

TAKESHI KAMADA

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE FÁFIA
(*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) POR RAPD, CARACTERES
MORFOLÓGICOS E TEOR DE BETA-ECDISONA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2006**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

K15a
2006

Kamada, Takeshi, 1969-

Avaliação da diversidade genética de populações de fáfia (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) por RAPD, caracteres morfológicos e teor de beta-ecdisona / Takeshi Kamada. – Viçosa : UFV, 2006.
106f. : il. ; 29cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Wagner Campos Otoni.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 92-97.

1. *Pfaffia glomerata*. 2. Diversidade biológica - Conservação. 3. *Pfaffia glomerata*. - Melhoramento genético. 4. *Pfaffia glomerata*. - Morfologia. 5. Polimorfismo do DNA ampliado ao acaso. 6. Plantas medicinais. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 633.88

TAKESHI KAMADA

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE FÁFIA
(*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) POR RAPD, CARACTERES
MORFOLÓGICOS E TEOR DE BETA-ECDISONA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 12 de dezembro de 2005.

Prof. Cosme Damião Cruz
(Conselheiro)

Dr. Roberto Fonte Vieira
(Co-orientador)

Prof. Luiz Orlando de Oliveira

Prof. Edgard Augusto de Toledo Picoli

Prof. Wagner Campos Otoni
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todos os momentos.

À minha família e aos nossos mestres, pelo constante apóio sem os quais jamais teria atingido mais uma etapa.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade de realização do Curso.

À Fundação do Ensino Superior de Rio Verde (FESURV), pelo incentivo e oportunidade de aperfeiçoamento do quadro docente, pelo o qual fui contemplado com os recursos financeiros e afastamento por período integral.

As agências financiadoras de pesquisa, pela manutenção e apóio da infraestrutura das instituições, os quais foram imprescindíveis na realização desse estudo.

Ao Professor Wagner Campos Otoni, pela amizade, pela orientação, pelo incentivo, e sobretudo, pelo eminente exemplo de conduta.

Ao Professor Acelino Couto Alfenas, pela prestimosa e fundamental colaboração nas análises moleculares.

Ao Dr. Roberto Fontes Vieira, pela co-orientação e constante motivação nos estudos de plantas medicinais.

Aos Professores Cosme Damião Cruz e Luiz Cláudio de Almeida Barbosa, pela amizade, aconselhamento e motivação dispensada nesse trabalho.

Ao Professor Aloísio Xavier pela amizade e prestimosa e fundamental concessão da área experimental do Viveiro Experimental da Silvicultura (DEF/UFV).

Aos membros da banca examinadora Professores Luiz Orlando de Oliveira, Edgard Augusto de Toledo Picoli, Cosme Damião Cruz e Dr. Roberto Fontes Vieira, pelos ensinamentos, críticas e valiosas sugestões.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela concessão dos materiais avaliados nesse estudo. Ao Laboratório de Patologia Florestal e Genética da Interação Planta–Patógeno (Bioagro/UFV), Laboratório de Síntese de Agroquímicos – LASA (DEQ/UFV), Laboratório de Cultura de Tecidos – LCTII (Bioagro/UFV) e ao Viveiro Experimental da Silvicultura (DEF/UFV), pela viabilização na condução das diferentes etapas do experimento.

A todos os meus colegas de Curso e dos laboratórios, funcionários e professores desta instituição os quais, certamente, foram contagiados em um ambiente de agradável convívio e, ou, progresso profissional e pessoal.

BIOGRAFIA

TAKESHI KAMADA, filho de Rikio Kamada e Fumiko Harada, nasceu em Brasília, DF, no dia 29 de julho de 1969.

Em janeiro de 1993, graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Em março de 1994, iniciou o Curso de Mestrado em Genética e Melhoramento na UFV, tendo defendido tese em outubro de 1997. No período de dezembro de 1996 a setembro de 1997, exerceu as atividades de Monitor II da disciplina Anatomia das Espermatófitas.

Em fevereiro de 1998 foi contratado pela Fundação do Ensino Superior de Rio Verde (FESURV) como Professor Substituto das disciplinas genética e bioquímica aplicada dos cursos de Agronomia e Zootecnia, tornando-se Professor efetivo concursado em agosto de 1998.

Em março de 2003, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da UFV, em nível de Doutorado, submetendo-se à defesa de tese em 12 de dezembro de 2005.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	Viii
ABSTRACT	X
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERAURA	4
2.1. Fáfia	4
2.1.1. Descrição botânica e ocorrência	4
2.1.2. Constituintes químicos e usos	5
2.1.3. Biossíntese e produção de -ecdisona	6
2.2. Divergência genética	7
2.3. Técnicas de Agrupamento	9
CAPÍTULO 1	11
AVALIAÇÃO DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATIVAS DE <i>Pfaffia glomerata</i> (SPRENG.) PEDERSEN ORIUNDAS DA REGIÃO DO RIO PARANÁ, MEDIANTE CARACTERES FENOTÍPICOS E ASSOCIAÇÃO COM A PRODUÇÃO DE -ECDISONA	11
1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1. Procedência das populações e cultivo dos indivíduos	13
2.2. Caracteres avaliados	14
2.2.1. Caracteres fenotípicos das variáveis contínuas.....	15
2.2.2. Caracteres fenotípicos das variáveis multcategóricas.....	18

	Página
2.3. Análises estatísticas	19
2.3.1. Medidas de dissimilaridade	19
2.3.2. Métodos de agrupamento.....	20
2.3.3. Importância dos caracteres.....	21
2.3.4. Correlação entre dados das matrizes de dissimilaridade	21
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
3.1. Potencial genético dos indivíduos e populações de fáfia no melhoramento vegetal.....	29
3.2. Divergência genética avaliada pelos caracteres contínuos	30
3.2.1. Dissimilaridade entre 64 indivíduos	30
3.2.2. Dissimilaridade das populações.....	33
3.2.3. Agrupamento dos indivíduos e populações pelos métodos de otimização de Tocher e UPGMA	34
3.2.4. Estudo dos caracteres.....	38
3.2.4.1. Metodologia de SINGH.....	38
3.2.4.2. Correlação de Pearson	39
3.3. Divergência genética avaliada pelos caracteres multicategóricos	40
3.3.1. Dissimilaridade entre 64 indivíduos	40
3.3.2. Dissimilaridade das populações.....	42
3.3.3. Agrupamento dos indivíduos e populações pelos métodos de otimização de Tocher e UPGMA	42
3.4. Divergência genética avaliada pelos caracteres fenotípicos binários	43
3.4.1. Dissimilaridade entre 64 indivíduos	43
3.4.2. Dissimilaridade das populações.....	46
3.4.3. Agrupamento dos indivíduos e populações pelos métodos de otimização de Tocher e UPGMA	46
3.5. Correlação entre as matrizes de dissimilaridade.....	48
4. CONCLUSÕES	49
CAPÍTULO 2	51
AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATIVAS DE FÁFIA (<i>Pfaffia glomerata</i>) COLETADAS NA REGIÃO DO RIO PARANÁ, MEDIANTE USO DE MARCADORES RAPD.....	51
1. INTRODUÇÃO.....	51
2. MATERIAL E MÉTODOS	53
2.1. Material vegetal	53
2.2. Extração do DNA genômico.....	56

	Página
2.3. Quantificação e diluição do DNA genômico.....	56
2.4. Seleção dos <i>primers</i>	57
2.5. Condições de amplificação.....	57
2.6. Identificação dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose.....	57
2.7. Análise dos dados.....	58
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
3.1. Dissimilaridade entre 64 indivíduos.....	61
3.2. Dissimilaridade das populações.....	63
3.3. Agrupamento dos indivíduos e populações pelos métodos de otimização de Tocher e UPGMA.....	66
4. CONCLUSÕES.....	71
CAPÍTULO 3.....	72
COMPARAÇÃO DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA AVALIADAS POR CARACTERES FENOTÍPICOS E MOLECULARES EM QUATRO POPULAÇÕES NATIVAS DE <i>Pfaffia glomerata</i> (SPRENG.) PEDERSEN ORIUNDAS DA REGIÃO DO RIO PARANÁ.....	72
1. INTRODUÇÃO.....	72
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	74
2.1. Material vegetal, procedência das populações e indivíduos.....	74
2.2. Caracteres avaliados.....	75
2.3. Análises estatísticas.....	76
2.3.1. Medidas de dissimilaridade.....	76
2.3.2. Métodos de agrupamento.....	76
2.3.4. Correlação entre as matrizes de dissimilaridade.....	76
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
3.1. Medidas de dissimilaridade entre os indivíduos.....	77
3.2. Dissimilaridade das populações.....	81
3.3. Agrupamento dos indivíduos e populações pelos métodos de otimização de Tocher e UPGMA.....	83
3.4. Correlação entre as matrizes de dissimilaridade.....	87
4. CONCLUSÕES.....	89
CONCLUSÕES GERAIS.....	90
REFERÊNCIAS.....	92
APÊNDICES.....	98

RESUMO

KAMADA, Takeshi., D.S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2005. **Avaliação da diversidade genética de populações de fáfia (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) por RAPD, caracteres morfológicos e teor de beta-ecdisona.** Orientador: Wagner Campos Otoni. Co-orientador: Roberto Fontes Vieira. Conselheiros: Cosme Damião Cruz e Luiz Cláudio de Almeida Barbosa.

A fáfia (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) é uma espécie nativa da América do Sul e de ocorrência comum nos Estados do Paraná, Mato Grosso do Sul e Goiás. Possui valor econômico principalmente devido à semelhança das suas características fitoquímicas ao ginseng-coreano (*Panax ginseng*). Instituições de pesquisa vêm realizando freqüentes coletas de germoplasma, uma vez que os riscos de perda da variabilidade são acentuados pelo extrativismo e comercialização de suas raízes aos laboratórios de fitoterápicos. No presente estudo, objetivou-se avaliar a diversidade genética de quatro populações coletadas na região do rio Paraná e preservadas na coleção de germoplasma de plantas medicinais da Embrapa/Cenargen, por meio da avaliação dos caracteres fenotípicos e marcador RAPD. Utilizaram-se 14 caracteres fenotípicos contínuos e oito multicategóricos. Os marcadores RAPD foram obtidos pela seleção de 67 *primers*, amplificando-se 267 marcas polimórficas. Os dados foram analisados, inicialmente, pelas medidas de dissimilaridade calculadas pelas distâncias de Mahalanobis (caracteres contínuos), índice de dissimilaridade dos dados binários (multicategóricos) e complemento aritmético do coeficiente de Nei e Li (RAPD). As matrizes de dissimilaridade foram utilizadas para agrupamento dos indivíduos e

populações pelo método de otimização de Tocher e UPGMA. A importância relativa dos caracteres para estudo da diversidade foi analisada pela metodologia de SINGH. As correlações entre os grupos de caracteres foram verificadas pela estatística Z (teste de Mantel) pelas matrizes de dissimilaridade das distâncias genéticas. As medidas de dissimilaridades das populações apresentaram semelhante resultado com relação aos caracteres moleculares e multicategóricos, coincidindo as populações de maior dissimilaridade. Os resultados indicaram menores níveis de dissimilaridade entre os indivíduos e maiores entre as populações, sugerindo que novas populações podem ser obtidas para incremento da diversidade na coleção do banco de germoplasma. Em todas as análises, a população coletada no município de Querência do Norte, PR, destacou-se pela maior dissimilaridade estabelecida entre as populações, além de seus indivíduos apresentarem altos teores de -ecdisona, tornando-se indispensável priorizar a preservação dessa população, que também está localizada em área de intenso extrativismo. As correlações entre as matrizes de distância genética apresentaram valores significativos no teste-Z ($p < 0,01$), entretanto esses valores foram baixos. A maior correlação foi encontrada entre a diversidade obtida dos caracteres multicategóricos e o marcador RAPD (0,2815). Os resultados permitiram concluir que não é recomendável utilizar apenas um tipo de característica, seja fenotípica ou molecular, para estimar a diversidade genética no aspecto qualitativo, uma vez que as correlações entre as distâncias genéticas de cada característica foram baixas ($< 0,30$). O uso exclusivo de marcador RAPD pode ser uma escolha favorável sob alguns aspectos, principalmente quando não se dispõe de tempo e recursos para visitas frequentes ao local de avaliação das populações. No entanto, quando a espécie já se encontra em estágios avançados de melhoramento será indispensável a avaliação dos caracteres fenotípicos.

ABSTRACT

KAMADA, Takeshi. D.S., Universidade Federal de Viçosa, December 2005. **Genetic diversity of *Pfaffia* populations (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) by RAPD, morphological characters and β -ecdisonone contents.** Adviser: Wagner Campos Otoni. Co-adviser: Roberto Fontes Vieira. Committee Members: Cosme Damião Cruz and Luiz Cláudio de Almeida Barbosa.

Pfaffia (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) is a native species of South America with widespread occurrence in the States of Paraná, Mato Grosso do Sul and Goiás. Its economic value is mainly due to the similarity of their phytochemical characteristics to the Korean-ginseng (*Panax ginseng*). Research institutions are carrying out continual germplasm collections, once the risks of losing variability are increased by the extracting and commercialization of roots to pharmaceutical companies. The objective of the present study was to evaluate the genetic diversity of four populations collected in the region of the Paraná river, and maintained in the germplasm collection of medicinal plants at Embrapa/Cenargen, through the evaluation of phenotypic characters and RAPD markers. Fourteen continuous and eight multicategorical phenotypic characters were used. RAPD markers were obtained by screening 67 primers, with the amplification 267 polymorphic patterns. Data were initially analyzed for the dissimilarity measures using the Mahalanobis' D^2 -statistics (continuous characters), dissimilarity index of binary data (multicategorical) and arithmetic complement of Nei and Li's coefficient (RAPD). Dissimilarity matrices were used for grouping individuals and populations by the Tocher optimization method and

UPGMA. The relative importance of the characters towards diversity was analyzed by the SINGH methodology. The correlations between the types of characters were tested by the Z statistics (Mantel test) for the dissimilarity matrix of genetic distances. The dissimilarity measurements of the populations presented similar results regarding molecular and multicategorical characters, with the populations of larger dissimilarity coinciding. The results indicated lower dissimilarity levels among individuals and higher among populations suggesting that new populations can be obtained to increase diversity in the germplasm collection. In all the analyses, the population collected in the municipality of Northern Querência, PR, stood out as the largest established dissimilarity among populations, besides their individuals present high β -ecdysone contents, becoming fundamental to prioritize the preservation of this population, which is also located in an area of intense extractivism. The correlations between the genetic distance matrices were significant by the Z test ($p < 0,01$), however those values were low. The largest correlation was found between the diversity obtained with the multicategorical characters and the RAPD marker (0,2815). The results led to the conclusion that it is not recommended to use just one type of characteristic, either phenotypic or molecular, to evaluate the genetic diversity in the qualitative aspect, once the correlations between the genetic distances of each characteristic were small ($< 0,30$). The exclusive use of RAPD markers can be a suitable choice in some aspects, mainly when there is no time and resources for periodic visits to the site for evaluation of the populations. However, when the species is already in advanced stages of improvement, the evaluation of the phenotypic characters will be essential.

1. INTRODUÇÃO

A flora medicinal brasileira vem se tornando alvo de exploração insustentável, principalmente pelo extrativismo motivado pela crescente demanda das indústrias (VIEIRA, 2002). Estudos das espécies medicinais nativas são incipientes, ou inexistentes, em diversas áreas de pesquisa, sobretudo os relacionados com os aspectos genético e ambiental, que influenciam a produção de fitofármacos. Assim, tornam-se necessários estudos relacionados à preservação, caracterização e seleção de genótipos, com o intuito de obter variedades apropriadas aos sistemas de cultivo para produção de fitofármacos em quantidade e qualidade requeridas pelas indústrias de produtos naturais.

As espécies de fáfia nativas no Brasil pertencem ao gênero *Pfaffia*, sendo comumente utilizadas *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Pfaffia iresinoides* (Kunth) Spreng. para fins medicinais (LORENZI e MATOS, 2002). Outra espécie, *Hebanthe paniculata* Martius (Sin.: *Pfaffia paniculata* (Mart.) Kuntze), também é denominada fáfia e possui expressiva importância medicinal e econômica (*ibidem*). As saponinas e os compostos esteroidais representam um grupo de constituintes químicos importantes em espécies de *Pfaffia* e atuam, principalmente, como coadjuvantes na absorção de outras substâncias ativas pelo organismo (VIGO et al., 2003). Em *P. glomerata* foram descritas a β -ecdisona, ácido glomérico, ácido pfamérico, oleanólico, rubrosterona, β -D-glucopiranosil oleanolato e seus glicosídeos (SHIOBARA et al., 1992; DE-PARIS et al., 2000). O teor de β -ecdisona, um dos constituintes químicos principais, apresentou níveis diferentes em alguns estudos associados à época de colheita, variação genética e fertilidade do solo, evidenciando-se valores entre 0,3 e 0,75% nas raízes de *P. glomerata* (MAGALHÃES, 1998; FIGUEIREDO, 2002; CORREIA JÚNIOR, 2003).

A fáfia possui importante valor econômico devido à semelhança das suas características fitoquímicas com as do ginseng-coreano (*Panax ginseng*) (DE-PARIS et al., 2000). Ming e Correia Júnior (2002) verificaram que aproximadamente 120 toneladas de raízes de *Pfaffia* spp. foram exportadas para o Japão em 1995 e, em 2002, estimou-se que 720 toneladas de raízes foram destinadas aos mercados interno e externo (CORREIA JÚNIOR, 2003), ressaltando que a maior parte do extrativismo ocorreu na bacia do rio Paraná e no município de Mogi das Cruzes, SP. Tal procedimento de extrativismo severo e descontrolado ocorreu também em outras regiões, colocando em risco a variabilidade genética encontrada nas populações naturais, assim como a continuidade do fornecimento da matéria-prima.

No melhoramento vegetal, uma etapa fundamental é a obtenção de variabilidade genética entre indivíduos de uma espécie ou entre grupos de cruzamentos interespecíficos. Em geral, o pesquisador forma as coleções de indivíduos a partir da variabilidade das características desejadas para obtenção das variedades agronômicas. Portanto, uma das etapas indispensáveis é o conhecimento da diversidade genética, principalmente em espécies que ainda não foram domesticadas. Diversos parâmetros podem ser empregados para caracterização dos indivíduos, dentre esses a divergência genética avaliada por meio de caracteres morfológicos, histoquímicos, fitoquímicos, bioquímicos e marcadores moleculares.

Os caracteres morfológicos foram os primeiros a serem descritos e até hoje são os mais utilizados com eficiência nos diversos tipos de germoplasma (ARAÚJO et al., 2002; MARTEL, 2002; NEGREIROS, 2004). Suas principais vantagens são justificadas pela simplicidade na detecção e quantificação dos fenótipos, o que muitas vezes representa baixo custo e relativa eficiência na obtenção dos resultados. No entanto, os marcadores fenotípicos sofrem efeitos não-controláveis do meio ambiente, apresentando resultados variáveis conforme a capacidade de resposta do genótipo às variações do ambiente.

Os marcadores moleculares também possuem especial aplicação e têm sido utilizados em diversos trabalhos de melhoramento de plantas, sobretudo para estimar, de forma rápida, os padrões de distribuição da variabilidade genética e para a tomada de decisão em conservação de recursos genéticos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Entre as classes de marcadores moleculares existentes, aqueles baseados em seqüências simples repetitivas (SSR) ou microssatélites são considerados os que mais se aproximam dos marcadores ideais para estudos de genética de populações (ZUCCHI, 2002). Entretanto, requerem estudo prévio do genoma para construção dos *primers* e apresentam elevado

custo e carência de informações nos genomas parentais de *Pfaffia* ssp. Os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), embora pouco informativos para caracterização dos locos gênicos e amplamente distribuídos ao longo do genoma (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998), tornam-se apropriados para caracterização inicial do genoma da fáfia.

Assim, o presente trabalho teve como principais objetivos: *i*) caracterizar a diversidade genética da fáfia oriunda de quatro populações naturais da região do rio Paraná, visando obter informações úteis na determinação de estratégias de conservação *in situ*, assim como de preservação *ex situ*, para futuros estudos de melhoramento vegetal; *ii*) avaliar a magnitude de diversidade genética entre os indivíduos e as populações, mediante métodos que utilizam diferentes caracteres fenotípicos e moleculares em análises estatísticas apropriadas; *iii*) associar os caracteres de importância agrônômica aos parâmetros relacionados à divergência genética de indivíduos e populações.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fáfia

2.1.1. Descrição botânica e ocorrência

As espécies de fáfia (*Pfaffia* spp.) são conhecidas popularmente como ginseng-brasileiro, corango, paratudo e suma, sendo usadas na medicina popular de forma semelhante ao ginseng-coreano (*Panax ginseng*), devido à sua atividade adaptógena contra estresses físico e mental e ao uso afrodisíaco atribuído à planta (LORENZI e MATOS, 2002; VIGO et al., 2003). Atualmente, a *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen é a mais explorada comercialmente, principalmente pelo extrativismo na região do rio Paraná (CORREIA JÚNIOR, 2003).

Vasconcelos (1986) descreve que a espécie *P. glomerata* atinge até 2 m de altura; caule ereto, nós engrossados, entrenós de até 23 cm de comprimento, ramificações predominantemente dicotômicas. Folhas com pecíolo muito curto; lâminas foliares variáveis desde linear-oblongas até largo-ovaladas, comprimento de 1 - 14 cm e largura de 0,3 - 4,5 cm, ápice acuminado a mucronado, base decurrente, nervuras mais proeminentes na face dorsal, pubescência tênue ou densa, principalmente na face dorsal, coloração verde-clara ou azulada na face abaxial. Possui inflorescência capituliforme com longo pedúnculo (3 - 20 cm), branco-amareladas e capítulos com menos de 8 mm de diâmetro. Bráctea ovalada, uninervada e mucronada com 1 - 1,5 mm de comprimento. Flores hermafroditas

com cerca de 3 - 4 mm, tépalas branco-amareladas, trinervadas, vilosas e pêlos que crescem após a antese. Tubo seminal de 0,5 - 1,0 mm; parte livre dos filamentos com margens fimbriadas, ápice diminutivamente trilobulado; e anteras de 0,3 - 0,8 mm de comprimento. Ovário ovalado-globoso, geralmente menor do que o tubo estaminal na antese; estigma capitado, bilobado e papiloso. Segundo o mesmo autor, observou-se flor hermafrodita em fase de botão, ainda fechada, com anteras já bem desenvolvidas; indicando que a flor seja hermafrodita e, possivelmente autógama.

O gênero *Pfaffia* é nativo da América Tropical, e sua presença é relatada em muitos países latino-americanos, como Guiana, Brasil, Paraguai, Argentina, Bolívia e Colômbia (SIQUEIRA, 1988; VASCONCELOS, 1986; SMITH e DOWNS, 1972). No Brasil foram descritas 27 espécies, que são encontradas nos Estados da Amazônia, Mato Grosso, Goiás, São Paulo e Paraná (TERAN, 1990). É comum encontrar *P. glomerata* na beira de rios e nas orlas das matas de galerias, onde podem receber bastante luz (MAGALHÃES, 1998).

As espécies *Pfaffia iresinoides* e *Pfaffia glomerata* foram citadas nas atividades de extrativismo em regiões alagadas das ilhas de Porto Rico, PR (CORREIA JÚNIOR, 2003). A extração indiscriminada dessas plantas tem causado sério problema ecológico nessa região, onde tem sido utilizada a prática de queimadas nas áreas escolhidas para favorecer a coleta, provocando danos irreparáveis na flora e fauna da região (MING e CORREIA JÚNIOR, 2002).

2.1.2. Constituintes químicos e usos

Os principais compostos isolados das espécies de fáfia (*Pfaffia* ssp.) foram as saponinas triterpênicas, fitoecdisteróides e demais esteróides e triterpenos (SHIOBARA et al. 1993; DE-PARIS et al., 2000; VIGO et al., 2003). Entre os constituintes presentes na *P. glomerata*, destaca-se o composto 20-hidroxiecdisona ou β -ecdisona (20E) (Figura 1), que é um análogo dos hormônios de insetos envolvidos na ecdise (DINAN, 2001). A 20E é encontrada em concentrações variáveis em diversas espécies vegetais, dentre elas milho, espinafre, samambaia e *Ajuga*, sendo essa última utilizada comercialmente nas formulações de cosméticos e de complementos dietéticos obtidos por processos fitoquímicos de extração em *Rhaponticum carthamoides*, *Achyranthes bidentata*, *Pfaffia glomerata* e *Hebanthe paniculata* (CORREIA JÚNIOR, 2003). Os laboratórios manipulam em seus produtos uma mistura de ecdisteróides, β -ecdisona e seu derivado acetilado, visando fortalecer a barreira hídrica da pele e atribuir uma função hidratante aos cosméticos. O derivado acetilado da β -

ecdisona, devido à sua lipossolubilidade, é largamente empregado em preparações na forma de emulsões (*ibidem*).

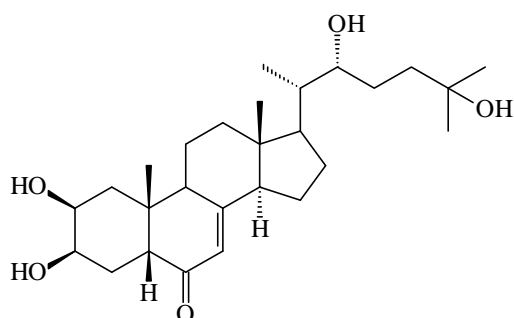


Figura 1 - Estrutura química do fitoecdisteróide 20 hidroxiecdisona (β -ecdisona – $C_{27}H_{44}O_7$).

De modo geral, a mistura de compostos produzidos na fáfia possui importante atividade biológica no organismo pelos seus efeitos favoráveis à adaptação das condições de estresse físico e mental (SHIOBARA et al., 1992; BRUNETON, 1993; VIGO et al., 2003). Atualmente, há grande interesse na obtenção de fármacos adaptógenos, os quais promovem aumento inespecífico da resistência do organismo animal, sendo no caso de *Pfaffia*, essa atividade já evidenciada (VIGO et al., 2003). Em estudos realizados por Marques et al. (1998), foram verificados alguns efeitos na memória de ratos idosos após tratamentos crônicos e com baixa toxicidade dessa espécie em roedores. Michiro et al. (1998) relataram que o extrato de *P. glomerata*, de plantas obtidas da flora brasileira, administrado na dose de 1.000 mg/kg, induziu maior taxa de natalidade, bem como espermatogênese vigorosa, histologicamente analisada, em “hamsters”. Além disso, a síntese de DNA em espermatogônia de ratos, tratados com o extrato a 1.000 mg/kg, aumentou significativamente.

2.1.3. Biossíntese e produção de β -ecdisona

A β -ecdisona e outros fitosteróides possivelmente utilizam a via metabólica do ácido mevalônico, onde o acetil-CoA participa como precursor inicial (DINAN, 2001). No entanto, em estudos realizados *in vitro* na cultura de raízes de *Ajuga reptans*, Nagakari et al. (1994) observaram que adição do colesterol marcado (carbono ^{13}C) no meio de cultura pode atuar como precursor direto da β -ecdisona, porém não sendo possível afirmar que também atua na formação dos demais fitosteróides. Os dados disponíveis ainda não são suficientes

para esclarecer qual o limite onde se inicia a biossíntese e se existem outras vias de biossíntese dos ecdisteróides (DINAN, 2001).

As citações na literatura sugerem que a biossíntese dos fitosteróides pode ocorrer nos tecidos em desenvolvimento e que, posteriormente, haja sua translocação para outros órgãos. Os acúmulos de fitosteróides do tipo fitoecdisteróides, incluindo β -ecdisona, foram observados nas partes jovens da planta, folhas apicais, tecidos em desenvolvimento, flores, sementes e, sobretudo, em órgãos de armazenamento como raiz, caule e rizoma (CAMPS et al., 1990; GREBENOK e ADLER, 1993; TOMÁS et al., 1993; REIXACH et al., 1996; MOREAU et al., 2002); entretanto, o seu local de síntese ainda é pouco conhecido e, possivelmente, difere de acordo com tipo de estrutura e a espécie. Tomás et al. (1993) quantificaram o teor de fitoecdisteróides de estruturas C27, C28 e C29 produzidos na parte aérea e raiz de *Ajuga reptans* cultivados *in vitro* a partir de diferentes explantes (segmento nodal e fragmento de raiz). Ainda, observaram que o maior acúmulo de fitosteróides nos três tipos ocorreu em raízes obtidas de plantas inteiras propagadas a partir dos segmentos de raízes. Nas plantas que originaram apenas parte aérea ou raízes, também foram encontrados fitosteróides em menor quantidade, sendo a β -ecdisona ausente nesses dois tecidos. Os autores concluíram que a síntese desses fitosteróides ocorre na raiz.

Cultivos experimentais de fáfia têm sido avaliados no intuito de obter aumento no teor de β -ecdisona e produção de matéria seca de raízes. Magalhães (1997) observou 0,65 a 0,75% de β -ecdisona em raízes de *P. glomerata* cultivadas em solo argiloso. Em outro estudo, avaliando a idade da planta, Montanari et al. (1999) obtiveram teores de 0,71 e 0,67% de β -ecdisona em plantas colhidas aos 12 e 24 meses, respectivamente. Figueiredo (2002) observou teores de β -ecdisona entre 0,15 e 0,47% em 23 acessos de fáfia após 13 meses de cultivo, no município de Campos dos Goytacazes, RJ. Correia Júnior (2003) estudou o efeito da época da colheita em quatro acessos de fáfia e obteve teores de β -ecdisona entre 0,12 e 0,50 %, sendo a média geral da produção de raízes estimada em 1.211 kg/ha.

2.2. Divergência genética

A divergência genética pode ser definida, de forma simplificada, como a distância entre populações, indivíduos ou organismos, com base numa série de características de aspectos morfológico, fisiológico, bioquímico e molecular (AMARAL JÚNIOR, 1994). Estudos de divergência genética são importantes no conhecimento da variabilidade e geram

informações úteis na preservação, manejo e uso dos genótipos ou populações *in situ* e *ex situ* (PERECIN, 2000).

Avaliações sobre a divergência genética são utilizadas em programas de melhoramento que visam identificar genitores ou combinações promissoras e que possibilitam maior efeito heterótico na progênie, redução de tempo na obtenção de genótipos superiores durante as gerações segregantes (OLIVEIRA et al., 1999; ARAÚJO et al., 2002). Ainda, são importantes na identificação de populações e locais de coleta de germoplasma com elevada diversidade e, em estudos de evolução, permitem melhor compreensão das relações filogenéticas entre as espécies (PERECIN, 2000).

Nas análises de divergência genética empregam-se técnicas estatísticas que permitem obter inferências mais precisas sobre grande número de genótipos e características (MARTINELLO et al., 2001). Nessas situações, as avaliações combinam múltiplas informações sobre os genótipos e os respectivos caracteres, tornando-se úteis na caracterização de coleções de germoplasma de espécies cultivadas ou de populações nativas, mesmo não tendo definido os descritores da espécie.

Diversos coeficientes ou índices de dissimilaridades têm sido propostos para expressar a distância entre amostras e populações (CRUZ e CARNEIRO, 2003). Alguns desses coeficientes se baseiam nas frequências alélicas estimadas, enquanto outros operam com índices que representam a ausência (0) ou presença (1) do alelo. As distâncias genéticas são, então, determinadas pelos complementos aritméticos dos coeficientes de similaridades e são apresentadas na forma de matriz de dissimilaridade.

A distância de Mahalanobis (D^2) tem sido muito utilizada nas análises envolvendo variáveis contínuas (OLIVEIRA et al., 1999; MARTINELLO et al., 2001). A vantagem desse método está relacionada ao uso das variâncias e co-variâncias residuais dependentes dos dados experimentais, que permitem a obtenção da matriz de dispersão residual (CRUZ e CARNEIRO, 2003). Além de possibilitar o estudo da diversidade genética, é possível, por meio das distâncias generalizadas, quantificar a contribuição relativa dos caracteres pela metodologia proposta por Singh. As distâncias Euclidianas também são utilizadas nas análises das variáveis contínuas, porém dispensam dados residuais (*ibidem*).

Segundo Cruz e Carneiro (2003), no cálculo das distâncias das variáveis multicategóricas geralmente se utilizam os índices de dissimilaridade, mediante a sua conversão em dados binários. Os caracteres cujos fenótipos são quantificados pela atribuição de valores às suas classes fenotípicas, ou comumente denominados caracteres qualitativos, recebem notas ou valores (0, 1, 2, 3, ...), conforme os critérios determinados

pelo pesquisador. As categorias ou classes fenotípicas de um caráter são, então, convertidas em informações do tipo ausência (0) ou presença (1) em relação a todas as categorias e genótipos.

Diversos coeficientes são propostos na determinação das distâncias a partir das informações dos dados binários. Entre eles, os mais utilizados são o coeficiente de coincidência simples, Nei e Li e Jaccard (CRUZ e CARNEIRO, 2003). O coeficiente de coincidência, embora seja idêntico ao quadrado da distância euclidiana média, apresenta a desvantagem de considerar o fator de similaridade de coincidência do tipo (0-0), categoria ausente nos dois genótipos. Nos índices de Jaccard e de Nei e Li são excluídos esse tipo de coincidência e considerados apenas a coincidência do tipo (1-1), presença da categoria em ambos os genótipos. O coeficiente de Nei e Li difere de Jaccard por considerar que a coincidência do tipo (1-1) seja menos esperada.

Segundo Cruz e Carneiro (2003), em estudos em que a frequência de coincidências do tipo 1-1 esperada é baixa, recomenda-se o uso do coeficiente de Nei e Li, sendo geralmente utilizada nos trabalhos de diversidade de populações naturais da mesma espécie. O índice de Jaccard será recomendado em populações onde a coincidência de ocorrência do tipo 1-1 pode ser admitida como fenômeno esperado, a exemplo de avaliações de genótipos de determinada variedade agrônômica.

2.3. Técnicas de agrupamento

Em estudos envolvendo grandes quantidades de genótipos, torna-se impraticável o reconhecimento e limitação visual dos indivíduos que estabelecem algum tipo de relação de similaridade (CRUZ e CARNEIRO, 2003). Portanto, utilizam-se os métodos de agrupamento, os quais devem ser criteriosamente analisados, pois propiciam diferentes resultados. Basicamente, os métodos de agrupamento estabelecem homogeneidade dentro dos grupos e heterogeneidade entre grupos.

Segundo Cruz e Carneiro (2003), os principais métodos de agrupamento são classificados em dois tipos: *i*) métodos de otimização, em que os indivíduos são incluídos no mesmo grupo, com o objetivo de estabelecer máxima ou mínima partição que otimize alguma medida predefinida; e *ii*) método hierárquico onde os genótipos são agrupados por um processo que se repete em vários níveis, caracterizando-se pelo estabelecimento do dendrograma ou diagrama de árvore.

O método de otimização de Tocher é um dos mais utilizados no melhoramento vegetal. Inicialmente, esse método identifica o par de indivíduos mais similares e forma o grupo inicial. A possibilidade de inclusão de novos indivíduos no grupo respeita um limite de distância média intragrupo menor que a distância média intergrupos (*ibidem*). Os grupos formados serão claramente definidos, não permitindo a subjetividade para visualização de possíveis subgrupos.

O método hierárquico das médias da dissimilaridade ponderada (UPGMA) é o mais utilizado entre os métodos hierárquicos, principalmente em estudos de sistemática e ecologia. O dendrograma é estabelecido com base nas médias de dissimilaridade dos pares de indivíduos, sendo apresentadas graficamente as ramificações que indicam o nível de similaridade entre eles. A delimitação dos grupos pode ser estabelecida por critérios visuais, em que se avaliam pontos de alta mudança de nível, tornando-se, em geral, critérios determinantes do número de genótipos no grupo (CRUZ e CARNEIRO, 2003). Outros autores preferem adotar diferentes níveis de dissimilaridade no dendrograma para estabelecer os grupos e subgrupos.

CAPÍTULO 1

AVALIAÇÃO DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS de *Pfaffia glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN ORIUNDAS DA REGIÃO DO RIO PARANÁ, MEDIANTE CARACTERES FENOTÍPICOS E ASSOCIAÇÃO COM A PRODUÇÃO DE -ECDISONA

1. INTRODUÇÃO

Estudos das espécies medicinais nativas são incipientes ou inexistentes em diversas áreas de pesquisa, principalmente em relação aos aspectos genético e ambiental que influenciam a produção de fitofármacos. A fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] é espécie de ocorrência comum em vegetações naturais nos Estados do Paraná, Mato Grosso do Sul e Goiás, tendo nos últimos anos grande projeção no mercado internacional devido às suas propriedades medicinais utilizadas semelhantemente ao ginseng-coreano (*Panax ginseng*) (DE-PARIS et al., 2000). Aproximadamente 120 toneladas de raízes de *Pfaffia* spp. foram exportadas para o Japão em 1995 e, em 2002, estimou-se que 720 toneladas de raízes foram destinadas aos mercados interno e externo, sendo que a maior parte do extrativismo ocorreu na bacia do rio Paraná e no município de Mogi das Cruzes, SP (MING e CORREA JÚNIOR, 2002; CORREIA JÚNIOR, 2003). Esse procedimento de extrativismo severo e descontrolado ocorre também em outras regiões, colocando em risco

a variabilidade genética encontrada nas populações naturais de fáfia, assim como a continuidade do fornecimento da matéria-prima.

No melhoramento vegetal, uma etapa fundamental é a obtenção de variabilidade genética entre indivíduos de uma espécie ou entre grupos de cruzamentos interespecíficos. Em geral, o pesquisador estabelece as coleções de acessos a partir da variabilidade coletada nos locais de ocorrência comum da espécie. Portanto, uma das etapas indispensáveis no melhoramento é o estudo da diversidade genética, principalmente em espécies que ainda não foram domesticadas. Diversos parâmetros podem ser empregados para caracterização dos genótipos, dentre esses os caracteres morfológicos, histoquímicos, fitoquímicos, bioquímicos e marcadores moleculares.

A exploração adequada das plantas medicinais em nível comercial, referente à otimização na produção e qualidade de princípios ativos, demanda prévio conhecimento e caracterização do germoplasma. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a diversidade genética de quatro populações oriundas da bacia Rio Paraná, Brasil, por meio de estudos dos caracteres fenotípicos, visando obter informações relacionadas à diversidade genética para ações de conservação *in situ*, assim como dados na caracterização da coleção de germoplasma para futuros estudos agronômicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A divergência genética foi avaliada em 64 indivíduos de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] coletadas em quatro populações na bacia do rio Paraná, Brasil, e oriundas da coleção de germoplasma de plantas medicinais do Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa/Cenargen). Utilizaram-se 14 caracteres fenotípicos de distribuição contínua e oito caracteres multicategóricos. As análises de diversidade foram distintas em cada grupo de caracteres, sendo avaliadas as magnitudes da diversidade por meio desses caracteres em 64 indivíduos, em suas populações e entre as populações.

2.1. Procedência das populações e cultivo dos indivíduos

As populações foram coletadas nos Estados do Paraná e Mato Grosso do Sul, percorrendo parte da região da bacia do rio Paraná. Os locais de coleta com as respectivas características e número de indivíduos encontram-se descritas no Quadro 1. A identificação dos indivíduos e populações atribuídas nesse estudo foi denominada pelas referências que se encontram no Quadro 2.

Os indivíduos (genótipos) foram multiplicados vegetativamente *in vitro*, adaptando-se aos protocolos descritos por Nicoloso et al. (2001) e Kajiki (1996). Para tal, culturas *in vitro* foram estabelecidas utilizando-se explantes nodais provenientes de plantas mantidas em casa de vegetação, os quais, após procedimento de desinfestação, foram cultivados em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) acrescidos de 30 g/L de sacarose, vitaminas (2,0 mg/L glicina, 0,5 mg/L ácido nicotínico, 0,5 mg/L piridoxina.HCl e 0,1 mg/L

tiamina.HCl), 100 mg/L de mio-inositol e 6,5 g/L ágar (Merck, Alemanha). Posteriormente, o meio foi ajustado ao pH $5,7 \pm 0,1$, sendo autoclavado a 120°C , 1,1 Pa por 20 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As plantas, aos 34 dias, foram submetidas à etapa de aclimação, transferindo-se, inicialmente, para recipientes fechados contendo água pura (3 - 5 dias). Posteriormente, foram transferidas para recipientes (copo plástico - 300 mL) contendo 100% substrato (Plantmax[®]). A etapa de aclimação foi conduzida em estufa equipada por nebulizadores (15 - 20 dias) e estufa aberta com cobertura de tela de náilon (7 dias).

Após obtenção das mudas aclimatadas, esses foram transplantadas em vasos plásticos com capacidade para 18 L, contendo mistura de solo e esterco de curral (3:1) e sem adubação química, durante o período de Junho/2004 a fevereiro/2005 em Viçosa, MG. Utilizou-se o delineamento estatístico inteiramente casualizado com três repetições, totalizando 192 parcelas.

Quadro 1 – Descrição das populações de fáfia (*Pfaffia glomerata*) avaliadas no estudo da diversidade genética

População	Qde. de indivíduos	Local de coleta	Coordenadas geográficas	Vegetação predominante
1	19	Rio Ivaí (Querência do Norte, PR)	Lat $23^0 13' 09,2''$ Long $53^0 34' 07,6''$ Alt. 233 m	Pastagem e vegetação nativa em regeneração
2	18	Ilha do Mineiro (Querência do Norte, PR)	Lat $23^0 07' 27''$ Long $53^0 38' 49,9''$ Alt. 239m	Vegetação nativa
3	16	Entre Porto Primavera e São José, beira de estrada (Baitaporã, MS)	Lat $22^0 33' 24,1''$ Long $53^0 06' 13,9''$ Alt. 239 m	Vegetação nativa fragmentada
4	11	Ilha do Marçal, Prainha - Parque Nacional de Ilha Grande (Vila Alta, PR)	Lat $23^0 23' 09,7''$ Long $53^0 50' 02,1''$ Alt. 232 m	Vegetação nativa preservada em área de conservação

2.2. Caracteres avaliados

Na ausência de descritores para caracterização da *Pfaffia glomerata*, foram observadas várias características desde o início do crescimento até a colheita, sendo avaliadas em intervalos de dois dias com relação a alguns caracteres. Do total de 30 caracteres observados, foram selecionados 22 relacionados à morfologia, e a aspectos agrônômicos, fisiológicos e fitoquímicos, que demonstraram consistente distinção entre os indivíduos, mesmo que tenha sido diferenciado em apenas um estágio de desenvolvimento

da planta. Os caracteres fenotípicos foram divididos em dois grupos, conforme a descrição e quantificação de seus fenótipos.

Quadro 2 – Indivíduos avaliados no estudo da diversidade genética da fáfia (*Pfaffia glomerata*)

indivíduo (referência)	Identifica- ção do BG*	População	Localização	Indivíduo (referência)	Identifica- ção do BG*	População	Localização
1	2202-01	1	Rio Ivaí	33	2209-09	3	Baitaporã
2	2202-02	1	Rio Ivaí	34	2209-10	3	Baitaporã
3	2202-04	1	Rio Ivaí	35	2209-11	3	Baitaporã
4	2202-05	1	Rio Ivaí	36	2209-12	3	Baitaporã
5	2202-07	1	Rio Ivaí	37	2209-13	3	Baitaporã
6	2202-09	1	Rio Ivaí	38	2209-14	3	Baitaporã
7	2202-10	1	Rio Ivaí	39	2209-15	3	Baitaporã
8	2202-11	1	Rio Ivaí	40	2209-16	3	Baitaporã
9	2202-12	1	Rio Ivaí	41	2202-06	1	Rio Ivaí
10	2202-13	1	Rio Ivaí	42	2202-08	1	Rio Ivaí
11	2202-14	1	Rio Ivaí	43	2205-01	2	Ilha do Mineiro
12	2202-15	1	Rio Ivaí	44	2205-06	2	Ilha do Mineiro
13	2202-16	1	Rio Ivaí	45	2205-07	2	Ilha do Mineiro
14	2202-17	1	Rio Ivaí	46	2205-08	2	Ilha do Mineiro
15	2202-18	1	Rio Ivaí	47	2205-10	2	Ilha do Mineiro
16	2202-21	1	Rio Ivaí	48	2205-11	2	Ilha do Mineiro
17	2202-22	1	Rio Ivaí	49	2209-04	3	Baitaporã
18	2205-02	2	Ilha do Mineiro	50	2209-08	3	Baitaporã
19	2205-03	2	Ilha do Mineiro	51	2209-20	3	Baitaporã
20	2205-11	2	Ilha do Mineiro	52	2209-23	3	Baitaporã
21	2205-12	2	Ilha do Mineiro	53	2209-26	3	Baitaporã
22	2205-17	2	Ilha do Mineiro	54	2216-06	4	Vila Alta
23	2205-18	2	Ilha do Mineiro	55	2216-07	4	Vila Alta
24	2205-19	2	Ilha do Mineiro	56	2216-08	4	Vila Alta
25	2205-20	2	Ilha do Mineiro	57	2216-10	4	Vila Alta
26	2205-21	2	Ilha do Mineiro	58	2216-12	4	Vila Alta
27	2205-22	2	Ilha do Mineiro	59	2216-14	4	Vila Alta
28	2205-23	2	Ilha do Mineiro	60	2216-15	4	Vila Alta
29	2205-24	2	Ilha do Mineiro	61	2216-17	4	Vila Alta
30	2209-01	3	Baitaporã	62	2216-18	4	Vila Alta
31	2209-02	3	Baitaporã	63	2216-19	4	Vila Alta
32	2209-06	3	Baitaporã	64	2216-20	4	Vila Alta

BG*: Banco de Germoplasma/coleção de plantas medicinais do Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia.

