

JOSÉ EMÍLIO ZANZIROLANI DE OLIVEIRA

**PLASTICIDADE FENOTÍPICA DA MORFOLOGIA, DE MARCADORES
QUÍMICOS E DA ANATOMIA DE ACESSOS DE *Bidens pilosa* L.
CRESCIDOS EM QUATRO ALTITUDES**

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
2001

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

T

O48p
2001

Oliveira, José Emílio Zanzirolani de, 1965-

Plasticidade fenotípica da morfologia, de marcadores químicos e da anatomia de acessos de *Bidens pilosa* L. crescidos em quatro altitudes. / José Emílio Zanzirolani de Oliveira. – Viçosa : UFV, 2001.

239 p. : il.

Orientador: Vicente Wagner Dias Casali.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Viçosa.

1. Picão-preto – Caracterização isozimática. 2. Picão-preto –
Diversidade genética. 3. Picão-preto – Micropropagação. 4. Picão-preto
– Morfometria. 5. Picão-preto – Plasticidade fenotípica – Efeito da
altitude. 6. Compostos fenólicos – Cromatografia líquida de alta
eficiência. 7. Picão-preto – Anatomia. 8. Plantas medicinais. I.
Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD. 19.ed. 633.88355

CDD. 20.ed. 633.88355

JOSÉ EMÍLIO ZANZIROLANI DE OLIVEIRA

**PLASTICIDADE FENOTÍPICA DA MORFOLOGIA, DE MARCADORES
QUÍMICOS E DA ANATOMIA DE ACESSOS DE *Bidens pilosa* L.
CRESCIDOS EM QUATRO ALTITUDES**

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: 09 de agosto de 2001.

Prof. Marcos Ribeiro Furtado
(Conselheiro)

Profa. Maria das Graças Lins Brandão

Prof. Tuneo Sedyama

Profa. Maria Eliana Lopes R. de Queiroz

Prof. Vicente Wagner Dias Casali
(Orientador)

AGRADECIMENTO

A Deus, meu criador e de todo o universo, pela companhia.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Curso de Genética e Melhoramento, pela oportunidade de realizar o curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida.

Ao professor Vicente Wagner Dias Casali, pela orientação, pela confiança, pela flexibilidade, pela presença e pelo provar incessante de que tudo é mudança.

Ao professor Marcos Ribeiro Furtado, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos professores Tuneo Sedyama, Maria das Graças Lins Brandão e Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz, pelas críticas e pelas valiosas sugestões.

Ao professor Fernando Luiz Finger, pelos ensinamentos e pelas facilidades no laboratório durante a pesquisa.

Ao professor Hélio Vieira, pelo incentivo e pelo ensinamento na confecção dos aparelhos climatológicos.

Aos professores e funcionários do Laboratório de Anatomia Vegetal, em especial à professora Leticia e ao Robson, pelo precioso auxílio e pela companhia.

Ao professor Luiz Cláudio de Almeida Barbosa, pelas sugestões, pelo auxílio e pelo acompanhamento nas análises químicas.

Aos colegas do Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos, alunos de iniciação científica e de pós-graduação e os funcionários, Senhor Antônio e Ricardo, pela boa convivência, pelas dicas e pelo auxílio nas análises químicas.

À professora Maria das Graças Lins Brandão, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, e sua orientada Francis, pelo ensinamento prático e direcionamento das análises químicas.

Ao Ribeiro, exemplo de dedicação, pelo empenho nas análises isozimáticas.

Ao Geraldo, pela presença e pelo auxílio durante a micropropagação.

Ao Senhor Vicente Rosado e José Geraldo, pela cooperação no preparo do solo e na aclimatação das plantas.

Ao Cláudio, Laboratorista da Física do Solo, da UFV, pela análise realizada no solo utilizado no experimento.

Aos motoristas da UFV, pela disposição e pelo transporte seguro durante a condução do experimento.

Ao Grupo Entre Folhas – Plantas Medicinais e seus integrantes, pela harmonia compartilhada, pelo convívio e pelo apoio logístico.

Ao José Jorge e à Suzana, pela identificação ao experimento demonstrada pelo empenho, pela seriedade e pela competência.

Ao Cláudio Lúcio, incansável pesquisador de definições e esquemas, pelo compartilhamento do aprendizado e pelo auxílio na micropropagação.

Ao João Bosco Sant'Ana, pelo auxílio na coleta do experimento.

Aos estudantes Ricardo e André Lara, pelo talento e empenho em produzir os atmômetros, os pluviômetros e os abrigos meteorológicos deste experimento.

Ao André Lara, pela ajuda na montagem do experimento em campo e na coleta de dados, e pela convivência fraterna e indutora de reflexões.

À Débora Castellani, por ser incentivadora e companheira neste trabalho.

Ao Galvão e Bruno, pela acolhida, pela companhia e pelas preces.

Ao José Célio e José Gomes, pela amizade descompromissada, pelo estímulo constante e pelo contato com os proprietários dos locais onde foram montados os experimentos.

Ao Waldo Romeiro da Silva, ao Waldiney Romeiro da Silva, ao Braz Heleno Dias, à Maria da Conceição Lemos Dias, ao Luiz Pereira da Silva, à Eliane Vilma Rodrigues da Silva e ao Waltencir Gonçalves de Oliveira, pelo cuidado, pelo compromisso e pela dedicação de parte do seu tempo de vida em prol da condução deste experimento em campo.

À Maria Imaculada, minha esposa, à Alice e ao Lucas, meus filhos, pelas preces e pelas reflexões que me proporcionaram desenvolvimento interior e paz.