2.2.1. Caracteres fenotípicos das variáveis contínuas

1. Matéria fresca do caule (MFC): determinação do peso de massa fresca do caule e inflorescência, em gramas, obtida no momento da colheita entre 259 e 271 dias.

2. Matéria seca do caule (MSC): peso da massa seca do caule e inflorescência, em gramas, determinado após a secagem em estufa de ventilação forçada por 96 h a 70 °C.
3. Matéria fresca da raiz (MFR): determinação da massa fresca da raiz, em gramas, no momento da colheita entre 259 e 271 dias. Ilustração do aspecto da raiz encontra-se na Figura 1.
4. Matéria seca da raiz (MFR): peso da massa seca da raiz, em gramas, determinado após a secagem em estufa de ventilação forçada por 72 h a 70 °C.
5. Altura da planta (ALT): medida tomada em centímetro desde o coleto até o último nó do caule principal, excluindo-se o comprimento da inflorescência. A medida foi anotada semanalmente, sendo utilizada a altura máxima atingida pela planta. Ilustração do porte da planta encontra-se na Figura 2.
6. Abertura da flor (AF): média de dias em que iniciou a abertura das flores dos dois principais caules da planta.
7. Senescência de 90% das folhas (S90): corresponde ao número de dias necessários para atingir a queda espontânea de 90% das folhas desde a data de transplântio. A data para atingir a senescência foi obtida a partir da contagem das folhas de três ramos principais de cada planta, em intervalo de três dias, quando alcançava o índice de queda de folhas (I) correspondente a 0,9. Utilizou-se a seguinte fórmula: $I = (\text{n. de folhas senescentes}) / [(\text{n. gemas}) \times (2)]$.
8. Intervalo entre início da abertura da flor e senescência de 90% das folhas (IAS): diferença de dias entre abertura da flor e queda de 90% das folhas.
9. Diâmetro do caule (DC): medida obtida pela média do diâmetro de três caules de cada planta, tomada a 10 cm acima da região do coleto.
10. Número de caules (NC): contagem de caules verticais lançados na região basal da planta até altura de 10 cm acima do coleto.

11. Distância de entrenós (DE): medida avaliada entre o 4° e o 5° entrenó. Valores anotados em cm, no período de 111 a 116 dias.
12. Índice de colheita (IC): valor obtido entre a relação da produção de raízes e o peso da parte aérea no momento da colheita determinado pela seguinte expressão: $IC = MSR/(MSR + MSC)$, em que MSR: matéria seca da raiz e MSC: matéria seca do caule.
13. Relação comprimento/largura do limbo (RL): medidas tomadas a partir da base do limbo até o ápice (comprimento), dividida pela largura máxima perpendicular ao comprimento.
14. Determinação do teor de β -ecdisona (20-E)

O fitosteróide 20-hidróxi-ecdisona ou β -ecdisona (Apêndices 1a e 1b) foi quantificado pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), analisando-se amostras de raízes obtidas do extrato metanólico. Utilizou-se o método descrito por Figueiredo (2002), com algumas modificações. As raízes frescas foram cortadas na seção de maior diâmetro em fragmentos de aproximadamente 0,4 - 0,7 mm e submetidas à secagem em estufa de ventilação forçada (45 a 50 °C) durante oito dias e, em seguida, moídas em moinho do tipo Willey. As amostras foram preparadas a partir de 200 mg de raízes e 20 mL de metanol, as quais ficaram armazenadas na temperatura ambiente (25 ± 2 °C), durante oito dias sob agitação diária do extrato. Após esse período, os extratos foram centrifugados (8 minutos/10.000 rpm) e o sobrenadante coletado para filtragem em filtro de 0,45 μ m (Millex LCR com membrana PTFE modificada). Obtido o extrato metanólico filtrado, este foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando as seguintes condições: equipamento da Shimadzu modelo LC 10AD equipado com detector SPD 10AV, CBM 10A; coluna Bomdesil C 18 (5,0 μ m x 4,6 mm x 250 mm); fase móvel metanol (100%) com fluxo de 1 mL/min; volume de amostra injetada de 20 μ L; leitura em $\lambda = 245$ nm; e tempo médio de corrida da amostra de 12 minutos.

A curva de calibração foi obtida com padrão de 99% de pureza de β -ecdisona (Sigma Chem. Co., EUA), em concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 e 120 mg/L metanol, os quais foram injetados (20 μ L) em triplicatas. Os valores obtidos nos cromatogramas, correspondentes às concentrações das amostras-padrão, foram plotados no gráfico e obtido a equação para cálculo do teor de β -ecdisona dos indivíduos:

$$\text{Teor de } \beta\text{-ecdisona} = 2,6382 + 2.10^{-5} \times \text{área do pico} \quad (r^2 = 0,9963).$$

2.2.2. Caracteres fenotípicos das variáveis multicategóricas

1. Cor do pecíolo (CP): atribuíram-se valores ao padrão da coloração na região do pecíolo, de acordo com a deposição de pigmento vermelhos nas faces abaxial e adaxial do pecíolo e no mesófilo margeante, observada nas folhas basais do 3º e 4º nós e, antes do período de florescimento: 1 = deposição de pigmento em qualquer face do pecíolo e no mesófilo; 2 = deposição apenas no mesófilo; e 3 = nenhuma deposição na região do pecíolo. A característica foi avaliada semanalmente, sendo obtidos dados consistentes aos 94 e 109 dias após o transplântio.
2. Pilosidade do caule (PIL): os valores foram atribuídos conforme a frequência, persistência e local de ocorrência dos pelos: 1 = abundante em locais próximos ao ápice e ao longo do caule, pelos persistentes, porém sem diferenciação do comprimento; 2 = pouco freqüente, presença de pêlos em regiões jovens e pouca freqüência de pêlos persistentes ao longo do caule; e 3 = rara freqüência, baixa quantidade próxima ao ápice e ausência de pêlos persistentes ao longo do caule.
3. Cor do caule (CC): padrão de coloração avaliada desde a base até a região próxima ao ápice e no início do florescimento (formação do botão floral): 1 = distribuição abundante de pigmento vermelho, a qual atinge acima de 75% da altura do caule; 2 = distribuição freqüente de pigmento vermelho, entre 25 e 75% da altura do caule; e 3 = predomínio da cor verde e pouca quantidade de pigmento atingindo no máximo 25% da altura do caule (Figuras 3a – 3c).
4. Crescimento inicial do caule (CIC): descrição predominante da disposição do caule entre 60 e 87 dias após o transplântio. Foram atribuídos os seguintes valores: 1 = caules eretos, próximos entre si, sem ramificação e pequena área projeção lateral da copa; 2 = caules ramificados e distanciados, com lançamento perceptível de ramos laterais e média projeção da área da copa; e 3 = prostrado, caules com predomínio de crescimento paralelo à superfície horizontal (Figuras 4a – 4c).
5. Abertura da copa (AC): disposição e projeção dos caules após queda de 90% das folhas. Foram atribuídos os seguintes valores: 1 = caules eretos e muito próximos, ausência de ramos laterais até altura de 2/3 da planta; 2 = caules eretos, porém com pequeno afastamento entre si e ramificações do caule a partir de 1/3 altura da planta; 3 = caules

abertos, com ângulo de afastamento de até 45^0 na altura de 1/3 planta e ramificações abaixo de 1/3 da altura; e 4 = caules abertos, com pequena expansão horizontal próximo ao coleto (Figuras 5a – 5d).

6. Cor da raiz (CR): coloração atribuída com base em observações visuais da raiz seca e moída. Foram atribuídos os seguintes valores: 1 = branca; 2 = amarelo-creme; 3 = amarelo; e 4 = amarelo-canarinho (Figura 6).

7. Descrição do ápice e base do limbo foliar (ABL): atribuíram-se valores conforme o tipo de combinação entre a forma do ápice e da base do limbo foliar.

Valor	Forma do Ápice	Forma da Base
1	Agudo a acuminado	Oblíqua a acunheada
2	Agudo a acuminado	Truncada a reniforme
3	Mucronado	Oblíqua a acunheada
4	Mucronado	Truncada a reniforme

8. Formato do limbo (FL): descrição do formato predominante do limbo das folhas localizadas entre 1/3 e 2/3 da altura da planta e antes da abertura da flor. Foram atribuídos os seguintes valores: 1 = elíptico; 2 = lanceolado; e 3 = oval.

2.3. Análises estatísticas

Inicialmente foram obtidas as distâncias genéticas entre todos os pares de indivíduos, utilizando-se os valores quantitativos dos caracteres contínuos e valores das classes ou categorias fenotípicas dos caracteres multicategóricos. Posteriormente, realizaram-se o agrupamento dos indivíduos, o estudo da importância dos caracteres, correlação simples dos caracteres e a correlação da dissimilaridade entre os grupos de caracteres. As análises foram todas processadas no programa “Genes” – versão Windows 2005.6.1 (CRUZ, 2001). Os métodos estatísticos foram utilizados na seqüência, como mostrado nos tópicos subsequentes.

2.3.1. Medidas de dissimilaridade

Para avaliar as informações múltiplas do conjunto de caracteres de cada indivíduo foram determinadas as medidas de dissimilaridade, as quais indicam os pares de indivíduos com maior ou menor magnitude de divergência genética. Esses dados também foram utilizados na elaboração das matrizes de dissimilaridade das análises de agrupamento no

estudo dos caracteres. A diversidade entre os indivíduos com base nos caracteres contínuos foi determinada pela distância de Mahalanobis. A diversidade com base nas informações multicategóricas foi determinada pelo índice de dissimilaridade, obtido pelas variáveis binárias, em que os valores foram convertidos em dados binários dos tipos 0 e 1, atribuídos, respectivamente pela ausência ou presença da categoria no indivíduo.

A Distância de Mahalanobis é dada pela expressão:

$$D_{ii'}^2 = \mathbf{e}' \mathbf{D}^{-1} \mathbf{e}$$

em que:

- $D_{ii'}^2$ = distância de Mahalanobis entre os genótipos i e i' ;
- \mathbf{D} = matriz de variâncias e co-variâncias residuais;
- $\mathbf{e}' = [d_1 \ d_2 \ \dots \ d_v]$, sendo: $d_j = Y_{ij} - Y_{i'j}$; e
- Y_{ij} = média do i -ésimo genótipo em relação à j -ésima variável.

O índice de dissimilaridade, obtido a partir dos dados binários é dado pela expressão:

$$d_{ii'} = \sum_{j=1}^v \left(\frac{b + c}{a + b + c} \right)_j$$

sendo:

- $d_{ii'}$ = índice de dissimilaridade;
- a = categoria observada nos dois indivíduos;
- b = categoria observada no primeiro indivíduo e ausente no segundo;
- c = categoria ausente no primeiro indivíduo e observado no segundo; e
- v = número de variáveis multicategóricas.

2.3.2. Métodos de agrupamento

Os indivíduos e as populações foram agrupados seguindo os critérios de dissimilaridade pelos métodos de otimização de Tocher e método hierárquico das médias aritméticas das medidas de dissimilaridades (UPGMA). O método de Tocher segue o critério de inclusão dos indivíduos no mesmo grupo, quando a distância média dos indivíduos (intragrupo) não excede a distância média intergrupo (CRUZ e CARNEIRO, 2003). O valor máximo da distância dentro do grupo () pode ser estabelecido arbitrariamente (*ibidem*). A inclusão de um indivíduo é aceito quando:

$$\frac{d_{(ij)k}}{n} <$$

considerando que:

$$d_{(ij)k} = d_{ik} + d_{jk}$$

em que:

$d_{(ij)k}$ = distância entre o grupo ij e o indivíduo k;

d_{ik} = distância entre os indivíduos i e k;

d_{jk} = distância entre os indivíduos j e k; e

n = número de indivíduo que constitui o grupo original.

No método UPGMA, a distribuição dos indivíduos no dendrograma não segue um critério de formação dos grupos, uma vez que o principal aspecto desse método consiste nas ramificações que são obtidas. Os indivíduos são agrupados aos pares, utilizando-se médias aritméticas da dissimilaridade. O dendrograma prioriza os genótipos com maior similaridade, e as distâncias entre um indivíduo e um grupo formado pelos indivíduos i e j são calculadas por:

$$d_{(ij)k} = \text{média} \{ d_{ik} + d_{jk} \} = \frac{d_{ik} + d_{jk}}{2}$$

em que:

$d_{(ij)k}$ = distância média entre o grupo ij e o indivíduo k;

d_{ik} = distância entre os indivíduos i e k; e

d_{jk} = distância entre os indivíduos j e k.

2.3.3. Importância dos caracteres no estudo da diversidade genética

A identificação dos caracteres de menor contribuição relativa para divergência entre os indivíduos, assim como aqueles que apresentam alta correlação, pode ser excluída ou substituída em estudos futuros da divergência. A importância relativa dos caracteres quantitativos de distribuição contínua foi avaliada pela metodologia de Singh (1981). As correlações entre os caracteres foram avaliadas pela correlação de Pearson, visando destacar os caracteres que possivelmente influenciam a produção de -ecdisona.

2.3.4. Correlação entre dados das matrizes de dissimilaridade

A magnitude e significância da correlação das medidas de dissimilaridade determinadas pelas variáveis dos caracteres contínuos e multicategóricos, foi avaliada pela estatística Z (teste de Mantel) para verificar a correlação entre as matrizes de distâncias dos dois grupos de caracteres, como também verificar a correlação de cada grupo com a matriz-soma.



Figura 1 – Aspecto das raízes dos genótipos de fáfia cultivados em vasos de 18 litros e colhidos a partir de 259 dias após o transplante.



Figura 2 – Campo experimental com detalhe da parte aérea dos indivíduos de fáfia cultivados em recipientes de 18 litros. As plantas alcançaram máxima altura entre 164 e 230 dias após transplante.

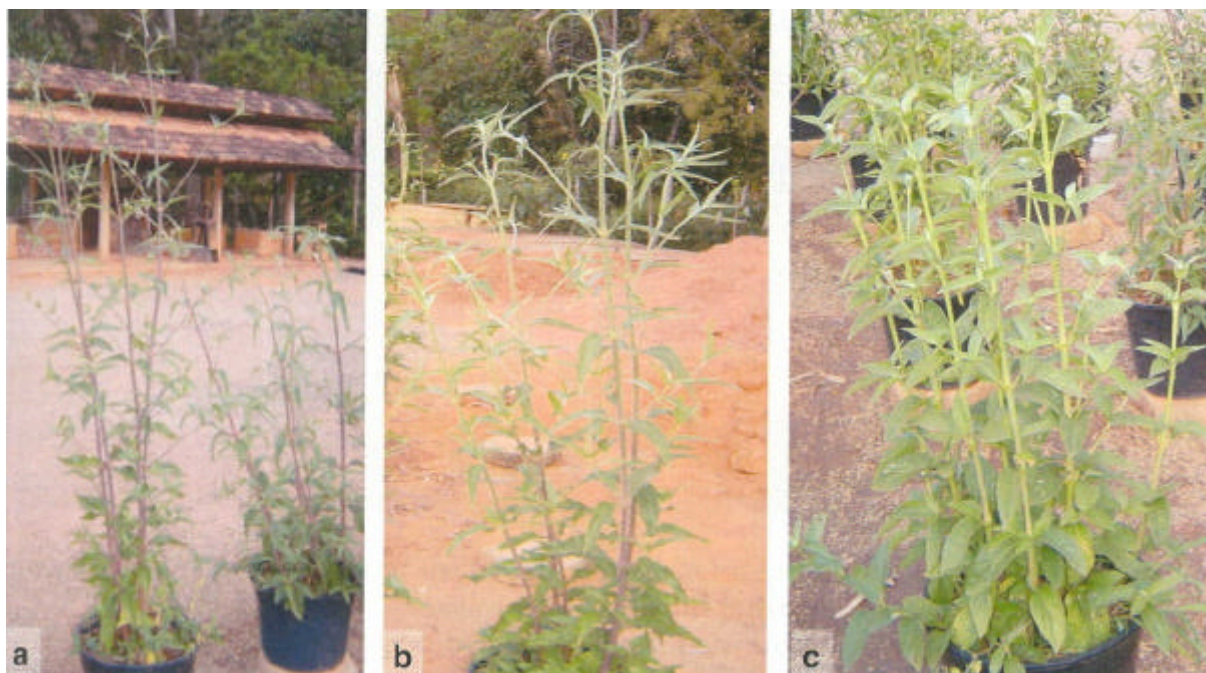


Figura 3 - Descrição da cor do caule com base na distribuição de pigmentos no início da floração: a) distribuição abundante de pigmento vermelho, a qual atinge acima de 75% da altura do caule; b) distribuição freqüente de pigmento vermelho, entre 25 e 75% da altura do caule e; c) predomínio da cor verde e pouca quantidade de pigmento vermelho, atingindo no máximo 25% da altura do caule.

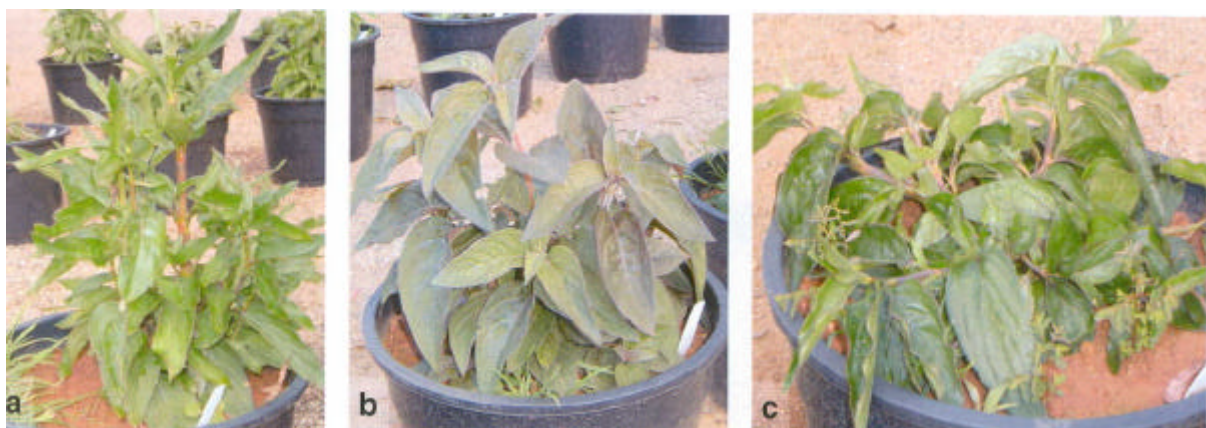
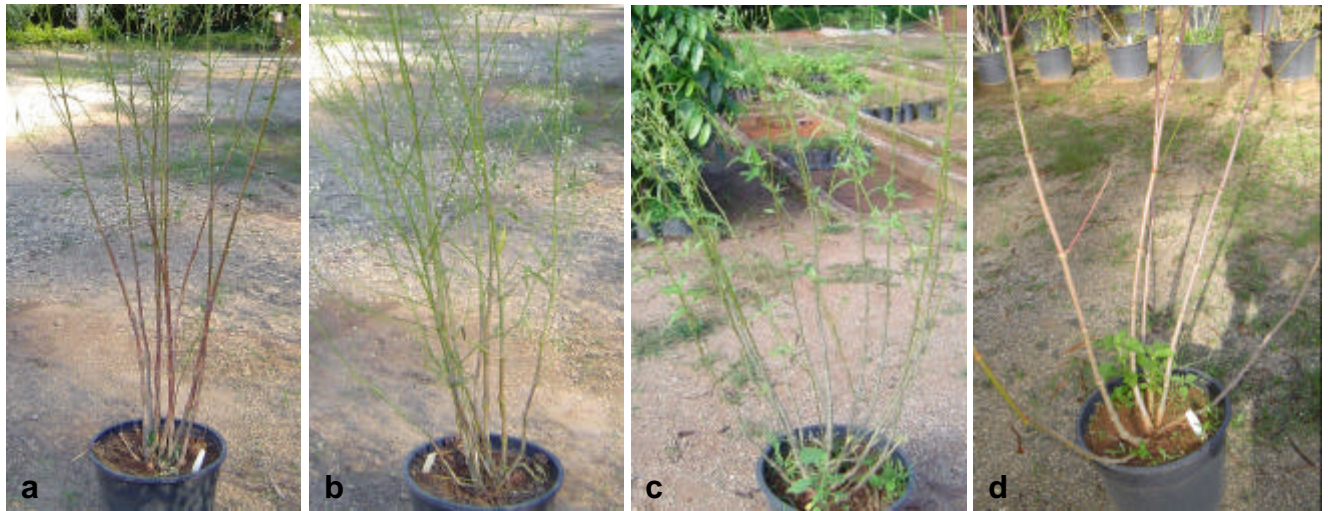


Figura 4 - Descrição do crescimento inicial, com base no crescimento e disposições dos caules entre 60 e 87 dias após o transplante: a) caules eretos, próximos entre si, sem ramificação e pequena área projeção lateral da copa; b) caules ramificados e distanciados, com lançamento de ramos laterais e média projeção da área da copa e; c) prostrado, caules com predomínio de crescimento paralelo à superfície horizontal



Figuras 5 - Descrição dos tipos de abertura da copa, com base na distribuição dos caules após queda de 90% das folhas: a) caules eretos e muito próximos, ausência de ramos laterais até altura de 2/3 da planta; b) caules eretos, porém com pequeno afastamento entre si e ramificações do caule a partir de 1/3 altura da planta; c) caules abertos, com ângulo de afastamento de até 45° na altura de 1/3 da planta; d) caules abertos, com pequena expansão horizontal próximo ao coleto.

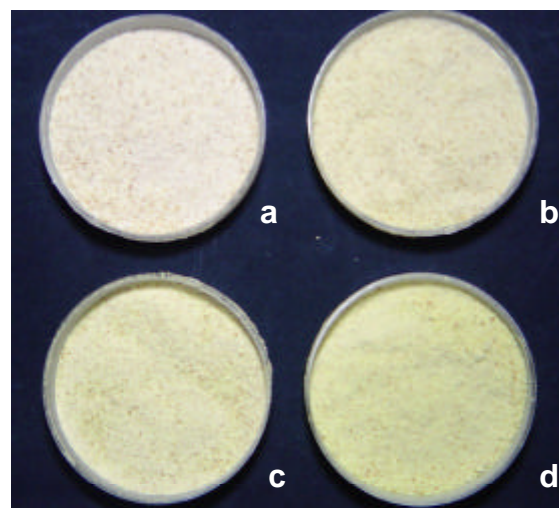


Figura 6 – Cores das raízes de fáfia após secagem e moagem: a) branca; b) amarelo-creme; c) amarelo e; d) amarelo-canarinho.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse estudo, os dados foram analisados individualmente para os grupos de caracteres de variáveis contínuas e variáveis multicategóricas, com o intuito de destacar os aspectos agronômicos e fitoquímicos de interesse no melhoramento da espécie. Posteriormente, foi realizada uma análise conjunta dos caracteres contínuos e multicategóricos, denominando-se caracteres fenotípicos binários devido à transformação das variáveis contínuas em dados binários. Os resultados da análise de variância demonstraram significativa variação de origem genética dos caracteres contínuos associados aos elevados índices de determinação genética (H^2) (Quadro 3). Os dados das médias foram agrupados pelo teste de Scott e Knott (Quadro 4). Para os caracteres multicategóricos, os valores atribuídos às diferentes classes fenotípicas são descritos no Quadro 5.

Do total de 30 caracteres observados, utilizaram-se 22 que apresentaram favorável descrição e quantificação em todos os indivíduos. As características excluídas foram: coloração da nervura principal; disposição dos ramos laterais; coloração, ondulação, pilosidade e borda do limbo; dias para abertura de 50% das flores da inflorescência principal; e concentração de clorofila. Esses caracteres, embora não foram estáveis em todos os indivíduos ou tiveram metodologias inadequadas de avaliação, poderão ser úteis em estudos de outras populações, uma vez que em alguns indivíduos foram consistentes durante o desenvolvimento da planta.

Quadro 3 – Quadrado médio dos indivíduos (QMA), média geral (MD), coeficiente de variação (CV), coeficiente de determinação genotípico (H²) e contribuição relativa da característica no estudo da diversidade (S_j) avaliada nos caracteres contínuos de quatro populações de fáfia (P1, P2, P3 e P4) e no total de 64 indivíduos (T64)

	MFC					MSC					MFR					MSR				
	QMA	MD	CV	H ²	S _j	QMA	MD	CV	H ²	S _j	QMA	MD	CV	H ²	S _j	QMA	MD	CV	H ²	S _j
P1	130924,5 ^{**}	903,64	12,69	89,95	0,0863	14940,47 ^{**}	300,89	14,88	86,75	0,0449	56400 ^{**}	435,46	19,45	86,75	0,1355	4818,62 ^{**}	126,91	18,71	88,30	0,1985
P2	35333,51 ^{**}	1180,74	17,87	86,72	2,7482	38754,16 ^{**}	425,66	16,84	86,73	4,8971	33906,35 ^{**}	400,02	21,92	77,31	4,5234	2633,17 ^{**}	121,62	22,80	70,89	4,9838
P3	160141,40 ^{**}	1163,77	10,22	91,15	0,0012	25562,44 ^{**}	410,47	11,05	91,94	0,0026	100424,7 ^{**}	588,20	15,26	91,98	0,0021	4703,73 ^{**}	177,66	15,63	92,05	0,0001
P4	54410,44 ^{ns}	1115,57	15,99	42,59	2,2179	7397,79 ^{ns}	403,29	16,71	38,61	0,6394	18435,85 ^{**}	367,29	15,59	82,21	16,104	1294,14 ^{**}	109,6	16,74	73,98	9,7188
T64	217262,17 ^{**}	1083,00	14,72	88,31	0,1847	30424,20 ^{**}	380,98	15,16	89,03	4,7769	72577,04 ^{**}	451,96	18,34	90,52	5,1720	6540,00 ^{**}	135,13	18,63	90,31	5,0619

	ALT					AF					S90					IAS				
	QMA	MD	CV	H ²	S _j	QMA	MD	CV	H ²	S _j	QMA	MD	CV	H ²	S _j	QMA	MD	CV	H ²	S _j
P1	2121,09 ^{**}	252,81	5,13	92,06	0,0739	256,29 ^{**}	115,60	2,12	97,65	39,0129	336,11 ^{**}	189,03	1,89	96,58	49,385	60,38 ^{**}	73,43	4,59	81,18	10,7161
P2	3255,47 ^{**}	267,35	8,01	85,93	0,4299	2488,37 ^{**}	140,42	12,58	99,47	42,8594	814,16 ^{**}	203,48	2,60	96,56	4,6846	1096,81 ^{**}	62,99	10,69	95,87	18,8460
P3	2825,85 ^{**}	277,43	5,08	92,98	0,0050	1641,39 ^{**}	145,31	3,15	98,72	49,9979	470,73 ^{**}	214,31	2,34	94,67	39,4073	1174,65 ^{**}	69,00	8,81	96,85	10,5661
P4	748,10 ^{**}	294,72	4,70	74,32	2,2722	766,28 ^{**}	149,03	2,65	97,98	40,5630	73,66 ^{**}	200,33	1,40	89,22	8,0564	488,15 ^{**}	51,30	9,05	95,58	11,7686
T64	2911,61 ^{**}	270,26	5,93	91,02	3,3332	1806,59 ^{**}	135,75	2,69	99,25	51,9400	709,17 ^{**}	201,36	2,18	97,27	1,4352	847,55 ^{**}	65,58	8,14	96,57	4,8827

	NC					DC					DE					IC				
	QMA	MD	CV	H ²	S _j	QMA	MD	CV	H ²	S _j	QMA	MD	CV	H ²	S _j	QMA	MD	CV	H ²	S _j
P1	7,23 ^{**}	6,31	21,02	73,10	0,0086	3,89 ^{**}	13,31	7,60	73,67	0,0311	9782,606 ^{**}	211,84	16,29	87,81	0,0111	0,0138 ^{**}	0,2969	10,11	93,47	0,1931
P2	14,66 ^{**}	8,42	24,06	71,95	0,1382	2,95 ^{**}	13,34	10,53	33,12	0,2882	3958,55 ^{**}	156,44	9,42	94,51	5,8482	0,0092 ^{**}	0,2280	12,82	91,43	2,3773
P3	24,62 ^{**}	9,71	21,57	82,14	0,0008	6,71 ^{**}	12,62	7,60	86,26	0,0020	3820,74 ^{**}	162,56	8,97	94,43	0,0060	0,0229 ^{**}	0,3040	11,84	94,36	0,0021
P4	4,69 ^{ns}	6,69	22,96	49,68	0,8992	2,22 ^{**}	13,47	5,96	71,06	1,2175	706,93 [*]	148,09	10,19	67,73	1,2436	0,0045 ^{**}	0,2152	13,39	81,78	1,1893
T64	18,39 ^{**}	7,82	23,00	82,20	0,8776	4,17 ^{**}	13,17	8,32	71,25	0,9801	6893,08 ^{**}	172,98	13,02	92,64	4,1778	0,0172 ^{**}	0,2600	11,66	94,43	7,6017

	20E					RL				
	QMA	MD	CV	H ²	S _j	QMA	MD	CV	H ²	S _j
P1	0,0290 ^{**}	0,6147	9,64	87,90	0,0839	0,5267 ^{**}	2,72	14,62	69,93	0,0185
P2	0,0206 ^{**}	0,4365	8,52	93,30	4,6669	0,6457 ^{**}	2,51	10,83	88,54	2,7090
P3	0,0179 ^{**}	0,5089	9,49	87,01	0,0030	1,0271 ^{**}	2,70	9,33	93,80	0,0038
P4	0,0147 ^{**}	0,4608	8,60	89,33	0,9091	1,2462 ^{**}	3,05	8,74	94,28	3,2007
T64	0,0363 ^{**}	0,5100	9,35	93,56	6,7737	0,8620 ^{**}	2,71	11,41	88,86	2,8045

(*) e (**) significativos a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.
MFC: matéria fresca do caule, MSC: matéria seca do caule, MFR: matéria fresca da raiz, MSR: matéria seca da raiz, ALT: altura da planta, AF: abertura da flor, S90: senescência de 90% das folhas, IAS: intervalo entre AF e S90, NC: número de caules verticais, DC: diâmetro do caule, DE: distância entrenó, IC: índice de colheita, 20E: teor de -ecdisona, e RL: relação largura/comprimento do limbo.

Quadro 4 – Média dos caracteres das variáveis contínua: matéria fresca do caule (MFC), matéria seca do caule (MSC), matéria fresca da raiz (MFR), matéria seca da raiz (MSR), altura da planta (ALT), dias para abertura da flor (AF), dias para senescência de 90% das folhas (S90), intervalo entre abertura da flor e senescência de 90% da folha (IAS), número de caules verticais (NC), diâmetro do caule (DC), distância dos entrenós (DE), índice de colheita (IC), teor de -ecdisona (20E), e relação comprimento/largura do limbo (RL), em 64 indivíduos de *Pfaffia glomerata*

Indiví- duos	MFC (g)	MSC (g)	MFR (g)	MSR (g)	ALT (cm)	AF (dias)	S90 (dias)	IAS (dias)	NC	DC (mm)	DE (mm)	IC	20E (%)	RL
1	750,77 d	262,77 d	403,17 d	126,53 d	242,67 d	113,00 j	188,67 g	75,67 c	5,67 c	13,31 a	219,33 c	0,3244 d	0,6496 b	2,92 c
2	753,97 d	209,63 d	448,67 d	113,64 d	255,00 d	112,83 j	185,67 g	72,83 c	5,00 c	12,86 b	230,00 c	0,3525 c	0,5461 c	2,88 c
3	1114,60 c	357,77 c	227,17 e	68,62 e	271,17 c	112,17 j	186,00 g	73,83 c	7,33 c	12,90 b	302,67 b	0,1609 f	0,7493 a	2,54 d
4	1111,07 c	357,53 c	447,73 d	129,43 d	247,17 d	118,50 i	191,33 g	72,83 c	7,00 c	14,42 a	188,33 d	0,2625 e	0,6072 c	2,88 c
5	1094,02 c	339,07 c	463,43 d	131,26 d	274,83 c	116,67 i	184,33 g	67,67 d	5,33 c	15,37 a	217,33 c	0,2801 e	0,7285 a	1,87 e
6	1023,97 c	385,63 c	758,17 b	230,75 b	284,17 c	138,33 g	214,00 c	75,67 c	5,67 c	12,04 b	126,67 e	0,3736 b	0,6391 b	2,87 c
7	883,27 d	330,37 c	364,17 d	104,54 e	274,17 c	108,33 k	188,67 g	80,33 b	5,67 c	13,51 a	300,00 b	0,2401 e	0,6448 b	3,68 b
8	739,67 d	246,13 d	431,07 d	134,22 d	194,00 e	110,17 k	181,67 h	71,50 c	9,00 b	11,62 b	205,00 c	0,3475 c	0,5712 c	2,22 e
9	880,60 d	326,23 c	569,67 c	177,41 c	293,00 c	127,83 h	195,67 f	67,83 d	4,33 c	14,48 a	228,33 c	0,3528 c	0,4847 d	2,32 d
10	837,45 d	295,30 d	632,29 c	160,17 c	208,33 e	117,50 i	187,00 g	69,50 c	9,00 b	13,01 b	145,00 e	0,3563 c	0,5332 c	2,39 d
11	1102,70 c	403,87 b	378,77 d	110,75 d	252,83 d	112,67 j	188,67 g	76,00 c	8,00 c	13,11 b	176,67 d	0,2158 f	0,6409 b	2,73 d
12	1321,20 b	425,63 b	473,57 d	141,33 d	268,83 d	135,00 g	212,33 c	77,33 c	8,33 b	13,30 a	132,33 e	0,2498 e	0,7485 a	2,70 d
13	868,80 d	288,23 d	568,63 c	165,84 c	233,83 d	110,00 k	189,67 g	79,67 b	7,33 c	11,29 c	186,67 d	0,3633 c	0,4202 e	2,43 d
14	791,13 d	236,97 d	511,47 c	144,58 d	235,33 d	110,00 k	185,67 g	75,67 c	7,33 c	13,63 a	175,00 d	0,3787 b	0,4629 d	2,32 d
15	646,63 d	198,43 d	414,43 d	117,37 d	221,50 e	111,83 j	186,33 g	74,50 c	6,00 c	12,42 b	191,67 d	0,3717 b	0,5438 c	3,33 b
16	1221,20 b	353,50 c	390,47 d	121,80 d	246,33 d	119,50 i	195,00 f	75,50 c	5,33 c	15,16 a	180,00 d	0,2565 e	0,6076 c	3,06 c
17	628,43 d	246,90 d	313,57 e	92,95 e	257,00 d	113,50 j	188,33 g	74,83 c	4,33 c	13,56 a	338,33 a	0,2775 e	0,6928 b	2,86 c
18	1355,17 b	413,63 b	426,67 d	118,77 d	241,33 d	165,00 c	218,67 c	53,67 e	13,33 a	12,52 b	116,67 e	0,2240 e	0,4565 d	1,88 e
19	706,07 d	382,50 c	355,33 d	109,40 d	260,00 d	137,67 g	202,33 e	64,67 d	6,00 c	14,25 a	146,67 e	0,2202 e	0,5158 d	1,94 e
20	1055,00 c	390,07 c	432,27 d	132,06 d	255,00 d	117,50 i	193,33 f	75,83 c	6,67 c	14,25 a	178,33 d	0,2541 e	0,3598 e	2,46 d
21	1392,13 b	535,50 a	323,13 e	103,91 e	256,33 d	144,33 f	215,00 c	70,67 c	8,67 b	14,25 a	135,00 e	0,1602 f	0,4784 d	2,43 d
22	1708,43 a	601,07 a	441,60 d	129,82 d	331,00 a	197,50 a	217,67 c	20,17 h	8,67 b	13,39 a	141,67 e	0,1809 f	0,3763 e	2,36 d
23	1069,80 c	387,57 c	509,23 c	152,04 c	280,83 c	124,67 h	221,00 c	96,33 a	9,33 b	12,73 b	141,67 e	0,2831 e	0,4806 d	2,81 c
24	1523,47 a	530,03 a	294,40 e	95,36 e	310,00 b	193,67 a	217,67 c	24,00 h	10,33 b	13,02 b	146,67 e	0,1530 f	0,3700 e	2,43 d
25	1214,90 b	429,77 b	517,77 c	145,58 d	275,00 c	120,67 i	187,00 g	66,33 d	7,33 c	13,90 a	236,00 c	0,2514 e	0,4439 d	2,01 e
26	1242,10 b	451,03 b	465,93 d	136,14 d	239,17 d	122,17 h	197,67 f	74,17 c	7,00 c	13,93 a	246,67 c	0,2317 e	0,3909 e	2,03 e
27	1589,63 a	621,20 a	289,27 e	90,14 e	283,83 c	163,50 c	217,67 c	54,17 e	6,67 c	15,06 a	150,00 e	0,1261 f	0,6026 c	2,39 d
28	941,53 c	343,83 c	255,43 e	81,26 e	260,50 d	128,67 h	190,00 g	61,33 d	7,33 c	12,62 b	153,33 e	0,1913 f	0,5045 d	2,93 c
29	1647,93 a	479,61 b	603,10 c	172,20 c	299,67 b	160,50 d	215,00 c	54,50 e	9,00 b	14,40 a	135,00 e	0,2648 e	0,4423 d	1,95 e
30	1473,00 a	497,80 b	381,23 d	108,62 d	330,17 a	153,83 e	216,00 c	62,17 d	9,67 b	14,69 a	190,00 d	0,1792 f	0,5762 c	3,10 c
31	1324,97 b	444,97 b	589,97 c	169,44 c	269,17 d	182,17 b	219,00 c	36,83 g	8,67 b	13,80 a	135,00 e	0,2757 e	0,5330 c	1,98 e
32	1357,34 b	452,63 b	430,20 d	118,57 d	327,00 a	149,67 e	214,67 c	65,00 d	13,00 a	13,12 b	195,00 d	0,2075 f	0,5986 c	3,16 c
33	1154,67 b	414,60 b	1114,70 a	326,21 a	242,83 d	159,00 d	238,33 a	79,33 b	8,33 b	11,98 b	121,67 e	0,4394 a	0,3459 e	2,14 e
34	1505,13 a	618,93 a	524,87 c	162,24 c	300,50 b	127,50 h	221,67 c	94,17 a	10,67 b	14,04 a	201,67 c	0,2097 f	0,5511 c	2,62 d
35	1319,77 b	551,00 a	614,37 c	194,18 c	306,17 b	125,67 h	218,67 c	93,00 a	8,67 b	14,52 a	221,67 c	0,2641 e	0,5107 d	2,21 e
36	1202,20 b	410,47 b	598,07 c	177,55 c	247,17 d	147,00 f	232,33 a	85,33 b	14,67 a	10,29 c	135,00 e	0,3022 d	0,5382 c	4,30 a
37	1386,85 b	456,50 b	516,77 c	158,72 c	272,00 c	190,00 a	227,00 b	37,00 g	8,00 c	13,42 a	142,67 e	0,2591 e	0,5484 c	2,34 d
38	1288,00 b	413,17 b	576,07 c	174,91 c	249,50 d	155,67 d	213,67 c	58,00 e	12,00 a	12,94 b	123,33 e	0,2977 d	0,4519 d	2,37 d
39	868,87 d	315,43 c	816,60 b	255,76 b	243,17 d	169,67 c	216,33 c	46,67 f	15,33 a	8,89 d	108,33 e	0,4484 a	0,4676 d	2,57 d
40	899,39 d	317,27 c	672,73 c	219,27 b	282,50 c	128,00 h	203,67 e	75,67 c	5,00 c	12,98 b	220,00 c	0,4043 b	0,5172 d	2,70 d
41	611,03 d	190,57 d	283,06 e	81,91 e	254,17 d	101,67 l	174,33 i	72,67 c	5,00 c	12,21 b	218,33 c	0,2968 d	0,6647 b	2,65 d
42	788,73 d	272,47 d	194,34 e	58,15 e	289,00 c	107,00 k	168,33 i	61,33 d	4,33 c	14,65 a	263,33 c	0,1813 f	0,7461 a	3,05 c
43	1490,07 a	562,47 a	388,28 d	128,36 d	323,33 a	157,17 d	204,00 e	46,83 f	12,67 a	11,96 b	180,00 d	0,1836 f	0,5704 c	3,07 c
44	827,80 d	264,13 d	409,80 d	123,48 d	204,83 e	115,67 j	178,00 h	62,33 d	9,00 b	12,55 b	121,67 e	0,3196 d	0,3240 e	2,95 c
45	1148,37 b	411,97 b	484,07 d	152,14 c	262,50 d	108,50 k	187,00 g	78,50 c	9,33 b	13,41 a	163,33 d	0,2741 e	0,4758 d	2,53 d
46	907,17 d	329,90 c	507,80 c	163,85 c	256,67 d	160,17 d	233,33 a	73,17 c	5,00 c	14,03 a	106,67 e	0,3272 d	0,4199 e	2,43 d
47	746,67 d	259,37 d	247,47 e	76,44 e	241,17 d	107,33 k	180,67 h	73,33 c	9,33 b	11,29 c	156,67 d	0,2281 e	0,3349 e	3,13 c
48	687,20 d	258,33 d	248,83 e	78,13 e	231,17 d	102,83 l	186,67 g	83,83 b	6,00 c	12,57 b	160,00 d	0,2315 e	0,3117 e	3,47 b
49	843,07 d	293,13 d	593,95 c	187,08 c	245,83 d	123,33 i	213,33 c	90,00 a	6,33 c	12,16 b	165,00 d	0,3868 b	0,5806 c	2,45 d
50	807,80 d	296,97 d	643,60 c	201,03 c	245,33 d	120,33 i	203,67 e	83,33 b	7,00 c	12,86 b	145,00 e	0,4040 b	0,6139 c	2,57 d
51	1039,77 c	364,60 c	363,98 d	106,87 d	283,33 c	105,17 l	194,00 f	88,83 a	8,67 b	11,99 b	185,00 d	0,2260 e	0,4157 e	3,50 b
52	984,33 c	347,73 c	570,57 c	164,39 c	281,17 c	135,50 g	194,00 f	58,50 e	9,00 b	11,78 b	156,67 d	0,3216 d	0,5121 d	2,37 d
53	1165,23 b	372,27 c	403,60 d	117,69 d	313,00 b	152,50 e	202,67 e	50,17 f	10,33 b	12,54 b	155,00 d	0,2392 e	0,3818 e	2,86 c
54	1180,57 b	394,50 c	459,07 d	130,87 d	300,33 b	167,00 c	206,00 d	39,00 g	4,67 c	13,88 a	135,00 e	0,2517 e	0,3916 e	3,79 a
55	1013,83 c	360,37 c	446,97 d	124,09 d	301,67 b	178,00 b	206,00 d	28,00 h	4,67 c	13,70 a	150,00 e	0,2583 e	0,4121 e	3,46 b
56	1102,07 c	394,17 c	269,93 e	80,90 e	287,50 c	134,33 g	199,00 f	64,67 d	8,33 b	13,71 a	145,00 e	0,1702 f	0,5566 c	2,60 d
57	1428,97 a	527,10 a	437,20 d	127,62 d	298,33 b	146,50 f	196,33 f	49,83 f	7,33 c	14,39 a	137,33 e	0,1938 f	0,5961 c	1,90 e
58	1250,20 b	434,63 b	296,67 e	93,82 e	317,83 a	141,67 f	202,67 e	61,00 d	6,33 c	15,17 a	170,00 d	0,1806 f	0,5134 d	2,42 d
59	1188,70 b	431,40 b	302,77 e	95,89 e	295,50 c	143,50 f	197,67 f	54,17 e	7,67 c	13,09 b	138,33 e	0,1816 f	0,4023 e	2,63 d
60	1069,73 c	416,93 b	351,63 d	109,26 d	301,67 b	137,17 g	190,33 g	53,17 e	7,00 c	13,85 a	163,33 d	0,2085 f	0,4217 e	2,73 d
61	1002,47 c	358,87 c	277,70 e	85,32 e	256,67 d	158,83 d	203,33 e	44,50 f	5,67 c	12,53 b	125,00 e	0,1909 f	0,4776 d	3,43 b
62	1001,93 c	381,00 c	433,93 d	135,67 d	282,50 c	138,83 g	197,67 f	58,83 e	8,00 c	12,52 b	158,33 d	0,2632 e	0,4780 d	3,61 b
63	1028,47 c	384,33 c	311,43 e	91,18 e	307,50 b	127,17 h	198,67 f	71,50 c	7,33 c	12,48 b	170,00 d	0,1924 f	0,4315 d	3,07 c
64	1002,17 c	352,90 c	452,91 d	131,00 d	292,50 c	166,33 c	206,00 d	39,67 g	6,67 c	12,86 b	136,67 e	0,2766 e	0,3879 e	3,93 a
Md	1083,00	380,98	451,96	135,13	270,26	135,76	201,36	65,58	7,82	13,17	172,98	0,27	0,51	2,71

Médias seguidas da mesma letra constituem um grupo homogêneo, pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

Quadro 5 – Valores atribuídos aos caracteres multicategóricos avaliados em 64 indivíduos de *Pfaffia glomerata* de quatro populações

indivíduos	PIL	CC	CP	CIC	AC	CR	ABL	FL
1	2	2	2	1	1	4	1	1
2	3	3	2	1	1	3	1	1
3	2	1	1	1	2	3	1	1
4	2	2	2	1	2	3	1	1
5	2	1	1	1	1	4	2	3
6	2	1	2	3	4	3	1	1
7	3	2	2	1	2	4	1	1
8	2	3	3	2	2	2	1	1
9	3	2	1	1	1	4	1	1
10	2	1	1	1	2	4	1	1
11	3	1	2	2	3	2	1	1
12	2	1	1	2	2	2	1	1
13	3	3	2	1	2	3	1	1
14	2	3	3	1	2	2	2	1
15	3	2	1	1	2	3	1	2
16	3	1	1	1	2	3	1	1
17	3	2	2	1	1	3	1	1
18	1	1	2	2	3	3	2	3
19	1	2	3	1	2	1	2	1
20	1	1	1	2	3	2	2	1
21	1	2	2	2	2	2	1	1
22	1	1	1	2	3	1	1	1
23	1	3	3	1	1	1	1	1
24	1	1	1	3	3	1	2	1
25	1	1	2	2	3	2	2	1
26	1	1	2	2	4	2	2	1
27	1	1	1	2	3	3	1	1
28	1	2	3	2	2	1	1	1
29	1	2	1	1	2	4	2	1
30	1	2	2	2	3	3	1	1
31	1	3	3	2	2	2	4	1
32	1	2	2	2	3	3	1	1
33	1	2	3	2	3	2	4	1
34	1	2	1	1	3	4	1	1
35	1	2	2	1	3	4	2	1
36	1	3	3	2	1	4	1	2
37	1	3	3	2	2	3	3	1
38	1	3	3	2	3	1	2	1
39	1	2	2	3	2	3	1	1
40	1	2	2	1	2	4	1	1
41	2	2	2	1	1	3	1	1
42	3	1	1	2	2	4	1	1
43	1	2	2	2	3	2	1	1
44	1	2	3	2	4	2	1	1
45	1	3	3	1	3	3	1	1
46	1	2	2	2	2	3	2	1
47	1	1	2	2	3	2	1	1
48	1	1	2	2	3	2	1	1
49	1	3	3	2	2	4	1	1
50	1	3	3	2	2	3	1	1
51	1	2	2	2	3	3	1	2
52	1	3	3	2	3	4	1	1
53	1	3	3	2	3	2	1	1
54	1	1	2	2	4	1	1	2
55	1	1	2	2	4	1	1	2
56	1	3	3	1	2	2	1	1
57	1	1	2	2	3	2	2	3
58	1	2	2	2	3	1	2	1
59	1	1	2	3	4	1	2	1
60	1	1	2	2	4	1	2	1
61	1	3	3	2	2	2	1	2
62	1	2	2	2	4	2	1	2
63	1	2	3	3	4	2	1	2
64	1	1	2	2	4	2	1	2

Cor do pecíolo (CP), 1 = deposição de pigmento na face adaxial e abaxial no pecíolo e mesófilo margeante, 2 = deposição apenas no mesófilo, 3 = nenhuma deposição na região do pecíolo; pilosidade do caule (PIL), 1 = abundante, 2 = pouco freqüente, 3 = rara freqüência; cor do caule (CC), 1 = distribuição abundante de pigmento vermelho, 2 = distribuição freqüente de pigmento (25 e 75%) 3 = predomínio da cor verde; crescimento inicial do caule (CIC): 1 = caules eretos; 2 = caules ramificados; 3 = prostrado; abertura da copa (AC), 1 = caules eretos e muito próximos, 2 = caules eretos, porém com pouca ramificação a partir de 1/3 altura da planta; 3 = caules abertos, com ângulo de afastamento de até 45° na altura de 1/3; 4 = caules abertos, com pequena expansão horizontal próximo ao coleto; cor da raiz (CR): 1 = branca; 2 = amarelo-creme; 3 = amarelo; 4 = amarelo-canarinho; descrição do ápice e base do limbo foliar (ABL): 1- agudo - acuminado e oblíqua - acunhada, 2- agudo - acumunado e truncada - reniforme, 3) mucronado e oblíqua - acunhada, e 4) mucronado e truncada - reniforme; formato do limbo (FL): 1 = elíptica; 2 = lanceolada; e 3 = ovalada.

3.1. Potencial genético dos indivíduos e populações de fáfia no melhoramento vegetal

A produção de -ecdisona (20E) e demais metabólitos são as principais características relacionadas ao aspecto medicinal da fáfia, sendo o teor de 20E freqüentemente visado nas avaliações de cultivo e seleção de genótipos (MAGALHÃES, 1998; FIGUEIREDO, 20002; CORREIA JÚNIOR, 2003). No presente estudo foi obtido maiores médias de 20E nos indivíduos da população 1, porém a produção média de matéria seca da raiz (MSR) apresentou, predominantemente, valores abaixo da média geral (Quadros 3). Os indivíduos da população 3 apresentaram maiores médias de MSR, em que o teor de 20E foi superior às populações 2 e 4 (Quadro 4), o que indica presença de alelos relacionados com aumento no teor de 20E e produção de MSR, demonstrando relativa superioridade e potencial genético para melhoramento vegetal da população 3. Também, destaques individuais foram observados nos genótipos da população 1, onde combinam maiores teores de 20E e MSR no mesmo indivíduo (Quadro 4), resultando em maiores níveis de produção total de 20E. Tais indivíduos possuem potencial que permitem iniciar a seleção e submeter às avaliações com o intuito de originar variedades no curto prazo, pois a fáfia possui mecanismos favoráveis para reprodução vegetativa.

Os indivíduos da população 1 (genótipos: 03, 12, 42, 05, 41, 1, 7, 11 e 06) que tiveram maiores valores de 20E em relação aos 64 indivíduos avaliados no presente estudo (Quadro 4) apresentaram o seguinte perfil: MSR abaixo da média geral (135,1 g/planta), exceto os acessos 06 (230,75 g/planta) e 12 (141,33 g/planta); antese precoce em relação a média geral (135 dias), exceto os acessos 12 (212,3 dias) e 06 (214 dias); dias para ocorrer a senescência de 90% das folhas abaixo da média geral (201,4 dias), exceto os indivíduos 12 (212,3 dias) e 06 (214,0 dias); intervalo entre antese e senescência acima da média (65,5), exceto o indivíduo 42 (61,3 dias).

Os resultados sugerem que a produção total de -ecdisona pode ser favorecida nos genótipos que apresentam longo período de área foliar durante o florescimento, enquanto a produção de raízes parece ser favorável com a redução do período de florescimento. Alguns estudos demonstram que o teor de 20E apresenta freqüentes variações em seus níveis de acúmulo. Correia Júnior (2003), avaliando o teor de 20E em quatro épocas de colheita (8, 10, 12 e 14 meses) de quatro acessos de fáfia cultivados em condições experimentais de campo, obteve maior média da concentração nas plantas colhidas aos 12 meses, e aos 14 meses houve redução no teor. Filippova et al. (2003), avaliaram a produção de 20E em suspensão celular de *Serratula coronata* estabelecidas por sete anos e,

observaram que num ciclo de crescimento (20 dias) ocorrem picos de aumento e redução na concentração de 20E desde a fase lag até a fase estacionária, sendo que os picos de queda foram menos acentuados na fase estacionária. No entanto, não houve aumento de 20E na fase estacionária, como é típico em metabólitos secundários (RAMACHANDRA RAO e RAVISHANKAR, 2002). Portanto, tais observações podem ser úteis nos estudos de sazonalidade, onde o acúmulo de 20E pode ser influenciado pela capacidade fotossintética dos genótipos com destacado potencial genético para produção do metabólito.

3.2. Divergência genética avaliada pelos caracteres contínuos

3.2.1. Dissimilaridade entre 64 Indivíduos

Os resultados das medidas de dissimilaridade ou distâncias genéticas (Apêndice 2) das variáveis contínuas calculadas pela distância de Mahalanobis demonstraram que os pares de indivíduos 42 x 22 e 54 x 64 apresentaram a maior e menor distância, respectivamente. A identificação dos pares mais distantes ou divergentes é um aspecto visado pelos fitomelhoristas, uma vez que pode orientar uma combinação de genitores para ganho em heterose (ALLARD, 1971). Foram destacados 20 pares de acessos, que apresentaram maiores e menores distâncias (Quadro 6). As maiores distâncias foram encontrados entre indivíduos de diferentes populações, e as menores entre indivíduos da mesma população, ou seja, os indivíduos mais divergentes foram encontrados em populações distintas e os indivíduos mais semelhantes, na mesma população.

Os indivíduos 22 e 24 foram freqüentes na formação dos pares de maior dissimilaridade (Quadro 6), os quais apresentaram as menores médias dos caracteres teor de -ecdisona (20E) e matéria seca da raiz (MSR) (Quadro 4). Tal evidência deve ser analisada com ressalvas, pois, apesar de aumentar a variabilidade, não representa necessariamente vantagem para uma coleção ativa do banco de germoplasma. Os indivíduos 42 e 41 também predominaram na classificação de maior dissimilaridade, sendo pertencentes à população 1, apresentando alto teor de 20E e baixa MSR. Os indivíduos 22 e 24; e 41 e 42 obtiveram altas médias das medidas de dissimilaridade (Quadro 7), e os caracteres de interesse foram nitidamente de magnitude oposta (Quadro 4).

Quadro 6 – Pares de indivíduos que obtiveram valores extremos de maior e menor medida de dissimilaridade dos caracteres contínuos (D^2), calculados com base na distância de Mahalanobis

Ordem	Maiores distâncias			Menores distâncias		
	Indivíduos	Populações	D^2	Indivíduos	Populações	D^2
1	42 x 22	1 x 2	1036,62	64 x 54	4 x 4	4,42
2	41 x 22	1 x 2	957,58	4 x 16	1 x 1	6,69
3	2 x 22	1 x 2	919,65	50 x 49	3 x 3	8,00
4	42 x 24	1 x 2	896,23	59 x 60	4 x 4	9,41
5	48 x 22	2 x 2	859,07	34 x 35	3 x 3	9,56
6	7 x 22	1 x 2	847,95	30 x 32	3 x 3	9,65
7	41 x 24	1 x 2	847,06	2 x 15	1 x 1	9,91
8	42 x 37	1 x 3	833,72	47 x 48	2 x 2	10,84
9	17 x 22	1 x 2	822,32	4 x 11	1 x 1	11,36
10	3 x 22	1 x 2	819,58	31 x 37	3 x 3	13,20
11	47 x 22	2 x 2	815,62	54 x 55	4 x 4	13,41
12	8 x 22	1 x 1	814,78	9 x 40	1 x 3	14,72
13	42 x 33	1 x 3	791,81	55 x 64	4 x 4	15,39
14	3 x 24	1 x 2	788,61	28 x 56	2 x 4	15,39
15	51 x 22	3 x 2	781,00	56 x 58	4 x 4	15,70
16	41 x 37	1 x 3	766,61	18 x 38	2 x 3	16,20
17	5 x 22	1 x 2	758,57	22 x 24	2 x 2	16,69
18	45 x 22	2 x 2	752,90	13 x 14	1 x 1	16,91
19	11 x 22	1 x 2	750,31	4 x 1	1 x 1	17,71
20	11 x 21	1 x 2	750,31	60 x 63	4 x 4	18,57

Populações: 1 - rio Ivaí; 2 - Ilha do Mineiro; 3 - Baitaporã; 4 - Vila Alta.

Os pares de baixa distância foram observados entre os indivíduos de todas as quatro populações (Quadro 6), sendo predominante na população 4. A maioria desses pares apresentou valores médios e baixos em ambos os caracteres (20E e MSR). No melhoramento vegetal, os genótipos que apresentam baixa dissimilaridade e possuem os alelos de interesse podem ser úteis como genitores, visando, principalmente, reduzir o tempo de gerações necessárias para desenvolvimento da variedade. Nos indivíduos avaliados, as principais características desejadas correspondem ao aumento do teor de 20E e produção de MSR. No Quadro 8, mostram-se as medidas de dissimilaridade entre os indivíduos que produziram maiores níveis de 20E e MSR, como um possível critério de escolha dos genitores para melhoramento da fáfia; evidentemente, outros aspectos devem ser analisados como nível de heterozigose, aspectos fitopatológicos, efeito da sazonalidade e outros não avaliados neste estudo. A dissimilaridade entre os indivíduos 12 x 06 revelou menor distância com base nos caracteres contínuos, o que possibilita obter um cruzamento promissor em relação aos demais pares de indivíduos que combinam alto teor de 20E e MSR.

Quadro 7 – Médias das medidas de dissimilaridade dos indivíduos avaliados pelos caracteres contínuos (D^2_{md}), multicategóricos (D_{md}) e fenotípicos binários (D'_{md}) com base nas distâncias obtidas pelo coeficiente de Mahalanobis (D^2) e índice de dissimilaridade dos dados binários (D e D'), em 64 indivíduos de fáfia

Ordem	Contínuo			Multicategórico			Fenotípico		
	D^2_{md}	indivíduo	Pop	D_{md}	indivíduo	Pop	D'_{md}	indivíduo	Pop
1	476,95	22	2	6,30	5	1	13,28	5	1
2	403,29	24	2	5,39	15	1	12,39	14	1
3	357,09	37	3	5,20	63	4	12,27	9	1
4	321,08	33	3	5,19	14	1	12,17	36	3
5	310,36	42	1	5,06	9	1	12,16	15	1
6	286,31	55	4	5,06	24	2	12,00	6	1
7	282,97	31	3	5,00	36	3	11,98	38	3
8	267,29	39	3	4,98	59	4	11,95	24	2
9	263,21	3	1	4,95	6	1	11,95	31	3
10	243,97	41	1	4,94	18	2	11,94	10	1
11	228,49	46	2	4,91	57	4	11,94	29	2
12	226,50	48	2	4,84	2	1	11,88	37	3
13	222,57	17	1	4,83	10	1	11,83	13	1
14	220,88	64	4	4,78	1	1	11,83	18	2
15	220,75	54	4	4,75	16	1	11,78	33	3
16	215,34	7	1	4,73	3	1	11,69	59	4
17	213,95	47	2	4,70	17	1	11,67	23	2
18	206,13	27	2	4,70	29	2	11,66	63	4
19	196,69	8	1	4,70	54	4	11,64	35	3
20	189,59	36	3	4,70	55	4	11,61	2	1
21	188,07	18	2	4,69	41	1	11,61	57	4
22	184,73	44	2	4,67	37	3	11,56	54	4
23	183,94	51	3	4,66	19	2	11,56	64	4
24	183,78	5	1	4,63	31	3	11,55	39	3
25	183,20	15	1	4,63	61	4	11,53	55	4
26	181,50	14	1	4,61	42	1	11,52	1	1
27	179,75	2	1	4,59	13	1	11,52	16	1
28	172,76	29	2	4,59	23	2	11,50	62	4
29	168,84	43	2	4,59	38	3	11,47	3	1
30	168,13	61	4	4,55	7	1	11,45	41	1
31	166,59	13	1	4,55	64	4	11,44	17	1
32	166,24	45	2	4,52	33	3	11,44	52	3
33	166,19	11	1	4,52	62	4	11,42	8	1
34	165,34	26	2	4,50	8	1	11,41	26	2
35	165,10	1	1	4,48	60	4	11,39	12	1
36	161,42	10	1	4,47	12	1	11,39	34	3
37	148,16	16	1	4,47	35	3	11,36	19	2
38	148,11	30	3	4,44	4	1	11,36	45	2
39	146,56	6	1	4,41	20	2	11,36	61	4
40	146,04	12	1	4,36	51	3	11,34	42	1
41	145,63	34	3	4,33	26	2	11,25	46	2
42	145,38	35	3	4,28	34	3	11,22	25	2
43	143,88	32	3	4,27	58	4	11,16	7	1
44	142,22	23	2	4,25	11	1	11,16	40	3
45	142,09	50	3	4,25	45	2	11,13	49	3
46	141,49	38	3	4,19	56	4	11,13	51	3
47	141,29	49	3	4,16	39	3	11,13	60	4
48	138,36	4	1	4,14	25	2	11,08	4	1
49	138,15	19	2	4,11	22	2	11,08	20	2
50	136,60	53	3	4,11	46	2	11,03	50	3
51	136,04	25	2	4,11	52	3	11,00	58	4
52	135,18	20	2	4,08	49	3	10,97	22	2
53	130,66	21	2	4,03	44	2	10,95	11	1
54	130,59	57	4	3,98	27	2	10,86	44	2
55	130,03	40	3	3,98	40	3	10,84	53	3
56	124,45	28	2	3,98	50	3	10,83	56	4
57	121,33	59	4	3,98	53	3	10,72	27	2
58	119,90	9	1	3,97	28	2	10,64	30	3
59	118,55	63	4	3,69	30	3	10,64	32	3
60	117,63	56	4	3,69	32	3	10,64	43	2
61	116,38	60	4	3,69	47	2	10,58	28	2
62	115,51	58	4	3,69	48	2	10,36	21	2
63	107,39	62	4	3,66	43	2	10,27	47	2
64	106,33	52	3	3,63	21	2	10,17	48	2
Md geral	166,215			4,52			11,43		

D^2 : medida de dissimilaridade calculada com base na distância de Mahalanobis.

D : medida de dissimilaridade calculada com base no índice de dissimilaridade dos dados binários.

D' : medida de dissimilaridade calculada com base no complemento aritmético do coeficiente de Nei e Li.

Quadro 8 – Medidas de dissimilaridade calculadas com base nas distâncias de Mahalanobis entre pares de indivíduos que obtiveram maiores médias dos caracteres produção de -ecdisona (20E) e matéria seca da raiz (MSR)

Indivíduo MSR (g)	Indivíduo – Produção de 20E (%)			
	03 (0,7493)	12 (0,7485)	42 (0,7461)	05 (0,7461)
33 (326,21)	660,40	283,73	791,81	490,34
39 (255,75)	590,33	253,34	693,80	436,52
06 (230,75)	275,58	46,61	343,52	152,08
40 (219,27)	191,92	85,22	247,51	98,86

3.2.2. Dissimilaridade das populações

Os resultados do estudo da diversidade genética entre e dentro das quatro populações, mediante a transformação das variáveis contínuas em dados binários, indicaram que a população 2 apresentou maior valor de dissimilaridade oriundo de seus indivíduos (Quadro 9). Na seqüência, as populações 4, 3 e 1 representaram a ordem decrescente da medida de dissimilaridade dentro das populações. Nos resultados para avaliação das distâncias entre as populações (Quadro 10), observou-se maior dissimilaridade entre as populações 1 x 4, em que estes originaram os pares de maiores medidas de dissimilaridade. Os valores indicaram que a diversidade é maior entre as populações e menor dentro das populações. Essa observação significa que as populações 1 e 4 reúnem maior diversidade que a população 2, isoladamente. A estratégia de preservar duas populações (1 e 4) de menor diversidade reúne maior diversidade e seria recomendável preservar essas populações *in situ*.

Outro aspecto que pode ser considerado com base nas distâncias entre as populações está relacionado com os critérios de determinação do número de populações de coleta. Os dados revelaram que as maiores dissimilaridades ainda são obtidas entre as populações, portanto é possível coletar novas populações na mesma região com o intuito de aumentar a diversidade genética da coleção, considerando-se que as amostragens das populações avaliadas foram representativas.

Quadro 9 – Valores das medidas de dissimilaridade das populações com base no índice do complemento aritmético do coeficiente de Nei e Li, calculadas a partir de dados binários dos caracteres contínuos, multicategóricos e fenotípicos binários

População	Dissimilaridade dos caracteres		
	Contínuos	Multicategóricos	Fenotípicos binários
1 (Rio Ivaí)	0,3802	0,4898	0,4413
2 (Ilha do Mineiro)	0,5898	0,4673	0,5060
3 (Baitaporã)	0,3971	0,4489	0,4164
4 (Vila Alta)	0,4194	0,4773	0,4520

Quadro 10 - Valores das medidas de dissimilaridade entre populações com base no índice do complemento aritmético do coeficiente de Nei e Li, calculados a partir dos valores de dados binários dos caracteres contínuo, multicategóricos e fenotípicos binários

População P x P'	Dissimilaridade dos caracteres		
	Contínuos	Multicategóricos	Fenotípicos binários
1 x 2	0,6403	0,6407	0,6372
1 x 3	0,5417	0,6410	0,5893
1 x 4	0,6776	0,7249	0,7023
2 x 3	0,5312	0,4917	0,4997
2 x 4	0,5635	0,5239	0,5332
3 x 4	0,5459	0,5728	0,5558

P e P': populações; 1 - rio Ivaí; 2 - Ilha do Mineiro; 3 - Baitaporã; 4 - Vila Alta.

3.2.3. Agrupamento dos indivíduos e populações pelos métodos de otimização de Tocher e UPGMA

O método de Tocher forma grupos de similaridade, inicialmente a partir do par de genótipo de menor dissimilaridade ou maior similaridade. Outros genótipos serão incluídos no mesmo grupo até que a distância média dentro do grupo não seja superior à distância entre os demais grupos (CRUZ e CARNEIRO, 2003). Portanto, indivíduos de elevada e baixa dissimilaridade média, calculada pelo somatório de todos os indivíduos, podem ser incluídos no mesmo grupo ou em grupos distintos. Os pares de menor dissimilaridade, geralmente, estarão no mesmo grupo, e os pares de maior dissimilaridade frequentemente estarão em grupos distintos. Os grupos maiores, formados por grande número de genótipos, geralmente agrupam os pares que apresentam menores distâncias entre si, uma vez que o tamanho do grupo é delimitado pela distância média dos pares de indivíduos.

Na avaliação dos 64 indivíduos, o método de otimização de Tocher distribuiu os genótipos em 10 grupos (Quadro 11), sendo em apenas dois grupos incluídos 45 indivíduos (70,3%). O grupo 1 foi composto por 20 indivíduos oriundos das populações 2, 3 e 4 (Quadro 12). No segundo grupo, reuniram-se 25 indivíduos, tendo representantes de todas as populações. Os demais grupos foram constituídos por 6, 3, 2 e 1 indivíduos, sendo no grupo 5 incluídos três indivíduos exclusivos da população 1. Quatro grupos foram constituídos por um único indivíduo oriundo da população 3 (indivíduos 39 e 36) e população 2 (indivíduos 19 e 26).

O agrupamento para estudo da diversidade das quatro populações formou três grupos (Quadro 13). As populações 1 e 4 foram incluídas isoladamente em cada grupo, ressaltando-se que estes originam os pares de indivíduos com as maiores medidas de dissimilaridade. As

populações 2 e 3 foram incluídas no mesmo grupo, embora a população 2 tenha apresentada maior dissimilaridade entre seus indivíduos (Quadro 9).

No método de agrupamento hierárquico UPGMA, os indivíduos ou populações são agrupados com base nas médias aritméticas das medidas de dissimilaridade. A representação gráfica de suas distâncias, indicada pelo comprimento das barras horizontais e as ramificações no dendrograma, permite rápida visualização da magnitude das distâncias e aproximação dos indivíduos. No dendrograma obtido para agrupamento dos indivíduos foram distinguidos seis grupos, em que foi considerada uma dissimilaridade relativa de 37% no critério de delimitação dos grupos (Figura 7). Os dois maiores grupos foram constituídos por 34 e 14 indivíduos (75%), incluindo indivíduos das quatro populações e excluindo os da população 4, respectivamente. Os demais grupos foram formados por 9, 4, 2 e 1 indivíduos. O grupo 4 foi constituído por dois indivíduos exclusivos da população 2. No agrupamento das populações foi possível observar que as populações 2 e 3 apresentam maior similaridade em relação às populações 3 e 4 (Figura 8).

Quadro 11 – Agrupamento de 64 indivíduos de fáfia pelo método de otimização de Tocher com base nas distâncias generalizadas de Mahalanobis (D^2) e índice de dissimilaridade dos dados binários (D e D'), mediante avaliação dos caracteres contínuos, multicategóricos e fenotípicos binários

Grupos	Caracteres		
	Contínuos	Multicategóricos	Fenotípico binários
1	54 64 55 61 53 38 29 18 31 30 43 27 59 21 62 57 58 32 60 52	30 32 43 51 21 47 48 11 25 27 22 53 20 58	30 32 43 58 27 22 57 24 18 21 53
2	4 16 11 1 5 45 8 41 25 13 14 2 15 10 20 50 51 9 28 44 63 47 7 48 56	54 55 64 62 26 60 59	47 48 28 44 51 63 61 62
3	34 35 23 49 40 6 12	1 41 4 17 2 7 13 40 9	49 50 10 13 40 14 8
4	22 24 37	3 10 16 12 42	1 17 41 2 4 7 15 16 3 42
5	3 42 17	18 57	25 26 20 11
6	33 46	37 50 49 31 8 56 61 52 28 44	34 35 29
7	39	19 29 35 34	55 64 54 60 59
8	36	23 45 38	31 37 38 33 36 45
9	19	39 46	39 46
10	26	06	5 9
11	-	15	23
12	-	33	52
13	-	24	6
14	-	63	12
15	-	14	56
16	-	36	19
17	-	5	-

Quadro 12 – Descrição dos indivíduos agrupados pelo método de otimização de Tocher com base nas distâncias de Mahalanobis (D^2) e índice de dissimilaridade dos dados binário (D e D'), para os caracteres contínuos, multicategóricos e fenotípicos binários, especificando as respectivas populações de origem (Pop), ordem dentro do grupo (Ord) e dissimilaridade média ($D_{(md)}$) em 64 indivíduos de fáfia (Ind)

Grupos		Contínuos			Grupos		Multicategóricos			Grupos		Fenotípicos binários		
(Tocher)	Ind	Pop	Ord	$D^2_{(md)}$	(Tocher)	Ind	Pop	Ord	$D_{(md)}$	(Tocher)	Ind	Pop	Ord	$D'_{(md)}$
1	54	4	1	220,75	1	30	3	1	3,75	1	30	3	1	10,64
1	64	4	2	220,88	1	32	3	2	3,75	1	32	3	2	10,64
1	55	4	3	286,31	1	43	2	3	3,71	1	43	2	3	10,64
1	61	4	4	168,13	1	51	3	4	4,43	1	58	4	4	11,00
1	53	3	5	136,60	1	21	2	5	3,68	1	27	2	5	10,72
1	38	3	6	141,49	1	47	2	6	3,75	1	22	2	6	10,97
1	29	2	7	172,76	1	48	2	7	3,75	1	57	4	7	11,61
1	18	2	8	188,07	1	11	1	8	4,32	1	24	2	8	11,95
1	31	3	9	282,97	1	25	2	9	4,21	1	18	2	9	11,83
1	30	3	10	148,11	1	27	2	10	4,05	1	21	2	10	10,36
1	43	2	11	168,84	1	22	2	11	4,17	1	53	3	(11)	10,84
1	27	2	12	206,13	1	53	3	12	4,05	2	47	2	1	10,27
1	59	4	13	121,33	1	20	2	13	4,48	2	48	2	2	10,17
1	21	2	14	130,66	1	58	4	(14)	4,33	2	28	2	3	10,58
1	62	4	15	107,39	2	54	4	1	4,78	2	44	2	4	10,86
1	57	4	16	130,59	2	55	4	2	4,78	2	51	3	5	11,13
1	58	4	17	115,51	2	64	4	3	4,62	2	63	4	6	11,66
1	32	3	18	143,88	2	62	4	4	4,59	2	61	4	7	11,36
1	60	4	19	116,38	2	26	2	5	4,40	2	62	4	(8)	11,50
1	52	3	(20)	106,33	2	60	4	6	4,56	3	49	3	1	11,13
2	4	1	1	138,36	2	59	4	(7)	5,06	3	50	3	2	11,03
2	16	1	2	148,16	3	1	1	1	4,86	3	10	1	3	11,94
2	11	1	3	166,19	3	41	1	2	4,76	3	13	1	4	11,83
2	1	1	4	165,10	3	4	1	3	4,51	3	40	3	5	11,16
2	5	1	5	183,78	3	17	1	4	4,78	3	14	1	6	12,39
2	45	2	6	166,24	3	2	1	5	4,92	3	8	1	(7)	11,42
2	8	1	7	196,69	3	7	1	6	4,62	4	1	1	1	11,52
2	41	1	8	243,97	3	13	1	7	4,67	4	17	1	2	11,44
2	25	2	9	136,04	3	40	3	8	4,05	4	41	1	3	11,45
2	13	1	10	166,59	3	9	1	(9)	5,14	4	2	1	4	11,61
2	14	1	11	181,50	4	3	1	1	4,81	4	4	1	5	11,08
2	2	1	12	179,75	4	10	1	2	4,90	4	7	1	6	11,16
2	15	1	13	183,20	4	16	1	3	4,83	4	15	1	7	12,16
2	10	1	14	161,42	4	12	1	4	4,54	4	16	1	8	11,52
2	20	2	15	135,18	4	42	1	(5)	4,68	4	3	1	9	11,47
2	50	3	16	142,09	5	18	2	1	5,02	4	42	1	(10)	11,34
2	51	3	17	183,94	5	57	4	2	4,98	5	25	2	1	11,22
2	9	1	18	119,90	6	37	3	1	4,75	5	26	2	2	11,41
2	28	2	19	124,45	6	50	3	2	4,05	5	20	2	3	11,08
2	44	2	20	184,73	6	49	3	3	4,14	5	11	1	(4)	10,95
2	63	4	21	118,55	6	31	3	4	4,70	6	34	3	1	11,39
2	47	2	22	213,95	6	8	1	5	4,57	6	35	3	2	11,64
2	7	1	23	215,34	6	56	4	6	4,25	6	29	2	(3)	11,94
2	48	2	24	226,50	6	61	4	7	4,70	7	55	4	1	11,53
2	56	4	(25)	117,63	6	52	3	8	4,17	7	64	4	2	11,56
3	34	3	1	145,63	6	28	2	9	4,03	7	54	4	3	11,56
3	35	3	2	145,38	6	44	2	(10)	4,10	7	60	4	4	11,13
3	23	2	3	142,22	7	19	2	1	4,73	7	59	4	(5)	11,69
3	49	3	4	141,29	7	29	2	2	4,78	8	31	3	1	11,95
3	40	3	5	130,03	7	35	3	3	4,54	8	37	3	2	11,88
3	6	1	6	146,56	7	34	3	(4)	4,35	8	38	3	3	11,98
3	12	1	(7)	146,04	8	23	2	1	4,67	8	33	3	4	11,78
4	22	2	1	476,95	8	45	2	2	4,32	8	36	3	(5)	12,17
4	24	2	2	403,29	8	38	3	(3)	4,67	8	45	2	1	11,36
4	37	3	(3)	357,09	9	39	3	1	4,22	9	39	3	2	11,55
5	3	1	1	263,21	9	46	2	(2)	4,17	9	46	2	(3)	11,25
5	42	1	2	310,36	10	6	1	(1)	5,03	10	5	1	1	13,28
5	17	1	(3)	222,57	11	15	1	(1)	5,48	10	9	1	(2)	12,27
6	33	3	1	321,08	12	33	3	(1)	4,59	11	23	2	(1)	11,67
6	46	2	(2)	228,49	13	24	2	(1)	5,14	12	52	3	(1)	11,44
7	39	3	(1)	267,29	14	63	4	(1)	5,29	13	6	1	(1)	12,00
8	36	3	(1)	189,59	15	14	1	(1)	5,27	14	12	1	(1)	11,39
9	19	2	(1)	138,15	16	36	3	(1)	5,08	15	56	4	(1)	10,83
10	26	2	(1)	165,34	17	5	1	(1)	6,40	16	19	2	(1)	11,36

Pop: populações; 1 - rio Ivaí; 2 - Ilha do Mineiro; 3- Baitaporã; 4 - Vila Alta.

Quadro 13 – Agrupamento pelo método de otimização de Tocher com base nas distâncias obtidas pelo índice de dissimilaridade de Nei e Li, mediante avaliação dos caracteres contínuos, multicategóricos e fenotípicos binários de quatro populações de fáfia

Grupos	Caracteres		
	Contínuos	Multicategóricos	Fenotípicos binários
1	2 3	2 3 4	2 3 4
2	4	1	1
3	1	-	-

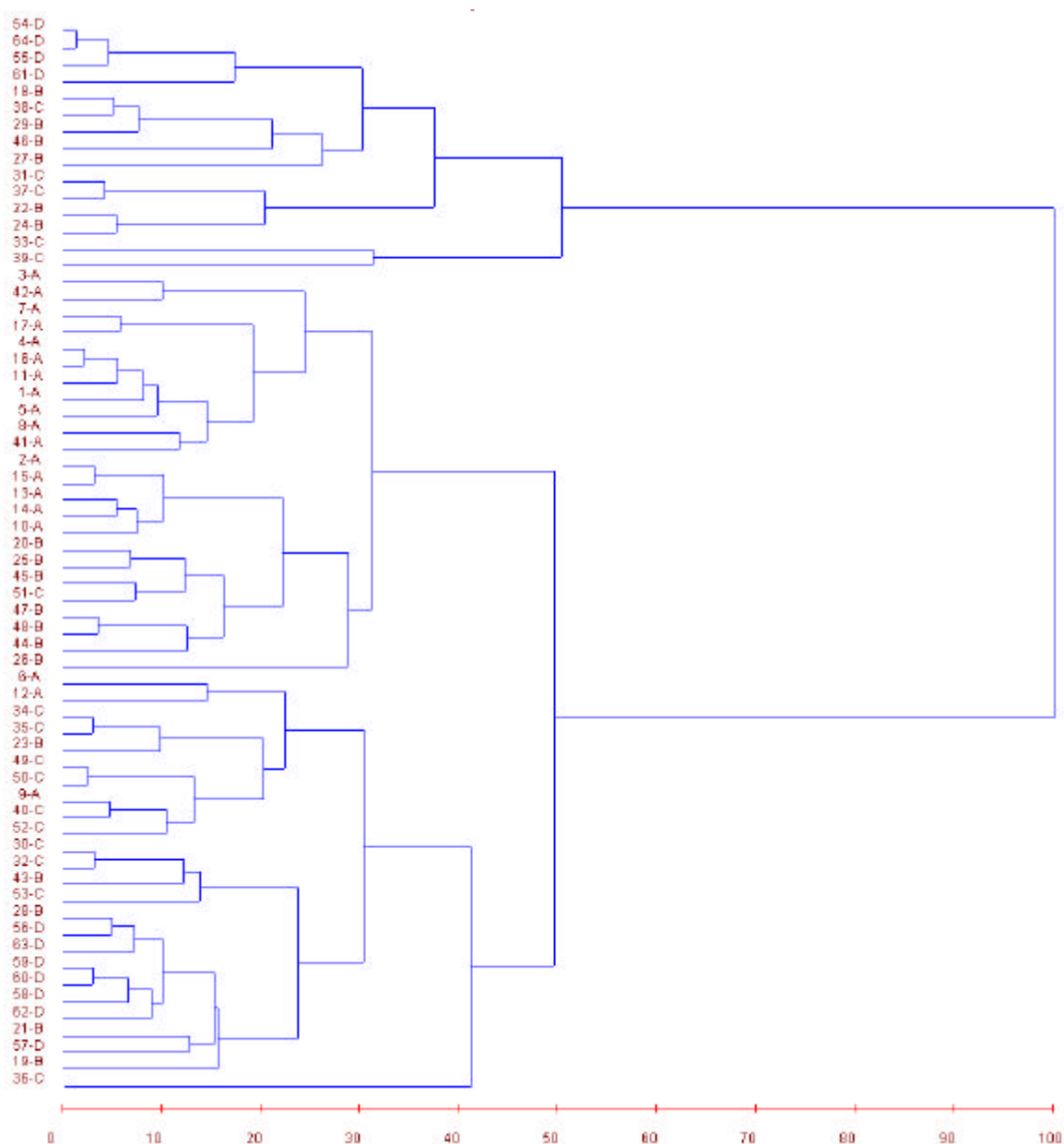


Figura 7 - Dendrograma da análise de agrupamento pelo método hierárquico UPGMA, com base na matriz de dissimilaridade determinada pelas distâncias de Mahalanobis dos caracteres de variáveis contínuos avaliados em 64 indivíduos de fáfia. Populações: A) população 1, rio Ivaí; B) população 2, Ilha do Mineiro; C) população 3, Baitaporã; e D) população 4, Vila Alta.

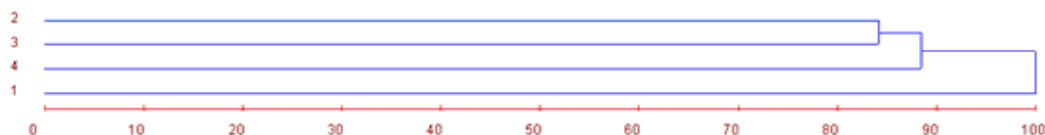


Figura 8 - Dendrograma da análise de agrupamento pelo método hierárquico UPGMA, com base nas distâncias obtidas pelo índice de dissimilaridade de Nei e Li, mediante avaliação dos caracteres de variáveis contínuas de quatro populações de fáfia.

3.2.4. Estudo dos caracteres

3.2.4.1. Metodologia de Singh

O caráter dias para abertura da flor demonstrou a maior contribuição relativa (51,93%) em relação à variação total dos caracteres contínuos (Quadro 14), em 64 indivíduos de fáfia. Na seqüência foi atribuída uma contribuição de 7,60 e 6,77% nos caracteres índice de colheita e teor de -ecdisona, respectivamente.

Quadro 14 – Contribuição relativa dos caracteres ($S_{.j}$), média geral (Md), e estimativas dos coeficientes de determinação genotípica (H^2) em 64 indivíduos de fáfia (T64) e dentro de cada população (P1, P2, P3 e P4)

Caráter	SINGH ($S_{.j}$)					Média geral					Coef. det. genotípica – H^2				
	T64	P1	P2	P3	P4	T64	P1	P2	P3	P4	T64	P1	P2	P3	P4
MFC	0,1857	0,086	2,748	0,001	2,218	1.083,0	903,6	1.180,7	1.163,7	1.115,60	88,31	89,95	86,72	91,15	42,59
MSC	4,777	0,045	4,897	0,003	0,639	380,98	300,89	425,66	410,47	403,29	89,03	86,75	86,73	91,94	38,61
MFR	5,172	0,135	4,523	0,002	16,104	451,96	19,45	400,02	1588,20	367,29	90,52	86,75	77,31	91,98	82,21
MSR	5,062	0,198	4,984	0,000	9,719	135,13	18,71	121,62	177,66	109,60	90,31	88,30	70,89	92,05	73,98
ALT	3,333	0,074	0,429	0,005	2,272	270,26	5,13	267,35	277,43	294,72	91,02	92,06	85,93	92,98	70,72
AF	51,938	39,010	42,850	49,998	40,563	135,75	2,12	140,42	145,31	149,03	99,25	97,65	99,47	98,72	97,98
S90	1,435	49,380	4,685	39,407	8,056	201,36	1,89	203,48	214,31	200,33	97,27	96,58	96,56	94,67	89,22
IAS	4,883	10,720	18,850	10,566	11,769	65,58	4,59	62,99	69,00	51,30	96,57	81,18	95,87	96,85	95,58
NC	0,878	0,009	0,138	0,001	0,899	7,82	6,31	8,42	9,71	6,69	82,20	73,10	71,95	82,14	49,68
DC	0,980	0,031	0,288	0,002	1,217	13,17	13,31	13,34	12,62	13,47	71,25	73,67	33,12	86,26	71,06
DE	4,178	0,011	5,849	0,006	1,244	172,98	211,80	156,44	172,56	148,09	92,68	87,81	94,51	94,43	67,73
IC	7,602	0,193	2,377	0,002	1,189	0,2600	0,2969	0,2280	0,3040	0,2152	94,43	93,47	91,43	94,36	81,78
20E	6,774	0,084	4,667	0,003	0,909	0,51	0,61	0,44	0,51	0,46	93,56	87,90	93,30	87,00	89,33
RL	2,804	0,018	2,709	0,004	3,201	2,71	2,72	2,512	2,70	3,05	88,86	69,93	88,54	93,80	94,28

MFC: matéria fresca do caule; MSC: matéria seca do caule; MFR: matéria fresca da raiz; MSR: matéria seca da raiz; ALT: altura da planta; AF: dias para abertura da flor; S90: dias para senescência de 90% das folhas; IAS: intervalo entre abertura da flor e senescência de 90% da folha; NC: número de caules verticais; DC: diâmetro do caule; DE: distância dos entrenós; IC: índice de colheita; 20E: teor de -ecdisona; e RL: relação comprimento largura do limbo.

Na análise individual das populações (Quadro 14), observou-se que a contribuição das características foi notavelmente diferente, em que o teor de 20E apresentou baixíssima contribuição (0,003%) na população 3. Essa grande discrepância observada entre valores obtidos nas populações e no conjunto de 64 indivíduos está coerente com a alta divergência detectada entre as populações. Nas populações 1 e 3, observa-se que a contribuição dos caracteres limitou-se, basicamente, as características AF, S90 e IAS. A população 1 apresentou maior média no teor de 20E (Quadro 14), no entanto a variação desta característica estimada pela metodologia de Singh foi baixa (0,084) demonstrando um predomínio para elevado teor de 20E entre os indivíduos dessa população. De modo geral, as estimativas do coeficiente de determinação genotípica apresentaram valores que atribuem confiabilidade ao controle da variação de origem não-genética.

3.2.4.2. Correlação de Pearson

Valores significativos ($p < 0,05$ e $0,01$) de correlações para teor de -ecdisona (20E) foram detectados em quatro caracteres (Quadro 15), no entanto foram de baixas magnitudes. Observaram-se considerável correlação negativa ($-0,2678$) e significativa ($p < 0,01$) entre os caracteres número de dias para início da abertura da flor (AF) e teor 20E, onde algumas plantas com baixo AF tiveram aumento no acúmulo de 20E até a data da colheita (271 dias). Também, foi observada correlação positiva e significativa ($p < 0,01$) entre 20E e intervalo da antese até a senescência de 90% da folhas (IAS), mostrando que houve pequena correlação (0,2226) no incremento do teor 20E e aumento do período de florescimento na presença de folhas. A correlação de 0,4199, detectada entre 20E x distância entrenó (Quadro 16), indicou que indivíduos de caules mais alongados entre o 3° e o 4° entrenó tiveram média correlação no aumento do teor de 20E. No entanto, esses valores ainda são de pequena importância para recomendação de critérios visando à coleta de germoplasma para seleção de 20E, sendo coerente considerar esses resultados como uma tendência da associação dos caracteres de variáveis contínuos na população estudada.

Das correlações significativas, os caracteres que apresentaram maior valor (0,9757) foi entre matéria fresca da raiz (MFR) x matéria seca da raiz (MSR). Esse resultado indica que é dispensável avaliar as duas características no estudo da diversidade desses indivíduos, pois a correlação foi próxima de 1. A segunda correlação de maior valor (0,9070) foi observada entre os caracteres matéria fresca do caule (MFC) x matéria seca do caule (MSC). Na situação em que é necessário reduzir o número de caracteres será

recomendável desconsiderar o caráter MFC, uma vez que sua contribuição relativa pela metodologia de Singh foi baixa (0,1847). O caráter que apresentou, em média, maior correlação entre os caracteres contínuos foi o número de dias para atingir a senescência de 90% das folhas (S90). Esse resultado demonstra a importância da área foliar para o desenvolvimento da fáfia, que possivelmente está associada à fotossíntese e ao metabolismo das substâncias de reserva. Técnicas de cultivo que contribuem para ampliar o período de permanência da área foliar, como época de plantio, irrigação, luminosidade e adubação, dentre outras, podem favorecer os caracteres de maior correlação com S90, inclusive a produção de 20E, que teve uma correlação negativa de 0,1758 ($p < 0,05$).

A avaliação entre os indivíduos estudados não demonstrou correlação significativa entre teor de 20E e produção de matéria seca da raiz. A amplitude do teor de 20E oscilou entre 0,31 e 0,75%, sendo a média estimada em 0,51%. Os indivíduos da população 1 apresentaram os maiores valores de 20E. Na produção de matéria seca da raiz foram encontrados valores entre 58,15 e 326,21 g/planta, sendo a média de 135 g e, os indivíduos mais produtivos foram os da população 3.