Aos responsáveis pela minha existência, Olímpio e Helena, que além de me fornecerem o meu código genético e me darem amor, me ensinaram ao longo dos meus dias a lutar pelos meus ideais por maiores que fossem as barreiras a serem transpostas.

Às minhas irmãs, aos irmãos e aos demais entes queridos, pelas cobranças e desafios expostos.

A todos os mestres, por me darem a riqueza do conhecimento.

Aos colegas de Curso, principalmente àqueles de convivência diária, pela contribuição dada, cada um à sua maneira.

Aos amigos conquistados em Viçosa, dos mais antigos aos mais recentes, por terem tornado a caminhada mais amena e agradável.

A todos que me deram a chance de amá-los.

A muitos que influenciaram neste trabalho, mas que não foram relacionados. A todos serei sempre grato.

BIOGRAFIA

JOSÉ EMÍLIO ZANZIROLANI DE OLIVEIRA, filho de Olímpio de Oliveira e Helena Zanzirolani de Oliveira, nasceu em 23 de setembro de 1965, em Leopoldina, Minas Gerais.

Em 1990, graduou-se em Ciências pela Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Cataguases, em Cataguases, Minas Gerais.

Em 1994, graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Juiz de Fora, em Juiz de Fora, Minas Gerais.

Em 1997 defendeu a dissertação de Mestrado em Genética e Melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

Em 2001 defendeu a tese de Doutorado em Genética e Melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

Em 2001 ingressou na Universidade Presidente Antônio Carlos (Unipac) onde assumiu a coordenação do Curso de Biotecnologia e de Farmácia-Bioquímica, no Campus Magnus, em Campolide, distrito de Antônio Carlos, Minas Gerais.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1 – ANÁLISE ISOZIMÁTICA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE <i>Bidens pilosa</i> L. COLETADOS EM NOVE ALTITUDES	2
1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5. RESUMO E CONCLUSÕES	46
CAPÍTULO 2 – MICROPROPAGAÇÃO E ACLIMATAÇÃO DE GENÓTIPOS DE <i>Bidens pilosa</i> L.	47
1. INTRODUÇÃO	47
2. REVISÃO DE LITERATURA	49
3. MATERIAL EMÉTODOS	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5. RESUMO E CONCLUSÕES	65
CAPÍTULO 3 – PLASTICIDADE FENOTÍPICA DA MORFOLOGIA DE SEIS GENÓTIPOS DE <i>Bidens pilosa</i> L. CRESCIDOS EM QUATRO ALTITUDES E COLHIDOS EM QUATRO ESTÁDIOS REPRODUTIVOS	67
1. INTRODUÇÃO	67
2. REVISÃO DE LITERATURA	69

3. MATERIAL E MÉTODOS	74
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
5. RESUMO E CONCLUSÕES	124
CAPÍTULO 4 – PLASTICIDADE FENOTÍPICA DO ÁCIDO CLOROGÊNICO E DO ÁCIDO CAFÉICO DE GENÓTIPOS DE <i>Bidens pilosa</i> L.	
1. INTRODUÇÃO	127
2. REVISÃO DE LITERATURA	129
3. MATERIAL E MÉTODOS	140
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	150
5. RESUMO E CONCLUSÕES	186
CAPÍTULO 5 – PLASTICIDADE FENOTÍPICA DA ANATOMIA FOLIAR DE GENÓTIPOS DE <i>Bidens pilosa</i> L. EM QUATRO ALTITUDES	
1. INTRODUÇÃO	188
2. REVISÃO DE LITERATURA	190
3. MATERIAL E MÉTODOS	196
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	200
5. RESUMO E CONCLUSÕES	218
CONCLUSÕES GERAIS	220
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	224
APÊNDICE	235

RESUMO

OLIVEIRA, José Emílio Zanzirolani de, D. S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2001. **Plasticidade fenotípica da morfologia, de marcadores químicos e da anatomia de acessos de *Bidens pilosa* L. crescidos em quatro altitudes.** Orientador: Vicente Wagner Dias Casali. Conselheiros: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa e Marcos Ribeiro Furtado.

A caracterização de 46 indivíduos de *Bidens pilosa*, coletados em nove altitudes, foi realizada a partir de sete sistemas enzimáticos, utilizando-se a eletroforese em géis de amido a 12%. As enzimas fosfatase ácida, α -esterase, β -esterase, glutamato oxaloacetato transaminase, peroxidase, chiquimato desidrogenase e superóxido dismutase foram analisadas e apresentaram elevado polimorfismo. As variações ocorreram entre indivíduos de mesma ou de diferentes altitudes. Utilizando-se da matriz de dissimilaridade obtida pelo Complemento Aritmético do Índice de Similaridade de Jaccard, agruparam-se os indivíduos pelo Método de Otimização de Tocher e formaram-se dez grupos. Seis genótipos pertencentes a grupos isozimáticos distintos, representando as altitudes 210, 450, 475, 675, 950 e 1.150 m, foram propagados vegetativamente, em cultura de tecidos, obtendo-se clones. Esses foram padronizados, aclimatados e serviram ao estudo da plasticidade fenotípica da influência da altitude em plantas crescidas em vasos em quatro altitudes: 198, 479, 739 e 962 m e os resultados avaliados em quatro colheitas baseadas nos estádios reprodutivos. O início de florescimento variou entre os genótipos mantidos em uma altitude, bem como no mesmo genótipo em cada altitude. A primeira época de colheita de cada