Quadro 15 – Correlação simples entre os caracteres contínuos calculados pelo coeficiente de correlação de Pearson, em 64 indivíduos de fáfia

	MFC	MSC	MFR	MSR	ALT	AF	S90	IAS	NC	DC	DE	IC	20E
MSC	0,907 **												
MFR	0,1071	0,1019											
MSR	0,1043	0,1243	0,9757 **										
ALT	0,5375 **	0,5498 **	-0,1250	-0,1144									
AF	0,5682 **	0,5264 **	0,1819 *	0,1870 **	0,4294 **								
S90	0,5317 **	0,5532 **	0,4417 **	0,4690 **	0,2728 **	0,7145 **							
IAS	-0,3257 **	-0,2468 **	0,1246 *	0,1601 *	-0,3625 **	-0,7723 **	-0,1076						
NC	0,3713 **	0,3450 **	0,1895 **	0,1870 **	-0,0137	0,2889 **	0,3651 **	-0,788					
DC	0,3567 **	0,3196 **	-0,1398	-0,1537 *	0,3228 **	0,0133	-0,0612	-0,751	-0,4708 **				
DE	-0,2230 **	-0,2043 **	-0,2516 **	-0,2652 **	0,0538	-0,5208 **	-0,4604 **	0,3209 **	-0,3394 **	0,2054 **			
IC	-0,4987 **	-0,5406 **	0,7275 **	0,7324 **	-0,4886 **	-0,1964 **	0,0111	0,2899 **	-0,0543	-0,3343 **	-0,0842		
20E	-0,0917	-0,0898	-0,1206	-0,1364	-0,0044	-0,2678 **	-0,1758 *	0,2226 **	-0,1307	0,1369	0,4199 **	-0,395	
RL	-0,2010 **	-0,1923 **	-0,2088 **	-0,2123 **	0,0763	-0,0818	-0,0799	0,0452	-0,0293	-0,2323 **	0,0089	-0,0723	-0,0424

(**) e (*) significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente pelo teste t.

3.3. Divergência genética avaliada pelos caracteres multicategóricos

3.3.1. Dissimilaridade entre 64 indivíduos

A divergência genética dos caracteres multicategóricos, obtidos pelo índice de dissimilaridade dos dados binários, demonstrou que os indivíduos 5 e 15 foram pertinentes

nas combinações dos pares que apresentaram maiores medidas de dissimilaridade (Quadro 16). Os indivíduos 5 e 15 foram os que exibiram maiores médias de dissimilaridade (Quadro 7), ressaltando-se que o indivíduo 5 também se destacou, com alta dissimilaridade dos caracteres contínuos. Em todos os pares de máxima dissimilaridade ocorreu predomínio entre os indivíduos da população 1 e da população 3, diferenciado dos caracteres contínuos.

Entre os pares de menor dissimilaridade, observaram-se três combinações, em que a distância foi nula (0), ou seja, os indivíduos não demonstraram diferença com relação às variáveis multicategóricas avaliadas entre si (Quadro 16). Esses pares formados pelos indivíduos 30 x 32, 47 x 48 e 54 x 55 também foram observados entre os pares de menor dissimilaridade dos caracteres contínuos (Quadro 6). De modo geral, notou-se o mesmo padrão de combinação dos pares de indivíduos obtidos nos caracteres contínuos, em que as maiores distâncias foram encontradas entre indivíduos de diferentes populações e os menores, entre aqueles da mesma população. No entanto, os indivíduos pertinentes na combinação dos pares foram diferentes.

Quadro 16 – Pares de indivíduos que obtiveram valores extremos de maior e menor medida de dissimilaridade dos caracteres multicategóricos (D), calculadas com base no índice de dissimilaridade dos dados binários

Ordem	Maiores distâncias			Menores distâncias		
	indivíduos	Populações	D	indivíduos	Populações	D
1	5 x 21	1 x 2	8	30 x 32	3 x 3	0
2	5 x 28	1 x 2	8	47 x 48	2 x 2	0
3	5 x 30	1 x 3	8	54 x 55	4 x 4	0
4	5 x 31	1 x 3	8	25 x 20	2 x 2	1
5	5 x 33	1 x 3	8	25 x 26	2 x 2	1
6	5 x 32	1 x 3	8	25 x 47	2 x 2	1
7	5 x 37	1 x 3	8	25 x 48	2 x 2	1
8	5 x 39	1 x 3	8	25 x 57	2 x 4	1
9	5 x 43	1 x 2	8	43 x 21	2 x 2	1
10	5 x 50	1 x 3	8	43 x 30	2 x 2	1
11	5 x 51	1 x 3	8	22 x 27	2 x 2	1
12	5 x 44	1 x 3	8	4 x 41	1 x 1	1
13	5 x 53	1 x 3	8	17 x 41	1 x 1	1
14	5 x 61	1 x 4	8	64 x 54	2 x 2	1
15	5 x 62	1 x 4	8	49 x 50	3 x 3	1
16	5 x 63	1 x 4	8	59 x 60	4 x 4	1
17	15 x 25	1 x 2	8	55 x 64	4 x 4	1
18	15 x 26	1 x 2	8	10 x 3	1 x 1	1
19	15 x 38	1 x 3	8	40 x 7	3 x 1	1
20	15 x 57	1 x 4	8	2 x 13	1 x 1	1

Populações: 1 - rio Ivaí; 2 - Ilha do Mineiro; 3 - Baitaporã; 4 - Vila Alta.

3.3.2. Dissimilaridade das populações

Os valores de dissimilaridade das populações, em geral, apresentaram menor magnitude e pequenas diferenças em relação aos caracteres contínuos (Quadro 9). Essa baixa variação dentro das populações pode estar relacionada ao número de caracteres, forma de expressão e quantificação do fenótipo. A delimitação e quantificação dos fenótipos multicategóricos geralmente não atribuem valores que de fato abrangem todas as categorias, sendo nesse aspecto mais vulneráveis aos erros de efeito não-ambiental.

A população 1 apresentou maior medida de dissimilaridade (0,4898). No entanto, esse valor não se destacou nitidamente da segunda maior dissimilaridade (0,4773) obtida pela população 4. Tais resultados diferem do obtido nos caracteres contínuos, em que se observou maior dissimilaridade na população 2

A dissimilaridade entre as populações (Quadro 10) demonstrou semelhante resultados dos caracteres contínuos. Apesar de menor dissimilaridade das populações, as comparações entre os pares de população resultaram em similar magnitude e hierarquia de dissimilaridade, portanto serão consideradas as mesmas discussões dos caracteres contínuos para preservação e coleta das populações.

3.3.3. Agrupamento dos indivíduos e populações pelos métodos de otimização de Tocher e UPGMA

O método de otimização de Tocher distribuiu os 64 indivíduos em 17 grupos (Quadro 11) sendo em dois grupos incluídos 24 indivíduos (37,5%). O grupo 1 foi composto por 14 indivíduos oriundos das quatro populações (Quadro 12). No segundo maior grupo, reuniram-se 10 indivíduos, tendo representantes de todas as populações. Os demais grupos foram constituídos por 7, 9, 4, 3, 2 e 1. Um grupo foi formado por cinco indivíduos exclusivos da população 1. Oito grupos foram constituídos por único indivíduo, oriundos da população 1 (indivíduos 06, 15, 14 e 05), população 2 (indivíduo 24), população 3 (indivíduos 33 e 36) e população 4 (indivíduo 63). Esse maior número de grupos em relação aos caracteres contínuos pode estar relacionado com a menor variação da amplitude das distâncias médias dos indivíduos (Quadro 7), o que favorece a formação de grupos com menores distâncias. Em estudo realizado com 29 acessos de batata-baroa envolvendo 10 caracteres quantitativos e quatro qualitativos, Granate et al. (2004) observaram aumento no número de grupos de quatro para sete no método de Tocher, após a exclusão da testemunha de elevada dissimilaridade.

O agrupamento das quatro populações formou dois grupos (Quadro 13). As populações 2, 3 e 4 foram incluídas no mesmo grupo, e a população 1 destacou-se, constituindo isoladamente o segundo grupo. Nessa análise, os caracteres multicategóricos demonstraram menores distâncias da população 4, considerando-se que esta população foi incluída isoladamente num grupo de dissimilaridade para os caracteres de variáveis contínuas.

No agrupamento de 64 indivíduos pelo método hierárquico UPGMA (Figura 9), foram delimitados 13 grupos, considerando-se uma dissimilaridade relativa de 55,0% no ponto de delimitação dos grupos. Os três maiores grupos foram constituídos por 10, 10 e 13 indivíduos (51,6%), incluindo indivíduos das populações 2 e 4 e de todas as populações, sendo os demais grupos constituídos por 5, 4, 3, 2 e 1 indivíduos. Dois grupos foram constituídos por indivíduos exclusivos da população 1 (5 indivíduos) e população 4 (4 indivíduos). Três grupos foram constituídos por único indivíduo oriundo da população 1 (indivíduos 05, 15 e 14). Esses indivíduos agrupados isoladamente também apresentaram as maiores médias de dissimilaridade (Quadro 7). Os pares que apresentaram distâncias nulas (30 x 32; 54 x 55; 47 x 48) foram incluídas no mesmo grupo. No agrupamento das populações (Figura 10) foi possível observar que as populações 2 e 3 apresentaram maior similaridade em relação às populações 3 e 4.

3.4. Divergência genética avaliada pelos caracteres fenotípicos binários

3.4.1. Dissimilaridade entre 64 indivíduos

As medidas de dissimilaridade dos caracteres fenotípicos binários (Apêndice 3) foram obtidas a partir de uma única matriz originada pelo conjunto de caracteres contínuos e multicategóricos calculado pelo índice de dissimilaridade dos dados binários. Os pares de indivíduos 7 x 38 e 32 x 30 apresentaram a maior e a menor dissimilaridade, respectivamente (Quadro 17). Os resultados não apontaram predomínio de indivíduos nos pares de maior distância, como observado na avaliação individual dos grupos de caracteres anteriores. No entanto, indivíduos da população 1 (01, 02, 04, 05, 07, 09, 14, 15 e 17) estiveram entre todos os pares de maior dissimilaridade. As maiores médias de dissimilaridade foram encontradas nos indivíduo 5, 14 e 9 (Quadro 7), sendo o indivíduo 5 o único que se destacou nos três grupos de caracteres.

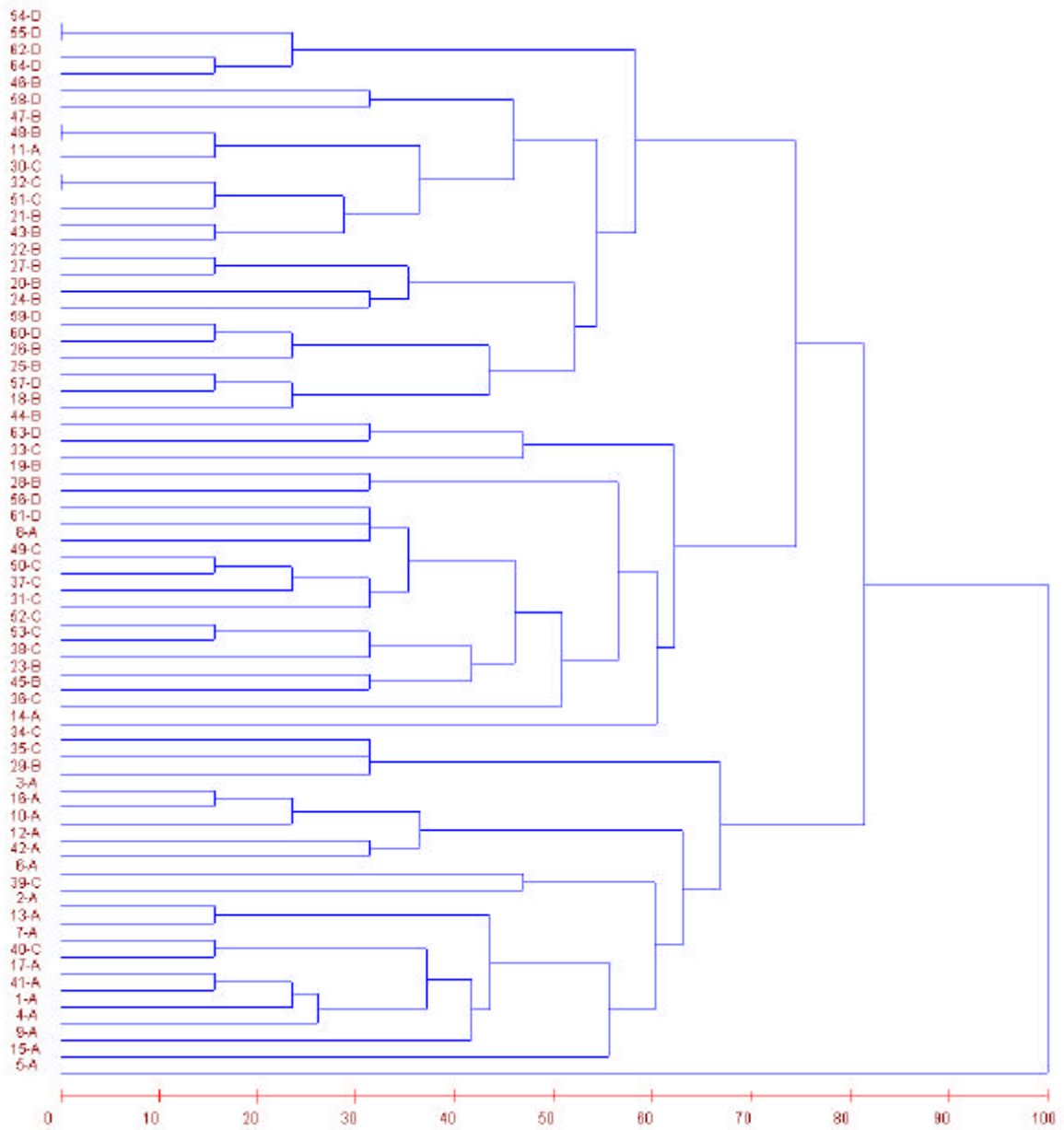


Figura 9 - Dendrograma da análise de agrupamento pelo método hierárquico UPGMA, com base na matriz de distâncias determinada pelo índice de dissimilaridade dos dados binários dos caracteres multicategóricos, avaliados em 64 indivíduos de fáfia. Populações: A) população 1, rio Ivaí; B) população 2, Ilha do Mineiro; C) população 3, Baitaporã; e D) população 4, Vila Alta.

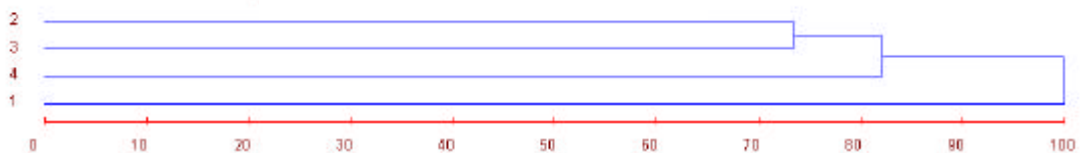


Figura 10 - Dendrograma da análise de agrupamento pelo método hierárquico UPGMA, com base nas distâncias obtidas pelo índice de dissimilaridade de Nei e Li, mediante avaliação dos caracteres multicategóricos em quatro populações de fáfia.

Entre os pares de indivíduos de menor dissimilaridade, observou-se, novamente, que os pares 32 x 30, 47 x 48, 49 x 50 foram coincidentes nos três grupos de caracteres, e o par 32 x 30 teve valor nulo, assim como na análise das variáveis multicategóricas.

No Quadro 18, mostram-se as medidas de dissimilaridade estimadas pelos caracteres fenotípicos binários entre os indivíduos que apresentaram maiores médias de 20E e MSR, como um possível critério de seleção dos genitores para melhoramento da espécie. A menor dissimilaridade estimada entre os indivíduos 12 x 06, 06 x 03, 42 x 40 indicou-as como uma combinação promissora. O par de indivíduos 12 x 06 demonstrou o mesmo resultado dos caracteres contínuos, sendo indispensável a inclusão desses indivíduos nos demais critérios de escolha de genitores.

Quadro 17 – Pares de indivíduos que obtiveram valores extremos de maior e menor medida de dissimilaridade dos caracteres fenotípicos binários (D'), calculados com base no índice de dissimilaridade dos dados binários

Ordem	Maiores distâncias			Menores distâncias		
	Indivíduos	Populações	D'	Indivíduos	Populações	D'
1	7 x 38	1 x 3	21	32 x 30	3 x 3	0
2	29 x 2	2 x 1	20	47 x 48	2 x 2	1
3	9 x 18	1 x 2	20	49 x 50	3 x 3	1
4	29 x 2	2 x 1	20	17 x 1	1 x 1	2
5	33 x 42	3 x 1	20	17 x 2	1 x 1	2
6	24 x 1	2 x 1	19	7 x 41	1 x 1	2
7	37 x 1	3 x 1	19	25 x 26	2 x 2	2
8	38 x 1	3 x 1	19	30 x 43	3 x 2	2
9	38 x 4	3 x 1	19	32 x 43	3 x 2	2
10	5 x 61	1 x 4	19	41 x 1	1 x 1	2
11	5 x 62	1 x 4	19	41 x 2	1 x 1	2
12	7 x 33	1 x 3	19	41 x 17	1 x 1	2
13	14 x 30	1 x 3	19	27 x 22	2 x 2	3
14	14 x 32	1 x 3	19	34 x 35	3 x 3	3
15	14 x 43	1 x 2	19	59 x 60	4 x 4	3
16	15 x 37	1 x 3	19	55 x 64	4 x 4	3
17	15 x 38	1 x 3	19	22 x 24	2 x 2	3
18	17 x 24	1 x 2	19	27 x 58	2 x 4	4
19	17 x 38	1 x 3	19	28 x 44	2 x 2	4
20	24 x 7	2 x 1	19	31 x 37	3 x 3	4

Quadro 18 – Medidas de dissimilaridade calculadas com base no índice de dissimilaridade dos binários que obtiveram maiores médias dos caracteres produção de - ecdisona (20E) e matéria seca da raiz (MSR)

Indivíduo MSR (g)	Indivíduo – Produção de 20E (%)			
	03 (0,7493)	12 (0,7485)	42 (0,7461)	05 (0,7461)
33 (326,21)	17	10	20	17
39 (255,75)	15	13	16	18
06 (230,75)	12	10	14	14
40 (219,27)	10	12	10	11

3.4.2. Dissimilaridade das populações

A população 2 apresentou maior medida de dissimilaridade (0,5060), assim como observado nos resultados dos caracteres contínuos (Quadro 9). Na seqüência, as populações 4, 1 e 3 exibiram a ordem decrescente de dissimilaridade das populações. Nos resultados da avaliação das distâncias entre as populações (Quadro 10), observaram maior dissimilaridade na comparação entre as populações 1 x 4 e menor entre as populações 2 x 3. Esses resultados também confirmam que a diversidade é maior entre as populações e menor dentro delas. As possíveis aplicações ou interpretações desses resultados são as mesmas mencionadas nos caracteres contínuos.

3.4.3. Agrupamento dos indivíduos e populações pelos métodos de otimização de Tocher e UPGMA

O agrupamento dos indivíduos pelo método de otimização de Tocher resultou em 19 grupos (Quadro 11), sendo nos dois maiores incluídos 21 indivíduos (32,8%). O primeiro foi composto por 11 indivíduos oriundos das quatro populações (Quadro 12). No segundo, reuniram-se 10 indivíduos oriundos apenas da população 1. Os demais grupos foram constituídos por 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 e 1 indivíduos. Um grupo de cinco indivíduos foi constituído exclusivamente por indivíduos da população 4. Seis grupos foram constituídos por único indivíduo oriundo da população 1 (indivíduos 06 e 12), população 2 (indivíduos 23 e 19), e população 4 (indivíduos 54 e 56). Nesse agrupamento foi possível evidenciar a dissimilaridade entre as populações 1 e 4, pois esses formaram consideráveis grupos exclusivos (10 e 5 representantes) de seus indivíduos. No agrupamento das populações, observaram-se dois grupos (Quadro 13), em que as populações 2, 3 e 4 foram incluídas no mesmo grupo e a população 1 ficou isolada no segundo.

No método hierárquico UPGMA para agrupamento dos 64 indivíduos, foram descritos 12 grupos, em que foi considerada uma dissimilaridade relativa de 70,5% no ponto de delimitação dos grupos (Figura 11). Os dois maiores grupos foram constituídos por 11 e 11 indivíduos (34,8%), incluindo indivíduos de todas as populações e apenas da população 1, respectivamente. Os demais grupos foram formados por 9, 8, 7, 5, 3, 2 e 1 indivíduos. Um grupo foi constituído por indivíduos exclusivos da população 4 (5 indivíduos). Apenas um grupo foi constituído por um único indivíduo, oriundo da população 2 (indivíduo 19). Esse método de agrupamento também evidenciou maior dissimilaridade entre as populações 1 e 4. No agrupamento das populações (Figura 12) foi possível observar que as populações 2 e 3 apresentaram maior similaridade em relação às populações 1 e 4.

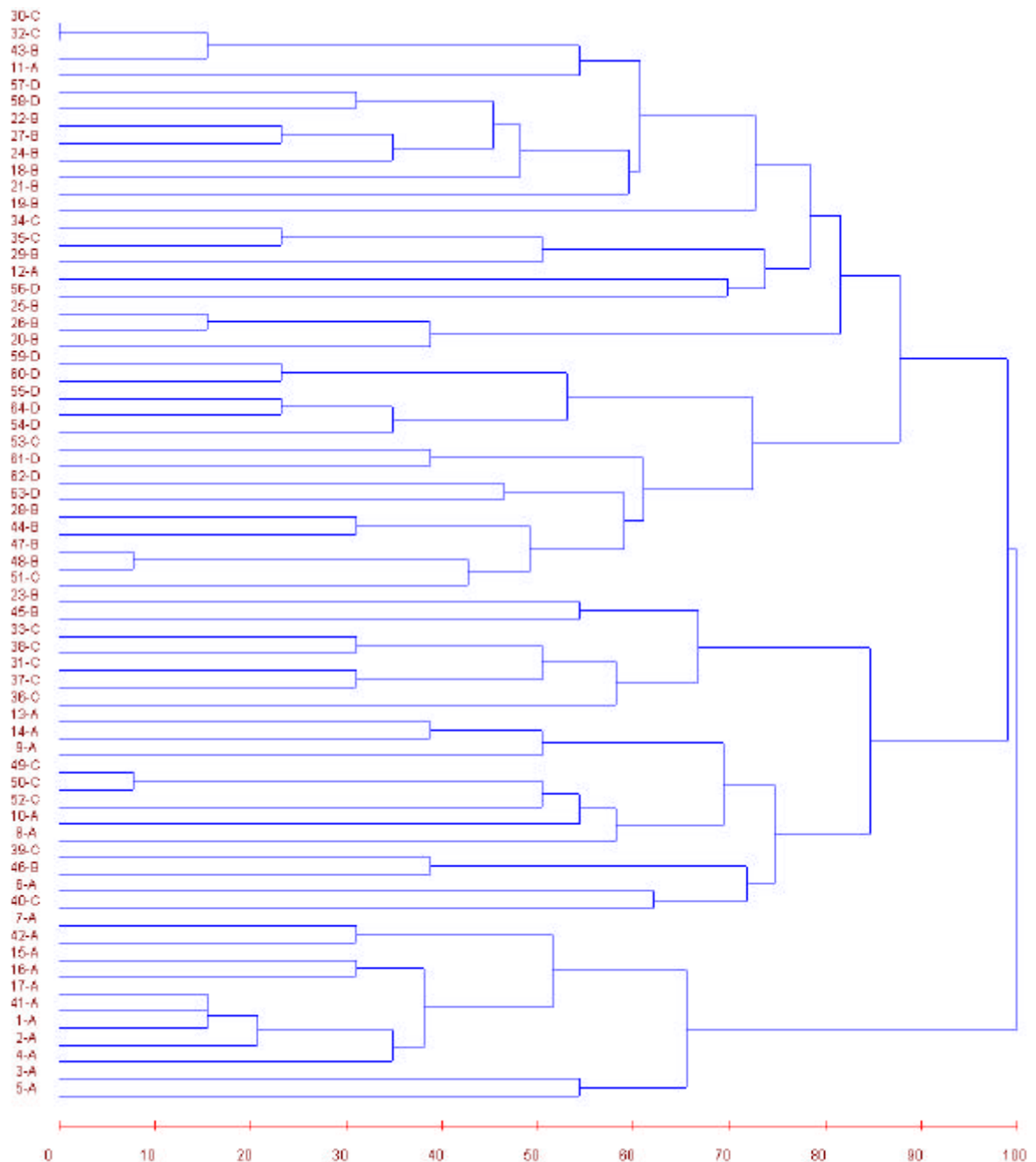


Figura 11 - Dendrograma da análise de agrupamento pelo método hierárquico UPGMA, com base na matriz de distâncias determinada pelo índice de dissimilaridade dos dados binários dos caracteres fenotípicos binários, avaliados em 64 indivíduos de fáfia. Populações: A) população 1, rio Ivaí; B) população 2, Ilha do Mineiro; C) população 3, Baitaporã; e D) população 4, Vila Alta.

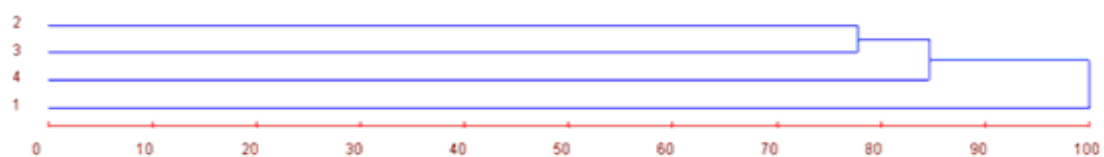


Figura 12 - Dendrograma da análise de agrupamento pelo método hierárquico UPGMA, com base nas distâncias obtidas pelo índice de dissimilaridade de Nei e Li, mediante avaliação dos caracteres fenotípicos binários em quatro populações de fáfia.

3.5. Correlação entre as matrizes de dissimilaridade

A estatística de Mantel (teste-Z) foi utilizada para verificar a correlação entre as matrizes de dissimilaridades obtidas dos grupos de caracteres contínuos, multicategóricos e fenotípicos binários. O resultado (Quadro 19), embora tenha sido significativo ($p < 0,01$), apresentou baixa correlação (0,1521), principalmente entre os caracteres contínuos e multicategóricos. A baixa correlação indica que as medidas de dissimilaridades em cada grupo de caracteres não representam a mesma distribuição nos indivíduos. No entanto, não se pode afirmar que o grupo de caracteres que demonstrou maior índice numérico possui os melhores caracteres (variabilidade) para avaliar os indivíduos. É possível que a baixa correlação seja mais uma informação de que os caracteres multicategóricos e contínuos são de importância distinta.

As correlações envolvendo a matriz fenotípica binária apresentaram maiores índices, uma vez que os dados foram obtidos pela junção de ambos os caracteres contínuos e multicategóricos. No entanto, observa-se que a correlação é maior (0,6441) entre multicategóricos x fenotípicos binários, o que pode ser explicado a origem comum dos dados binários. Na correlação entre caracteres contínuos e fenotípicos binários, tem-se uma matriz de variáveis contínuas e variáveis binárias que pode resultar numa considerável distorção.

Quadro 19 – Correlação entre as matrizes de dissimilaridade dos caracteres contínuos ($d_{(cont)}$), multicategóricos ($d_{(Mcat)}$) e fenotípicos binário ($d_{(fenot)}$)

Matriz	$d_{(cont)}$	$d_{(Mcat)}$	$d_{(fenot)}$
$d_{(cont)}$	1	0,1521 ⁺⁺	0,4291 ⁺⁺
$d_{(Mcat)}$		1	0,6441 ⁺⁺
$d_{(fenot)}$			1

⁽⁺⁺⁾ e ⁽⁺⁾ significativos a 1 e 5 % de probabilidade, pelo teste de Mantel baseado em 5.000 simulações.

4. CONCLUSÕES

Diante dos resultados, pode-se concluir que:

- A população 1 demonstrou maiores índices de dissimilaridade nas avaliações entre populações, indicando maior distância genética em relação às demais. No entanto, a população 2 apresentou maior índice de dissimilaridade dentro da população para os caracteres contínuos.

- Entre as populações amostradas, torna-se prioritário a preservação *in situ* da população 1, embora não tenha demonstrado maior dissimilaridade entre seus indivíduos, mas situa-se em local de intenso extrativismo e modificação da vegetação local.

- As populações 1 e 4 reúnem maior magnitude de dissimilaridade em relação às populações avaliadas individualmente. Portanto, a estratégia de preservar ambas as populações é recomendável.

- A maior dissimilaridade observada entre as populações em relação à dissimilaridade dentro das populações sugere que é possível aumentar a diversidade do banco de germoplasma, mediante amostragens de novas populações da região.

- A análise conjunta dos caracteres fenotípicos binários resultou em baixa correlação para os caracteres contínuos, sendo, portanto, útil apenas para estudos de diversidade quantitativa.

- O indivíduo 05 apresentou alta dissimilaridade para todos os grupos de caracteres e elevada média na produção de 20E (0,72%), sendo, assim, recomendável para uso em programas de melhoramento.

- A combinação entre os indivíduos 06 e 12 também demonstra potencial para inclusão nos trabalhos de melhoramento, uma vez que representam indivíduos que reúnem

alto teor de 20E e produção de matéria seca da raiz e, ainda, teve baixo valor de dissimilaridade pertencendo ambos à população 1.

- Não se observaram correlações em níveis desejados entre teor de 20E e demais caracteres contínuos.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE FÁFIA [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] COLETADAS NA REGIÃO DO RIO PARANÁ, MEDIANTE USO DE MARCADORES RAPD

1. INTRODUÇÃO

A constante pressão antrópica sob as florestas tropicais, seja pelo extrativismo, pela agricultura ou pelas ações ambientais criminosas, tem afetado o estabelecimento e a manutenção das populações naturais. Dessa forma, nos últimos anos se tornou de grande importância conhecer e estabelecer estratégias de conservação das populações naturais que ainda se encontram nos representativos biomas e, principalmente, ampliar as estratégias visando ao cultivo comercial das espécies de reconhecida importância econômica.

As diversas espécies denominadas fáfias, também popularmente conhecidas como “ginseng brasileiro”, pertencem à família Amaranthaceae e possuem ampla distribuição nas Américas Central e do Sul, sendo algumas de frequente ocorrência no território brasileiro (SIQUEIRA, 1988). O estudo da diversidade da *Pfaffia glomerata*, assim como o cultivo comercial, vem se tornando indispensável entre as espécies medicinais, em decorrência do crescente interesse da população pelos medicamentos fitoterápicos (MING

e CORREIA JÚNIOR, 2002). No entanto, a identificação e seleção dos genótipos de fáfia, por serem arbustos que requerem no mínimo oito meses para avaliação das principais características fenotípicas, necessitam de técnicas que otimizem essa etapa de avaliação.

Em várias espécies, basicamente se utilizam quatro tipos de marcadores na caracterização dos genótipos: morfológicos, bioquímicos, moleculares e citológicos. Os morfológicos são os mais utilizados até hoje devido à sua facilidade na obtenção e avaliação dos fenótipos. Entretanto, é um processo dependente do ciclo de desenvolvimento da planta e intensamente influenciado pelo ambiente, especialmente no caso dos genótipos não domesticados e que manifestam efeito da plasticidade fenotípica. O uso de marcadores moleculares tem gerado grandes expectativas, uma vez que podem ser usados em qualquer célula ou estágio de desenvolvimento das plantas, entretanto a baixa correlação entre os caracteres morfológicos e moleculares sugere a necessidade de mais estudo para tornar um marcador usual e eficiente nas avaliações da diversidade genética. O marcador molecular RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) é muito utilizado em populações naturais (LACERDA et al., 2001; STEINER e LOS SANTOS, 2001; GONZALEZ-RODRIGUES et al., 2004; VICCINI et al., 2004; BOLARIC et al., 2005; GOULART et al., 2005), pois podem detectar quantidade significativa de polimorfismo distribuída por todo o genoma amostrando (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Segundo Thormann et al. (1994), esse marcador é recomendável no estudo da divergência genética de indivíduos que estão próximos ou pertencem à mesma espécie. O uso de técnicas moleculares, como os marcadores baseados na amplificação de fragmentos aleatórios de DNA, representam as primeiras opções, principalmente pela quantidade de polimorfismo associado ao baixo custo e rapidez em obter os resultados (NYBOM, 2004; VICCINI et al., 2004; GOULART et al., 2005).

Nesse estudo, objetivou-se avaliar a diversidade genética de quatro populações oriundas da região do rio Paraná, mediante uso de marcadores RAPD, visando obter informações relacionadas à variabilidade genética e útil às ações de conservação e manejo da diversidade *in situ* das populações amostradas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Foram avaliados 64 indivíduos (Quadro 1) coletados em quatro populações de parte da região da bacia do rio Paraná, oriundos da coleção de germoplasma de plantas medicinais da Embrapa/Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen, Brasília). As populações foram coletadas nos Estados do Paraná e Mato Grosso do Sul, em locais de ocorrência natural das fáfias, sendo caracterizados por áreas de extrativismo e preservação permanente (Quadro 2 e Figura 1). As plantas foram estabelecidas e multiplicadas *in vitro* no laboratório Cultura de Tecidos do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), com os intuitos de obter material favorável à extração do DNA e promover a redução dos custos e riscos de preservação do germoplasma em condições de campo.

As plantas foram propagadas a partir de explantes apicais (caule) e segmentos nodais (0,5 - 1,0 mm) contendo uma gema, em meio cultura formulado pelas concentrações de sais MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) acrescidos de 30 g/L de sacarose, vitaminas (2,0 mg/L glicina, 0,5 mg/L ácido nicotínico, 0,5 mg/L piridoxina.HCl e 0,1 mg/L tiamina.HCl), 100 mg/L de mio-inositol e 6,5 g/L ágar (Merck, Alemanha). Posteriormente, o meio teve o pH ajustado ($5,7 \pm 0,1$), sendo autoclavado a 120 °C, 1,1 Pa por 20 minutos. Previamente à autoclavagem, alíquotas de 10 mL foram vertidas em tubos de ensaio (25 X 150 mm) vedados com tampas plásticas de polipropileno. As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura de $25 \pm 2^\circ$ C, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (2 lâmpadas fluorescentes, luz do dia especial, 20 W, Osram, Brasil). As culturas foram mantidas sob subcultivos a cada 60-90 dias.

Quadro 1 – Indivíduos avaliados no estudo da diversidade genética fáfia (*Pfaffia glomerata*)

indivíduo (referência)	Identifi- cação BG*	População	Localização	indivíduo (referência)	Identifi- cação BG*	População	Localização
1	2202-01	1	Rio Ivaí	33	2209-09	3	Baitaporã
2	2202-02	1	Rio Ivaí	34	2209-10	3	Baitaporã
3	2202-04	1	Rio Ivaí	35	2209-11	3	Baitaporã
4	2202-05	1	Rio Ivaí	36	2209-12	3	Baitaporã
5	2202-07	1	Rio Ivaí	37	2209-13	3	Baitaporã
6	2202-09	1	Rio Ivaí	38	2209-14	3	Baitaporã
7	2202-10	1	Rio Ivaí	39	2209-15	3	Baitaporã
8	2202-11	1	Rio Ivaí	40	2209-16	3	Baitaporã
9	2202-12	1	Rio Ivaí	41	2202-06	1	Rio Ivaí
10	2202-13	1	Rio Ivaí	42	2202-08	1	Rio Ivaí
11	2202-14	1	Rio Ivaí	43	2205-01	2	Ilha do Mineiro
12	2202-15	1	Rio Ivaí	44	2205-06	2	Ilha do Mineiro
13	2202-16	1	Rio Ivaí	45	2205-07	2	Ilha do Mineiro
14	2202-17	1	Rio Ivaí	46	2205-08	2	Ilha do Mineiro
15	2202-18	1	Rio Ivaí	47	2205-10	2	Ilha do Mineiro
16	2202-21	1	Rio Ivaí	48	2205-11	2	Ilha do Mineiro
17	2202-22	1	Rio Ivaí	49	2209-04	3	Baitaporã
18	2205-02	2	Ilha do Mineiro	50	2209-08	3	Baitaporã
19	2205-03	2	Ilha do Mineiro	51	2209-20	3	Baitaporã
20	2205-11	2	Ilha do Mineiro	52	2209-23	3	Baitaporã
21	2205-12	2	Ilha do Mineiro	53	2209-26	3	Baitaporã
22	2205-17	2	Ilha do Mineiro	54	2216-06	4	Vila Alta
23	2205-18	2	Ilha do Mineiro	55	2216-07	4	Vila Alta
24	2205-19	2	Ilha do Mineiro	56	2216-08	4	Vila Alta
25	2205-20	2	Ilha do Mineiro	57	2216-10	4	Vila Alta
26	2205-21	2	Ilha do Mineiro	58	2216-12	4	Vila Alta
27	2205-22	2	Ilha do Mineiro	59	2216-14	4	Vila Alta
28	2205-23	2	Ilha do Mineiro	60	2216-15	4	Vila Alta
29	2205-24	2	Ilha do Mineiro	61	2216-17	4	Vila Alta
30	2209-01	3	Baitaporã	62	2216-18	4	Vila Alta
31	2209-02	3	Baitaporã	63	2216-19	4	Vila Alta
32	2209-06	3	Baitaporã	64	2216-20	4	Vila Alta

BG*: Banco de Germoplasma / coleção de plantas medicinais do Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia

Quadro 2 – Descrição das populações de fáfia (*Pfaffia glomerata*) avaliadas no estudo da diversidade genética

Popu- lação	Qde. de indivíduos	Local de coleta	Coordenadas geográficas	Vegetação predominante
1	19	Querência do Norte, PR (beira do rio Ivaí)	Lat 23 ^o 13' 09,2" Long 53 ^o 34' 07,6" Alt. 233 m	Pastagem e vegetação nativa em regeneração
2	18	Querência do Norte, PR (Ilha do Mineiro)	Lat 23 ^o 07' 27" Long 53 ^o 38' 49,9" Alt. 239m	Vegetação nativa
3	16	Baitaporã, MS (entre Porto Primavera e São José, beira de estrada)	Lat 22 ^o 33' 24,1" Long 53 ^o 06' 13,9" Alt. 239 m	Vegetação nativa fragmentada
4	11	Vila Alta, PR (Parque Nacional Ilha Grande, Ilha do Marçal, Prainha,)	Lat 23 ^o 23' 09,7" Long 53 ^o 50' 02,1" Alt. 232 m	Vegetação nativa preservada em área de conservação

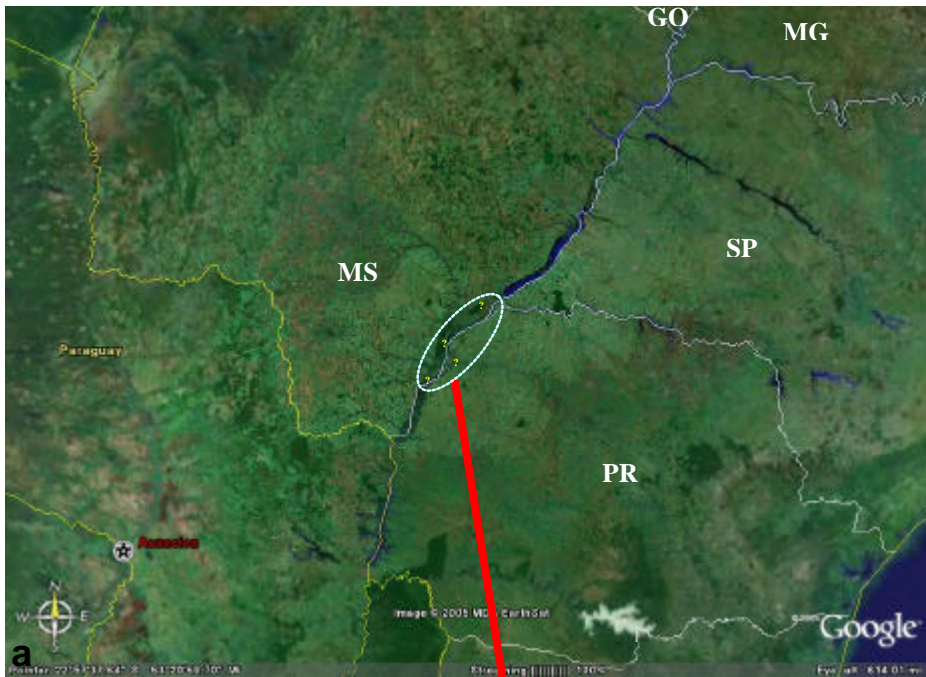


Figura 1- Localização georreferenciada das populações de fáfia e curso do rio Paraná: a) estados que contribuem com a formação do rio Paraná, iniciando-se em Minas Gerais/São Paulo (rio Grande) e Goiás/Minas Gerais (rio Paranaíba); b) coordenadas das populações coletadas.

2.2. Extração do DNA genômico

As amostras de DNA foram obtidas de folhas aos 25 e 30 dias após o recultivo das plantas *in vitro*. Todas as etapas das análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Patologia Florestal e Genética da Interação Planta – Patógeno, do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO).

O DNA foi extraído de acordo com o método descrito por Doyle e Doyle (1987), com algumas modificações. Cerca de quatro a seis folhas (100 a 150 mg) completamente desenvolvidas em condições *in vitro* foram maceradas após congelamento em nitrogênio líquido em tubos Eppendorf com capacidade para 1500 μ L. A cada tubo foram adicionados 600 μ L da solução-tampão extratora CTAB (2%) e mercaptoetanol (2 μ L/mL). Em seguida foram incubadas em banho-maria à temperatura de 60 e 65 °C por 45 a 60 minutos, sob agitação freqüente a cada 10 minutos. Após a incubação procedeu-se a desproteinização pela adição de 500 μ L de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), suave agitação e centrifugação por seis minutos/13.500 rpm (1ª separação). A fase superior foi transferida para um novo tubo e realizou-se a segunda desproteinização, seguindo os mesmos procedimentos (500 μ L de clorofórmio-álcool isoamílico, centrifugação e transferência para novo tubo). Um volume de 500 μ L de isopropanol (-20 °C) foi adicionado e centrifugado por cinco minutos/13.500 rpm para promover a precipitação do DNA (*pellet*). A fase aquosa foi descartada, mantendo-se o *pellet* aderido ao fundo do tubo. Um volume de 500 μ L de álcool 70% foi adicionado e centrifugado por três minutos/13.500 rpm, para lavagem do *pellet* (etapa realizada duas vezes). Adição de 500 μ L de álcool 95% e após cinco minutos, verteu-se o tubo cuidadosamente para retirada do álcool. A secagem foi finalizada no vácuo por aproximadamente 30 minutos. O material seco foi ressuspensionado em 60 μ L do tampão TE + RNAase (10 μ L/mL), sendo a etapa de extração finalizada com incubação em banho-maria a 37 °C, durante 60 minutos.

2.3. Quantificação e diluição do DNA genômico

O DNA extraído de cada amostra foi quantificado em gel de agarose (0,8%), comparando-se com DNA padrão da Gibco (0,45 μ g/ μ L), nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 ng. Após a determinação das concentrações aproximadas, que oscilaram entre 10 e 150 ng, realizou-se a diluição das amostras para concentração final de aproximadamente 2,5 ng/ μ L.

2.4. Seleção dos *primers*

Uma seqüência aleatória de 116 *primers* das séries “Operon Technologies” (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M e N) inicialmente foi avaliada para um grupo de quatro indivíduos (26, 38, 51 e 74) pertencentes a populações distintas. Dos 116, selecionaram-se 74 *primers* e, destes, 67 foram utilizados para obtenção dos dados dos marcadores polimórficos. A seleção dos *primers* obedeceu a dois critérios: amplificação (74 *primers*) e reprodutibilidade (67 *primers*). No Quadro 3, encontram-se a descrição dos *primers* utilizados com respectivas quantidades de bandas avaliadas como polimórficas e monomórficas em 64 indivíduos de fáfia.

2.5. Condições de amplificação

As reações de amplificação seguiram o protocolo descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998), com algumas modificações, utilizando-se os *primers* selecionados e volume final de 25 μ L para cada amostra de DNA (indivíduo). A mistura de reagentes e DNA foi composta de 9,4 μ L de água ultra-estéril e autoclavada; 3,0 μ L de tampão 10X; 2,1 μ L dNTPs (0,25 M de cada dGTP, dATP, dCTP, dTTP); 6 μ L de *primer* (5 ng/ μ L); 4 μ L DNA (\pm 2,5 ng/ μ L); e 0,5 Unidade da enzima Taq polimerase. Utilizou-se o termociclador modelo PT 100 (MJ-Research), programado para 40 ciclos, sendo cada ciclo constituído de uma etapa de desnaturação de um minuto a 92 °C, uma etapa de anelamento de dois minutos a 35 °C e uma de polimerização de três minutos a 72 °C. Após o último ciclo, uma etapa de sete minutos a 72 °C foi executada para promover a polimerização final, e a temperatura de finalização foi ajustada a 4 °C.

2.6. Identificação dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose

Os produtos da reação de amplificação (fragmentos ou bandas de DNA) foram acrescidos de 2 μ L de solução de azul-de-bromofenol (40%) e, posteriormente, transferida uma alíquota de 13 μ L para o gel de agarose. O gel foi preparado com a solução-tampão TBE (tris-borato 0,09 M e EDTA 0,002 M, pH 8,0), adicionada de 1,5% de agarose e fundida em forno de microondas. Após atingir a temperatura próxima de 50 °C, foi acrescida de brometo-de-etídio para uma concentração final de 0,2 μ L/mL. A solução foi

vertida em placa de acrílico para cuba de eletroforese horizontal e formatada com pentes espaçados de 30 cm.

Um padrão de DNA ladder de 1 Kb foi carregado em cada extremidade na seqüência de cavidades do gel, juntamente com as amostras de DNA e submetidas à eletroforese nas condições de 75 a 100 mA/4-5 h.

2.7. Análise dos dados

Os dados foram obtidos pela avaliação visual das bandas mais evidentes e consistentes nos 64 indivíduos avaliados. Foram atribuídos os valores “1” e “0” para presença ou ausência, respectivamente, de determinada banda polimórfica.

As análises estatísticas foram realizadas no programa computacional “Genes”, versão Windows 2005.6.1, desenvolvido no Laboratório de Bioinformática/Biagro/UFV. A partir dos dados binários, estimaram-se as distâncias entre os pares de indivíduos pelo índice de dissimilaridade do complemento aritmético do coeficiente de Nei e Li.

$$d_{ii'} = 1 - S_{ii'}$$

em que:

$d_{ii'}$ = distância genética entre os genótipos i e i' ; e

$S_{ii'}$ = índice de similaridade do coeficiente de Nei e Li, sendo:

$$S_{ii'} = \frac{2a}{2a + b + c}$$

em que:

a = número de bandas presentes nos dois genótipos;

b = número de bandas presentes apenas no genótipo i ; e

c = número de bandas presentes apenas no genótipo i' .

A matriz de dissimilaridade obtida também foi utilizada na obtenção do agrupamento dos indivíduos e populações pelos métodos de otimização de Tocher e método hierárquico das médias aritméticas das medidas de dissimilaridade (UPGMA). Os dados binários foram utilizados para analisar a divergência entre os indivíduos e as populações.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método de extração CTAB associado à qualidade do material vegetal (cultivado *in vitro*) mostrou-se eficiente na obtenção de DNA, em quantidade e grau de pureza satisfatórios para as amplificações (Figura 2). No ensaio preliminar, utilizando-se quatro indivíduos, foram avaliados 116 *primers* e selecionados 74, que apresentaram polimorfismo e bandas consistentes para posterior amplificação de todos os indivíduos. Dos 74 *primers*, selecionaram-se 67 *primers* (Quadro 3) dos géis que apresentaram nítido polimorfismo e resultados idênticos aos indivíduos observados na avaliação preliminar.

Foram obtidas um total de 384 marcas, sendo 267 polimórficas (69,53%) e 117 monomórficas (30,46%). Os *primers* amplificaram entre uma e nove marcas polimórficas, sendo a média de 3,98 marcas/*primer*. O comprimento dos fragmentos avaliados oscilou entre 300 e 2.980 pb. Apenas os marcadores polimórficos foram utilizados na elaboração do arquivo de dados binários dos tipos 0 (ausência) e 1 (presença), para obter a matriz de dissimilaridade. Os fragmentos obtidos apresentaram aspectos favoráveis na amplificação e reprodutibilidade para quantificação do polimorfismo, possibilitando credenciar os marcadores RAPD como mais um tipo de caracteres apropriado no estudo da diversidade genética da fáfia.

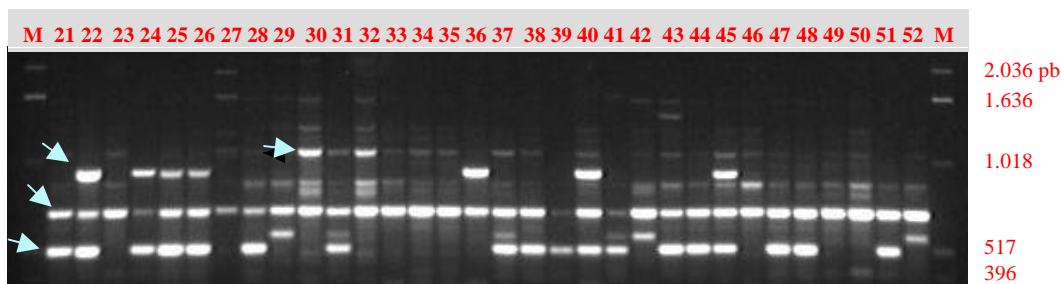


Figura 2 - Perfil dos fragmentos amplificados a partir do *primer* OPA-20 dos indivíduos 21 a 52, onde nas extremidades encontram-se o padrão DNA ladder de 1kb (M).

Quadro 3 – Relação dos 67 *primers* utilizados na amplificação de fragmentos polimórficos e monomórficos em 64 indivíduos de fáfia

<i>Primers</i>	Fragmentos polimórficos	Fragmentos monomórficos	Total de Fragmentos avaliadas	Tamanho aprox. dos Fragam. polimórficos (pb)
OPA-06	4	2	6	1.970 - 860
OPA-08	3	0	3	710 - 440
OPA-12	3	1	4	2.800 - 2.000
OPA-14	5	0	5	2.100 - 880
OPA-15	2	1	3	2.090 - 740
OPA-16	6	2	8	2.260 - 560
OPA-20	4	0	4	1.080 - 550
OPB-06	2	1	3	1.160 - 1.100
OPB-07	3	2	5	1.280 - 750
OPC-10	5	2	7	3.380 - 870
OPC-11	3	1	4	3.980 - 1.220
OPC-13	1	3	4	510
OPC-14	4	3	7	1.170 - 470
OPC-16	7	1	8	1.260 - 460
OPC-20	3	2	5	2.140 - 1.830
OPD-15	5	1	6	1.900 - 1.190
OPD-16	4	2	6	1.330 - 920
OPD-20	4	2	6	1.100 - 700
OPE-01	2	3	5	1.500 - 1.130
OPE-08	7	0	7	3.020 - 1.000
OPE-09	5	3	8	2.230 - 910
OPE-12	4	2	6	1.650 - 840
OPE-13	5	1	6	2.980 - 1.400
OPE-14	2	4	6	1.150 - 690
OPF-01	2	1	3	2.100 - 660
OPF-03	4	2	6	2.350 - 500
OPF-12	2	2	4	2.290 - 420
OPF-13	3	1	4	2.000 - 910
OPF-14	4	2	6	2.280 - 520
OPF-17	4	3	7	1.270 - 700
OPF-18	5	0	5	2.530 - 1.080
OPF-20	5	0	5	1.250 - 840
OPG-03	4	1	5	1.460 - 1.000
OPG-05	6	1	7	1.250 - 520
OPG-06	5	2	7	1.510 - 680
OPG-09	4	1	5	2.070 - 1.370
OPG-12	5	0	5	2.560 - 770
OPG-15	6	2	8	2.260 - 730
OPG-16	5	2	7	1.450 - 720
OPG-17	4	3	7	1.450 - 650
OPG-18	2	1	3	1.080 - 560
OPH-01	3	0	3	1.960 - 1.100
OPH-02	4	1	5	1360 - 430
OPH-04	4	2	6	1.320 - 680
OPH-09	7	2	9	2.690 - 520
OPH-11	4	0	4	1.690 - 470
OPH-12	6	1	7	1.740 - 390
OPH-14	4	3	7	2.040 - 750
OPH-17	4	1	5	1.920 - 880
OPI-01	3	2	5	1.590 - 1.820
OPI-04	4	2	6	2.070 - 800
OPI-15	5	0	5	1.850 - 790
OPI-19	6	1	7	2.850 - 1360
OPK-14	1	2	3	1.250
OPK-15	3	2	5	1.650 - 450
OPL-03	9	1	10	2.080 - 650
OPL-04	6	1	7	1.590 - 670
OPL-05	1	5	6	1.550
OPL-06	4	3	7	1.780 - 740
OPL-11	1	2	3	1.020
OPL-14	2	4	6	2.450 - 1.040
OPM-06	4	4	8	1.500 - 500
OPM-07	1	3	4	780
OPM-08	2	2	4	1.660 - 700
OPM-17	4	3	7	1.280 - 470
OPM-20	3	6	9	1.040 - 400
OPN-13	9	1	10	1.780 - 300
	267	117	384	

Segundo Correia Júnior (2003), as fáfias coletas na região do rio Paraná já foram citadas como *Pfaffia glomerata* e *P. paniculata*, o que poderia levantar hipóteses de que a população amostrada contém diferentes espécies de fáfia. No entanto, a proporção de marcas polimórficas (69,53%) sugere que as populações naturais amostradas são constituídas de uma única espécie e demonstra concordância com a identificação realizada pelo herbário depositário das excicatas (CEN). Em alguns estudos de diversidade genética avaliada por marcadores RAPD, os níveis elevados de polimorfismo, geralmente, envolvem diferentes espécies, enquanto que nas populações naturais ou cultivadas de única espécie não tem demonstrado altos níveis de polimorfismo. Em estudo realizado com nove espécies de *Lippia* spp., utilizando 18 *primers*, Viccini et al. (2005) obtiveram 489 marcas polimórficas do total de 490. Picoli (2005) avaliando o número de marcadores RAPD em duas espécies de *Eucalyptus* spp., obteve 89,9 % de marcas polimórficas do total de 501 marcadores. A diversidade genética de 41 indivíduos de uma variedade cultivada de *Camelina sativa* foi avaliada mediante uso de 24 *primers* e resultou em 63% de polimorfismo (VOLLMANN et al., 2005). Em estudo realizado com 48 plantas de de ginseng (*Panax quinquefolius*) oriundos de área de cultivo, utilizando-se 36 *primers* foi obtido um polimorfismo de apenas 45,7% (BAI et al., 1997). Amorim et al. (2003), estudando a variabilidade genética entre 13 genótipos de milho-doce, mediante uso de 14 *primers* obtiveram 72,7% de polimorfismo.

3.1. Dissimilaridade entre 64 indivíduos

A divergência genética dos indivíduos avaliados pelos marcadores RAPD, obtidos pelo complemento aritmético do índice de Nei e Li, demonstrou que os pares de indivíduos 54 x 41 e 47 x 48 apresentaram a maior e menor dissimilaridades, respectivamente (Quadro 4 e Apêndice 2). Foram destacados 20 pares de indivíduos que apresentaram maiores e menores distâncias (Quadro 4). As maiores distâncias foram encontradas entre indivíduos de diferentes populações e as menores, entre indivíduos da mesma população, sendo que os indivíduos da população 1 foram predominantes em formar os pares de maior dissimilaridade. Os indivíduos 54 e 39 tiveram destaque nas maiores distâncias e frequência na formação dos pares.

Entre os pares de menor dissimilaridade (Quadro 4), destacou-se a população 4, com predomínio de seus indivíduos (72% da população). No entanto, outras observações

merecem considerações para avaliação da baixa diversidade indicada nesta população. Aspectos relacionados ao local de coleta serão importantes nessa análise, como limites extremos da variação climática e plasticidade fenotípica, distância entre os pontos de coleta, níveis de gradiente da vegetação local, histórico da vegetação e ciclo fisiológico da planta. Outras observações que merecem mais inferências relacionadas ao local de coleta e biologia floral referem-se à coincidência dos pares de menor dissimilaridade formados com numeração sequencial: indivíduos 47 (2205-10) x 48 (2205-11); 25 (2205-20) x 26 (2205-21); e 59 (2216-16) x 60 (2216-17), o que pode estar relacionado à pequena distância entre os pontos de coleta dos indivíduos, pois em condição de alta taxa de autogamia é necessário coletar plantas com maiores distâncias entre si.

Quadro 4 – Pares de indivíduos que obtiveram valores extremos de maior e menor medida de dissimilaridade (d) com base no índice do complemento aritmético de Nei e Li calculados a partir de 267 marcadores RAPD, em 64 indivíduos de fáfia

Ordem	Maiores distâncias			Menores distâncias		
	Indivíduos	Populações	d	Indivíduos	Populações	d
1	54 x 41	4 x 1	0,5185	47 x 48	2 x 2	0,0277
2	54 x 5	4 x 1	0,5087	25 x 26	2 x 2	0,0310
3	54 x 31	4 x 3	0,4909	59 x 60	4 x 4	0,0320
4	8 x 9	1 x 1	0,4782	10 x 12	1 x 1	0,0531
5	39 x 13	3 x 1	0,4756	30 x 32	3 x 3	0,0556
6	5 x 57	1 x 4	0,4717	49 x 50	3 x 3	0,0638
7	39 x 5	3 x 1	0,4626	34 x 35	3 x 3	0,0732
8	39 x 8	3 x 1	0,4623	22 x 24	2 x 2	0,0965
9	39 x 42	3 x 1	0,4609	54 x 55	4 x 4	0,1045
10	5 x 23	1 x 2	0,4587	55 x 64	4 x 4	0,1088
11	8 x 50	1 x 3	0,4576	20 x 47	2 x 2	0,1137
12	39 x 9	3 x 1	0,4570	20 x 48	2 x 2	0,1181
13	8 x 30	1 x 3	0,4560	31 x 37	3 x 3	0,1225
14	39 x 1	3 x 1	0,4545	5 x 41	1 x 1	0,1705
15	8 x 44	1 x 2	0,4517	62 x 63	4 x 4	0,1808
16	9 x 44	1 x 2	0,4516	64 x 54	4 x 4	0,1875
17	36 x 41	3 x 1	0,4515	54 x 61	4 x 4	0,2063
18	9 x 41	1 x 1	0,4502	59 x 62	4 x 4	0,2088
19	6 x 54	1 x 4	0,4482	53 x 54	3 x 4	0,2121
20	11 x 56	1 x 4	0,4489	60 x 62	4 x 4	0,2137

Os resultados dos marcadores moleculares teoricamente possuem potencial para detectar e quantificar as informações exclusivas de origem genética (VASCONCELOS, 1995). Portanto, conforme a metodologia utilizada na coleta, variações de origem ambiental podem explicar a parcela de variação morfológica que não foi correlacionada aos dados moleculares, o que não assegura como critério decisivo para reavaliar novas coletas na população. O indivíduo 54 apresentou alta frequência em ambos os grupos de maior e menor dissimilaridade (Quadro 4), o que pode ser um atributo desse genótipo, que

reúne características moleculares e visuais representativas da população 4. Assim, pode-se utilizá-lo como referencial nas comparações visuais e seleção dos indivíduos durante a coleta. Esse indivíduo demonstrou, em condições experimentais, elevada altura (300 cm), caule de diâmetro espesso (13,88 mm) com elevada produção de matéria seca, raiz de cor branca e baixa produção, caule predominantemente vermelho com alta frequência de pêlos persistentes, além de baixa produção de -ecdisona.

3.2. Dissimilaridade das populações

Os valores de dissimilaridade das populações indicaram que a população 1 reúne maior distância entre os pares de seus indivíduos, entretanto a diferença é pequena (0,0203) em relação à subsequente população 3 (Quadro 5). A menor dissimilaridade foi observada na população 4, que possui os indivíduos de menor média de dissimilaridade (Quadro 6).

A dissimilaridade entre as populações (Quadro 7) demonstrou valores muito próximos nos pares que envolvem a população 1 (1 x 2, 1 x 3 e 1 x 4), entretanto essa população apresentou dissimilaridade superior às demais (Quadro 5). Esses resultados novamente indicam maior distância genética e importância na preservação da população 1, a qual está localizada em área de extrativismo (Querência do Norte, rio Ivaí) e que, de certa forma, deve-se considerar que os coletores procuram as plantas de melhores características comerciais neste local.

Em estudo realizado entre seis populações de vinhático (*Plathymentia reticulata*) oriundas dos municípios do Estado de Minas (Felixlândia, Sete Lagoas, Furnas e Serra do Cipó) e Goiás (Gouveia), foram detectados maiores índices de diversidade dentro das populações (média = 16%) em relação à diversidade entre as populações (média = 12,3%), mediante uso de 10 marcadores polimórficos RAPD (LACERDA et al., 2001). Segundo esses autores, populações de polinização aberta ou que apresentam alta taxa de fecundação cruzada são favorecidas no aumento da diversidade entre populações e, a alta taxa de autofecundação favorece à diversidade dentro das populações. Por outro lado, Gauer e Molina (2000) encontraram maiores níveis de divergência entre populações de mate (*Ilex paraguariensis*), que é uma espécie autógama e que os indivíduos alcançam mais de 100 anos. Nas populações de fáfia, de modo geral, as diferenças de dissimilaridade das populações (Quadro 5) e entre populações (Quadro 7) não foram altas. Contudo, observam-se tendências de maior dissimilaridade entre as populações, ainda que estudos sobre a

biologia reprodutiva da fáfia não são concluídas até o presente momento. No entanto, observou-se na coleção mantida na casa de vegetação, a formação de sementes viáveis obtidas da autofecundação de uma única planta florescida e isolada no vaso.

Os estudos sobre as taxas naturais de fecundação cruzada das populações de fáfia em seu habitat serão úteis na estimativa dos níveis de dissimilaridade a serem interpretados. Por exemplo, caso as referidas populações tenham altas taxas de fecundação cruzada é possível obter maiores índices de dissimilaridades com novas coletas, pois os dados obtidos revelam que as diferenças foram baixas apresentando tendência de maior dissimilaridade entre as populações. Por outro lado, caso tenha ocorrido elevada taxa de autofecundação seria justificável reavaliar o número de indivíduos dentro população (tamanho da amostra), com o intuito de aumentar a dissimilaridade dentro da população, coletando-se demais indivíduos em pontos mais distantes entre si.

Quadro 5 - Valores das medidas de dissimilaridade de quatro populações com base no complemento aritmético do coeficiente de Nei e Li, calculados a partir de 267 marcadores RAPD

População	Dissimilaridade
1 (rio Ivaí)	0,3477
2 (Ilha do Mineiro)	0,3024
3 (Baitaporã)	0,3274
4 (Vila Alta)	0,2704

Quadro 7 - Valores das medidas de dissimilaridade entre quatro populações com base no complemento aritmético do coeficiente de Nei e Li, calculados a partir de 267 marcadores RAPD

Populações P x P'	Dissimilaridade
1 x 2	0,3706
1 x 3	0,3771
1 x 4	0,3677
2 x 3	0,3366
2 x 4	0,3235
3 x 4	0,3345

P e P': populações; 1 - rio Ivaí; 2 - Ilha do Mineiro 3 - Baitaporã; 4 - Vila Alta.

Quadro 6 – Médias das medidas de dissimilaridade (d_{md}) dos indivíduos avaliados por 267 marcadores RAPD, obtidas com base no índice do complemento aritmético do coeficiente de Nei e Li

Ordem	d_{md}	Indivíduo	População
1	0,3991	8	1
2	0,3898	5	1
3	0,3884	41	1
4	0,3850	39	3
5	0,3821	13	1
6	0,3817	9	1
7	0,3810	1	1
8	0,3690	44	2
9	0,3609	11	1
10	0,3569	3	1
11	0,3563	42	1
12	0,3560	16	1
13	0,3529	23	2
14	0,3492	17	1
15	0,3484	51	3
16	0,3478	56	4
17	0,3469	10	1
18	0,3469	37	3
19	0,3465	40	3
20	0,3461	15	1
21	0,3459	63	4
22	0,3456	38	3
23	0,3440	30	3
24	0,3439	14	1
25	0,3433	31	3
26	0,3429	32	3
27	0,3420	12	1
28	0,3409	45	2
29	0,3402	2	1
30	0,3395	6	1
31	0,3393	54	4
32	0,3389	19	2
33	0,3384	35	3
34	0,3380	57	4
35	0,3368	36	3
36	0,3361	4	1
37	0,3353	43	2
38	0,3343	7	1
39	0,3342	33	3
40	0,3338	49	3
41	0,3332	52	3
42	0,3323	20	2
43	0,3310	27	2
44	0,3304	24	2
45	0,3302	28	2
46	0,3300	61	4
47	0,3299	50	3
48	0,3263	25	2
49	0,3261	48	2
50	0,3251	18	2
51	0,3246	53	3
52	0,3239	29	2
53	0,3227	26	2
54	0,3203	34	3
55	0,3191	21	2
56	0,3184	22	2
57	0,3165	55	4
58	0,3157	47	2
59	0,3156	59	4
60	0,3154	62	4
61	0,3142	60	4
62	0,3125	58	4
63	0,3110	64	4
64	0,3034	46	2
Média	0,3408		

Populações: 1 - rio Ivaí; 2 - Ilha do Mineiro; 3 - Baitaporã; 4 - Vila Alta.

3.3. Agrupamento dos indivíduos e populações pelos métodos de otimização de Tocher e UPGMA

O método de otimização de Tocher distribuiu os 64 indivíduos em 16 grupos (Quadro 8), sendo incluídos 32 indivíduos (50%) no primeiro. Os grupos maiores, formados por grande número de genótipos, geralmente agrupam os pares que apresentam menores distâncias, uma vez que o tamanho do grupo é delimitado pela distância média dos pares de indivíduos. O grupo 1 foi composto por indivíduos oriundos de todas as populações, exceto da população 1. Outro aspecto interessante foi a seqüência da inclusão dos indivíduos que apresentaram a seguinte tendência: populações 2, 4 e 3 (Quadro 8). Os demais grupos foram constituídos por oito, quatro, três, dois e um indivíduos, sendo um grupo de oito e outro de quatro indivíduos constituídos exclusivamente pela população 1. Nove grupos foram formados por um único indivíduo oriundo da população 1 (indivíduos 1, 8, 9 e 13), população 2 (indivíduos 19, 23 e 44) e população 3 (indivíduos 51 e 39). Esses indivíduos agrupados isoladamente, de modo geral, apresentaram altas médias de dissimilaridade (Quadro 6).

O agrupamento entre as quatro populações formou dois grupos (Quadro 9). As populações 2, 3 e 4 foram incluídas no mesmo grupo, e a população 1 destacou-se, constituindo isoladamente o segundo grupo. No entanto, um aspecto fitogeográfico pode ter interferido no estabelecimento das populações, assim como na diversidade genética. As populações 3, 2 e 4 foram estabelecidas e coletadas ao longo do curso do rio Paraná (Figura 1), o que possibilita a dispersão de alguma parcela em comum de propágulos (sementes e estacas). O fluxo do rio Paraná atinge sequencialmente os locais das populações 3, 2 e 4. Por outro lado, a população 1 encontra-se no rio Ivaí, um afluente do rio Paraná onde o fluxo de captação e trajetória fluvial diferente dos propágulos das demais populações. A fáfia desenvolve-se em locais alagados (CORREIA JÚNIOR, 2003) e suas inflorescências capituliformes (Figura 3A) conservam-se sobre a superfície da água, permitindo a dispersão pelo fluxo da água e germinação em solo alagado ou recém-drenado (Figura 3B). As estacas cilíndricas e ocas (VASCONCELOS, 1986) também favorecem ao transporte pela água, mantendo-se viável ao enraizamento.

Todas as introduções recebidas dos afluentes poderiam contribuir no aumento da diversidade das populações localizadas próximas ao rio Paraná. A população 4 situa-se em local com potencial de maior recebimento de propágulos entre as quatro populações avaliadas, pois pode receber materiais das populações 3, 2 e 1 (Figura 1). No entanto, a

população 4 apresentou menor dissimilaridade entre seus indivíduos e a população 1, maior dissimilaridade. Tal resultado sugere a busca de novas populações na localidade da população 1 ou re-amostragem da mesma. Por outro lado, também é possível que o fluxo de propágulos originários do rio Ivaí (população 1) tenha sido limitado por algum tipo de barreira que impediu a movimentação dos mesmos para o rio Paraná, viabilizando a coleta de novas populações nas proximidades do rio Ivaí.

No método hierárquico UPGMA para agrupamento dos 64 indivíduos foram delimitados 17 grupos, considerando-se uma dissimilaridade relativa de 80,5% no ponto de delimitação (Figura 4 e Quadro 8). O primeiro grupo foi constituído por 26 indivíduos (40,62%), incluindo indivíduos oriundos de todas as populações, exceto da população 1. Todos os indivíduos da população 4 foram incluídos nesse grupo. Os demais grupos foram formados por seis, cinco, quatro, dois e um indivíduos, sendo um grupo de quatro indivíduos constituídos exclusivamente pela população 1. Sete foram formados por um único indivíduo, oriundos da população 1 (indivíduos 8, 9, 13 e 19), população 2 (indivíduo 44) e população 3 (indivíduo 51). Para o agrupamento das populações (Figura 3) foi possível observar que as populações 2, 3 e 4 apresentaram maior similaridade em relação à população 1.

Os dois métodos de agrupamento separaram nitidamente as populações 1 e 4 entre si, sendo que não foi formado nenhum grupo contendo indivíduos dessas duas populações.



Figura 3 – Detalhe de inflorescências da fáfia com longos pedúnculos (tornam-se ocas, quando secas) e flores abertas em estruturas capituliformes (A) e da germinação da fáfia em solo recém-drenado (B). Observa-se, ainda, a presença de musgos na superfície.

Quadro 8 – Comparação entre os métodos de agrupamento de Tocher e UPGMA determinados a partir do índice do complemento aritmético do coeficiente de Nei e Li, especificando a ordem ou seqüência dentro do grupo (Ord), população de origem (Pop) e dissimilaridade média (d_{md}) em 64 indivíduos de fáfia (Indiv), calculadas a partir de 267 marcadores polimórficos RAPD

Tocher					UPGMA				
Grupo	Indiv	Ord	Pop	d_{md}	Grupo	Indiv	Ord	Pop	d_{md}
1	47	1	2	0,3157	1	47	1	2	0,3157
1	48	2	2	0,3261	1	48	2	2	0,3261
1	20	3	2	0,3323	1	20	3	2	0,3323
1	46	4	2	0,3034	1	45	4	2	0,3409
1	55	5	4	0,3165	1	25	5	2	0,3263
1	64	6	4	0,3110	1	26	6	2	0,3227
1	54	7	4	0,3393	1	18	7	2	0,3251
1	58	8	4	0,3125	1	28	8	2	0,3302
1	61	9	4	0,3300	1	22	9	2	0,3184
1	59	10	4	0,3156	1	24	10	2	0,3304
1	60	11	4	0,3142	1	49	11	3	0,3338
1	62	12	4	0,3154	1	50	12	3	0,3299
1	57	13	4	0,338	1	46	13	2	0,3034
1	21	14	2	0,3191	1	21	14	2	0,3191
1	25	15	2	0,3263	1	54	15	4	0,3393
1	26	16	2	0,3227	1	55	16	4	0,3165
1	18	17	2	0,3251	1	64	17	4	0,3110
1	27	18	2	0,3310	1	53	18	3	0,3246
1	29	19	2	0,3239	1	61	19	4	0,3300
1	24	20	2	0,3304	1	62	20	4	0,3154
1	22	21	2	0,3184	1	63	21	4	0,3459
1	50	22	3	0,3299	1	59	22	4	0,3156
1	49	23	3	0,3338	1	60	23	4	0,3142
1	53	24	3	0,3246	1	57	24	4	0,3380
1	28	25	2	0,3302	1	58	25	4	0,3125
1	52	26	3	0,3332	1	56	(26)	4	0,3478
1	34	27	3	0,3203	2	29	1	2	0,3239
1	36	28	3	0,3368	2	43	2	2	0,3353
1	45	29	2	0,3409	2	30	3	3	0,3440
1	43	30	2	0,3353	2	32	4	3	0,3429
1	35	31	3	0,3384	2	27	(5)	2	0,3310
1	33	(32)	3	0,3342	3	19	(1)	2	0,3389
2	10	1	1	0,3469	4	34	1	3	0,3203
2	12	2	1	0,3420	4	35	2	3	0,3384
2	6	3	1	0,3395	4	23	3	2	0,3529
2	7	4	1	0,3343	4	33	(4)	3	0,3342
2	2	5	1	0,3402	5	16	(1)	1	0,3560
2	15	6	1	0,3461	6	31	1	3	0,3433
2	14	7	1	0,3439	6	37	2	3	0,3469
2	3	(8)	1	0,3569	6	40	3	3	0,3465
3	30	1	3	0,3440	6	36	(4)	3	0,3368
3	32	2	3	0,3429	7	51	(1)	3	0,3484
3	38	3	3	0,3456	8	1	1	1	0,3810
3	4	(4)	1	0,3361	8	2	(2)	1	0,3402
4	31	1	3	0,3433	9	15	1	1	0,3461
4	37	2	3	0,3469	9	17	(2)	1	0,3492
4	40	(3)	3	0,3465	10	3	1	1	0,3569
5	5	1	1	0,3898	10	4	(2)	1	0,3361
5	41	2	1	0,3884	11	10	1	1	0,3469
5	42	3	1	0,3563	11	12	2	1	0,3420
5	11	(3)	1	0,3609	11	6	3	1	0,3395
6	56	1	4	0,3478	11	7	4	1	0,3343
6	63	(2)	4	0,3459	11	14	5	1	0,3439
7	16	1	1	0,3560	11	52	(6)	3	0,3332
7	17	(2)	1	0,3492	12	9	(1)	1	0,3817
8	19	(1)	2	0,3389	13	13	(1)	1	0,3821
9	23	(1)	2	0,3529	14	38	1	3	0,3456
10	44	(1)	2	0,3690	14	39	(2)	3	0,3850
11	51	(1)	3	0,3484	15	44	(1)	2	0,3690
12	9	(1)	1	0,3817	16	5	1	1	0,3898
13	1	(1)	1	0,3810	16	41	2	1	0,3884
14	8	(1)	1	0,3991	16	11	3	1	0,3609
15	13	(1)	1	0,3821	16	42	(4)	1	0,3563
16	39	(1)	3	0,3850	17	8	(1)	1	0,3991

Populações: 1 - rio Ivai, 2 - Ilha do Mineiro, 3 - Baitaporã, 4 - Vila Alta.

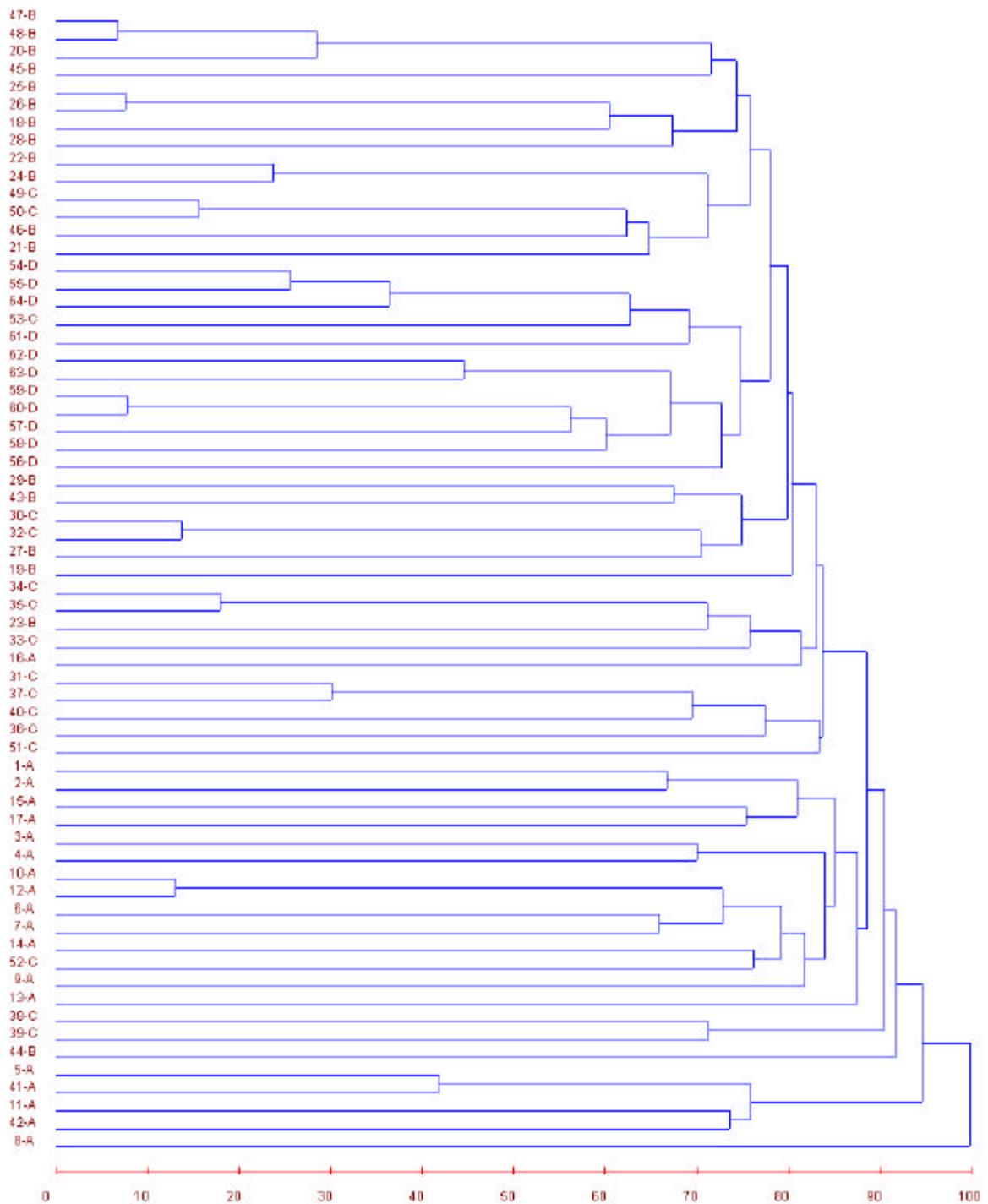


Figura 4 – Dendrograma representativo do agrupamento de 64 indivíduos de fáfia pelo método hierárquico UPGMA com base no índice de dissimilaridade do complemento aritmético do coeficiente de Nei e Li, calculados a partir de 267 marcadores RAPD. Populações: A - população 1, rio Ivaí; B - população 2, Ilha do Mineiro; C - população 3, Baitaporã; D - população 4, Vila Alta.

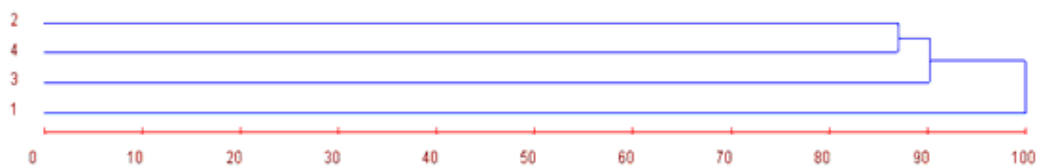


Figura 5 – Dendrograma representativo do agrupamento de 4 populações de fáfia pelo método hierárquico UPGMA com base no índice de dissimilaridade do complemento aritmético do coeficiente de Nei e Li, calculados a partir de 267 marcadores RAPD.

Quadro 9 – Agrupamento de quatro populações de fáfia pelo método de otimização de Tocher com base no índice de dissimilaridade do complemento aritmético do coeficiente de Nei e Li, calculado a partir de 267 marcadores RAPD

Grupos	Populações
1	2 4 3
2	1

4. CONCLUSÕES

Diante dos resultados, pode-se concluir que:

- A técnica molecular RAPD foi favorável à produção de fragmentos polimórficos em quantidade e qualidade suficientes para analisar a diversidade genética de 64 indivíduos de fáfia, verificadas pela reprodutibilidade e repetibilidade do padrão de fragmentos.

- A dissimilaridade dentro das populações foi sutilmente inferior à dissimilaridade entre populações, não podendo afirmar-se que a coleta de novas populações seria dispensável na preservação do germopla *ex situ*.

- O agrupamento das populações 2, 3 e 4 no mesmo grupo de similaridade pelo método de otimização de Tocher e método hierárquico UPGMA foi concordante com os aspectos fitogeográficos estabelecidos pelo curso atual do rio Paraná.

- A população 1, localizada na região de extrativismo, apresentou evidente distância genética em relação às demais populações, indicando que a preservação do seu ambiente e novas coletas dessa população serão necessárias para preservação da variabilidade genética da fáfia.

- A população 4 demonstrou menor magnitude de dissimilaridade entre seus indivíduos, no entanto é necessário rever os critérios de coleta relacionados ao tamanho da amostra e distância entre os indivíduos, para, de fato, mencionar a baixa variabilidade existente no seu local de coleta (Vila Alta-PR, Parque Nacional de Ilha Grande).

CAPÍTULO 3

COMPARAÇÃO DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA AVALIADA POR CARACTERES FENOTÍPICOS E MOLECULARES EM QUATRO POPULAÇÕES NATURAIS DE *Pfaffia glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN ORIUNDAS DA REGIÃO DO RIO PARANÁ

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento e manejo adequados da diversidade constituem uma condição indispensável na preservação da variabilidade genética existente nas populações nativas e coleções *ex situ* e *in situ*. Diversos estudos avaliaram a diversidade por meio da divergência genética para caracterização e obtenção de materiais geneticamente distintos (MARTINELLO et al., 2001; ARAÚJO et al., 2002). Esses estudos, basicamente, descreveram e quantificaram os caracteres com suas variações peculiares aos genótipos.

Os caracteres utilizados possuem várias denominações, mas podem ser compreendidos em dois grupos principais: os que informam o conteúdo e a organização do genoma de forma indireta (fenotípico) e os caracteres que descrevem diretamente a molécula de DNA, sendo ambos interpretados como marcadores que evidenciam diferenças entre indivíduos e que são reproduzidas com precisão na progênie (CORREIA, 1995).

Os caracteres amplamente utilizados são aqueles relacionados à morfologia da planta. Embora, atualmente, existam técnicas mais ajustadas às análises moleculares, os caracteres morfológicos ainda continuam sendo utilizados com eficiência nos diversos tipos de germoplasma (ARAÚJO et al., 2002; MARTEL, 2002; NEGREIROS, 2004). Suas principais vantagens são justificadas pela simplicidade na detecção e quantificação dos fenótipos o que, muitas vezes, representa baixo custo e relativa eficiência na obtenção dos resultados. No entanto, os marcadores fenotípicos sofrem efeitos não-controláveis do meio ambiente, apresentando resultados variáveis conforme a capacidade de resposta do genótipo às variações do ambiente.

Os marcadores moleculares também possuem especial aplicação no manejo dos recursos genéticos, principalmente pela não-influência direta do meio ambiente e pela obtenção de dados no curto prazo (KHANUJA et al., 2005). Envolvem grande número de variáveis associadas à descrição de seqüências codificadoras e não-codificadoras, assim como os sítios de controle da expressão gênica (CORREIA, 1995). Dessa forma, os marcadores moleculares podem detectar maior nível de diversidade no genoma relacionado ou não aos marcadores fenotípicos (*ibidem*).

Estudos comparativos entre caracteres fenotípicos e moleculares são praticamente inexistentes, uma vez que as expectativas de priorizar os marcadores moleculares em detrimento aos fenotípicos não foram instigantes. A maioria dos trabalhos realizados nesse aspecto revelou baixa correlação entre esses grupos de caracteres (BLACK-SAMUELSSON et al., 1997; DAHLBERG et al., 2004; GELETA et al., 2004). No entanto, torna-se necessário conhecer as tendências de aplicabilidade de cada marcador nos diferentes estudos relacionados à diversidade dos genótipos e populações.

No presente estudo foi comparado os métodos de caracterização mediante as análises individuais e conjuntas dos grupos de caracteres fenotípicos contínuos, multicategóricos e moleculares (RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*) obtidos em condições experimentais de cultivo em campo e análises laboratoriais do DNA. A comparação entre os métodos de caracterização será útil para estimar a eficiência de cada grupo de caracteres com relação aos diferentes objetivos dos estudos da diversidade genética.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A diversidade genética foi avaliada em 64 indivíduos de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] coletados em quatro populações da bacia do rio Paraná, Brasil, por meio de três grupos de caracteres, os quais foram comparados e interpretados com relação aos respectivos grupos. Utilizaram-se 14 caracteres fenotípicos contínuos, oito fenotípicos multicategóricos e 267 marcadores polimórficos RAPD. As análises de diversidade foram inicialmente distintas em cada grupo de caracteres, sendo avaliadas as magnitudes da diversidade por meio desses caracteres em 64 indivíduos, em suas populações e entre as populações. Posteriormente, todos os dados dos caracteres foram reunidos em uma única matriz de dissimilaridade, a qual permitiu verificar os resultados persistentes em relação a caracteres, indivíduos e populações.

2.1. Material vegetal, procedência das populações e indivíduos

Os indivíduos foram coletados em quatro populações nos Estados do Paraná e Mato Grosso do Sul, percorrendo parte da região do rio Paraná. As populações com os respectivos locais de coleta encontram-se descritas no Quadro 1, sendo que a identificação dos indivíduos foi denominada pelas mesmas referências citadas nos Capítulos 1 e 2.

As plantas foram multiplicadas vegetativamente e introduzidas no cultivo *in vitro*, para obter materiais prontamente disponíveis às análises de RAPD, mudas favoráveis ao desenvolvimento homogêneo das raízes e reduzir os custos e riscos de manutenção da coleção de germoplasma. Para tal, culturas foram estabelecidas utilizando-se explantes apicais (caule) e nodais provenientes de plantas mantidas em casa de vegetação, os quais, após o procedimento de desinfestação, foram cultivados em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) acrescidos de 30 g/L de sacarose, vitaminas (2,0 mg/L glicina, 0,5 mg/L

ácido nicotínico, 0,5 mg/L piridoxina.HCl e 0,1 mg/L tiamina.HCl), 100 mg/L de mio-inositol e 6,5 g/L ágar (Merck, Alemanha).

Após a etapa de aclimatização iniciada aos 34 dias, utilizaram-se três repetições de cada indivíduo, em delineamento inteiramente ao acaso. Os indivíduos foram cultivados em vasos plásticos com capacidade para 18 L, contendo mistura de solo e esterco de curral (3:1) e sem adubação química, durante o período de Junho/2004 a fevereiro/2005 em, Viçosa, MG.

Quadro 1 – Descrição das populações de fáfia (*Pfaffia glomerata*) avaliadas no estudo da diversidade genética

População	Qde. de indivíduos	Local de coleta	Coordenadas geográficas	Vegetação predominante
1	19	Rio Ivaí (Querência do Norte, PR)	Lat 23 ⁰ 13' 09,2" Long 53 ⁰ 34' 07,6" Alt. 233 m	Pastagem e vegetação nativa em regeneração
2	18	Ilha do Mineiro (Querência do Norte, PR)	Lat 23 ⁰ 07' 27" Long 53 ⁰ 38' 49,9" Alt. 239m	Vegetação nativa
3	16	Entre Porto Primavera e São José, beira de estrada (Baitaporã, MS)	Lat 22 ⁰ 33' 24,1" Long 53 ⁰ 06' 13,9" Alt. 239 m	Vegetação nativa fragmentada
4	11	Ilha do Marçal, Prainha - Parque Nacional de Ilha Grande (Vila Alta, PR)	Lat 23 ⁰ 23' 09,7" Long 53 ⁰ 50' 02,1" Alt. 232 m	Vegetação nativa preservada em área de conservação

2.2. Caracteres avaliados

Os caracteres fenotípicos relacionados aos aspectos agronômicos, taxionômicos, fisiológicos e fitoquímicos de fáfia foram classificados e quantificados como variáveis contínuas e multicategóricas.

Os caracteres contínuos avaliados foram: 1) matéria seca do caule; 2) matéria fresca do caule; 3) matéria fresca da raiz; 4) matéria seca da raiz; 5) altura da planta; 6) início da abertura da flor; 7) senescência de 90% das folhas; 8) intervalo entre início da abertura da flor e senescência de 90% das folhas; 9) número de caules; 10) diâmetro do caule; 11) distância de entrenó; 12) índice de colheita; 13) teor de -ecdisona; e 14) relação comprimento/largura do limbo. Os caracteres da classe multicategórica foram: 1) pilosidade; 2) cor do caule; 3) cor do pecíolo; 4) abertura da copa; 5) crescimento inicial do caule; 6) cor da raiz; 7) descrição do ápice e base do caule; e 8) forma do limbo. A descrição dos caracteres e os critérios utilizados na obtenção dos dados se encontram no Capítulo 1.

A técnica de RAPD foi utilizada na avaliação dos caracteres moleculares, sendo obtidas 267 marcas polimórficas pela amplificação de 67 *primers*. A metodologia para obtenção dos dados foi descrita no Capítulo 2.

2.3. Análises estatísticas

As distâncias genéticas foram estimadas entre todos os pares de indivíduos utilizando valores dos caracteres contínuos, multicategóricos e moleculares, obtendo-se, então, três matrizes de dissimilaridade. Posteriormente, cada matriz foi utilizada no agrupamento dos indivíduos e das populações para os respectivos caracteres. Uma matriz contendo informações de todos os caracteres foi obtida pelo somatório das medidas de dissimilaridade, calculada pela soma padronizada das três matrizes. Essa matriz reuniu proporcionalmente as medidas estimadas em cada grupo de caracteres. As análises foram todas processadas no programa “Genes” – versão Windows 2005.6.1 (CRUZ, 2001).