genótipo, em cada altitude, foi iniciada 14 dias após a constatação de que 50% de suas plantas estavam floridas. A partir dessa colheita seguiram-se as demais, sendo mantidos intervalos regulares de 14 dias entre as colheitas, essas representativas dos estádios reprodutivos: florescimento, início de frutificação, frutificação plena e senescência. As plantas de cada estágio serviram ao estudo da plasticidade fenotípica. Esse estudo foi feito por meio de caracteres morfométricos, de fitofármacos e anatômicos. Os estudos anatômicos foram feitos apenas no estágio de senescência. Os objetivos foram de identificar os efeitos da altitude sobre estes caracteres e estimar a magnitude e o padrão de resposta dos genótipos às altitudes testadas, bem como obter o coeficiente de coincidência (CCo) entre a resposta à altitude semelhante à de coleta e correlacionar as respostas das características com as variáveis climáticas. Os caracteres morfométricos analisados foram altura da planta, comprimento do caule, número de ramos, número de capítulos, massa seca caulinar, biomassa seca aérea, valor de SPAD foliar, número de folhas por planta, área foliar por planta, área foliar média, massa seca foliar e número de folhas em 1 grama. A análise de fitofármacos das folhas foi feita em extratos etanólicos (80%) submetidos à cromatografia líquida de alta eficiência. Foram identificados e quantificados o ácido clorogênico e o ácido caféico e sua porcentagem na massa seca foliar. Foram obtidas correlações entre as características e os fatores climáticos das altitudes, como temperaturas (máxima e mínima), pluviosidade e capacidade evaporativa do ar. O estudo anatômico foi feito com folhas, analisando a espessura foliar total, espessura do parênquima paliádico, do parênquima lacunoso, do mesofilo, das epidermes e as relações percentuais entre os tecidos analisados. Obteve-se correlação entre as características anatômicas e climáticas como pressão atmosférica, umidade relativa do ar e luminosidade. Pelos estimadores da plasticidade as altitudes influenciam a resposta morfométrica, de fitofármacos e anatômica e cada genótipo apresentou resposta de acordo com a altitude. Pelo CCo os caracteres morfométricos, de fitofármacos e anatômicos coincidiram em cerca de 53, 45 e 50%, respectivamente, com a resposta à altitude semelhante à de coleta, indicando adaptação intermediária (CCo compreendendo o intervalo de 25 a 75%). A magnitude e o padrão de

plasticidade foram específicos em cada genótipo, e nos caracteres morfométricos e de fitofármacos diferiram dentro do mesmo genótipo em função do estágio reprodutivo. Estimou-se que cerca de 83, 76 e 60% da variação morfométrica, de fitofármacos e anatômica, respectivamente, foram devido ao efeito da altitude. Houve variação de fitofármacos entre as altitudes, sendo que na maior altitude (962 m) ocorreu maior acúmulo de ácido clorogênico e na menor altitude (198 m) ocorreu maior acúmulo de ácido caféico. O ácido clorogênico e o ácido caféico tiveram correlação negativa com a temperatura e a evaporação e positiva com a pluviosidade. O aumento da pressão atmosférica e da umidade relativa e a diminuição da luminosidade promovem a diminuição da espessura dos tecidos foliares, sendo o parênquima lacunoso o mais afetado. Conclui-se que a altitude influencia na plasticidade fenotípica e que o estudo da plasticidade em plantas medicinais é importante na seleção de genótipos que possuam adequado crescimento e produção de fitofármacos, servindo na obtenção de plantas medicinais padronizadas, o que auxilia na determinação das doses terapêuticas a serem empregadas medicinalmente.

ABSTRACT

OLIVEIRA, José Emílio Zanzirolani de, D. S., Universidade Federal de Viçosa, August 2001. **Phenotypic plasticity of morphology, of chemical marker and of anatomy of access of *Bidens pilosa* L. grown in four altitudes.** Advisor: Vicente Wagner Dias Casali. Committee members: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa and Marcos Ribeiro Furtado.

The characterization of 46 individuals of *Bidens pilosa*, collected in nine altitudes, was held with seven enzymatic systems, using starch gel electrophoresis 12%. The acid phosphatase, α -esterase, β -esterase, glutamate oxaloacetate transaminase, peroxidase, shikimate dehydrogenase and superoxide dismutase enzymes were analyzed and presented high level polymorphism. The variations occurred among individuals of the same or different altitudes. Using the dissimilarity matrix obtained by Jaccard Arithmetics Complement of Similarity Index, the individuals were put into ten groups organized by Tocher's Optimization Method. Six genotypes pertaining to distinct isozimatic groups, representing the altitudes 210, 450, 475, 675, 950 and 1.150 m, were vegetatively spread in a tissue culture, obtaining clones. These tissues were standardized, acclimatized and served to the phenotypic plasticity study of the altitude influence in grown plants in vases, in four altitudes: 198, 479, 739 and 962 m, and the evaluated results in four harvests based in reproductive stages. The blooming beginning varied among the genotypes kept in an altitude, just like the same genotype in each altitude. The first harvesting period of each genotype, in each altitude, was initiated 14 days after observing that 50% of the plants were