2.3.1. Medidas de dissimilaridade

A matriz de dissimilaridade dos caracteres contínuos foi obtida com base na medida das distâncias de Mahalanobis, enquanto o índice de dissimilaridade dos dados binários foi empregado nas análises dos caracteres multicategóricos. Para os marcadores RAPD, foram utilizados apenas as marcas polimórficas, sendo calculado pelo complemento aritmético do coeficiente de Nei e Li (CRUZ e CARNEIRO, 2003). As descrições de cada metodologia encontram-se nos Capítulos 1 e 2.

2.3.2. Métodos de agrupamento

Os indivíduos e as populações foram agrupados seguindo-se os critérios de dissimilaridade pelos métodos de otimização de Tocher e método hierárquico das médias aritméticas das medidas de dissimilaridades (UPGMA), descritas no Capítulo 1.

2.3.4. Correlação entre as matrizes de dissimilaridade

Para verificar o nível de correlação da dissimilaridade estimada pelos caracteres contínuos, multicategóricos e molecular foi utilizada a estatística Z (teste de Mantel). A citação da metodologia encontra-se no Capítulo 1.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Medidas de dissimilaridade entre os indivíduos

Os pares de maior dissimilaridade diferiram entre si nos três grupos de caracteres (Quadro 2). No entanto, os dados dos marcadores RAPD demonstram uma parcela de concordância entre os resultados dos caracteres contínuos e multicategóricos, pois os pares de maior distância dos dados moleculares são constituídos por, pelo menos, um indivíduo que se destacou nos pares de maiores distâncias dos caracteres contínuos e multicategóricos. Por exemplo, o par de máxima distância molecular (54 x 41) é formado pelo indivíduo 41, que constitui os pares de maiores distâncias dos caracteres contínuos. A segunda maior distância molecular (54 x 5) possui o indivíduo 5, predominante nos pares dos multicategóricos de máxima distância. Essa observação está presente na maioria dos pares dos dados moleculares e sugerem que os marcadores RAPD abrangem maior dimensão do genoma que, supostamente, envolve os locos relacionados aos caracteres contínuos e multicategóricos. A amplitude de amostragem do RAPD no genoma é uma vantagem citada em diversos estudos (BLACK-SAMUELSSON et al., 1997; FERREIRA, 2003; MIRALI e NABULSI 2003; NYBOM, 2004).

Outro aspecto evidente observado entre os pares de maior dissimilaridade foi a predominância na combinação de diferentes populações em cada grupo de caracteres. A maioria dos pares foi formada por indivíduos oriundos de diferentes populações (Quadro 2) o que demonstra que as maiores divergências foram obtidas entre as populações. Nos caracteres contínuos observou-se que a maioria dos pares foram estabelecidos entre os indivíduos das populações 1 e 2. Por outro lado, os caracteres multicategóricos apresentaram predomínio entre os pares das populações 1 e 3, e tendência semelhante foi obtida nos dados dos marcadores RAPD. Esse resultado pode estar relacionado à localização e dispersão dos propágulos (sementes e estacas) pelo rio Paraná, pois a

população 1 situa-se em local não favorável a entrada de propágulos oriundas das populações 2 e 3 pelo fluxo da água e vice-versa.

Nos pares de indivíduos que apresentaram as menores dissimilaridades (Quadro 3), não se observou a mesma combinação na mínima distância dos três grupos de caracteres, entretanto, alguns pares foram comuns entre as 20 combinações dos três grupos de caracteres. Os pares que destacaram foram: 47 x 48, 59 x 60, 30 x 32, 49 x 50, 54 x 55, 55 x 64, 64 x 54. Esses foram observados nos três grupos e representam combinações de alta similaridade na maioria dos locos, considerando-se que foram avaliados os caracteres contínuos, multicategóricos e 267 marcadores RAPD. Os indivíduos 47 e 48 obtiveram a mínima distância molecular e multicategórica, ressaltando-se que a medida de dissimilaridade estimada pelos caracteres contínuos (10,84) pode ser predominantemente de origem ambiental. Os pares 25 x 26, 34 x 35, 22 x 24 e 31 x 37 também foram comuns entre os caracteres dos marcadores RAPD e das variáveis multicategóricas ou contínuas. A coincidência dos pares ou combinações de indivíduos que apresentaram baixa dissimilaridade ou maior similaridade entre os três grupos de caracteres reforça a suposição de que os marcadores RAPD, de fato, informam os alelos que estão relacionados a ambos os caracteres fenotípicos amostrados.

A maioria dos pares de menor dissimilaridade foi constituída por indivíduos da mesma população (Quadro 3), o que demonstra que as menores divergências são encontradas dentro das populações. Nos caracteres contínuos e moleculares, observou-se que os pares de indivíduos foram formados predominantemente entre indivíduos da população 4, enquanto nos caracteres multicategóricos, pela população 2. Esses resultados sugerem que a população 4 possui baixa diversidade com relação aos caracteres contínuos.

No Quadro 4, encontram-se as médias das medidas de dissimilaridade calculadas a partir do somatório de 64 pares. A ordem da magnitude de dissimilaridade dos indivíduos difere entre os três grupos de caracteres. Considerando-se apenas o 1º e 2º indivíduo de maior magnitude de cada grupo, é possível notar que as seqüências foram contrastantes. Nos caracteres contínuos, os indivíduos 22 e 24 apresentaram as máximas médias (1º e 2º), no entanto esses mesmos indivíduos tiveram considerável mudança de sua magnitude para os caracteres multicategóricos (49º e 6º) e molecular (56º e 44º). Nos caracteres multicategóricos a diferença foi menor, pois os indivíduos 5 e 15 (1º e 2º) alteraram-se para a 2º e 20º posição (molecular) e 24º e 25º (multicategóricos). Essa menor diferença dos multicategóricos em relação ao molecular pode ser um indício de maior correlação entre esses dois grupos de caracteres.

Quadro 2 - Pares de indivíduos que obtiveram valores extremos de maior dissimilaridade dos caracteres contínuos, multicategóricos, moleculares e dos dados da matriz soma calculadas com base na distância de Mahalanobis (D^2), índice de dissimilaridade dos dados binários (D) e complemento aritmético de Nei e Li (d)

Ord	Contínuo			Multicategóricos			Moleculares			Matriz soma		
	Indiv	Populações	D^2	Indiv	Populações	D	Indiv	Populações	d	Indiv	Populações	d'
1	42 x 22	1 - 2	1036,62	5 x 21	1 - 2	8	54 x 41	4 - 1	0,5185	24 x 41	2 - 1	18,63
2	41 x 22	1 - 2	957,58	5 x 28	1 - 2	8	54 x 5	4 - 1	0,5087	8 x 24	2 - 1	18,36
3	2 x 22	1 - 2	919,65	5 x 30	1 - 3	8	54 x 31	4 - 3	0,4909	41 x 54	1 - 4	18,23
4	42 x 24	1 - 2	896,23	5 x 31	1 - 3	8	8 x 9	1 - 1	0,4782	37 x 41	3 - 1	18,17
5	48 x 22	2 - 2	859,07	5 x 33	1 - 3	8	39 x 13	3 - 1	0,4756	22 x 41	2 - 1	18,12
6	7 x 22	1 - 2	847,95	5 x 32	1 - 3	8	5 x 57	1 - 4	0,4717	5 x 54	1 - 4	18,02
7	41 x 24	1 - 2	847,06	5 x 37	1 - 3	8	39 x 5	3 - 1	0,4626	5 x 39	1 - 3	18,00
8	42 x 37	1 - 3	833,72	5 x 39	1 - 3	8	39 x 8	3 - 1	0,4623	5 x 37	1 - 3	17,99
9	17 x 22	1 - 2	822,32	5 x 43	1 - 2	8	39 x 42	3 - 1	0,4609	39 x 42	3 - 1	17,60
10	3 x 22	1 - 2	819,58	5 x 50	1 - 3	8	5 x 23	1 - 2	0,4587	1 x 37	1 - 3	17,52
11	47 x 22	2 - 2	815,62	5 x 51	1 - 3	8	8 x 50	1 - 3	0,4576	33 x 41	3 - 1	17,51
12	8 x 22	1 - 1	814,78	5 x 44	1 - 3	8	39 x 9	3 - 1	0,4570	33 x 5	3 - 1	17,50
13	42 x 33	1 - 3	791,81	5 x 53	1 - 3	8	8 x 30	1 - 3	0,4560	13 x 24	1 - 2	17,19
14	3 x 24	1 - 2	788,61	5 x 61	1 - 4	8	39 x 1	3 - 1	0,4545	31 x 41	3 - 1	17,09
15	51 x 22	3 - 2	781,00	5 x 62	1 - 4	8	8 x 44	1 - 2	0,4517	1 x 24	1 - 2	17,08
16	41 x 37	1 - 3	766,61	5 x 63	1 - 4	8	9 x 44	1 - 2	0,4516	17 x 24	1 - 2	17,08
17	5 x 22	1 - 2	758,57	15 x 25	1 - 2	8	36 x 41	3 - 1	0,4515	5 x 22	1 - 2	17,06
18	45 x 22	2 - 2	752,90	15 x 26	1 - 2	8	9 x 41	1 - 1	0,4502	17 x 37	1 - 3	16,87
19	11 x 22	1 - 2	750,31	15 x 38	1 - 3	8	6 x 54	1 - 4	0,4482	17 x 22	1 - 2	16,81
20	11 x 21	1 - 2	750,31	15 x 57	1 - 4	8	11 x 56	1 - 4	0,4489	1 x 22	1 - 2	16,79

Quadro 3 – Pares de indivíduos que obtiveram valores extremos de menor dissimilaridade dos caracteres contínuos, multicategóricos, molecular e dos dados da matriz soma calculadas com base na distância de Mahalanobis (D^2), índice de dissimilaridade dos dados binários (D) e complemento aritmético de Nei e Li (d)

Ord	Contínuos			Multicategóricos			Molecular			Matriz soma		
	Indiv	Populações	D^2	Indiv	Populações	D	Indiv	Populações	d	Indiv	Populações	d'
1	64 x 54	4 - 4	4,42	30 x 32	3 - 3	0	47 x 48	2 - 2	0,0277	47 x 48	2 - 2	0,65
2	4 x 16	1 - 1	6,69	47 x 48	2 - 2	0	25 x 26	2 - 2	0,0310	30 x 32	3 - 3	1,24
3	50 x 49	3 - 3	8,00	54 x 55	4 - 4	0	59 x 60	4 - 4	0,0320	59 x 60	4 - 4	1,41
4	59 x 60	4 - 4	9,41	25 x 20	2 - 2	1	10 x 12	1 - 1	0,0531	25 x 26	2 - 2	1,59
5	34 x 35	3 - 3	9,56	25 x 26	2 - 2	1	30 x 32	3 - 3	0,0556	49 x 50	3 - 3	2,07
6	30 x 32	3 - 3	9,65	25 x 47	2 - 2	1	49 x 50	3 - 3	0,0638	54 x 55	4 - 4	2,29
7	2 x 15	1 - 1	9,91	25 x 48	2 - 2	1	34 x 35	3 - 3	0,0732	34 x 35	3 - 3	2,96
8	47 x 48	2 - 2	10,84	25 x 57	2 - 4	1	22 x 24	2 - 2	0,0965	55 x 64	4 - 4	3,07
9	4 x 11	1 - 1	11,36	43 x 21	2 - 2	1	54 x 55	4 - 4	0,1045	10 x 12	1 - 1	3,34
10	31 x 37	3 - 3	13,2	43 x 30	2 - 2	1	55 x 64	4 - 4	0,1088	22 x 24	2 - 2	3,49
11	54 x 55	4 - 4	13,41	22 x 27	2 - 2	1	20 x 47	2 - 2	0,1137	20 x 47	2 - 2	4,01
12	9 x 40	1 - 3	14,72	4 x 41	1 - 1	1	20 x 48	2 - 2	0,1181	31 x 37	3 - 3	4,02
13	55 x 64	4 - 4	15,39	17 x 41	1 - 1	1	31 x 37	3 - 3	0,1225	48 x 20	2 - 2	4,11
14	28 x 56	2 - 4	15,39	64 x 54	2 - 2	1	5 x 41	1 - 1	0,1705	54 x 64	4 - 4	4,65
15	56 x 58	4 - 4	15,70	49 x 50	3 - 3	1	62 x 63	4 - 4	0,1808	62 x 63	4 - 4	5,36
16	18 x 38	2 - 3	16,20	59 x 60	4 - 4	1	64 x 54	4 - 4	0,1875	58 x 60	4 - 4	6,43
17	22 x 24	2 - 2	16,69	55 x 64	4 - 4	1	54 x 61	4 - 4	0,2063	60 x 62	4 - 4	6,43
18	13 x 14	1 - 1	16,91	10 x 3	1 - 1	1	59 x 62	4 - 4	0,2088	62 x 64	4 - 4	6,78
19	4 x 1	1 - 1	17,71	40 x 7	3 - 1	1	53 x 54	3 - 4	0,2121	25 x 20	2 - 2	6,90
20	60 x 63	4 - 4	18,57	2 x 13	1 - 1	1	60 x 62	4 - 4	0,2137	52 x 53	4 - 4	7,01

Quadro 4 – Médias das medidas de dissimilaridade dos indivíduos avaliados pelos caracteres contínuos (D^2_{md}), multicategóricos (D_{md}), molecular (d_{md}) e dados da matriz soma (d'_{md}), com base nas distâncias obtidas pelo coeficiente de Mahalanobis (D^2) e índice de dissimilaridade dos dados binários (D) e complemento aritmético de Nei e Li (d), em 64 indivíduos de fáfia

	Contínuos			Multicategóricos			Moleculares			Matriz soma		
	D^2_{md}	Indiv	Pop	D_{md}	Indiv	Pop	d_{md}	Indiv	Pop	d'_{md}	Indiv	Pop
1	476,95	22	2	6,30	5	1	0,3991	8	1	13,68	5	1
2	403,29	24	2	5,39	15	1	0,3898	5	1	13,01	24	2
3	357,09	37	3	5,20	63	4	0,3884	41	1	12,94	41	1
4	321,08	33	3	5,19	14	1	0,3850	39	3	12,79	37	3
5	310,36	42	1	5,06	9	1	0,3821	13	1	12,73	8	1
6	286,31	55	4	5,06	24	2	0,3817	9	1	12,66	39	3
7	282,97	31	3	5,00	36	3	0,3810	1	1	12,64	42	1
8	267,29	39	3	4,98	59	4	0,3690	44	2	12,59	22	2
9	263,21	3	1	4,95	6	1	0,3609	11	1	12,44	3	1
10	243,97	41	1	4,94	18	2	0,3569	3	1	12,34	1	1
11	228,49	46	2	4,91	57	4	0,3563	42	1	12,25	9	1
12	226,50	48	2	4,84	2	1	0,3560	16	1	12,24	13	1
13	222,57	17	1	4,83	10	1	0,3529	23	2	12,20	31	3
14	220,88	64	4	4,78	1	1	0,3492	17	1	12,18	33	3
15	220,75	54	4	4,75	16	1	0,3484	51	3	12,13	15	1
16	215,34	7	1	4,73	3	1	0,3478	56	4	11,99	17	1
17	213,95	47	2	4,70	17	1	0,3469	10	1	11,94	14	1
18	206,13	27	2	4,70	29	2	0,3469	37	3	11,77	54	4
19	196,69	8	1	4,70	54	4	0,3465	40	3	11,71	55	4
20	189,59	36	3	4,70	55	4	0,3461	15	1	11,71	36	3
21	188,07	18	2	4,69	41	1	0,3459	63	4	11,70	44	2
22	184,73	44	2	4,67	37	3	0,3456	38	3	11,68	16	1
23	183,94	51	3	4,66	19	2	0,3440	30	3	11,63	10	1
24	183,78	5	1	4,63	31	3	0,3439	14	1	11,62	2	1
25	183,20	15	1	4,63	61	4	0,3433	31	3	11,59	63	4
26	181,50	14	1	4,61	42	1	0,3429	32	3	11,56	11	1
27	179,75	2	1	4,59	13	1	0,3420	12	1	11,52	7	1
28	172,76	29	2	4,59	23	2	0,3409	45	2	11,49	51	3
29	168,84	43	2	4,59	38	3	0,3402	2	1	11,47	23	2
30	168,13	61	4	4,55	7	1	0,3395	6	1	11,46	6	1
31	166,59	13	1	4,55	64	4	0,3393	54	4	11,42	18	2
32	166,24	45	2	4,52	33	3	0,3389	19	2	11,31	38	3
33	166,19	11	1	4,52	62	4	0,3384	35	3	11,29	57	4
34	165,34	26	2	4,50	8	1	0,3380	57	4	11,19	19	2
35	165,10	1	1	4,48	60	4	0,3368	36	3	11,18	61	4
36	161,42	10	1	4,47	12	1	0,3361	4	1	11,18	12	1
37	148,16	16	1	4,47	35	3	0,3353	43	2	11,14	45	2
38	148,11	30	3	4,44	4	1	0,3343	7	1	11,13	29	2
39	146,56	6	1	4,41	20	2	0,3342	33	3	11,10	35	3
40	146,04	12	1	4,36	51	3	0,3338	49	3	11,07	64	4
41	145,63	34	3	4,33	26	2	0,3332	52	3	11,01	27	2
42	145,38	35	3	4,28	34	3	0,3323	20	2	10,99	4	1
43	143,88	32	3	4,27	58	4	0,3310	27	2	10,93	56	4
44	142,22	23	2	4,25	11	1	0,3304	24	2	10,86	20	2
45	142,09	50	3	4,25	45	2	0,3302	28	2	10,84	48	2
46	141,49	38	3	4,19	56	4	0,3300	61	4	10,84	40	3
47	141,29	49	3	4,16	39	3	0,3299	50	3	10,82	59	4
48	138,36	4	1	4,14	25	2	0,3263	25	2	10,80	26	2
49	138,15	19	2	4,11	22	2	0,3261	48	2	10,71	30	3
50	136,60	53	3	4,11	46	2	0,3251	18	2	10,71	49	3
51	136,04	25	2	4,11	52	3	0,3246	53	3	10,66	46	2
52	135,18	20	2	4,08	49	3	0,3239	29	2	10,66	32	3
53	130,66	21	2	4,03	44	2	0,3227	26	2	10,64	43	2
54	130,59	57	4	3,98	27	2	0,3203	34	3	10,59	34	3
55	130,03	40	3	3,98	40	3	0,3191	21	2	10,57	50	3
56	124,45	28	2	3,98	50	3	0,3184	22	2	10,56	25	2
57	121,33	59	4	3,98	53	3	0,3165	55	4	10,54	47	2
58	119,90	9	1	3,97	28	2	0,3157	47	2	10,50	52	3
59	118,55	63	4	3,69	30	3	0,3156	59	4	10,46	28	2
60	117,63	56	4	3,69	32	3	0,3154	62	4	10,42	60	4
61	116,38	60	4	3,69	47	2	0,3142	60	4	10,42	53	3
62	115,51	58	4	3,69	48	2	0,3125	58	4	10,40	62	4
63	107,39	62	4	3,66	43	2	0,3110	64	4	10,23	58	4
64	106,33	52	3	3,63	21	2	0,3034	46	2	10,03	21	2
Md geral	166,215			4,52			0,3408			11,42		

D^2 : medida de dissimilaridade calculada com base na distância de Mahalanobis.

D: medida de dissimilaridade calculada com base no índice de dissimilaridade dos dados binários.

d: medida de dissimilaridade calculada com base no complemento aritmético do coeficiente de Nei e Li.

d' : medida de dissimilaridade calculada com base na soma padronizada das matrizes de dissimilaridade dos caracteres contínuos, multicategóricos e molecular.

A matriz soma reuniu as informações das medidas de dissimilaridade padronizadas dos três grupos de caracteres, permitindo fazer inferências sobre a avaliação conjunta e pertinente a todos os caracteres. Os resultados demonstraram que os pares 24 x 41 e 47 x 48 obtiveram a máxima e mínima dissimilaridades, respectivamente (Quadros 2 e 3). A população 1 foi predominante na formação dos pares de maior distância, sendo o indivíduo 41 mais freqüente. Os indivíduos 5 e 24 apresentaram as maiores médias das medidas de dissimilaridade (Quadro 4). Portanto, tais indivíduos são indispensáveis na coleção de germoplasma. Os 20 pares de menor dissimilaridade (Quadro 3) foram praticamente concordantes entre os grupos dos caracteres fenotípicos, com exceção dos pares 58 x 60 e 52 x 53.

As medidas de dissimilaridade estimadas pelos dados da matriz soma (Quadro 5) reúne informações dos caracteres fenotípicos e moleculares dos indivíduos que apresentaram maiores médias de teor de -ecdisona (20E) e matéria seca da raiz (MSR), para um possível critério de seleção dos genitores no melhoramento da espécie. A menor dissimilaridade estimada entre os indivíduos 12 x 06 indica que essa combinação pode reunir os alelos de interesse em seus descendentes e reduzir o tempo de gerações necessárias para desenvolvimento da variedade. É importante ressaltar que nessa análise, a parcela de variação ambiental pode ter sido amenizada com a inclusão dos dados do marcador molecular na matriz soma.

Quadro 5 – Medidas de dissimilaridade calculadas com base nas distâncias dos dados da matriz soma entre pares de indivíduos de fáfia (*Pfaffia glomerata*) que obtiveram maiores médias dos caracteres produção de -ecdisona (20E) e matéria seca da raiz (MSR)

Indivíduo MSR (g)	Indivíduo – Produção de 20E (%)			
	03 (0,7493)	12 (0,7485)	42 (0,7461)	05 (0,7461)
33 (326,21)	16,11	12,88	16,77	17,51
39 (255,75)	14,57	13,69	17,60	18,00
06 (230,75)	10,19	8,64	13,12	11,47
40 (219,27)	10,55	11,99	12,40	12,87

3.2. Dissimilaridade das populações

Os resultados do estudo da diversidade genética entre e dentro das quatro populações demonstraram padrões de dissimilaridade distintos nos três grupos. A população 1 apresentou maior dissimilaridade no estudo dos caracteres multicategóricos (0,4898) e molecular (0,3477), sendo as diferenças muito baixas nos caracteres multicategóricos (0,0125 - 0,0275) (Quadro 6). Em relação aos caracteres contínuos, a população 2 demonstrou maior dissimilaridade (0,5898).

Nos resultados para avaliação das distâncias entre as populações (Quadro 7), observou-se consenso nos caracteres fenotípicos, os quais apresentaram maiores dissimilaridades na combinação entre as populações 1 e 4 (0,6776 e 0,7249, respectivamente, caracteres contínuos e multicategóricos). Os caracteres moleculares não apresentaram valores significativos para diferenciar uma combinação de máxima dissimilaridade, pois os valores foram próximos nos três pares de maior valor (0,3677, 0,3706 e 0,3771,) e envolveram a população 1. A baixa variação dos marcadores RAPD em relação aos caracteres fenotípicos pode estar relacionada pela ausência dos efeitos ambientais. Apesar dos diferentes resultados, é possível concluir que a população 1 estabeleceu maior distância genética entre as demais populações, sendo sua preservação *in situ* ou *ex situ* indispensável.

A plasticidade fenotípica é uma resposta do genótipo as variações do ambiente de origem genética, e os genótipos apresentam diferentes níveis de resposta (PIGLIUCCI, 1997, citado por LEHMANN e REBELE, 2005). Portanto, considerando esse mecanismo que relaciona as magnitudes de variações de origem ambiental ao controle genético (JASIÉNSKI et al., 1997), pode-se sugerir que a divergência foi maior entre as populações (Quadros 6 e 7) nos caracteres fenotípicos e moleculares, o que indica que novas populações podem ser encontradas na mesma região, com o intuito de aumentar a diversidade da coleção.

Quadro 6 – Valores das medidas de dissimilaridade das populações com base no índice do complemento aritmético do coeficiente de Nei e Li, calculadas a partir de dados binários dos caracteres contínuos, multicategóricos e moleculares

População	Dissimilaridade dos caracteres		
	Contínuos	Multicategóricos	Moleculares
1 (Rio Ivaí)	0,3802	0,4898	0,3477
2 (Ilha do Mineiro)	0,5898	0,4673	0,3024
3 (Baitaporã)	0,3971	0,4489	0,3274
4 (Vila Alta)	0,4194	0,4773	0,2704

Quadro 7 - Valores das medidas de dissimilaridade entre populações com base no índice do complemento aritmético do coeficiente de Nei e Li, calculados a partir dos valores de dados binários dos caracteres contínuos, multicategóricos e moleculares

População P x P'	Dissimilaridade dos caracteres		
	Contínuos	Multicategóricos	Moleculares
1 x 2	0,6403	0,6407	0,3706
1 x 3	0,5417	0,6410	0,3771
1 x 4	0,6776	0,7249	0,3677
2 x 3	0,5312	0,4917	0,3366
2 x 4	0,5635	0,5239	0,3235
3 x 4	0,5459	0,5728	0,3345

P e P': populações; 1 - rio Ivaí; 2 - Ilha do Mineiro; 3 - Baitaporã; P4 - Vila Alta.

3.3. Agrupamento dos indivíduos e populações pelos métodos de Tocher e UPGMA

O método de Tocher forma grupos de similaridade, inicialmente a partir do par de genótipos de maior similaridade. Outros genótipos serão incluídos no mesmo grupo até que a distância média dentro do grupo não seja superior à distância entre os demais grupos (CRUZ e CARNEIRO, 2003). Portanto, os grupos maiores, formados por grande número de genótipos, geralmente agrupam os pares que apresentam menores distâncias, uma vez que o tamanho do grupo é delimitado pela distância média dos pares de indivíduos.

Na avaliação dos 64 indivíduos, o método de otimização de Tocher apresentou uma distribuição semelhante nos caracteres contínuos, moleculares e nos dados da matriz soma (Quadros 8 e 9). O primeiro grupo incluiu grande número de indivíduos e, em nenhum deles foi observado indivíduos da população 1 (Quadro 9). Nos caracteres multicategóricos os grupos foram menores e em maior número. Os indivíduos das populações 4 e 2 apresentaram tendências de agrupamentos para os caracteres contínuos e moleculares. Os indivíduos da população 4 concentraram-se no grupo 1 dos caracteres contínuos (81%) e dos dados da matriz soma (72%) enquanto a população 2, se concentrou no grupo 1 dos caracteres moleculares (85%). Esses resultados sugerem que os indivíduos da população 4 apresentam predominantemente, baixa dissimilaridade nos caracteres contínuos, ao passo que naqueles da população 2 há predomínio de baixa dissimilaridade nos caracteres moleculares. Os indivíduos da população 1 formaram grupos exclusivos em todos os tipos de caracteres, evidenciando sua considerável dissimilaridade em relação às demais populações e grupos de caracteres.

O agrupamento das populações no estudo da diversidade avaliado pelos caracteres contínuos formou três grupos (Quadro 10). As populações 1 e 4 foram incluídas isoladamente em grupos distintos, ressaltando-se que estes originam os pares de indivíduos com as maiores medidas de dissimilaridade. As populações 2 e 3 foram incluídas no mesmo grupo, embora a população 2 tenha apresentada maior dissimilaridade entre seus indivíduos. O agrupamento dos caracteres multicategóricos e moleculares apresentaram a mesma distribuição, sendo formado um grupo incluindo as populações 2, 3 e 4 e outro, exclusivamente pela população 1.

No método de agrupamento hierárquico UPGMA, os indivíduos ou populações são agrupados com base nas médias aritméticas das medidas de dissimilaridade. A representação gráfica de suas distâncias pelo comprimento das barras horizontais e as ramificações no dendrograma permitem uma rápida visualização da magnitude das distâncias e aproximação dos indivíduos. No entanto, os critérios de delimitação dos grupos nos níveis de dissimilaridade são pouco arbitrários, podendo o pesquisador determinar a formação de grupos

grandes e seus subgrupos ou grupos menores, conforme a facilidade de interpretação dos resultados do dendrograma.

No dendrograma dos caracteres contínuos foi possível visualizar um perfil de agrupamento a partir de 10 grupos (Figura 1), enquanto nos caracteres multicategóricos, moleculares e dados da matriz soma foram necessários 13, 17 e 14 grupos, respectivamente. As interpretações que evidenciam os grupos podem estar associadas ao nível de dissimilaridade dos indivíduos ou aos critérios utilizados na delimitação do tamanho dos grupos.

Quadro 8 – Agrupamento de 64 indivíduos de fáfia pelo método de otimização de Tocher com base nas distâncias generalizada de Mahalanobis (D^2), índice de dissimilaridade dos dados binários (D) e complemento aritmético de Nei e Li (d), mediante avaliação dos caracteres contínuos, multicategóricos, molecular e matriz soma

	Contínuos	Multicategóricos	Molecular	Matriz soma
1	54 64 55 61 53 38 29 18 31 30 43 27 59 21 62 57 58 32 60 52	30 32 43 51 21 47 48 11 25 27 22 53 20 58	47 48 20 46 55 64 54 58 61 59 60 62 57 21 25 26 18 27 29 24 22 50 49 53 28 52 34 36 45 43 35 33	47 48 20 25 26 60 59 58 57 62 21 64 43 18 46 32 30 27 53 55 54 28 52
2	4 16 11 1 5 45 8 41 25 13 14 2 15 10 20 50 51 9 28 44 63 47 7 48 56	54 55 64 62 26 60 59	10 12 6 7 2 15 14 3	49 50 61 56 63
3	34 35 23 49 40 6 12	1 41 4 17 2 7 13 40 9	30 32 38 4	34 35 29 40 7 4
4	22 24 37	3 10 16 12 42	31 37 40	10 12 16 3 6
5	3 42 17	18 57	5 41 42 11	22 24
6	33 46	37 50 49 31 8 56 61 52 28 44	56 63	31 37 33 38
7	39	19 29 35 34	16 17	5 41
8	36	23 45 38	19	1 2 17 15 13 9
9	19	39 46	23	23 45
10	26	06	44	11 42
11		15	51	8 14
12		33	9	19
13		24	1	44
14		63	8	51
15		14	13	36
16		36	39	39
17		5		

Quadro 9 – Descrição dos indivíduos agrupados pelo método de otimização de Tocher com base nas distâncias de Mahalanobis (D^2), índice de dissimilaridade dos dados binário (D) e complemento aritmético de Nei e Li (d), para os caracteres contínuo, multicategóricos, molecular e dados da matriz soma, especificando as respectivas populações de origem (Pop), ordem dentro do grupo (Ord) e dissimilaridade média ($D_{(md)}$) em 64 indivíduos de fáfia (Indiv)

Contínuos				Multicategóricos				Molecular				Matriz Soma							
Grupos	Indiv	Pop	Ord	$D^2_{(md)}$	Grupos	Indiv	Pop	Ord	$D_{(md)}$	Grupos	Indiv	Pop	Ord	d_{md}	Grupos	Indiv	Pop	Ord	d'_{md}
1	54	4	1	220,75	1	30	3	1	3,75	1	47	2	1	0,3157	1	47	2	1	10,54
1	64	4	2	220,88	1	32	3	2	3,75	1	48	2	2	0,3261	1	48	2	2	10,84
1	55	4	3	286,31	1	43	2	3	3,71	1	20	2	3	0,3323	1	20	2	3	10,86
1	61	4	4	168,13	1	51	3	4	4,43	1	46	2	4	0,3034	1	25	2	4	10,56
1	53	3	5	136,60	1	21	2	5	3,68	1	55	4	5	0,3165	1	26	2	5	10,80
1	38	3	6	141,49	1	47	2	6	3,75	1	64	4	6	0,311	1	60	4	6	10,42
1	29	2	7	172,76	1	48	2	7	3,75	1	54	4	7	0,3393	1	59	4	7	10,82
1	18	2	8	188,07	1	11	1	8	4,32	1	58	4	8	0,3125	1	58	4	8	10,23
1	31	3	9	282,97	1	25	2	9	4,21	1	61	4	9	0,33	1	57	4	9	11,29
1	30	3	10	148,11	1	27	2	10	4,05	1	59	4	10	0,3156	1	62	4	10	10,40
1	43	2	11	168,84	1	22	2	11	4,17	1	60	4	11	0,3142	1	21	2	11	10,03
1	27	2	12	206,13	1	53	3	12	4,05	1	62	4	12	0,3154	1	64	4	12	11,07
1	59	4	13	121,33	1	20	2	13	4,48	1	57	4	13	0,338	1	43	2	13	10,64
1	21	2	14	130,66	1	58	4	(14)	4,33	1	21	2	14	0,3191	1	18	2	14	11,42
1	62	4	15	107,39	2	54	4	1	4,78	1	25	2	15	0,3263	1	46	2	15	10,66
1	57	4	16	130,59	2	55	4	2	4,78	1	26	2	16	0,3227	1	32	3	16	10,66
1	58	4	17	115,51	2	64	4	3	4,62	1	18	2	17	0,3251	1	30	3	17	10,71
1	32	3	18	143,88	2	62	4	4	4,59	1	27	2	18	0,331	1	27	2	18	11,01
1	60	4	19	116,38	2	26	2	5	4,40	1	29	2	19	0,3239	1	53	3	19	10,42
1	52	3	(20)	106,33	2	60	4	6	4,56	1	24	2	20	0,3304	1	55	4	20	11,71
2	4	1	1	138,36	2	59	4	(7)	5,06	1	22	2	21	0,3184	1	54	4	21	11,77
2	16	1	2	148,16	3	1	1	1	4,86	1	50	3	22	0,3299	1	28	2	22	10,46
2	11	1	3	166,19	3	41	1	2	4,76	1	49	3	23	0,3338	1	52	3	(23)	10,50
2	1	1	4	165,10	3	4	1	3	4,51	1	53	3	24	0,3246	2	49	3	1	10,71
2	5	1	5	183,78	3	17	1	4	4,78	1	28	2	25	0,3302	2	50	3	2	10,57
2	45	2	6	166,24	3	2	1	5	4,92	1	52	3	26	0,3332	2	61	4	3	11,18
2	8	1	7	196,69	3	7	1	6	4,62	1	34	3	27	0,3203	2	56	4	4	10,93
2	41	1	8	243,97	3	13	1	7	4,67	1	36	3	28	0,3368	2	63	4	(5)	11,59
2	25	2	9	136,04	3	40	3	8	4,05	1	45	2	29	0,3409	3	34	3	1	10,59
2	13	1	10	166,59	3	9	1	(9)	5,14	1	43	2	30	0,3353	3	35	3	2	11,10
2	14	1	11	181,50	4	3	1	1	4,81	1	35	3	31	0,3384	3	29	2	3	11,13
2	2	1	12	179,75	4	10	1	2	4,90	1	33	3	(32)	0,3342	3	40	3	4	10,84
2	15	1	13	183,20	4	16	1	3	4,83	2	10	1	1	0,3469	3	7	1	5	11,52
2	10	1	14	161,42	4	12	1	4	4,54	2	12	1	2	0,342	3	4	1	(6)	10,99
2	20	2	15	135,18	4	42	1	(5)	4,68	2	6	1	3	0,3395	4	10	1	1	11,63
2	50	3	16	142,09	5	18	2	1	5,02	2	7	1	4	0,3343	4	12	1	2	11,18
2	51	3	17	183,94	5	57	4	2	4,98	2	2	1	5	0,3402	4	16	1	3	11,68
2	9	1	18	119,90	6	37	3	1	4,75	2	15	1	6	0,3461	4	3	1	4	12,44
2	28	2	19	124,45	6	50	3	2	4,05	2	14	1	7	0,3439	4	6	1	(5)	11,46
2	44	2	20	184,73	6	49	3	3	4,14	2	3	1	(8)	0,3569	5	22	2	1	12,59
2	63	4	21	118,55	6	31	3	4	4,70	3	30	3	1	0,344	5	24	2	(2)	13,01
2	47	2	22	213,95	6	8	1	5	4,57	3	32	3	2	0,3429	6	31	3	1	12,20
2	7	1	23	215,34	6	56	4	6	4,25	3	38	3	3	0,3456	6	37	3	2	12,79
2	48	2	24	226,50	6	61	4	7	4,70	3	4	1	(4)	0,3361	6	33	3	3	12,18
2	56	4	(25)	117,63	6	52	3	8	4,17	4	31	3	1	0,3433	6	38	3	(4)	11,31
3	34	3	1	145,63	6	28	2	9	4,03	4	37	3	2	0,3469	7	5	1	1	13,68
3	35	3	2	145,38	6	44	2	(10)	4,10	4	40	3	(3)	0,3465	7	41	1	(2)	12,94
3	23	2	3	142,22	7	19	2	1	4,73	5	5	1	1	0,3898	8	1	1	1	12,34
3	49	3	4	141,29	7	29	2	2	4,78	5	41	1	2	0,3884	8	2	1	2	11,62
3	40	3	5	130,03	7	35	3	3	4,54	5	42	1	3	0,3563	8	17	1	3	11,99
3	6	1	6	146,56	7	34	3	(4)	4,35	5	11	1	(3)	0,3609	8	15	1	4	12,13
3	12	1	(7)	146,04	8	23	2	1	4,67	6	56	4	1	0,3478	8	13	1	5	12,24
4	22	2	1	476,95	8	45	2	2	4,32	6	63	4	(2)	0,3459	8	9	1	(6)	12,25
4	24	2	2	403,29	8	38	3	(3)	4,67	7	16	1	1	0,356	9	23	2	1	11,47
4	37	3	(3)	357,09	9	39	3	1	4,22	7	17	1	(2)	0,3492	9	45	2	(2)	11,14
5	3	1	1	263,21	9	46	2	(2)	4,17	8	19	2	(1)	0,3389	10	11	1	1	11,56
5	42	1	2	310,36	10	6	1	(1)	5,03	9	23	2	(1)	0,3529	10	42	1	(2)	12,64
5	17	1	(3)	222,57	11	15	1	(1)	5,48	10	44	2	(1)	0,369	11	8	1	1	12,73
6	33	3	1	321,08	12	33	3	(1)	4,59	11	51	3	(1)	0,3484	11	14	1	(2)	11,94
6	46	2	(2)	228,49	13	24	2	(1)	5,14	12	9	1	(1)	0,3817	12	19	2	(1)	11,19
7	39	3	(1)	267,29	14	63	4	(1)	5,29	13	1	1	(1)	0,381	13	44	2	(1)	11,70
8	36	3	(1)	189,59	15	14	1	(1)	5,27	14	8	1	(1)	0,3991	14	51	3	(1)	11,49
9	19	2	(1)	138,15	16	36	3	(1)	5,08	15	13	1	(1)	0,3821	15	36	3	(1)	11,71
10	26	2	(1)	165,34	17	5	1	(1)	6,40	16	39	3	(1)	0,385	16	39	3	(1)	12,66

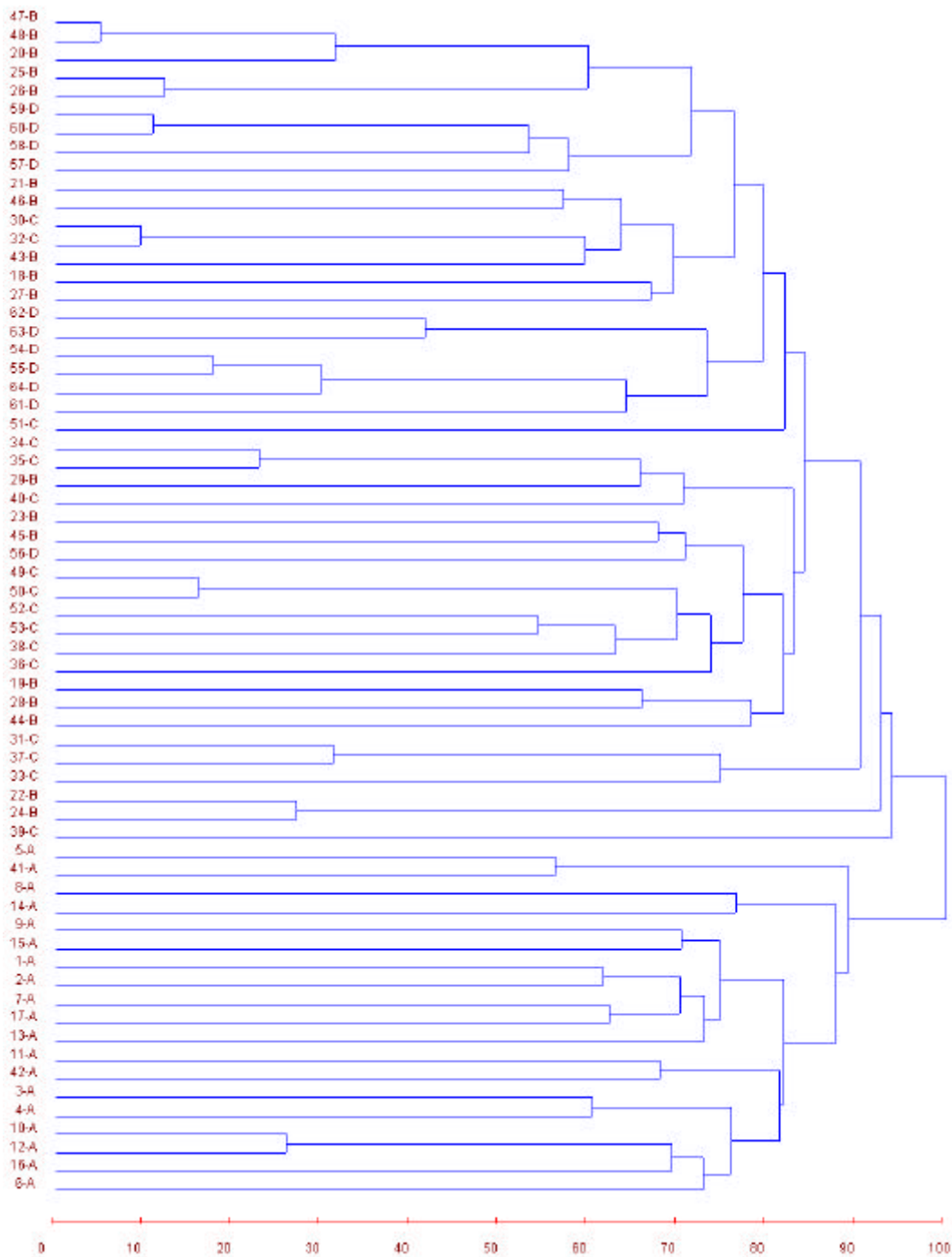


Figura 1 - Dendrograma da análise de agrupamento pelo método hierárquico UPGMA, com base na soma de matrizes padronizadas dos caracteres contínuos, multicatergórios e molecular, avaliados em 64 indivíduos de fáfia. Populações: A - população 1, rio Ivaí; B - população 2; Ilha do Mineiro; C - população 3, Baitaporã; D - população 4, Vila Alta.

Quadro 10 – Agrupamento pelo método de otimização de Tocher com base nas distâncias obtidas pelo índice de dissimilaridade de Nei e Li, mediante avaliação dos caracteres contínuos, multicategóricos e molecular de quatro populações de fáfia

Grupos	Caracteres		
	Contínuos	Multicategóricos	moleculares
1	2 3	2 3 4	2 4 3
2	4	1	1
3	1		

3.4. Correlação entre as matrizes de dissimilaridade

A estatística de Mantel (teste-Z) foi utilizada para verificar a correlação entre as matrizes de dissimilaridades obtidas dos grupos de caracteres contínuos, multicategóricos, molecular e dos dados da matriz soma. Os resultados, embora tenham sido significativos ($p < 0,01$), apresentaram baixa correlação entre os caracteres fenotípicos e molecular (Quadro 11). No entanto, os caracteres multicategóricos demonstraram maior correlação (0,2816) em relação aos caracteres contínuos (0,1377). A baixa correlação entre os caracteres contínuos e multicategóricos (0,1521) também sugerem que a expressão de seus fenótipos apresenta mecanismos e importâncias distintas o que não favorece uma análise conjunta destes grupos de caracteres. Observaram-se os maiores níveis de correlação envolvendo a matriz soma (Quadro 11), sendo os resultados esperados, uma vez que a matriz é obtida a partir dos dados padronizados das medidas de dissimilaridade dos três grupos de caracteres.

Para adotar um critério de seleção dos caracteres nos estudos da diversidade genética será indispensável considerar os objetivos mais relevantes do estudo. No caso de avaliar a diversidade apenas no aspecto quantitativo, independentemente de quais variáveis seriam predominantes, o uso exclusivo de marcadores RAPD pode indicar resultados com certo nível de confiabilidade e praticidade, sendo, então, recomendável nos casos de estudo de diversidade sem interesse específico das variáveis no curto prazo, como nos trabalhos para valoração do patrimônio genético. No caso em que o interesse está definido para algum tipo de caráter, podem-se utilizar os caracteres fenotípicos conforme a particularidade da variável ou associar aos marcadores previamente estudados.