flourished. After this harvest, the others happened, but the 14 days regular breaks were kept between the harvests and these are representing reproductive stages: blooming, initial frutification, total frutification and senescence. The plants of each stage served to the phenotypic plasticity study. This study was done using morphometric, phytopharmac and anatomic characters. The anatomic studies were done only in the senescence stage. The objectives were to identify the altitude effects in the characters and to estimate the magnitude and the response pattern of genotypes to the tested altitudes and to obtain the coincidence coefficient (CCo) between the same altitude response and the collecting response and to correlate these responses with the climatic variations responses. The analysed morphometric characters were the plant height, the stem length, the branch number, the flower-head number, the stem dry matter, the aerial dry biomass, the leaf SPAD value, the leaves number in each plant, the total leaves area per plant, the average leaf area, the dry leaf mass and the leaves number in 1 gram. The leaves phytopharmac analysis was done in ethanolic extracts (80%) submitted to high performance liquid chromatography. The chlorogenic acid and caffeic acid were identified and quantified and also their percentage in dry leaf mass. Correlations between characteristics and altitudes climate factors were obtained, like temperatures (maximum and minimum), pluviosity and the evaporative air capacity. The anatomic study was done analyzing the total leaf thickness, palisade parenchyma thickness, lacunary parenchyma thickness, mesophyll thickness, epidermis thickness and the percentual relations among the analyzed tissues. The correlation between the anatomic characteristics and climatic ones like atmospheric pressure, relative air humidity and luminosity were obtained. By the plasticity estimator the morphometric, phytopharmac and anatomic responses were influenced by the altitude and each genotype presented a response according to its altitude. According CCo the morphometric, phytopharmac and the anatomic characters coincided around 53, 45 and 50%, respectively, with the altitude response similar to the collect one indicating an intermediate adaptation (CCo interval comprehended between 25 and 75%). The magnitude and plasticity pattern were specific in each genotype and in morphometric and phytopharmac characters variations differed in the same

genotype due to the reproductive stage. Estimative numbers of the 83, 76 e 60% of the morphometric, phytopharmac and anatomic variation, respectively, were due to the altitude effects. There was phytopharmac variation among the altitudes and in the higher one (962 m) there was a higher accumulation of the chlorogenic acid and in the lowest altitude (198 m) there was a higher accumulation of the caffeic acid. The chlorogenic acid and caffeic acid had negative correlation with the temperature and the evaporation, but positive correlation with pluviosity. The atmospheric pressure increased, the relative air humidity increased and the luminosity decrease promoted a decrease on the thickness of the leaves tissues with the lacunary parenchyma the most affected. As a conclusion, the altitude influences the phenotypic plasticity, and the plasticity study in medicinal plants is important in selecting genotypes that have a suitable growing and phytopharmac production, serving in the obtension of standardized medicinal plants, and this helps to determine the therapeutic doses to be used medicinally.

INTRODUÇÃO GERAL

O interesse pelas plantas medicinais é crescente, seja pela população, na busca de remédios mais baratos e eficazes, ou pelas indústrias, na busca de novos compostos farmacologicamente ativos. Esse interesse desperta as pesquisas em plantas medicinais. Entretanto, o conhecimento científico depara-se com a multiplicidade de interações bióticas e abióticas que ocorrem com essas plantas. Dentro desse tema, foi realizada esta pesquisa abordando as interações da altitude com a espécie medicinal *Bidens pilosa* L., conhecida popularmente com picão-preto ou picão. O enfoque dado à altitude foi devido a ocorrência natural dessa espécie ser desde o nível do mar até cerca de 3.000 m de altitude e pelo seu freqüente uso terapêutico nos problemas hepáticos, como a hepatite e a icterícia.

O efeito da altitude foi verificado pela plasticidade fenotípica de *Bidens pilosa* e quantificado o grau de adaptação quanto à altitude de ocorrência natural. Coletaram-se espécimes em nove altitudes e desses selecionaram-se seis genótipos. Cada genótipo, representando uma altitude de coleta, foi avaliado em quatro altitudes. Tomou-se o cuidado de analisar o mesmo genótipo em todas as altitudes, portanto, as plantas selecionadas foram clonadas, o que possibilitou que uma mesma planta estivesse representada nas quatro altitudes avaliadas. Nessas altitudes obtiveram-se dados climatológicos diários que foram correlacionados com caracteres de morfologia, de fitofármacos e de anatomia.

CAPÍTULO 1

ANÁLISE ISOZIMÁTICA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE *Bidens pilosa* L. COLETADOS EM NOVE ALTITUDES

1. INTRODUÇÃO

Bidens pilosa L., popularmente conhecida como picão, ocorre espontaneamente desde o nível do mar até cerca de 3.000 m de altitude, acompanhando o homem e seus cultivos. E, devido a essa disponibilidade, tem sido utilizada como alimento ou remédio nos problemas relacionados ao fígado.

Em espécies de ampla dispersão, como o caso de *B. pilosa*, a variabilidade genética é fundamental durante o processo de adaptação e sobrevivência aos ambientes diversos, como os encontrados em altitudes. Do ponto de vista evolucionário, a proteção contra estresse ambiental ou mutação deve-se, em parte, à existência de isozimas pois, segundo RAVEN et al. (1978), com essas há incremento na versatilidade bioquímica do organismo. Objetivou-se neste trabalho:

- 1) Identificar e caracterizar a variabilidade isozimática de acessos de *Bidens pilosa* de nove altitudes;
- 2) Estimar a divergência genética entre os indivíduos, por meio de padrões isozimáticos, e formar grupos contendo padrões similares.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Origem, dispersão e importância

Bidens pilosa L. possui seu centro de origem no México e ocorrência espontânea onde há intervenção do homem que dispersa seus frutos por grudarem a seus pêlos ou vestes e, possivelmente, esse fato levou essa espécie a habitar diversas altitudes (desde o nível do mar até acima de 3.000 m) e seus domínios se estenderem pelas regiões tropicais e subtropicais do globo, com ocorrência espontânea em cerca de 40 países (STRANG et al., 1980; LORENZI, 1982; BASTIDAS et al., 1989). É encontrada em todo território brasileiro, sendo conhecida principalmente como picão ou picão-preto (LORENZI, 1982).

Essa planta é importante, pois onde ocorre possui emprego alimentício ou medicinal. Como alimento é feito o cozimento das folhas, por ser boa fonte de ferro, β -caroteno e proteínas (CORRÊA, 1984; BASTIDAS et al., 1989; BENHURA e CHITSIKU, 1997). Embora todas as partes da planta sejam empregadas medicinalmente, é sobre as folhas que foi encontrado o maior número de referências de uso, seja externo e/ou interno. Externamente, o preparado da planta na forma de emplastro alivia as inflamações, abscessos e furúnculos e a forma de banho é usada nos casos de hepatite. As folhas são usadas internamente, na forma de suco e chá, nos casos de icterícia e hepatite. Ainda na forma de chá é usada nas inflamações da garganta e no controle do diabetes. A planta toda ou suas partes são usadas devido à propriedade estimulante, antiescorbútica, sialagoga, odontálgica (principalmente a raiz),

desobstruente, antidisentérica, vermífuga, vulnerária, diurética e antileucorréica (STRANG et al., 1980; GAVILANES et al., 1982; VASQUES et al., 1986b; CORRÊA, 1984; MANANDHAR, 1993; AKAH e EKEKWE, 1995; RIVERA e OBÓN, 1995; BENHURA e CHITSIKU, 1997). Diversas dessas propriedades foram testadas e comprovadas, como por exemplo, a ação colerética (YOMURA et al., 1988).

2.2. Isozimas

2.2.1. Aspectos gerais

Isozimas são definidas como múltiplas formas moleculares da enzima, com especificidade similar ou idêntica por algum substrato, ocorrendo no mesmo organismo (MARKET e MOLLER, 1959; GOTTLIEB, 1971).

As isozimas podem ser originadas de diversos sítios gênicos, ou de alterações pós-transcricionais modificando sua estrutura original ou por duplicação do gene ou do número de cromossomos, com mutações subseqüentes nos locos. Dessa maneira, é detectado mais de um gene que contribui na formação dessas enzimas, que, como outras, podem ser compostas por uma ou mais subunidades de um polipeptídio (SCANDALIOS, 1975). As modificações causadas pela mutação na seqüência de nucleotídios de genes estruturais poderão ter modificações nas cargas finais dos polipeptídios constituintes dessas enzimas. Com isso, durante a eletroforese, quando ocorre a migração destas moléculas protéicas em um meio-suporte pelo uso de tampões adequados, a separação das isozimas pode ser processada por sua carga elétrica, seu tamanho e sua forma. Tais moléculas enzimáticas, na presença de substratos ou corantes específicos, formam complexos insolúveis, permitindo a visualização de bandas coloridas nos locais correspondentes às suas posições de migração. As bandas que aparecem na análise eletroforética da mesma enzima são chamadas de isozimas (GOTTLIEB, 1971; SCANDALIOS, 1975).

A detecção das isozimas envolve basicamente três passos: 1) a extração de proteínas do tecido vegetal; 2) a separação dessas proteínas por meio de eletroforese; e 3) a coloração histoquímica do gel, o que permite a visualização do produto da reação enzimática na forma de “bandas” no gel (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996).

2.2.2. Extração, separação eletroforética e coloração das isozimas

A extração das isozimas é feita do tecido vegetal (folhas, raízes, pólen, etc.), mantido em temperatura baixa e macerado em soluções-tampão adequadas. O extrato bruto deste macerado contém as enzimas com estabilidade e atividade catalítica preservadas (ALFENAS et al., 1991).

A separação das isozimas é processada de acordo com a carga elétrica, o tamanho e a forma, sob a influência de um campo elétrico (BREWER e SING, 1970), quando submetidas à eletroforese em gel de amido ou poliacrilamida (GOTTLIEB, 1971). O método se baseia na aplicação da diferença de potencial elétrico nas extremidades do gel, possibilitando o movimento das moléculas da amostra. As moléculas carregadas negativamente migram em direção ao anodo (+), enquanto as moléculas carregadas positivamente se direcionam ao catodo (-). Na corrida eletroforética, utilizam-se tampões adequados a cada tipo de isozima. Quanto à identificação das isozimas no gel, utilizam-se reações químicas baseadas em suas atividades catalíticas específicas. Nesse processo são fornecidos os substratos e os cofatores necessários à reação da enzima *in vitro*, e os produtos gerados pela ação enzimática podem, por meio da reação secundária, formar produtos coloridos e insolúveis que permitem identificar exatamente a sua posição no gel. Esses produtos formam “bandas” que visualizadas no gel são transpostas ao papel milimetrado, ou fotografadas. O conjunto de bandas reveladas é denominado zimograma (PEIRCE e BREWBAKER, 1973; ALFENAS et al., 1991; ROBINSON, 1998). Diversos métodos de coloração por enzima têm sido desenvolvidos (SHAW e PRASAD, 1970; SOLTIS et al., 1983; ALFENAS et al., 1991; ALFENAS, 1998).