Quadro 11 – Correlação entre as matrizes de dissimilaridade dos caracteres contínuos (d_{cont}), multicategóricos (d_{Mcat}), molecular (d_{mol}) e dados da matriz soma (d_{soma})

Matriz	d_{cont}	d_{Mcat}	d_{Mol}	d_{soma}
d_{cont}	1	0,1521 ⁺⁺	0,1377 ⁺⁺	0,6337 ⁺⁺
d_{categ}		1	0,2816 ⁺⁺	0,7044 ⁺⁺
d_{Mol}			1	0,6973 ⁺⁺
d_{soma}				1

⁽⁺⁺⁾ e ⁽⁺⁾ : significativo a 1 e 5 % de probabilidade pelo teste de Mantel, baseado em 5.000 simulações.

4. CONCLUSÕES

Os dados experimentais permitem concluir que:

As correlações entre os caracteres fenotípicos e moleculares foram baixas, significando que os marcadores RAPD não representaram, especificamente, as magnitudes das variáveis fenotípicas contínuas e multicategóricas avaliadas.

Estudos comparativos da variabilidade genética no aspecto quantitativo entre as populações podem adequar-se facilmente ao uso de marcadores RAPD mediante avaliação prévia e seleção dos oligonucleotídeos informativos.

Estudos da diversidade das variáveis dos caracteres contínuos de interesse, como produção de -ecdisona e matéria seca da raiz, não foram favoráveis pelo uso exclusivo de marcadores RAPD, sendo recomendada a análise individual das variáveis contínuas ou associadas a determinados marcadores RAPD.

A avaliação da diversidade apenas pelos marcadores RAPD pode fornecer estimativas que quantificam aleatoriamente a diversidade entre indivíduos e populações a curto prazo.

O uso combinado de marcadores RAPD e caracteres fenotípicos pode reunir genótipos promissores na coleção pela identificação dos indivíduos mais divergentes, que apresentam alta plasticidade fenotípica.

CONCLUSÕES GERAIS

A avaliação da diversidade genética das populações de fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] amostradas na região da bacia do rio Paraná, com base nas características fenotípicas e moleculares avaliadas, permitiu as seguintes conclusões:

- A população 1 apresentou os maiores índices de dissimilaridade nas avaliações entre as populações destacando-se, também, pela maior média no teor de -ecdisona (0,61%), coerentemente com a sua localização em área de intenso extrativismo e modificação da vegetação local. Portanto, sua preservação *in situ* e *ex situ* torna-se prioritária.

- Os indivíduos 05, 06 e 12 demonstraram alto potencial para inclusão nos trabalhos de melhoramento vegetal, uma vez que reúnem caracteres relacionados ao alto teor de -ecdisona e relativa produção de raízes.

- A técnica molecular RAPD permitiu a obtenção de fragmentos polimórficos em quantidade e qualidade suficientes para analisar a diversidade genética de 64 indivíduos de fáfia, verificadas pela reprodutibilidade e repetibilidade do padrão de bandas.

- As correlações entre os caracteres fenotípicos e moleculares foram baixas, indicando que os marcadores RAPD não representaram, especificamente, as magnitudes das variáveis fenotípicas contínuas e multicategóricas avaliadas. Os níveis de dissimilaridade obtidos para cada população foram diferentes, conforme os caracteres utilizados.

- O uso combinado de marcadores RAPD e caracteres fenotípicos podem reunir genótipos promissores na coleção pela identificação dos indivíduos mais divergentes e que apresentam alta plasticidade fenotípica.

- O uso exclusivo de marcador RAPD, em substituição aos caracteres fenotípicos, pode ser uma escolha favorável sob alguns aspectos, notadamente quando objetiva-se apenas quantificar a diversidade e não se dispõe de tempo e recursos para visitas freqüentes ao local de avaliação.

- O agrupamento das populações 2, 3 e 4 no mesmo grupo de similaridade pelo método de otimização de Tocher e método hierárquico UPGMA foi concordante com os aspectos fitogeográficos correlacionados ao curso atual do rio Paraná que, supostamente, indica origem distinta dos genótipos que compõem a população 1.

- A população 4 demonstrou menor magnitude de dissimilaridade entre seus indivíduos, no entanto é necessário rever os critérios de coleta relacionados ao tamanho da amostra e distância entre os indivíduos, para, de fato, mencionar a baixa variabilidade existente no seu local de coleta (Vila Alta-PR, Parque Nacional de Ilha Grande).

REFERÊNCIAS

- ALLARD, R.W. **Princípios de melhoramento genético de plantas**. São Paulo. Edgard Blucher, 1971. 381 p.
- AMARAL JÚNIOR, A. T. **Análise multivariada e isozimática da divergência genética entre indivíduos de moranga (*Cucurbita maxima* Duchesne)**. Viçosa: 95p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento), UFV, 1994.
- AMORIM A. P.; SOUZA ALMEIDA, C.C.; MELO SERENO, M. J. C.; BERED, F.; BARBOSA NETO, J. F. Genetic variability in sweet corn using molecular markers. **Maydica**, v. 48, p. 177-181, 2003.
- ARAUJO, D. G.; CARVALHO, S. P.; ALVES, R. M. Divergência genética entre clones de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Willd ex Spreng Schum). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, n. 1, p. 13-21, 2002.
- BAI, D.; BRANDLE, J.; REELEDER, R. Genetic diversity in north American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) grown in Ontario detected by RAPD analysis. **Genome**, v. 40, p. 111-115, 1997.
- BOLARIC, S.; BARTH, S.; MELCHINGER, A. E.; POSSELT, U. K. Molecular genetic diversity within and among German ecotypes in comparison to European perennial ryegrass cultivars. **Plant Breeding**, v. 124, p. 257-62, 2005.
- BLACK-SAMUELSSON, S.; ERIKSSON, E.; GUSTAFSSON, L.; GUSTAFSSON, P. RAPD and morphological analysis of the rare plant species *Vicia pisiformis* (Fabaceae) **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 61, p. 325–343, 1997.
- BRUNETON, J. **Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants**. 2nd ed., Paris: Lavoiseir, 1999, 1.119 p.

- CAMPS, F.; CLAVERIA, E.; COLL, J.; MARCO, M-P.; MESSEGUER, J. Ecdysteroid production in tissue cultures of *Polypodium vulgare*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 3.819-3.821, 1990.
- CORREIA JÚNIOR, C. **Estudo agrônômico da fáfia (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen): sazonalidade na produção de raízes e conteúdos de beta-ecdisona em diferentes indivíduos de São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul**. Botucatu: 94 p. Tese (Doutorado em Horticultura), UNESP/FCA. 2003.
- CORREIA, R. X. **Mapeamento genético da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) utilizando marcadores RAPD**. Viçosa, 97 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento), UFV, 1995.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2001. 648 p.
- CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2003. v. 2, 585 p.
- DAHLBERG, J. A.; ZHANG, X.; HART, G. E.; MULLET, J. E. Comparative assessment of variation among sorghum germplasm accessions using seed morphology and RAPD measurements. **Crop Science**, v. 42, p. 291-296, 2002.
- DE-PARIS, F.; NEVES, G., SALGUEIRO, J.B.; QUECEDO, J.; IZQUIERDO, I.; RATES, S.M.K. Psychopharmacological Screening of *Pfaffia glomerata* Spreng (Amaranthaceae) in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 261-269. 2000.
- DINAN, L. Phytoecdysteroids: biological aspects. **Phytochemistry**, v. 57, p. 325-339, 2001.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1987.
- FERREIRA, M.E. Melhoramento genético do arroz: impactos da genômica. In: BORÉM, A.; GIÚDICE, M.; SEDIYAMA, T. (Eds.) **Melhoramento genômico**. Viçosa, UFV, 2003. 224 p.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília, EMBRAPA/CENARGEN, 1998. 220 p.
- FIGUEIREDO, L. S. **Avaliação do comportamento em cultivo de campo e *in vitro* de indivíduos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae)**. Campos dos Goytacazes: 60p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal), UENF, 2002.
- FILIPPOVA, V. N.; ZORINYANTS, S. E.; VOLODINA, S. O.; SMOLENSKAYA, I. N. Cell cultures of ecdysteroid-containing *Ajuga reptans* and *Serratula coronata* plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 50, p. 501-508, 2003.

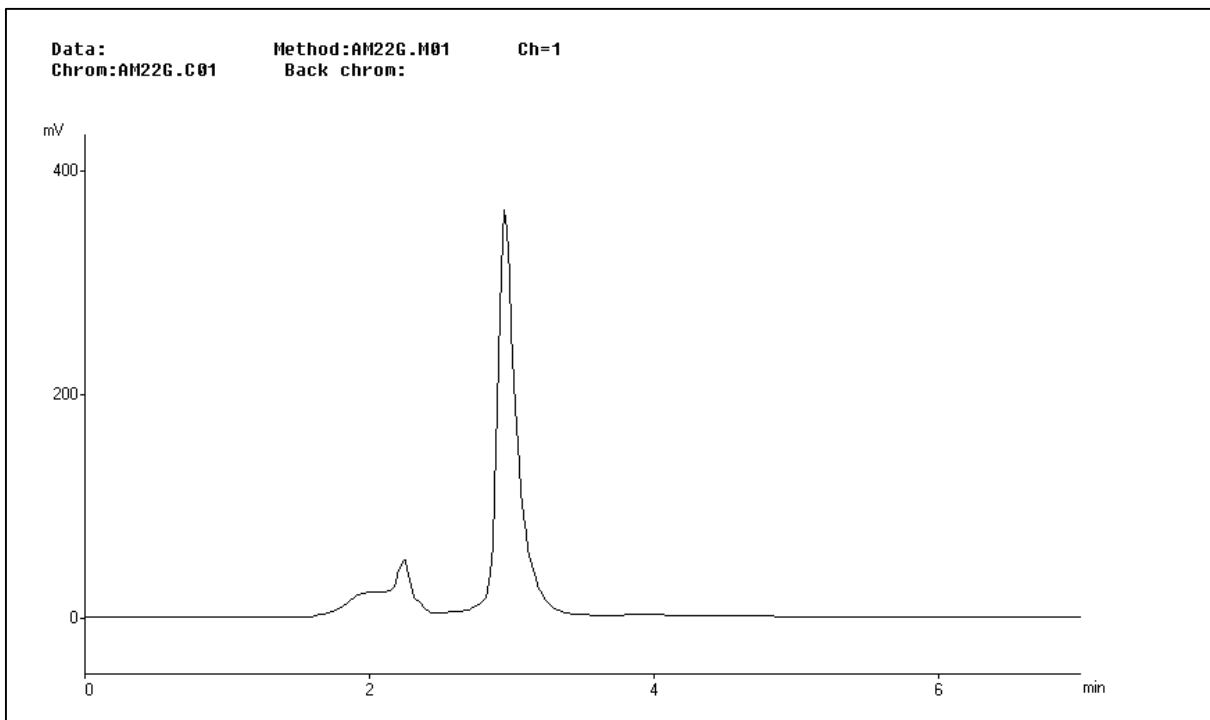
- GELETA, L. F.; LABUSCHAGNE, M. T.; VILJOEN, C. D. Relationship between heterosis and genetic distance based on morphological traits and AFLP markers in pepper. **Plant Breeding**, v. 123, p. 467-73, 2004.
- GONZALEZ-RODRIGUEZ, A.; ARIAS, D.M.; VALENCIA, S. OYAMA; K. Morphological and RAPD analysis of hybridization between *Quercus affinis* and *Q. laurina* (Fagaceae), two mexican red oaks. **American Journal of Botany**, v. 9, p. 401-409, 2004.
- GOULART, M. F.; RIBEIRO, S. P.; LOVATO, M. B. Genetic, morphological and spatial characterization of two populations of *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae), in different successional stages. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 275-284, 2005.
- GAUER, L.; MOLINA, S. C. Genetic variation in natural populations of maté (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hill., Aquifoliaceae) using RAPD markers. **Heredity**, v. 84, p. 647-656, 2000.
- GRANATE, M. J.; SEDIYAMA, M. A. N.; OLIVEIRA, L. C.; CRUZ, C. D.; PUIATTI, M. Clonal selection in arracacha breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, p. 105-110, 2004.
- GREBENOK, R. J.; ADLER, J. H. Ecdysteroid biosynthesis during the ontogeny of spinach leaves. **Phytochemistry**, v. 33, p. 341-347, 1993.
- JASIÉŃSKI, M; AYALA, F. J.; BAZZAZ, F. A. Phenotypic plasticity and similarity of DNA among genotypes of an annual plant. **Heredity**, v. 78, p. 176-181, 1997.
- KAJIKI, F.O. **Estudo das condições para indução de calos e produção de compostos secundários em *Pfaffia glomerata* (spreng.) Pedersen**. Piracicaba: 96p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas), ESALQ/USP, 1996.
- KHANUJA, S. P. S.; SHASANY, A. K; PAWAR, A.; LAL, R. K.; DAROKAR, M. P.; NAQVI, A. A.; RAJKUMAR, S.; SUNDARESAN, V.; LAL, N.; KUMAR, S. Essential oil constituents and RAPD markers to establish species relationship in *Cymbopogon* Spreng. (Poaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 171-186, 2005.
- LACERDA, D. R; ACEDO, M. D. P.; LEMOS FILHO, J. P.; LOVATO, M. B Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymenia reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 1143–1152, 2001.
- LORENZI, H; MATOS, F. J. **A Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 2002. 544 p.
- LEHMANN, C.; REBELE, F. Phenotypic plasticity in *Calamagrostis epigejos* (Poaceae): response capacities of genotypes from different populations of contrasting habitats to a range of soil fertility. **Acta Oecologica**, v. 28, p. 127–140, 2005.

- MAGALHÃES, P. M. **Agrotecnologia para o cultivo da *Pfaffia***. Campinas: CPQBA – UNICAMP. 1998. 5p.
- MARQUES, L. C.; GALVÃO, S. M. P.; OLIVEIRA, M. G. M.; CARLINI, E. A. Estudo farmacológico pré-clínico de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen – Amaranthaceae. **Anais do Simpósio de plantas medicinais do Brasil**, Águas de Lindóia, SP. p. 68, 1998.
- MARTEL, J. H. I **Caracterização de germoplasma de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) por descritores morfológicos**. Jabotical: 107p. Tese (Doutorado na área de Genética e Melhoramento de Plantas), UNESP/Jaboticabal, 2002.
- MARTINELLO, G. E.; LEAL, N. R.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; PEREIRA, M. G.; DAHER, R. F. Divergência genética em indivíduos de quiabeiro com base em marcadores morfológicos. **Horticultura Brasileira**, v. 20, p. 52-58, 2001.
- MICHIRO, K.; YASUHIRO, T.; TOSHIHARU, H.; SHIGEYUKI, A.; MASAO, I.; MASASHI, K. Enhancing effect of brazilian *Pfaffia glomerata* on reproductive ability of male golden hamsters and of male mice. **Natural Medicines**, v. 52, p. 68-73, 1998.
- MING, L. C.; CORREIA JÚNIOR, C. Collection of Fafia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Acta Horticulturae**, v. 57, p. 259-262, 2002.
- MIRALI, N.; NABULSI, I. Genetic diversity of almonds (*Prunus dulcis*) using RAPD technique. **Scientia Horticulturae**, v. 98, p. 461-471, 2003.
- MONTANARI, I. J.; MAGALHÃES, P. M.; QUEIROGA, C. L. Influence of plantation density and cultivation cycle on root productivity and tenors of beta-ecdysone in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Acta Horticulturae**, v. 502, p. 125-128, 1999.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NAGAKARI, M.; KUSHIRO, T.; MATSUMOTO, T.; TANAKA, T.; KAKINUMA, K.; FUJIMOTO, Y. Incorporation of acetate and cholesterol into 20-hydroxyecdysone by hairy root clone of *Ajuga reptans* var. *Atropurpurea*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 907-910, 1994.
- NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C.; MARTINS, C. F.; RUSSOWSSKI, D. Micropropagação do ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 3, p. 11-18, 2001.
- NEGREIROS, J. R. S. **Divergência genética entre progênie de maracujazeiro amarelo baseada em características morfoagronômicas**. Viçosa: 73p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), UFV, 2004.
- NYBOM, H. Compararion of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 1143-1155, 2004.

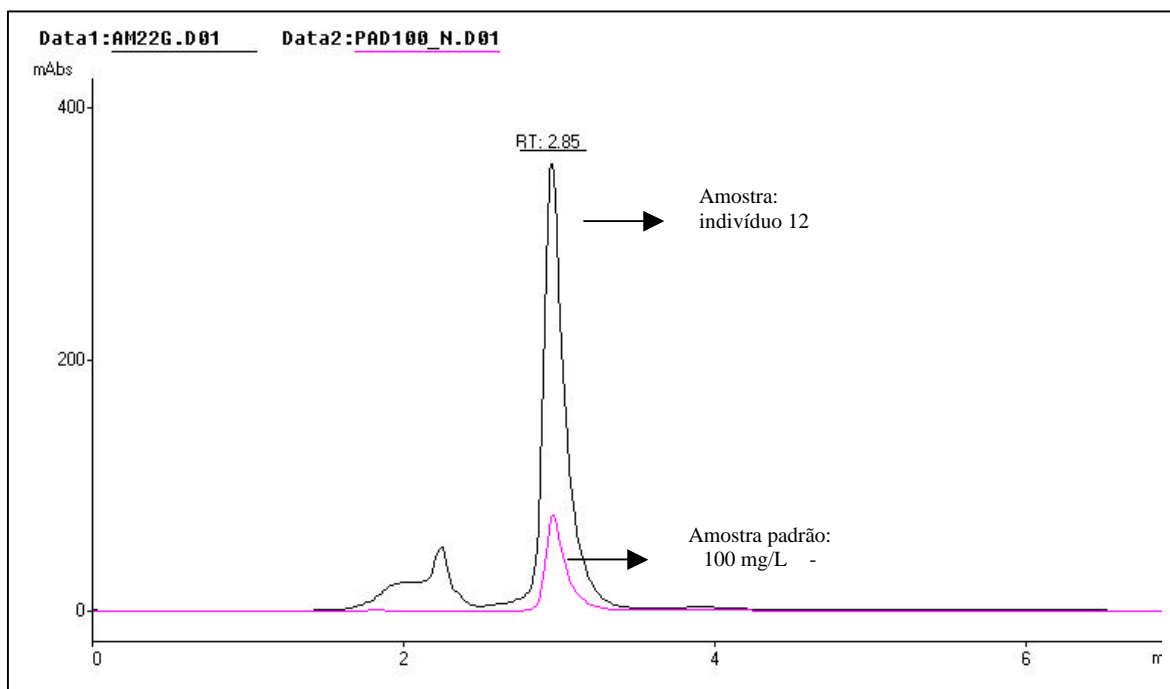
- OLIVEIRA, V. R.; CASALI, V. W. D.; CRUZ, C. D.; PEREIRA, P. R. G.; BRACCINI, A. L. Avaliação da diversidade genética em pimentão através de análise multivariada. **Horticultura Brasileira**, v. 17, p. 19-24, 1999.
- PERECIN, M. B. **Diversidade genética em populações naturais de espécies de espinheira-santa (*Maytenus aquifolia*) Mart. e *M. ilicifolia* Mart. Ex Reiss. (Celastraceae)**. Piracicaba: 134p. Tese (Doutorado na área de Genética e Melhoramento de Plantas), ESALQ, 2000.
- PICOLI, E. A. T. **Morfogênese *in vitro* e otimização do número de marcadores RAPD para estimação da diversidade genética em eucalipto**. Viçosa: 87p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento), UFV, 2005.
- RAMACHANDRA RAO, S.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 101-153, 2002.
- REIXACH, N.; IRORRE-SANTILARI, J.; CASAS, J.; MELÉ, H.; MESSEGUER, J.; CAMPS, C. (1996) Biosynthesis of ecdysteroids in *in vitro* prothalli cultures of *polypodium vulgare*. **Phytochemistry**, v. 43, p. 597-602, 1996.
- SMITH, L.B.; DOWNS, R.J. **Flora ilustrada catarinense. v. Amarantáceas**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1972. 110p.
- SHIOBARA, Y.; INOUE, S.; NISHIGUCHI, Y. Iresinoide, a yellow pigment from *Pfaffia iresinoides*. **Phytochemistry**, v. 31, p. 953-956, 1992.
- SHIOBARA, Y.; INOUE, S. S.; KEATO, K.; NISHIGUCHI, Y.; OISHI, Y.; NISHIMOTO, N.; OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K.; HASHIMOTO, G. A norriterpenoid, triterpenoids and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, v. 32, p. 1527-1530, 1993.
- SHAUCHENKO, T.; WHITING, P.; SARKER, S. D.; DINAN, L. Distribution and identity of phytoecdysteroids in *Gomphrena* spp. (Amaranthaceae). **Biochemical Systematics and ecology**, v. 26, p. 337-346, 1998.
- SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, v. 41, p. 237-245, 1981.
- SIQUEIRA, J. C. Considerações taxonômicas sobre as espécies brasileiras do gênero *Pfaffia*. **Acta Biológica Leopoldensia**, v. 10, p. 269-278, 1998.
- STEINER, J. J.; GARCIA LOS SANTOS, G. Adaptive ecology of *Lotus cornicatus* L. Genotypes: I. plant morphology and RAPD marker characterizations. **Crop Science**, v. 41, p. 352-563, 2001.
- SAUCHENKO, T.; WHITING, P.; SARKER, S. D.; DINAN, L. Distribution and identity of phytoecdysteroids in *Gomphrena* spp. (Amaranthaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, p. 337-346, 1998.
- TERAN, E. Plantas de interesse na cosmetologia. **Cosmetics & Toiletries**, v. 2, p. 18-23, 1990.

- THORMANN, C. E.; FERREIRA, M. E.; CAMARGO, L. E. A.; TIVANG, J. G.; OSBORN, T. C. Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 88, p. 973-980, 1994.
- TOMAS, J.; CAMPS, F.; COLL, J.; MELÉ, E.; MESSEGUER, J.; Phytoecdysteroid production by *Ajuga reptans* tissue cultures. **Phytochemistry**, v. 32, p. 317-324, 1993.
- VASCONCELOS, J. M. O. Amaranthaceae do Rio Grande do Sul, V-Gêneros de *Pfaffia* Mart e *Gomophera* L. **Roessléria**, v. 8, p. 75-94, 1986.
- VASCONCELOS, M. J. V. **Avaliação da variabilidade genética de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) pelo uso de marcadores moleculares RAPD**. Viçosa: 54p. Dissertação (Mestrado em agroquímica) UFV, 1995.
- VICCINI, L. F.; SOUZA da COSTA, D.C.; MACHADO, M.A.; CAMPOS, A.L. Genetic diversity among species of *Lippia* (Verbenaceae) based on RAPD markers. **Plant Systematics and Evolution**, v. 246, p. 1-8, 2004.
- VIEIRA, R. F **Estratégias para conservação e manejo de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas: resultados da 1ª Reunião Técnica**. Embrapa, Brasília, 2002. 184p.
- VIGO, C. L. S.; NARITA, E.; MARQUES, L. C. Validação metodológica de quantificação espectrofotométrica das saponinas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen - Amaranthaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 46-49, 2003.
- VOLLMANN, J.; GRAUSGRUBER, H.; STIFT, G.; DRYZHYRUK, V.; LELLEY, T. Genetic diversity in camelina germplasm as revealed by seed quality characteristics and RAPD polymorphism. **Plant Breeding**, v. 124, p. 446-453, 2005.
- ZUCCHI, M. I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia desynerica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR**. Piracicaba: 130p. Tese (Doutorado na área de Genética e Melhoramento de Plantas), ESALQ/USP, 2002.

APÉNDICES



Apêndice 1a – Cromatograma do extrato metanólico do acesso 12, analisado por CLAE, utilizando coluna Bomdesil C 18 (5,0 m x 4,6 mm x 250 mm); fase móvel metanol (100%) e leitura em $\lambda = 245$ nm.



Apêndice 1b – Cromatograma do extrato metanólico do indivíduo 12 e do padrão - ecdisona (100 mg/L), analisado por CLAE, utilizando coluna Bomdesil C 18 (5,0 m x 4,6 mm x 250 mm); fase móvel metanol (100%) e leitura em $\lambda = 245$ nm.

Apêndice 2 – Valores das medidas de dissimilaridade entre pares de indivíduos de fáfia avaliados pelos caracteres contínuos (acima do corte diagonal), com base na distância Mahalanobis (D^2) e marcadores RAPD (abaixo da diagonal), com base no índice do complemento aritmético de Nei e Li, em 64 indivíduos de fáfia

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1		30.93	75.26	17.71	29.03	140.87	31.08	26.10	57.23	57.48	31.14	99.22	48.77	44.42	27.62	27.12
2	0,2712		155.35	56.98	72.55	164.20	71.42	46.04	54.54	42.89	84.01	155.28	29.36	21.36	9.91	74.65
3	0,3939	0,2946		68.97	58.55	275.58	45.88	98.83	180.68	191.91	52.82	163.82	166.79	187.22	171.20	77.73
4	0,3942	0,3466	0,2846		25.83	120.47	47.75	37.85	62.71	48.33	11.36	64.70	53.30	57.03	54.98	6.69
5	0,4234	0,3879	0,3304	0,3249		152.88	68.12	53.14	81.14	80.44	28.72	84.60	85.83	77.04	88.92	36.06
6	0,3761	0,3279	0,3025	0,3253	0,3044		220.36	202.30	76.25	142.05	155.85	45.61	147.31	176.34	169.28	121.46
7	0,3957	0,3061	0,3195	0,3360	0,4113	0,2675		72.87	105.85	127.76	52.83	163.79	101.20	109.81	77.28	62.02
8	0,4220	0,3860	0,3393	0,4077	0,4112	0,3628	0,3216		93.28	40.09	45.76	157.32	32.33	36.95	39.27	57.59
9	0,3889	0,3482	0,3484	0,3793	0,3839	0,2915	0,3244	0,3780		69.25	96.27	103.84	56.66	60.00	69.67	80.39
10	0,3729	0,3008	0,3527	0,3785	0,3793	0,2787	0,3143	0,3772	0,3244		69.80	134.29	25.18	21.42	40.67	75.08
11	0,4138	0,3471	0,3418	0,3198	0,2983	0,3333	0,3361	0,3661	0,3184	0,2975		83.66	67.80	78.56	83.09	23.00
12	0,3390	0,2927	0,3389	0,3466	0,3739	0,2675	0,3225	0,3860	0,3482	0,0531	0,3112		152.61	163.55	155.95	54.33
13	0,3364	0,3478	0,4018	0,3872	0,3982	0,3421	0,3450	0,3585	0,3744	0,3565	0,3628	0,3420		16.91	33.79	76.10
14	0,3879	0,3141	0,3080	0,3441	0,4123	0,3167	0,3278	0,3929	0,3394	0,3223	0,3277	0,3029	0,3274		22.92	78.68
15	0,3305	0,2846	0,3527	0,2988	0,4138	0,3443	0,3143	0,4211	0,3128	0,3171	0,3388	0,3008	0,3391	0,3141		67.66
16	0,4059	0,3414	0,3771	0,3622	0,4043	0,3117	0,3387	0,4026	0,3799	0,3173	0,3551	0,3307	0,4077	0,3633	0,3494	
17	0,3617	0,3388	0,3610	0,3440	0,3766	0,3580	0,3115	0,3745	0,3867	0,3306	0,3195	0,3443	0,3799	0,3610	0,3061	0,3226
18	0,3959	0,3961	0,3840	0,3231	0,4191	0,3492	0,3518	0,4153	0,4359	0,4095	0,3840	0,3834	0,4202	0,3200	0,3465	0,4186
19	0,3702	0,3306	0,3942	0,3440	0,3593	0,3471	0,3663	0,4071	0,3991	0,3607	0,4000	0,3416	0,3947	0,3417	0,3361	0,3548
20	0,4025	0,3705	0,4146	0,3281	0,3924	0,3548	0,3414	0,4397	0,3853	0,3600	0,3902	0,3790	0,4017	0,3659	0,3680	0,3701
21	0,3934	0,3386	0,3414	0,3125	0,4034	0,3440	0,3333	0,4043	0,3761	0,3597	0,3871	0,3413	0,4008	0,3468	0,3518	0,3828
22	0,3740	0,3516	0,3600	0,3023	0,3833	0,2937	0,2992	0,3671	0,3502	0,3333	0,3440	0,3333	0,3640	0,3200	0,3647	0,3488
23	0,4054	0,3593	0,3363	0,3613	0,4587	0,3478	0,3362	0,3767	0,3991	0,3793	0,3860	0,3593	0,4009	0,3362	0,3906	0,3532
24	0,3859	0,3626	0,3796	0,3490	0,4153	0,3522	0,3387	0,4286	0,3680	0,3494	0,3633	0,3574	0,3991	0,3388	0,3574	0,3755
25	0,3967	0,3413	0,4089	0,3774	0,4202	0,3735	0,3760	0,4249	0,4286	0,3466	0,3927	0,3466	0,3957	0,3603	0,3466	0,3804
26	0,3802	0,3254	0,4008	0,3463	0,3950	0,3655	0,3840	0,3991	0,4286	0,3546	0,3603	0,3546	0,3702	0,3522	0,3387	0,3804
27	0,4050	0,3571	0,3710	0,3074	0,3808	0,3360	0,3200	0,4335	0,4335	0,3730	0,3710	0,3546	0,3729	0,3952	0,3705	0,3516
28	0,3724	0,3333	0,3279	0,3228	0,3872	0,3496	0,3279	0,4261	0,3772	0,3468	0,3689	0,3360	0,3535	0,3361	0,3387	0,3889
29	0,3937	0,3409	0,3668	0,3234	0,3680	0,3563	0,3282	0,4286	0,4016	0,3688	0,3900	0,3640	0,4089	0,3514	0,3536	0,3633
30	0,3583	0,3600	0,3496	0,3177	0,4237	0,3790	0,3655	0,4569	0,4286	0,3840	0,3902	0,3735	0,4188	0,3902	0,3920	0,3834
31	0,4204	0,3726	0,3120	0,3615	0,3776	0,3439	0,3518	0,4153	0,3906	0,3543	0,3840	0,3730	0,4310	0,3040	0,3780	0,4186
32	0,3734	0,3583	0,3610	0,3173	0,4348	0,3776	0,3640	0,4449	0,4375	0,4074	0,4034	0,4050	0,4248	0,3891	0,3975	0,3684
33	0,3814	0,3333	0,3361	0,2988	0,4224	0,3525	0,3469	0,4211	0,4071	0,3740	0,3554	0,3633	0,4174	0,3471	0,3659	0,3574
34	0,3787	0,3251	0,3249	0,3225	0,3826	0,2946	0,2869	0,3805	0,3867	0,3469	0,3671	0,3610	0,4061	0,3222	0,3498	0,2956
35	0,3808	0,3574	0,3607	0,3150	0,3957	0,3117	0,3145	0,4026	0,3887	0,3735	0,3878	0,3815	0,4163	0,3306	0,3815	0,3175
36	0,4132	0,3785	0,4008	0,3488	0,4393	0,3200	0,3440	0,4213	0,3680	0,3413	0,3629	0,3413	0,4008	0,3600	0,3785	0,3672
37	0,4359	0,3745	0,3587	0,3790	0,4236	0,3500	0,3444	0,4311	0,3812	0,3884	0,4202	0,3802	0,4386	0,3193	0,3416	0,3984
38	0,3865	0,3410	0,3307	0,3233	0,3765	0,3566	0,3668	0,3967	0,3859	0,3846	0,3516	0,3822	0,4016	0,3672	0,3385	0,4015
39	0,4546	0,3693	0,3814	0,3577	0,4626	0,4310	0,4250	0,4709	0,4570	0,4191	0,4177	0,4108	0,4756	0,4177	0,4108	0,4344
40	0,3860	0,3787	0,3130	0,3833	0,3874	0,3621	0,3535	0,4326	0,3774	0,3820	0,3712	0,3820	0,4091	0,3478	0,3617	0,3529
41	0,3909	0,3680	0,3540	0,3872	0,1705	0,3625	0,4174	0,4085	0,4502	0,4087	0,3304	0,4035	0,4178	0,4248	0,3939	0,4359
42	0,3363	0,3021	0,3707	0,3667	0,3032	0,3562	0,3192	0,3917	0,3581	0,3448	0,2987	0,3333	0,3455	0,3304	0,2992	0,3724
43	0,3913	0,3232	0,3514	0,3060	0,3655	0,3717	0,3359	0,4041	0,3992	0,3992	0,3591	0,3712	0,4008	0,3745	0,3764	0,3308
44	0,3991	0,3991	0,4149	0,3698	0,4155	0,3853	0,3966	0,4512	0,4512	0,4335	0,4323	0,4274	0,4378	0,3799	0,3820	0,3983
45	0,3840	0,3684	0,3663	0,3492	0,4421	0,3689	0,3633	0,4298	0,4159	0,3577	0,3884	0,3415	0,4348	0,3719	0,3415	0,3680
46	0,3934	0,3307	0,3387	0,2973	0,3750	0,3016	0,3123	0,3898	0,3787	0,3071	0,3200	0,2937	0,3950	0,3200	0,3228	0,2841
47	0,3917	0,3520	0,3796	0,3412	0,3898	0,3603	0,3065	0,4113	0,4174	0,3414	0,3796	0,3468	0,4163	0,3388	0,3735	0,3202
48	0,4142	0,3735	0,4016	0,3465	0,4043	0,3659	0,3198	0,4261	0,4236	0,3548	0,3934	0,3603	0,4397	0,3689	0,3790	0,3333
49	0,4091	0,3739	0,4044	0,3535	0,3704	0,3597	0,3656	0,4623	0,3839	0,3826	0,3540	0,3712	0,4178	0,3543	0,3568	0,3625
50	0,3853	0,3622	0,3871	0,3591	0,3667	0,3651	0,3597	0,4576	0,3532	0,3701	0,3440	0,3597	0,4118	0,3520	0,3386	0,3463
51	0,4302	0,3895	0,3838	0,3472	0,4350	0,3656	0,3441	0,3977	0,4286	0,3723	0,3838	0,3684	0,3596	0,3622	0,3511	0,3854
52	0,3902	0,3594	0,3680	0,3257	0,4298	0,3543	0,3177	0,4286	0,3644	0,3047	0,3730	0,3281	0,3417	0,3095	0,3438	0,3436
53	0,3976	0,3436	0,3202	0,3333	0,4367	0,3516	0,3230	0,3750	0,3724	0,3488	0,3780	0,3541	0,3719	0,3543	0,3488	0,3512
54	0,4182	0,2787	0,4098	0,3016	0,5088	0,4483	0,3115	0,3448	0,4138	0,3115	0,3559	0,2759	0,3667	0,2787	0,3333	0,2787
55	0,4023	0,3653	0,3736	0,3261	0,4008	0,3731	0,3234	0,4048	0,3815	0,3482	0,3609	0,3407	0,3937	0,3534	0,3407	0,3504
56	0,3610	0,3785	0,4251	0,3750	0,4477	0,3655	0,3629	0,4335	0,4310	0,3976	0,4449	0,4056	0,3898	0,3959	0,3785	0,3647
57	0,3700	0,3816	0,4286	0,3810	0,4792	0,3301	0,3756	0,4074	0,4211	0,3366	0,4129	0,3301	0,3299	0,3930	0,3561	0,3398
58	0,3494	0,3256	0,3597	0,3333	0,3878	0,3178	0,3101	0,4250	0,3640	0,3514	0,3490	0,3359	0,3607	0,3177	0,3436	0,3333
59	0,3853	0,3202	0,3840	0,3282	0,4440	0,3333	0,3123	0,3932	0,3898	0,3412	0,3705	0,3412	0,3389	0,3520	0,3465	0,3672
60	0,3872	0,3333	0,4083	0,3440	0,4397	0,3251	0,3197	0,3833	0,3833	0,3469	0,3802	0,3469	0,3565	0,3667	0,3551	0,3603
61	0,3787	0,3279	0,3640	0,3440	0,3621	0,3251	0,3361	0,4044	0,4071	0,3415	0,4050	0,3415	0,3826	0,3444	0,3551	0,3684
62	0,3961	0,3258	0,3591	0,3333	0,4183	0,3536	0,3258	0,3740	0,3934	0,3585	0,3640	0,3534	0,3976	0,3333	0,3509	0,3184
63	0,3802	0,3546	0,3846	0,3230	0,3866	0,3440	0,3626	0,4163	0,4372	0,4127	0,4032	0,3992	0,4153	0,3710	0,3492	0,3780
64	0,3822	0,3433	0,3460	0,3358	0,4275	0,3835	0,3184	0,3896	0,3927	0,3582	0,3788	0,3508	0,4048	0,3409	0,3358	0,3579

continua...

Apêndice 2 – continuação

	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
1	32.16	307.64	143.94	67.89	175.79	747.50	116.38	649.43	57.83	99.74	306.67	74.47	280.49	202.99	453.73	176.80
2	68.10	315.22	181.40	76.16	211.60	714.13	127.41	641.05	61.54	111.31	340.21	116.62	271.13	223.83	456.96	195.25
3	58.59	425.36	246.78	160.41	269.70	919.66	245.36	788.61	112.95	158.06	410.45	118.45	409.31	291.47	604.80	257.28
4	65.89	232.12	107.34	42.55	117.39	667.97	91.15	566.30	38.49	73.47	248.14	36.26	215.52	158.99	385.49	139.62
5	65.43	306.36	149.03	92.42	184.11	758.57	142.06	664.42	60.47	120.19	303.05	87.08	267.12	209.17	451.69	185.89
6	226.94	136.83	116.75	149.87	100.63	397.34	70.60	353.66	146.21	187.86	144.59	128.69	88.76	88.67	179.28	84.41
7	18.01	403.65	207.33	106.28	239.84	847.95	174.76	735.12	82.39	125.91	382.81	103.19	374.01	241.16	562.83	207.00
8	68.02	324.09	172.98	67.83	211.79	814.79	164.83	708.25	53.89	84.71	375.72	91.47	319.49	286.89	503.16	252.08
9	93.94	182.02	75.34	50.53	105.62	478.11	69.53	413.26	39.48	84.72	192.91	77.72	137.77	106.52	268.15	95.55
10	132.03	230.66	117.83	47.09	153.93	665.53	105.73	585.53	49.70	84.83	299.86	86.91	221.84	222.86	384.86	196.02
11	81.17	285.20	121.12	53.29	142.04	750.31	114.23	640.37	47.82	92.41	288.08	38.79	271.51	201.02	462.13	176.96
12	178.10	147.30	117.09	133.07	79.66	499.14	71.45	423.74	129.68	165.48	139.60	89.18	121.76	84.38	244.80	79.16
13	111.41	273.18	147.06	37.00	176.18	704.45	99.37	622.85	36.05	74.65	339.49	88.67	243.75	239.28	440.44	208.09
14	111.49	296.33	151.56	46.62	193.02	749.04	104.95	663.74	54.69	101.16	357.15	109.37	267.74	247.25	470.78	216.44
15	79.25	318.44	181.19	76.72	205.55	732.43	130.84	650.81	80.63	118.13	341.17	111.73	290.05	237.63	466.36	211.33
16	82.43	236.07	128.32	61.80	117.60	669.34	97.71	567.07	64.85	92.51	239.63	47.58	214.90	158.21	385.74	147.03
17		395.18	202.47	126.94	251.17	822.32	199.43	714.63	89.57	125.33	371.97	129.97	371.13	251.08	529.61	221.23
18	0,3701		118.77	200.98	56.81	191.87	154.50	130.98	210.84	208.20	74.61	166.44	26.90	79.60	54.57	94.56
19	0,3443	0,3228		64.50	39.93	415.79	86.23	327.74	88.95	110.54	122.30	56.51	134.01	106.70	216.00	115.28
20	0,3600	0,3077	0,3120		89.45	597.93	70.29	499.70	21.17	47.87	242.87	35.51	192.68	166.73	367.90	154.47
21	0,3705	0,2548	0,3068	0,2868		309.21	76.40	232.04	116.02	117.76	51.72	67.93	68.40	54.10	148.68	74.10
22	0,3518	0,2679	0,3439	0,2923	0,2782		531.48	16.69	578.77	585.20	161.20	519.82	175.92	246.33	79.39	309.14
23	0,3507	0,3141	0,3707	0,3587	0,2833	0,3471		450.02	105.39	138.10	198.80	99.68	133.49	98.22	296.82	81.26
24	0,3655	0,2587	0,3680	0,3020	0,2996	0,0965	0,3587		493.26	490.67	121.66	414.89	142.00	189.22	59.75	243.64
25	0,3466	0,2490	0,3227	0,2918	0,2644	0,3232	0,3277	0,2685		40.48	244.25	45.42	186.34	162.49	354.35	143.86
26	0,3387	0,2414	0,2988	0,2763	0,2769	0,3130	0,3361	0,2763	0,0310		246.67	77.53	209.59	197.43	353.66	189.56
27	0,3705	0,2901	0,3068	0,3230	0,2846	0,3206	0,3473	0,3152	0,2973	0,2819		181.64	70.12	57.37	75.24	103.07
28	0,3548	0,2946	0,3226	0,2835	0,3125	0,3023	0,3814	0,3202	0,2706	0,2549	0,3125		171.63	123.80	306.13	117.01
29	0,3688	0,2894	0,3156	0,2714	0,3040	0,2800	0,3307	0,3011	0,2815	0,2815	0,2768	0,2959		55.36	55.99	73.33
30	0,3896	0,3436	0,3494	0,3804	0,2841	0,3591	0,3755	0,3622	0,3281	0,3281	0,2841	0,3281	0,2985		123.28	9.65
31	0,3937	0,2727	0,3307	0,3563	0,3333	0,3282	0,3306	0,3359	0,3257	0,3180	0,3588	0,3256	0,2967	0,3282		161.12
32	0,3833	0,3173	0,3636	0,3684	0,2713	0,3520	0,3593	0,3714	0,3117	0,3117	0,2880	0,3306	0,3000	0,0560	0,3254	
33	0,3306	0,3255	0,3388	0,3626	0,3571	0,3622	0,3276	0,3626	0,3413	0,3413	0,3651	0,3253	0,3106	0,2960	0,3020	0,2975
34	0,3141	0,3253	0,3443	0,3466	0,3040	0,2742	0,2759	0,3089	0,3520	0,3520	0,3440	0,3659	0,2797	0,3145	0,3175	0,2803
35	0,3307	0,3488	0,3387	0,3465	0,3490	0,2763	0,3021	0,3150	0,3882	0,3726	0,3516	0,3810	0,3109	0,3597	0,3566	0,3388
36	0,3546	0,3487	0,3413	0,3125	0,3154	0,2824	0,3557	0,3177	0,3230	0,3152	0,3178	0,3490	0,3063	0,3152	0,3384	0,3147
37	0,4156	0,2648	0,3251	0,3494	0,3175	0,3571	0,3362	0,3821	0,3120	0,3120	0,3571	0,3388	0,3180	0,3710	0,1225	0,3583
38	0,3539	0,3630	0,3692	0,3684	0,3284	0,3704	0,3927	0,3887	0,3184	0,3034	0,3483	0,3333	0,3620	0,3132	0,3556	0,3178
39	0,4250	0,3840	0,4000	0,4065	0,3710	0,3760	0,4000	0,3878	0,3765	0,3684	0,3871	0,3689	0,4131	0,3714	0,4160	0,3833
40	0,3846	0,3279	0,3418	0,3610	0,3306	0,3361	0,3571	0,3333	0,3141	0,3306	0,3633	0,3613	0,3123	0,3306	0,2705	0,3333
41	0,3652	0,4083	0,3739	0,3898	0,3924	0,3724	0,4378	0,3983	0,4237	0,3898	0,3840	0,3906	0,3629	0,3991	0,3891	0,4009
42	0,3021	0,3827	0,3305	0,3640	0,3610	0,3443	0,4054	0,3557	0,4000	0,3917	0,3583	0,3277	0,3546	0,4202	0,3802	0,4323
43	0,3741	0,3162	0,3282	0,3508	0,3432	0,3333	0,3629	0,3358	0,3234	0,3160	0,3086	0,3384	0,2740	0,3184	0,3529	0,3231
44	0,3448	0,2810	0,3793	0,3445	0,3583	0,3223	0,4247	0,3361	0,3389	0,3305	0,3808	0,3220	0,3785	0,4008	0,3719	0,3799
45	0,3333	0,2734	0,3252	0,3175	0,3098	0,3385	0,3219	0,3466	0,3202	0,3202	0,3307	0,3440	0,3434	0,3466	0,3594	0,3225
46	0,3439	0,2928	0,3044	0,2973	0,2567	0,2852	0,3029	0,3023	0,2923	0,3000	0,2692	0,3385	0,2868	0,2946	0,3384	0,2720
47	0,3494	0,3127	0,3092	0,1137	0,2996	0,2973	0,3390	0,3228	0,2969	0,2969	0,3125	0,2806	0,2910	0,3622	0,3514	0,3522
48	0,3710	0,3178	0,3145	0,1181	0,3125	0,3101	0,3532	0,3202	0,3020	0,3098	0,3177	0,2937	0,2959	0,3676	0,3721	0,3659
49	0,3571	0,2911	0,3304	0,3247	0,2681	0,2750	0,3458	0,2814	0,3590	0,3820	0,3162	0,3391	0,3226	0,3846	0,3702	0,3812
50	0,3597	0,2852	0,3360	0,3282	0,2644	0,2852	0,3610	0,3023	0,3692	0,3846	0,3103	0,3307	0,3088	0,3798	0,3612	0,3790
51	0,3730	0,3402	0,3804	0,3226	0,3333	0,3636	0,3552	0,3617	0,3298	0,3158	0,3264	0,2910	0,3399	0,3474	0,3158	0,3548
52	0,4118	0,2981	0,4118	0,3103	0,3359	0,3184	0,3745	0,3231	0,3053	0,3053	0,3232	0,3359	0,2920	0,3308	0,3208	0,3413
53	0,3566	0,3060	0,3566	0,3333	0,2857	0,3209	0,3061	0,3308	0,3208	0,3208	0,3308	0,3206	0,2852	0,2928	0,3209	0,3150
54	0,3651	0,3548	0,3667	0,3651	0,3548	0,3226	0,3968	0,3016	0,3443	0,3667	0,3016	0,3448	0,4118	0,3898	0,4909	0,3771
55	0,3556	0,2857	0,3259	0,3188	0,2975	0,3096	0,3954	0,3164	0,2852	0,2924	0,2924	0,3066	0,3080	0,3455	0,3500	0,3434
56	0,3494	0,3050	0,3466	0,3412	0,3488	0,3282	0,3613	0,3307	0,2996	0,3074	0,3643	0,3333	0,3358	0,3726	0,3385	0,3714
57	0,3498	0,2986	0,3134	0,3495	0,2952	0,3578	0,3535	0,3558	0,3110	0,3077	0,2952	0,3493	0,3273	0,3558	0,3649	0,3467
58	0,3488	0,3284	0,3411	0,2879	0,3209	0,3011	0,3633	0,3004	0,3636	0,3636	0,3008	0,3130	0,2899	0,3308	0,3185	0,3386
59	0,3439	0,3232	0,3123	0,3333	0,2901	0,2879	0,3333	0,3050	0,3000	0,3000	0,3180	0,3178	0,2915	0,3178	0,3460	0,3226
60	0,3443	0,3150	0,3033	0,3468	0,2880	0,3016	0,3448	0,3092	0,2880	0,2800	0,3173	0,3145	0,3077	0,3036	0,3307	0,3165
61	0,3115	0,3386	0,3279	0,3253	0,2857	0,3465	0,3766	0,3173	0,3147	0,3387	0,3466	0,3494	0,3435	0,3253	0,3701	0,3306
62	0,3258	0,3285	0,3182	0,3160	0,2794	0,3139	0,3280	0,3086	0,2963	0,3111	0,2868	0,3508	0,3121	0,3086	0,3212	0,3023
63	0,3387	0,3103	0,3227	0,3672	0,3462	0,3588	0,3587	0,3541	0,3307	0,3385	0,3566	0,3882	0,3532	0,3672	0,3717	0,3710
64	0,3284	0,2806	0,3060	0,3114	0,2924	0,3047	0,3804	0,3114	0,2847	0,2847	0,3091	0,3088	0,3007	0,3187	0,3381	0,3080

continua...