2.2.3. A importância das isozimas como marcadores genéticos

Os estudos da variabilidade genética em espécies vegetais são iniciados pela avaliação de caracteres morfológicos e, posteriormente, de moleculares, como químicos, bioquímicos ou de DNA. Marcadores bioquímicos, como as isozimas, examinados por eletroforese, são mais sensíveis na estimação da variabilidade genética do que os marcadores morfológicos, por serem menos influenciados pelo ambiente. Por isso a utilização desses marcadores tem sido crescente nas últimas décadas (MILACH, 1998). Variantes de isozimas ocorrem espontaneamente, e raramente produzem efeitos deletérios. O controle genético de isozimas mais comum em plantas é o que envolve segregação monogênica e codominância, ou seja, expressão de ambos os produtos alélicos no heterozigoto, tornando possível identificar facilmente heterozigotos e homozigotos (SCANDALIOS, 1975). Na interpretação dos padrões de bandas isozimáticas resultantes, é importante ter conhecimento prévio sobre o número de subunidades da enzima. Por exemplo, enzimas monoméricas são formadas por um único peptídeo; enquanto que enzimas diméricas, por dois. Indivíduos heterozigotos de uma enzima dimérica, além das duas bandas correspondentes aos dois peptídeos, formam a terceira banda intermediária, produto da conjugação dos dois peptídeos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996). Quando alguma banda particular aparece na mesma posição no gel em todos os indivíduos examinados, a suposição feita é que o gene que codifica esta enzima não variou. Isso torna possível detectar o loco que variou e o que não variou. Pelos locos que variaram se determina o polimorfismo (GOTTLIEB, 1971).

Mesmo com o desenvolvimento de técnicas moleculares que revelam grande polimorfismo em nível de DNA, na eletroforese de isozimas há vantagens pela obtenção de estimativas de variabilidade genética (PARKER et al., 1998), sendo mais indicada nos estudos de microevolução (sistemas de cruzamento, migração, estrutura de populações e hibridação). O uso de isozimas é particularmente interessante na abordagem inicial de parâmetros genéticos populacionais em espécies pouco estudadas (ROBINSON, 1998), como é o caso da maioria das plantas medicinais.

2.2.4. Utilização de isozimas em plantas medicinais

As plantas medicinais contêm em um ou vários de seus órgãos, substâncias que podem ser usadas diretamente com fins terapêuticos ou em semi-sínteses químicas ou farmacêuticas (ATISSO, 1979).

Nas espécies medicinais ocorrem variações de hábito, há herbáceas anuais e perenes, trepadeiras, arbustos e árvores, e, principalmente variações na composição química.

As técnicas isozimáticas têm sido utilizadas nos estudos da diversidade genética de plantas medicinais, auxiliando a identificação e caracterização de acessos, genótipos, variedades e tipos.

A análise do polimorfismo isozimático identificou e caracterizou a variabilidade entre e dentro de duas populações de alfavaca (*Ocimum selloi*) por AMARAL e CASALI (2000), na identificação e caracterização de acessos picão (*Bidens pilosa*) coletados em sete altitudes por OLIVEIRA e CASALI (1999), na determinação da taxa de cruzamento de picão de flores radiadas e não radiadas por SUN e GANDERS (1990) e na determinação da biologia da reprodução em estévia (*Stevia rebaudiana*) por BALLVÉ (1992).

Nas análises de AMARAL e CASALI (2000) foram utilizados os resultados do polimorfismo das enzimas fosfatase ácida (ACP), esterase (EST), glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), peroxidase (PO) e chiquimato desidrogenase (SKDH) em duas populações de alfavaca (*Ocimum selloi*). Em todos esses sistemas foram detectadas variabilidade entre e dentro das duas populações. A separação dessas populações foi possível pela análise conjunta desses sistemas polimórficos.

Na análise isozimática de sete acessos de *Bidens pilosa*, realizada por OLIVEIRA e CASALI (1999), detectaram-se variantes isozimáticos de ACP, EST e PO. Nos acessos das altitudes extremas (5 e 1.160 m) houve variações mais marcantes. A diferença em número de bandas entre os acessos coletados na menor e maior altitude foi detectada em ACP, respectivamente dez e oito bandas. O grande número de bandas isozimáticas comuns a todos os acessos (27 das 35

bandas reveladas) levaram os autores a suporem essa característica favorável à adaptação de *B. pilosa* a diversas altitudes.

Na família Asteraceae, há plantas com flores radiadas e não radiadas. Essa diferença morfológica, presente também na espécie *Bidens pilosa*, propicia diferença na fecundação das plantas. Os raios das flores facilitam a localização dessas e favorecem o pouso dos insetos polinizadores, o que auxilia na fecundação cruzada, enquanto as flores não radiadas tendem a ocorrer em plantas com elevadas taxas de autopolinização. Esse fato levou SUN e GANDERS (1990) a estudarem a taxa de cruzamento de picão (*Bidens pilosa*) que possuíam flores radiadas e não radiadas utilizando 34 sistemas isozimáticos e plantas do Havaí com três formas de flores: radiada, intermediária e não radiada. Nesse estudo determinaram que essa espécie é autógama, com taxa de fecundação cruzada de 8,8% nas formas radiadas, 5,1% nas formas intermediárias e 4,3% nas formas sem raio. Com o auxílio das isozimas, sendo o loco *Pgi-3*, da enzima fosfoglico isomerase, utilizado como marcador, observaram a ocorrência de grande heterozigosidade, mas de pequena diversidade genética dentro e entre populações.

Na determinação da biologia da reprodução em estévia (*Stevia rebaudiana*), BALLVÉ (1992) obteve resultados confirmadores da reprodução sexuada dessa espécie. Trabalhos anteriores baseados em características morfológicas da flor haviam concluído ser a espécie de reprodução assexuada (apomítica), entretanto, os resultados contrários obtidos com variantes de fosfatase ácida (ACP), esterase (EST), glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) e peroxidase (PO), além dos de leucina aminopeptidase (LAP), fosfoglico isomerase (PGI) e fosfoglicomutase (PGM) detectaram variação isozimática entre e dentro de progênies individuais, o que confirma a reprodução sexuada, principalmente por sementes alógamas.

Nas plantas de propagação sexuada há variação maior dentro do que entre populações, enquanto que nas de reprodução assexuada a variação ocorre entre populações, como por exemplo o dente-de-leão (*Taraxacum officinale*), citado por DIGGLE et al. (1998), espécie medicinal de reprodução assexuada por meio de sementes apomíticas.

A separação de quatro espécies do gênero *Plantago* foi realizada por PRAMANIK e RAYCHAUDHURI (1997), utilizando o polimorfismo isozimático de esterase (EST) e superóxido dismutase (SOD). Os autores observaram que apenas o uso da EST ou da SOD serviria à separação das espécies e por isso consideraram serem esses importantes marcadores bioquímicos na determinação de espécies do gênero *Plantago*.

FUENTES-GRANADOS et al. (1998) utilizaram as análises isozimáticas no estudo da herança isozimática das progênies de cinco populações de hissopo aniz (*Agastache foeniculum*), determinando a diversidade genética entre e dentro das populações.

SEVESTRE-RIGOUZZO et al. (1993) utilizaram o polimorfismo isozimático na detecção de híbridos naturais entre *Catharanthus roseus* e *C. trichophyllus*.

2.2.5. Variabilidade Genética

As medidas mais usuais de verificação da variabilidade utilizando isozimas baseiam-se na amostragem aleatória de locos obtida em populações não hierarquicamente estruturadas. Ao focalizar múltiplos locos dessas populações, diversos índices e coeficientes têm sido propostos a fim de expressar o grau de similaridade e distância genética entre amostras de populações. Alguns desses se baseiam nas frequências alélicas estimadas de modo convencional, enquanto outros operam com frequências alélicas arbitrárias dos tipos 1 e 0, referindo-se, respectivamente, à presença e à ausência de dado alelo. Muitos coeficientes são calculados com base em locos individuais, sendo a distância final obtida a partir da média das distâncias dos locos. Outros são calculados, usando-se a combinação de todos os locos, sem individualizar quaisquer deles. Além disso, muitas distâncias genéticas são essencialmente medidas a partir de distâncias geométricas, sem qualquer conteúdo genético, e por isso mesmo são denominadas coeficientes de dissimilaridade ou divergência (DIAS, 1998). A divergência genética pode ser definida como a expressão da dissimilaridade entre dois indivíduos. A análise da divergência genética tem sido utilizada pelos

melhoristas de plantas na investigação do parentesco entre as espécies, da diversidade de origem geográfica, da capacidade de combinação e da heterose (ALFENAS et al., 1991). Sendo que os padrões isozimáticos se prestam a estes trabalhos, bem como à caracterização e identificação de genótipos, acessos e variedades, em espécies cultivadas ou silvestres. Nesses estudos podem ser realizados cruzamentos seguidos de análises de segregação desses marcadores. Como as isozimas seguem padrões Mendelianos de segregação, é possível estimar o grau de divergência entre determinado número de locos que codificam enzimas mesmo na ausência de cruzamentos (GOTTLIEB, 1971).

No caso dos fenótipos não interpretáveis em níveis de locos e alelos é empregado o Índice de Similaridade de Jaccard, por esse ser próprio aos dados de presença/ausência de bandas isozimáticas (ALFENAS et al., 1991). Esse índice é definido pela fórmula:

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

em que:

a = número de casos em que a banda está presente nos dois acessos, simultaneamente;

b = número de casos em que a banda está presente somente no acesso i;

c = número de casos em que a banda está presente somente no acesso i'
(SNEATH e SOKAL, 1973).

A estimativa da similaridade ou dissimilaridade entre os indivíduos é a primeira etapa do processo de agrupamento e a segunda é a técnica de agrupamento na formação dos grupos. A análise de agrupamento tem por finalidade reunir, com base em algum critério de classificação, as unidades amostrais em vários grupos, de tal forma que existam homogeneidade dentro dos grupos e heterogeneidade entre eles (CRUZ, 1997). Alternativamente, as técnicas de análise de agrupamento têm por objetivo, ainda, dividir algum grupo original de observações em vários grupos homogêneos, segundo algum critério de similaridade e dissimilaridade (CRUZ, 1990; MORAIS, 1992).

Destaca-se, dentre os métodos de agrupamento, o método de otimização, proposto por Tocher, o qual adota o critério de manter a distância média intragrupo sempre inferior a qualquer distância intergrupos (CRUZ, 1997). Esse método requer a obtenção da matriz de dissimilaridade, em que a dissimilaridade foi obtida pelo complemento aritmético do Índice de Similaridade de Jaccard, utilizando-se a seguinte expressão:

$$C_{iii'} = 1 - I_{ii'}$$

em que:

$C_{iii'}$ = medida de dissimilaridade;

$I_{ii'}$ = índice de Jaccard.

A obtenção de estimativa da divergência genética com base em dados isozimáticos foi utilizada em pesquisas com espécies medicinais. O Índice de Similaridade de Jaccard, com base no coeficiente de dissimilaridade de variáveis binárias obtidos de dez sistemas isozimáticos, foi utilizado por LOPES (1997) na estimação do grau de variabilidade genética entre oito acessos de erva-de-bicho (*Polygonum punctatum* Ell.). Os valores do coeficiente serviram, com o emprego do Método de Otimização de Tocher, à formação de três grupos de indivíduos com padrões isozimáticos similares, indicando baixo grau de divergência genética entre os acessos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção dos indivíduos

As plantas amostradas de *Bidens pilosa* ocorriam naturalmente em nove altitudes, variando de 210 a 1.150 m (Quadro 1). Foram coletados 46 indivíduos, no período de agosto-setembro/1999, e mantidos em cultivo no Grupo Entre Folhas - Plantas Mediciniais, em Viçosa-MG. Após o período de um mês foi realizada a análise isozimática das partes apicais.