Apêndice 2 – continuação...

	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
1	465.26	122.77	113.66	231.51	553.99	218.02	393.46	64.17	28.11	93.34	234.51	93.32	43.61	345.74	100.61	102.29
2	453.45	151.97	141.39	247.27	565.73	226.76	380.21	71.06	54.21	176.89	260.65	81.81	70.53	345.97	113.99	116.77
3	660.40	214.29	207.71	374.39	705.20	352.38	590.33	191.92	68.26	31.48	309.46	220.27	106.64	554.11	157.11	179.40
4	399.63	98.77	96.11	193.57	484.28	162.37	357.29	73.65	52.50	92.80	194.64	74.82	27.52	300.59	77.65	83.57
5	490.84	135.57	122.42	296.09	562.28	232.46	436.52	98.86	41.67	79.22	245.87	142.48	52.87	382.41	140.59	157.68
6	154.48	87.25	82.24	84.40	236.94	75.86	140.89	45.09	247.65	343.52	120.16	222.69	167.52	115.96	269.99	277.22
7	575.42	157.82	150.54	281.60	661.67	305.72	505.39	116.36	48.39	60.02	271.20	150.47	76.83	461.98	113.66	114.01
8	491.36	182.84	167.31	296.16	622.57	241.52	417.52	107.50	36.43	124.15	296.87	59.48	43.15	409.77	79.43	92.87
9	273.28	70.78	48.79	164.45	356.18	108.75	222.87	14.72	126.43	215.90	133.62	107.94	76.07	184.97	140.70	147.87
10	349.45	142.33	131.23	222.38	507.50	161.79	313.37	91.86	92.53	213.58	254.21	42.08	51.63	289.43	90.99	98.31
11	477.92	114.63	115.00	250.02	570.74	215.26	432.22	113.23	41.75	68.98	223.60	90.32	20.85	372.31	66.92	78.46
12	283.73	72.03	86.21	112.08	306.62	102.91	253.34	85.22	180.69	231.46	131.87	207.63	123.31	184.42	226.60	236.89
13	369.86	135.76	117.17	234.02	558.28	190.39	340.61	68.24	71.11	200.15	260.47	42.65	35.55	318.92	66.48	73.62
14	429.81	144.33	127.29	263.15	596.35	211.69	380.80	85.78	65.83	201.11	289.86	47.39	41.50	330.83	82.71	85.41
15	463.25	161.58	157.69	231.92	570.60	225.48	377.88	80.45	59.30	185.62	269.31	63.54	70.85	340.20	105.51	101.23
16	409.66	107.76	110.42	189.28	472.69	167.75	374.56	82.76	69.71	107.37	203.96	97.21	46.97	292.75	103.57	102.76
17	566.83	175.05	157.84	309.45	625.48	304.16	484.03	108.29	58.58	85.20	281.04	176.13	109.56	443.61	159.89	161.72
18	133.91	164.06	176.12	111.12	98.77	16.20	92.72	188.37	448.88	527.51	103.18	261.69	286.84	68.99	335.55	363.36
19	261.10	86.67	77.07	188.53	302.37	90.73	238.98	114.63	224.42	272.23	134.36	139.84	120.56	138.38	156.15	159.76
20	343.31	88.96	76.44	209.26	477.57	140.74	330.47	84.52	107.09	180.68	197.42	35.92	25.01	249.55	39.97	40.93
21	219.46	62.97	79.68	111.73	206.10	44.36	198.20	124.35	284.81	338.08	83.08	167.02	150.10	94.66	199.06	202.73
22	322.53	480.37	509.45	363.16	64.25	229.37	192.75	489.49	957.58	1036.62	202.53	681.76	752.90	224.01	815.62	859.04
23	226.94	30.90	30.23	92.76	379.31	101.00	246.90	67.97	200.30	306.22	172.85	152.12	92.45	139.60	156.31	149.39
24	293.27	407.72	434.28	297.31	50.86	170.62	165.76	428.81	847.06	896.23	154.48	580.75	647.41	181.10	686.50	727.95
25	360.31	98.75	81.85	233.85	464.89	149.45	320.83	71.65	87.65	146.46	171.77	62.86	32.11	296.10	67.67	87.21
26	347.66	129.64	116.61	238.70	452.25	159.07	339.07	111.75	153.24	215.19	215.10	89.77	83.52	286.50	106.99	112.00
27	259.00	145.20	177.53	162.97	96.86	80.71	188.95	207.17	454.18	499.30	64.75	340.09	324.30	101.64	408.93	420.60
28	363.09	109.56	110.83	183.98	394.34	121.03	299.97	103.09	113.37	131.83	130.48	68.38	51.15	247.40	58.68	74.34
29	123.12	135.84	141.90	111.43	100.26	21.12	92.06	136.97	415.23	506.15	81.31	268.00	264.29	68.09	345.38	372.25
30	237.14	69.31	88.96	78.30	161.18	56.47	161.54	111.97	327.99	363.36	33.97	264.37	216.21	108.10	292.23	309.90
31	139.29	280.79	290.11	181.41	13.20	71.67	73.62	262.63	640.13	715.00	125.36	445.27	481.14	82.48	562.90	592.38
32	243.76	61.04	76.53	65.84	210.01	62.45	157.38	96.15	288.95	328.23	42.31	243.58	185.75	138.87	258.80	284.65
33		274.85	249.08	159.40	182.17	113.95	97.68	231.19	653.34	791.81	288.77	434.03	450.35	93.44	530.35	531.98
34	0,2863		9.56	111.48	353.43	112.29	266.59	76.11	218.20	291.47	118.90	199.20	106.78	169.95	200.24	199.69
35	0,3092	0,0732		134.29	371.77	116.41	260.51	55.08	204.46	278.50	142.20	191.32	97.01	170.36	189.87	189.24
36	0,3281	0,3065	0,3047		213.16	69.26	122.31	123.19	383.23	474.25	124.46	268.46	255.13	109.76	314.82	316.52
37	0,3225	0,3333	0,3740	0,3012		123.22	106.06	336.63	766.61	833.72	160.81	565.82	603.29	111.13	690.77	717.15
38	0,3487	0,3000	0,3409	0,3358	0,3488		67.61	105.64	351.47	436.76	75.78	192.22	206.91	60.59	264.75	286.70
39	0,3361	0,3333	0,3525	0,3494	0,4118	0,2891		190.70	566.44	693.80	141.50	364.83	411.08	110.85	479.78	519.73
40	0,3502	0,3391	0,3698	0,3029	0,2936	0,3200	0,3621		148.84	247.51	139.27	142.74	100.02	175.40	180.25	185.49
41	0,4372	0,3887	0,4017	0,4515	0,4336	0,4098	0,4756	0,3699		58.62	350.25	114.55	53.55	522.71	91.34	103.09
42	0,3590	0,3939	0,3866	0,4059	0,3793	0,3840	0,4609	0,3839	0,3000		377.42	216.24	117.16	648.25	143.95	163.85
43	0,3004	0,3385	0,3384	0,3333	0,3514	0,3166	0,4109	0,3387	0,3927	0,3600		268.96	238.04	173.66	305.02	346.33
44	0,3734	0,3887	0,3729	0,3975	0,3712	0,3952	0,4474	0,4118	0,3548	0,3575	0,3280		52.75	340.80	34.60	43.62
45	0,3360	0,3441	0,3760	0,3360	0,3443	0,3359	0,3884	0,3333	0,4310	0,3814	0,3030	0,3504		360.78	38.00	50.40
46	0,3228	0,2727	0,3152	0,2973	0,3307	0,3011	0,3815	0,3223	0,3587	0,3498	0,2915	0,2946	0,2784		429.84	417.24
47	0,3360	0,3120	0,3360	0,3203	0,3333	0,3283	0,3796	0,3417	0,3617	0,3808	0,3034	0,3080	0,2669	0,2481		10.84
48	0,3333	0,3226	0,3492	0,3255	0,3469	0,3409	0,3853	0,3557	0,3846	0,4008	0,3233	0,3220	0,2880	0,2685	0,0277	
49	0,3333	0,3184	0,3333	0,3192	0,3333	0,3610	0,4182	0,3456	0,3674	0,3303	0,3577	0,3488	0,3540	0,2542	0,2957	0,2838
50	0,3465	0,3040	0,3230	0,3308	0,3494	0,3680	0,4217	0,3444	0,3724	0,3251	0,3432	0,3361	0,3569	0,2519	0,2946	0,2996
51	0,3122	0,3913	0,4136	0,3265	0,3403	0,3571	0,3514	0,3702	0,4070	0,3556	0,3769	0,3605	0,3730	0,3367	0,2903	0,2935
52	0,3594	0,3175	0,3282	0,3282	0,3333	0,3284	0,3466	0,3361	0,4333	0,3689	0,3626	0,3745	0,3541	0,2955	0,3077	0,3205
53	0,2896	0,3282	0,3512	0,3208	0,3101	0,2847	0,3858	0,3333	0,4050	0,3846	0,3044	0,3577	0,3231	0,3184	0,3156	0,3130
54	0,3333	0,3448	0,3016	0,3231	0,4386	0,4035	0,2983	0,4386	0,5185	0,3793	0,3438	0,3448	0,3333	0,3231	0,3016	0,3016
55	0,3210	0,3483	0,3723	0,3116	0,3233	0,3077	0,3759	0,3101	0,3961	0,3539	0,3125	0,3411	0,3235	0,2617	0,2800	0,2774
56	0,3175	0,3655	0,3676	0,3780	0,3680	0,3485	0,3976	0,3498	0,4213	0,3891	0,3534	0,3361	0,3360	0,3178	0,3333	0,3465
57	0,3366	0,3204	0,3561	0,3555	0,3039	0,3521	0,3636	0,3886	0,4404	0,4070	0,3581	0,4421	0,3168	0,3148	0,3301	0,3399
58	0,2868	0,2813	0,2950	0,3308	0,3569	0,3358	0,3439	0,3360	0,3910	0,3522	0,3236	0,3740	0,3154	0,2884	0,2748	0,2874
59	0,2964	0,3068	0,3203	0,3077	0,3413	0,3606	0,3360	0,3471	0,3924	0,3416	0,2889	0,3942	0,3098	0,2672	0,3152	0,3281
60	0,2898	0,3004	0,3145	0,2880	0,3333	0,3436	0,3278	0,3532	0,3974	0,3447	0,2846	0,3707	0,3117	0,2698	0,3171	0,3306
61	0,3361	0,3143	0,3360	0,3626	0,3967	0,3539	0,3698	0,3590	0,3799	0,3419	0,3487	0,3879	0,3415	0,2885	0,2984	0,3036
62	0,2955	0,2636	0,2884	0,3086	0,3030	0,3429	0,3822	0,3150	0,3976	0,3543	0,3025	0,3730	0,3384	0,2601	0,2836	0,2884
63	0,3307	0,3089	0,3307	0,3954	0,3680	0,3708	0,3821	0,3663	0,3840	0,3942	0,3134	0,3724	0,3755	0,3308	0,3490	0,3543
64	0,2985	0,3206	0,3432	0,2774	0,3208	0,3239	0,3460	0,3203	0,3992	0,3591	0,2983	0,3594	0,3185	0,2708	0,2794	0,2841

continua...

Apêndice 2 – continuação...

	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64
1	64.67	43.56	66.22	88.10	210.65	348.10	448.55	96.32	157.38	128.30	163.92	120.99	247.01	104.22	94.22	342.52
2	76.71	62.15	78.92	82.67	198.35	327.37	422.83	142.02	186.90	158.01	178.77	134.42	273.14	117.70	106.78	317.22
3	206.15	184.27	125.66	203.22	328.88	515.53	626.16	144.15	230.23	201.08	249.40	207.45	346.82	213.79	167.88	523.44
4	67.78	48.74	52.05	68.56	164.40	296.46	397.51	50.12	107.57	86.20	111.64	84.49	187.22	78.31	62.43	300.14
5	93.40	67.66	103.09	99.35	232.58	394.88	493.47	89.15	128.45	120.93	173.48	135.11	278.25	145.69	115.33	403.23
6	42.95	52.27	193.03	53.38	106.74	157.94	221.15	100.36	81.72	87.65	110.02	116.24	129.69	72.11	107.93	162.65
7	142.95	121.45	67.77	152.17	263.29	414.14	522.05	135.04	227.34	174.03	213.52	158.50	303.22	140.90	116.70	407.17
8	101.35	76.01	84.81	106.64	250.43	413.69	516.65	134.24	193.04	183.77	192.65	150.58	290.14	148.33	131.80	405.51
9	44.03	40.57	99.29	27.13	89.19	192.89	258.06	74.92	87.16	60.20	82.15	53.72	160.90	49.79	54.39	186.80
10	73.17	51.21	88.60	60.92	175.43	305.17	394.98	108.28	142.74	142.35	140.96	110.23	227.48	108.09	99.15	297.53
11	100.12	75.06	45.32	93.41	205.50	365.34	476.34	55.61	122.87	106.63	129.82	99.86	228.92	108.28	68.92	370.59
12	55.61	57.89	154.86	78.83	140.54	230.92	314.53	56.20	68.55	67.26	111.99	119.45	146.96	89.85	98.36	243.72
13	64.91	53.31	52.72	63.66	180.28	330.10	432.35	120.61	168.13	149.85	144.69	112.36	254.56	109.78	83.53	321.95
14	72.55	51.80	67.98	82.00	200.93	360.18	462.19	130.15	184.88	155.30	169.48	127.79	291.45	130.78	103.04	348.35
15	77.23	58.37	80.78	94.85	210.59	326.28	426.42	145.40	199.86	170.13	183.36	140.54	261.62	112.66	115.47	312.72
16	70.34	56.39	69.69	89.65	178.92	296.23	402.72	58.26	116.40	90.76	123.19	103.37	185.39	88.91	78.13	305.59
17	137.98	122.01	120.09	155.83	276.44	420.26	508.39	158.86	230.21	185.03	234.03	176.52	313.75	161.96	150.19	411.14
18	183.65	211.41	322.43	114.25	60.36	95.83	120.24	125.19	87.16	97.17	81.42	125.55	70.37	116.08	161.29	101.31
19	111.29	108.39	153.23	67.11	88.72	180.44	229.88	38.72	56.65	39.88	44.56	39.58	101.59	67.85	56.45	180.87
20	85.27	74.74	38.36	58.48	120.11	259.97	352.93	51.82	109.48	73.86	69.46	46.55	174.31	69.39	32.18	258.09
21	112.39	126.49	172.79	76.95	62.42	122.64	180.03	39.96	39.91	29.09	30.71	51.38	59.91	56.59	64.30	132.34
22	566.12	613.98	781.60	389.09	223.70	114.82	72.67	458.97	298.24	344.72	298.70	365.97	210.76	346.01	473.30	127.30
23	35.15	47.05	87.10	69.18	107.20	236.09	325.78	66.29	119.90	69.04	98.05	96.91	186.29	82.13	53.35	230.67
24	496.73	540.60	670.32	330.17	165.53	88.68	56.07	361.52	243.39	268.45	225.09	288.96	145.47	275.82	385.29	97.39
25	95.44	83.02	58.32	44.76	123.16	268.69	351.89	63.29	93.51	79.79	81.37	51.97	187.93	75.83	46.92	269.51
26	124.73	124.89	108.35	96.00	162.42	283.42	363.54	102.63	136.53	120.20	113.59	94.91	190.53	110.57	92.86	286.10
27	216.89	241.29	360.05	152.94	101.57	86.08	108.59	132.41	62.10	82.59	91.62	127.03	66.28	118.64	174.94	104.24
28	112.12	98.27	63.60	54.63	94.95	206.19	288.15	15.40	65.98	45.61	38.14	27.52	97.91	40.58	23.95	210.21
29	149.83	176.34	298.78	85.32	46.51	76.11	108.96	124.15	64.29	77.28	75.88	111.97	84.59	99.58	143.00	88.78
30	135.27	152.15	218.42	84.76	41.11	88.70	131.62	73.26	60.83	34.45	62.66	77.01	80.89	55.72	87.67	92.11
31	294.68	329.60	531.13	201.36	121.66	70.32	55.98	253.27	146.25	184.99	170.85	221.44	98.72	191.75	296.10	81.03
32	118.34	130.10	183.56	70.52	43.15	123.61	173.13	69.87	75.80	43.71	73.17	79.73	109.22	53.64	77.58	118.72
33	232.14	278.78	476.49	226.66	201.83	204.06	226.13	320.14	268.68	277.93	257.20	302.29	228.15	253.20	318.81	205.86
34	64.57	75.47	114.00	81.20	114.21	236.69	317.52	68.58	93.41	56.96	97.91	91.36	189.41	83.59	64.32	235.06
35	53.44	63.25	110.91	72.86	118.18	253.12	330.22	74.10	102.39	61.40	103.73	89.95	205.76	89.68	64.91	250.05
36	116.70	142.63	234.83	127.63	103.40	139.02	200.38	152.35	173.72	139.50	146.17	169.50	129.29	90.69	149.09	127.31
37	374.89	421.89	645.21	287.55	179.40	91.35	67.64	334.67	214.90	252.01	239.90	303.26	132.74	255.56	382.83	104.64
38	113.12	130.26	240.08	60.98	36.21	78.88	116.48	91.66	64.64	67.48	57.26	83.52	60.10	61.89	111.55	79.29
39	229.59	253.52	449.22	153.32	112.91	111.15	112.89	269.87	196.52	222.53	190.45	222.35	149.60	163.63	273.74	95.11
40	25.87	29.48	119.39	37.59	107.45	198.33	268.61	100.07	110.66	86.62	111.49	90.17	169.45	57.98	80.16	191.94
41	145.36	110.05	74.50	153.42	313.69	500.43	619.82	152.03	236.32	208.13	240.63	183.75	366.28	190.35	142.26	496.30
42	273.10	226.62	135.23	244.76	379.51	570.39	686.93	170.70	278.34	239.49	284.02	222.73	394.71	243.52	190.35	575.47
43	193.27	200.12	255.23	86.90	45.61	83.69	115.90	100.65	56.65	63.51	61.31	73.56	73.65	55.78	110.37	83.78
44	144.03	117.62	72.24	93.91	171.86	302.13	400.97	116.31	177.66	157.15	122.07	93.75	212.98	105.16	90.41	292.42
45	93.29	67.14	22.92	79.75	185.53	367.80	482.62	69.42	140.32	111.93	123.31	88.38	257.27	106.89	57.60	365.17
46	161.00	202.26	377.55	164.39	110.40	101.18	123.75	192.05	158.17	137.07	142.64	183.04	116.94	150.38	205.45	103.11
47	181.39	155.07	29.60	132.91	210.38	392.85	508.20	105.53	215.90	165.61	140.75	106.86	265.81	134.32	72.89	383.29
48	175.59	153.93	31.86	160.24	240.25	406.49	528.65	122.17	245.77	180.98	162.77	127.46	279.99	148.29	84.42	398.61
49		8.00	115.72	56.90	146.38	254.38	339.39	97.23	123.67	100.35	134.90	124.31	199.66	91.28	93.01	250.43
50	0,0638		99.59	51.59	157.30	275.64	365.37	90.13	120.74	103.34	137.33	115.50	212.38	87.67	90.08	269.74
51	0,3517	0,3438		107.21	187.12	365.96	489.00	85.36	189.33	128.77	135.27	101.81	266.17	107.97	45.96	358.69
52	0,3333	0,2955	0,3163	47.29	143.69	204.55	204.55	50.30	44.69	46.91	43.22	33.52	106.18	28.50	40.84	139.87
53	0,2941	0,2959	0,3065	0,2863		57.97	96.44	72.85	62.47	42.17	24.55	37.31	56.45	33.06	60.54	53.80
54	0,3684	0,3651	0,4182	0,3548	0,2121		13.41	188.03	128.80	130.10	96.11	125.05	40.47	89.56	179.80	4.42
55	0,2669	0,2760	0,3137	0,3238	0,2747	0,1045		263.31	178.46	189.29	150.90	184.25	71.92	150.24	261.19	15.39
56	0,3734	0,3643	0,3706	0,3333	0,2955	0,3125	0,3066		39.69	15.70	29.01	26.98	94.80	42.69	21.05	194.39
57	0,3500	0,3302	0,3258	0,3333	0,3271	0,3333	0,2978	0,3333		25.35	31.33	40.13	73.80	56.58	70.86	144.18
58	0,2757	0,2509	0,2893	0,2639	0,3382	0,2581	0,2606	0,3106	0,2546		19.55	21.98	77.72	36.62	30.16	138.12
59	0,3447	0,3435	0,3474	0,3182	0,3308	0,3000	0,3047	0,2835	0,2359	0,2435		9.41	45.87	26.61	29.16	101.76
60	0,3422	0,3413	0,3048	0,3228	0,3178	0,3571	0,2959	0,2720	0,2200	0,2344	0,0320		73.40	20.35	18.57	125.54
61	0,3216	0,3123	0,3552	0,3490	0,3463	0,2064	0,2963	0,3065	0,2843	0,2481	0,2863	0,2840		53.96	114.30	49.85
62	0,3089	0,3114	0,3498	0,3236	0,3453	0,3750	0,2966	0,2985	0,2760	0,2734	0,2088	0,2137	0,3030		30.60	84.89
63	0,3162	0,3077	0,3846	0,3588	0,3359	0,3438	0,3430	0,2713	0,3270	0,2981	0,2973	0,2857	0,2960	0,1808		178.61
64	0,2857	0,2780	0,3107	0,2975	0,2766	0,1875	0,1088	0,3088	0,2719	0,2553	0,2754	0,2632	0,2734	0,2639	0,3164	

Apêndice 3 – Valores das medidas de dissimilaridade entre pares de acessos de fâcia dos caracteres fenotípicos binários (acima do corte diagonal), com base no índice de dissimilaridade dos dados binários e caracteres fenotípicos multicategóricos (abaixo da diagonal), com base na distância do índice de dissimilaridade dos dados binários

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1		4	9	4	8	12	4	8	7	9	9	13	9	9	6	6	2	18	12	11	13
2	3		8	6	11	11	6	7	9	10	9	15	5	10	4	5	2	16	14	12	15
3	4	4		5	7	12	7	8	10	8	10	11	9	11	7	5	9	14	13	10	13
4	2	3	2		10	13	4	9	11	11	7	10	9	10	6	4	4	15	11	11	10
5	4	6	4	6		14	10	12	7	9	13	13	12	9	11	8	10	16	15	11	17
6	4	4	3	3	6		13	14	13	10	14	10	11	14	13	13	12	14	14	16	14
7	2	3	4	2	6	5		10	7	11	8	13	9	11	6	6	4	18	11	11	12
8	5	5	4	4	7	5	5		12	7	9	11	8	7	8	9	9	15	13	10	11
9	2	3	4	4	4	6	2	6		8	14	14	6	7	9	9	7	20	15	11	15
10	3	5	1	3	3	4	3	4	3		13	8	7	8	9	9	11	16	14	13	14
11	5	4	5	5	7	4	4	4	5	5		7	13	14	11	7	8	11	14	7	8
12	5	6	2	4	5	4	5	2	5	2	3		14	12	14	10	14	13	13	11	8
13	4	1	3	2	7	4	2	4	4	4	4	5		5	7	8	7	16	15	12	14
14	5	5	4	4	5	6	5	2	6	4	6	4	4		11	10	10	18	12	9	14
15	5	4	3	3	6	6	3	6	3	4	6	5	3	6		4	4	17	13	12	15
16	5	3	1	3	5	4	3	5	3	2	4	3	2	5	2		4	16	13	10	13
17	2	1	4	2	6	4	2	6	2	5	4	6	2	6	3	3		17	12	11	13
18	7	6	6	6	5	5	7	7	8	7	4	6	6	7	7	6	6		10	10	7
19	5	6	5	4	6	7	4	5	5	5	7	6	5	3	5	5	5	6		10	8
20	7	7	5	7	5	6	7	5	6	5	3	3	7	5	7	5	7	3	5		9
21	4	5	5	3	8	5	3	3	5	5	3	3	4	5	5	5	4	5	4	4	
22	6	6	4	6	6	5	6	5	5	4	3	3	6	7	6	4	6	4	5	2	4
23	4	3	5	5	6	6	5	4	4	5	6	6	4	4	6	5	4	7	3	6	5
24	7	7	5	7	5	5	7	7	6	5	5	5	7	6	7	5	7	4	4	2	6
25	6	6	6	6	6	5	6	5	7	6	2	4	6	5	8	6	6	2	5	1	3
26	6	6	6	6	6	4	6	5	7	6	3	4	6	5	8	6	6	3	5	2	3
27	6	5	3	5	6	4	6	5	5	4	3	3	5	7	5	3	5	3	6	2	4
28	5	6	5	4	8	6	4	3	5	5	5	4	5	5	5	5	5	6	2	5	2
29	4	6	4	4	4	7	3	6	3	3	7	5	5	4	4	4	5	6	2	4	4
30	4	4	5	3	8	4	4	5	6	3	5	4	7	5	5	3	3	5	4	2	
31	7	6	6	6	8	7	6	2	7	6	5	4	5	3	7	6	7	6	4	4	3
32	4	4	5	3	8	4	4	5	5	6	3	5	4	7	5	5	3	3	5	4	2
33	6	7	7	6	8	7	6	4	6	7	4	5	7	5	7	7	6	5	4	3	3
34	3	5	4	4	5	6	3	6	2	3	5	5	5	6	4	4	6	4	4	4	4
35	3	5	6	4	5	6	3	7	4	5	5	7	5	5	6	6	4	4	3	4	4
36	5	5	7	7	6	7	6	4	5	6	6	6	6	6	6	7	6	6	6	6	5
37	7	5	5	5	8	6	6	3	7	6	6	5	4	4	6	5	6	5	4	5	4
38	7	6	7	7	7	7	7	4	7	7	5	6	6	4	8	7	7	4	3	3	5
39	4	4	4	2	8	3	3	5	5	5	5	3	6	4	4	3	5	4	6	2	
40	2	4	4	2	6	5	1	5	3	3	5	5	3	5	4	4	3	6	3	6	2
41	1	2	3	1	5	3	3	5	3	4	5	5	3	5	4	4	1	6	5	7	4
42	5	5	3	5	5	5	3	4	3	2	3	2	4	6	4	2	5	6	6	4	4
43	4	5	6	4	8	5	4	4	5	6	2	4	5	6	6	6	4	4	5	3	1
44	5	6	6	5	8	5	5	3	5	6	4	4	6	5	6	6	5	6	4	4	2
45	5	3	4	4	7	5	5	4	5	5	5	6	3	4	5	4	4	5	4	5	5
46	5	5	5	3	7	5	4	5	6	6	5	5	4	5	5	5	4	3	3	4	2
47	5	5	5	5	7	4	5	4	6	5	1	3	5	6	7	5	5	3	6	2	2
48	5	5	5	5	7	4	5	4	6	5	1	3	5	6	7	5	5	3	6	2	2
49	5	5	5	5	7	6	4	2	5	4	5	4	4	4	6	5	6	6	4	5	3
50	6	4	4	4	8	5	5	2	6	5	5	4	3	4	5	4	5	5	4	5	3
51	5	5	6	4	8	5	5	6	6	7	4	6	5	8	4	6	4	3	6	5	3
52	5	5	6	6	7	6	5	3	5	5	4	5	5	5	7	6	6	5	5	4	4
53	6	5	6	6	8	6	6	2	6	6	3	4	5	4	7	6	6	5	5	3	3
54	6	6	6	6	7	4	6	6	7	6	4	5	6	8	6	6	6	4	6	5	4
55	6	6	6	6	7	4	6	6	7	6	4	5	6	8	6	6	6	4	6	5	4
56	5	4	4	4	7	6	4	2	5	4	5	4	3	2	5	4	5	7	3	5	3
57	7	7	7	7	5	6	7	6	8	7	3	5	7	6	8	7	7	1	6	2	4
58	5	6	7	5	7	6	5	6	6	7	4	6	6	6	7	7	5	3	3	3	3
59	6	6	6	6	6	3	6	7	7	6	5	6	6	6	8	6	6	4	4	4	5
60	6	6	6	6	6	4	6	6	7	6	4	5	6	6	8	6	6	3	4	3	4
61	7	6	6	6	8	7	6	2	7	6	5	4	5	4	5	6	7	6	5	5	3
62	5	6	7	5	8	5	5	5	6	7	4	5	6	7	5	7	5	5	6	5	2
63	6	7	7	6	8	5	6	5	6	7	6	6	7	6	5	7	6	7	5	6	4
64	6	6	6	6	7	4	6	5	7	6	3	4	6	7	6	6	6	4	7	4	3

continua

Apêndice 3 - continuação...

	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
1	17	13	19	14	13	15	10	17	12	17	12	17	11	12	14	19	19	14	7	2	8	13
2	18	11	18	15	14	15	10	20	13	17	13	17	14	15	13	18	17	13	8	2	9	13
3	12	15	12	11	12	9	11	14	12	17	12	17	11	12	17	14	18	15	10	7	7	12
4	15	16	17	12	11	12	9	15	9	16	9	17	10	11	16	15	19	14	9	4	8	11
5	15	15	15	10	11	13	17	13	16	16	16	17	11	10	15	16	17	18	11	10	10	17
6	14	9	13	13	13	11	15	14	12	13	12	12	12	13	10	12	13	9	8	10	14	12
7	15	14	17	12	13	13	9	14	10	18	10	19	9	10	17	16	21	15	6	6	4	11
8	15	12	16	14	13	15	9	18	14	11	14	12	15	15	12	14	13	12	11	7	10	12
9	15	10	17	10	11	15	13	11	16	16	16	14	9	10	15	16	16	12	7	9	9	17
10	15	10	15	14	13	15	12	12	18	12	18	12	11	12	11	14	13	9	8	9	11	17
11	10	15	13	8	8	10	12	16	7	13	7	13	9	10	13	14	15	17	14	10	8	7
12	10	11	13	10	9	10	13	10	11	8	11	10	7	10	9	9	12	13	12	14	11	11
13	18	10	18	11	10	17	11	15	17	14	17	13	14	13	14	15	13	8	7	7	12	17
14	18	11	18	9	8	18	12	13	19	11	19	12	14	12	15	14	12	12	10	10	13	19
15	18	14	18	17	16	15	9	18	14	18	14	17	13	16	14	19	19	13	8	4	8	14
16	14	15	16	13	12	11	11	16	12	15	12	17	11	14	15	16	18	15	10	6	6	14
17	17	13	19	14	13	14	10	18	11	17	11	17	12	13	15	18	19	13	8	2	8	13
18	6	15	5	11	11	7	12	10	8	11	8	9	15	12	12	10	7	10	18	16	16	8
19	9	13	9	14	13	8	8	8	10	9	10	12	13	11	14	9	10	11	13	13	12	11
20	9	15	10	5	5	9	10	13	12	14	12	12	12	11	17	15	13	16	15	12	9	12
21	6	13	9	10	9	8	10	8	7	8	7	7	11	10	11	9	10	9	14	14	14	7
22		12	3	10	12	3	11	7	6	10	6	10	10	11	13	8	8	12	17	18	11	7
23	4		12	13	14	15	11	11	14	11	14	9	9	11	7	11	8	10	8	12	16	13
24	2	5		11	13	6	12	7	9	12	9	10	12	11	14	10	7	11	17	18	14	8
25	3	6	3		2	10	14	10	11	12	11	10	9	6	15	11	11	15	12	15	12	11
26	4	6	4	1		12	13	11	13	11	13	10	11	8	14	12	11	14	13	14	13	13
27	1	5	3	3	4		12	9	5	10	5	12	10	11	13	7	11	13	15	15	9	7
28	3	3	5	5	5	4		14	12	14	12	13	15	17	14	14	12	10	11	9	8	11
29	5	5	4	5	5	5	4		10	8	10	9	7	6	12	6	8	9	12	19	14	11
30	3	5	5	3	4	2	3	5		11	0	12	7	8	12	8	12	12	12	12	10	2
31	5	4	6	4	4	5	3	5	5		11	5	12	11	7	4	5	9	14	18	16	11
32	3	5	5	3	4	2	3	5	0	5		12	7	8	12	8	12	12	12	12	10	2
33	4	5	5	3	4	4	3	5	3	2	3		11	10	7	9	4	8	13	16	20	10
34	3	4	4	5	6	3	4	2	3	6	3	4		3	10	13	14	7	13	11	8	
35	5	5	4	3	4	5	5	2	3	6	3	4	2		12	9	11	13	8	14	14	9
36	5	3	7	6	6	5	4	6	5	4	5	5	5	6		9	7	11	11	14	17	11
37	5	4	6	5	5	4	3	5	4	2	4	4	6	6	4		7	10	14	19	14	10
38	3	3	3	3	4	4	3	5	4	3	4	3	5	4	4	3		8	15	18	19	11
39	5	5	5	5	5	4	3	4	2	5	2	5	4	4	6	4	6		9	12	16	12
40	5	4	6	5	5	5	3	2	3	5	3	5	2	2	5	5	6	2		7	10	11
41	6	4	7	6	6	5	5	5	3	7	3	6	4	4	6	6	7	3	3		10	12
42	3	6	5	5	5	3	4	4	5	5	5	6	4	6	5	5	6	5	4	6		11
43	3	5	5	2	3	3	3	5	1	4	1	2	3	3	5	5	4	3	3	4	5	
44	4	4	6	4	3	4	2	5	3	3	3	2	4	5	4	4	4	4	4	5	5	2
45	4	2	5	5	6	3	4	5	3	4	3	4	3	4	4	3	3	4	4	4	6	4
46	5	6	5	3	3	4	3	3	2	4	2	4	5	3	6	3	4	2	3	4	5	3
47	2	5	4	1	2	2	4	6	2	4	2	3	4	4	5	5	4	4	4	5	4	1
48	2	5	4	1	2	2	4	6	2	4	2	3	4	4	5	5	4	4	4	5	4	1
49	4	3	6	5	5	4	2	4	4	2	4	4	4	5	2	2	3	4	3	6	3	4
50	4	3	6	5	5	3	2	5	3	2	3	4	5	6	3	1	3	3	4	5	4	4
51	4	6	6	4	5	3	4	6	1	6	1	4	4	4	4	5	5	3	4	4	6	2
52	3	3	5	4	5	3	3	5	3	3	3	3	3	4	2	3	2	5	4	6	4	3
53	3	3	5	3	4	3	3	6	3	2	3	2	4	5	3	3	2	5	5	6	5	2
54	3	5	5	4	3	4	4	7	4	6	4	6	6	6	4	6	5	5	5	6	5	4
55	3	5	5	4	3	4	4	7	4	6	4	6	6	6	4	6	5	5	5	6	5	4
56	5	2	6	5	5	5	3	4	5	2	5	4	4	5	4	3	4	4	3	5	5	4
57	4	7	4	1	2	4	6	6	4	5	4	4	6	4	6	6	4	6	6	7	6	3
58	3	5	3	2	3	4	3	4	2	5	2	3	4	2	6	5	2	4	4	5	6	2
59	4	5	2	3	2	5	5	5	5	6	5	6	6	4	7	6	4	4	5	6	6	5
60	3	5	3	2	1	4	4	5	4	5	4	5	6	4	6	5	3	5	5	6	5	4
61	5	4	7	5	5	5	3	6	5	2	5	4	6	7	2	3	4	5	5	7	5	4
62	5	6	7	4	3	5	4	6	3	5	3	4	5	5	4	6	6	4	4	5	6	2
63	6	5	6	6	5	6	4	6	5	5	5	4	5	6	4	6	6	4	5	6	7	4
64	4	6	6	3	2	4	5	7	4	5	4	5	6	6	4	6	6	5	5	6	5	3

continua

Apêndice 3- continuação...

	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64
1	10	13	12	10	9	11	12	10	14	16	16	12	12	15	14	15	13	14	15	12	14
2	10	12	13	9	8	10	9	9	13	14	17	13	12	16	16	14	14	12	15	12	13
3	14	13	15	11	10	12	11	10	14	13	15	15	10	12	13	12	14	14	16	12	15
4	12	12	12	10	9	13	12	9	17	14	14	14	9	13	12	13	13	13	15	12	16
5	17	13	14	16	15	13	14	15	14	18	15	15	14	11	14	15	15	19	20	16	15
6	14	13	10	13	12	10	9	14	11	14	10	10	15	14	13	10	11	14	11	11	8
7	12	15	13	10	9	12	13	8	14	14	14	12	9	13	12	13	11	13	13	10	14
8	7	11	13	8	9	7	7	10	9	11	19	15	10	15	16	17	16	10	14	12	14
9	13	10	10	14	13	10	11	12	11	17	16	14	15	17	16	17	15	17	15	13	14
10	11	9	11	10	11	6	7	14	8	16	18	16	13	17	18	17	17	15	15	15	14
11	11	11	16	6	7	15	15	9	15	11	12	14	8	9	11	12	11	14	12	12	15
12	13	10	12	10	11	10	10	15	14	12	11	15	9	13	13	15	14	13	13	14	14
13	12	8	8	11	10	7	6	11	11	16	17	15	15	18	18	16	16	13	15	14	13
14	12	8	8	13	12	8	8	15	12	16	18	16	13	16	17	17	15	13	17	14	15
15	10	14	13	11	10	11	10	8	15	16	17	13	13	17	17	16	16	11	14	10	13
16	12	11	13	11	10	12	11	12	16	15	15	13	10	14	15	14	14	14	18	14	15
17	10	12	11	10	9	12	11	9	15	16	16	12	12	15	14	15	13	14	15	12	14
18	12	12	11	9	10	15	14	11	13	8	9	11	13	6	7	8	9	10	10	14	11
19	12	13	9	14	13	11	11	16	13	12	11	11	9	9	5	10	8	9	13	12	14
20	11	11	11	7	6	13	13	10	15	13	13	13	12	8	10	11	8	12	13	10	14
21	10	10	8	8	9	12	12	11	14	8	9	11	9	9	7	11	10	9	9	11	12
22	12	11	13	10	11	15	15	12	11	6	6	8	9	7	5	8	7	11	10	13	11
23	10	7	12	11	12	8	8	12	9	10	12	12	10	18	15	13	13	12	11	10	11
24	13	13	14	11	12	16	16	13	12	7	9	11	11	8	6	5	8	12	11	12	12
25	15	9	10	10	9	13	13	11	13	13	10	14	12	7	9	10	9	16	12	12	13
26	13	9	9	10	9	12	12	13	15	15	10	14	13	9	11	10	9	15	12	12	13
27	14	12	12	12	11	13	12	13	11	8	7	9	9	5	4	9	8	11	12	13	11
28	4	13	11	6	5	9	9	8	11	8	11	9	9	13	11	9	8	5	9	7	10
29	15	10	9	16	17	13	14	16	11	11	10	14	10	11	8	11	11	14	11	15	14
30	12	13	13	11	12	16	15	8	12	7	8	10	8	8	5	10	9	12	9	13	12
31	12	8	9	15	16	8	8	19	8	10	12	14	9	11	10	15	14	11	13	17	13
32	12	13	13	11	12	16	15	8	12	7	8	10	8	8	5	10	9	12	9	13	12
33	10	7	8	11	12	9	9	14	9	9	13	15	14	13	11	14	15	12	11	13	12
34	15	9	14	13	14	12	13	11	12	12	12	16	9	14	11	15	15	17	13	13	16
35	17	9	11	14	15	12	13	12	12	14	13	17	11	11	8	14	14	19	14	15	17
36	12	9	12	13	14	7	8	14	8	10	11	13	12	15	14	15	16	10	11	13	11
37	15	9	10	16	17	10	9	16	8	9	10	14	8	10	8	13	12	12	12	16	14
38	11	7	9	13	14	9	9	16	7	8	11	13	13	12	9	11	12	11	12	16	12
39	9	10	5	11	12	8	7	12	8	11	13	11	15	16	13	13	14	10	10	14	9
40	12	13	9	12	11	6	7	10	10	14	14	12	13	17	14	15	15	13	13	12	10
41	9	13	12	9	8	11	10	8	14	15	17	13	13	16	15	14	14	13	14	11	13
42	11	17	15	10	9	12	13	10	12	12	10	9	11	12	12	9	11	13	12	12	12
43	10	15	15	9	10	15	15	8	11	5	9	11	8	8	6	9	10	10	7	11	10
44		11	12	5	6	10	10	8	9	7	13	9	9	14	14	11	10	7	7	7	8
45	4		10	11	12	9	8	13	9	12	14	16	9	14	14	15	15	15	14	13	16
46	4	5		12	11	7	6	13	11	14	12	10	17	13	10	14	11	11	13	15	10
47	3	4	4		1	11	11	5	11	7	12	10	10	11	13	10	9	8	8	8	9
48	3	4	4	0		10	10	6	12	8	11	9	11	10	12	9	8	7	9	7	8
49	3	3	4	4	4		1	14	6	12	15	13	13	16	14	17	16	9	15	13	11
50	3	2	3	4	4	1		13	7	12	15	13	13	16	14	17	16	9	15	13	11
51	4	4	3	3	3	5	4		12	9	12	10	12	13	13	12	11	10	7	7	10
52	3	2	5	3	3	1	2	4		8	14	12	11	12	12	14	13	11	10	14	10
53	2	2	5	2	2	2	2	4	1		9	9	7	10	9	9	10	5	8	10	8
54	4	6	5	3	3	5	5	3	5	5		4	11	8	7	6	5	9	8	10	5
55	4	6	5	3	3	5	5	3	5	5	0		13	10	9	8	5	7	8	10	3
56	3	2	5	4	4	2	2	6	3	2	6	6		9	10	10	10	10	10	9	14
57	5	6	4	2	2	6	6	4	5	4	4	4	6		4	7	6	12	10	12	11
58	4	5	2	3	3	5	5	3	4	4	4	4	6	3		7	6	12	11	13	12
59	5	6	4	4	4	6	6	6	6	6	3	3	6	4	3		3	11	8	8	9
60	4	6	3	3	3	5	5	5	5	5	2	2	6	3	2	1		10	7	9	8
61	3	4	5	4	4	2	2	4	3	2	4	4	2	5	6	7	6		8	8	6
62	2	6	4	3	3	5	5	2	5	4	2	2	5	4	4	5	4	3		6	7
63	2	5	6	5	5	5	5	4	5	4	4	4	4	6	6	5	6	3	2		9
64	3	6	5	2	2	5	5	3	5	4	1	1	5	3	5	4	3	3	1	3	