Quadro 1 - Altitude, local, área e *habitat* de coleta das 46 espécimes de *Bidens pilosa* L. 1999

Altitude ⁽¹⁾	Local de Coleta	N ⁽²⁾	Área e <i>Habitat</i> de Coleta
210	Leopoldina (MG)	4	Urbana - terreno baldio, ensolarado e seco
450	Leopoldina (MG)	5	Rural - horta, sombreada e úmida
475	Oratórios (MG)	7	Rural - horta, ensolarada e úmida
675	Viçosa (MG)	6	Rural - horta, ensolarada e úmida
795	Araponga (MG)	3	Rural - horta, ensolarada e úmida
800	Araponga (MG)	3	Rural - horta, ensolarada e úmida
875	Canaã-Araponga (MG)	7	Rural - horta, ensolarada e úmida
950	Araponga (MG)	7	Rural - horta, ensolarada e úmida
1.150	Araponga (MG)	4	Rural - horta, ensolarada e úmida

⁽¹⁾ Altitude em metros; ⁽²⁾ N = número de indivíduos coletados.

Na identificação dos indivíduos coletados utilizou-se a altitude de coleta seguida de algarismos romanos minúsculos subscritos, representando o

indivíduo. Assim, o primeiro indivíduo coletado na altitude 210 m foi representado por 210_i, o segundo por 210_{ii} e assim por diante.

3.2. Obtenção dos dados isozimáticos

As 46 plantas amostradas encontravam-se em estágio de florescimento. Em cada planta coletaram-se, com auxílio de tesoura, as folhas nas regiões apicais dos ramos vegetativos. Essas amostras foram colocadas em embalagens identificadas, acondicionadas em recipiente de isopor contendo gelo e levadas ao Laboratório de Melhoramento de Hortaliças, do Departamento de Fitotecnia da UFV. Nesse, imediatamente, pesaram-se cerca de 500 mg de material os quais foram macerados em almofariz, utilizando PVPP (Polivinilpolipirrolidona) e solução extratora número 1 e número 3 de ALFENAS et al. (1991). A composição das soluções extratoras encontra-se no Apêndice. A proporção de tampão extrator e amostra foi de 1:1 (mL g⁻¹) na análise do sistema peroxidase e de 2:1 na análise dos demais sistemas. O extrato foi absorvido em tiras de papel cromatográfico Whatman 3M, medindo 1,5 x 0,6 cm, que foram envoltos em papel alumínio previamente identificados e esses transferidos a recipientes contendo nitrogênio líquido. Em seguida, foram retirados, acondicionados em sacos plásticos e mantidos em refrigerador a -70 °C. A corrida eletroforética foi realizada com estas amostras contidas nas tiras de papel aplicadas nos géis.

3.3. Preparo do gel

No preparo dos géis a 12%, foram utilizados 42 g de amido suspensos em 350 mL de solução-tampão (descrita na Tabela 2), em frasco kitasato de 1 L, sob agitação constante e à temperatura ambiente. Após homogeneização, a suspensão foi levada ao cozimento em forno microondas, por 3 a 4 minutos, interrompendo-se esse cozimento e agitando-se fortemente a suspensão a cada 15 segundos. Ao atingir a fervura e a solução tornar-se viscosa e transparente, retirou-se o frasco do microondas e procedeu-se a retirada das bolhas, acoplando o kitazato a uma bomba de vácuo. Em seguida, verteu-se a suspensão em fôrmas de acrílico, com

o cuidado de evitar a formação de bolhas, e cobriu-as com placas de vidro, a fim de uniformizar a superfície e evitar o excesso de evaporação.

No dia anterior à corrida, os géis foram preparados, mantidos em temperatura ambiente e, posteriormente, acondicionados em geladeira até a corrida eletroforética.

3.4. Aplicação das amostras no gel

Os géis foram retirados da geladeira, e, com o auxílio de bisturi, fez-se um corte transversal a 4 cm da extremidade catodal (-). A parte menor do gel foi afastada a fim de facilitar a aplicação das amostras.

As amostras foram colocadas na face cortada do maior gel, em posições equidistantes, num total de dez amostras em cada gel. Nas extremidades, foram inseridos papelotes de azul-de-bromofenol com a finalidade de permitir a visualização da frente de migração e do término da corrida. Em seguida, as duas partes do gel foram unidas, seguindo-se a corrida eletroforética na posição horizontal.

3.5. Eletroforese

As corridas eletroforéticas foram realizadas a 4 °C. As fôrmas de acrílico contendo os géis foram colocadas em suportes entre duas cubas com eletrodos, cada cuba contendo cerca de 100 mL de tampão apropriado a cada sistema. Tecido tipo “perfex”, dobrado uma vez, foi utilizado como ponte conectando o gel às cubas dos eletrodos.

Inicialmente foi feita uma pré-corrida de 30 minutos, a 20 mA (130 V). Esse procedimento foi usado visando transferir as enzimas das tiras de papel ao gel, uniformizando a partida de todas as amostras. Após esse período retiraram-se as tiras de papel e retomou-se a eletroforese, em 35 mA (210 V), permanecendo assim até o final da corrida, quando a cor azul do azul-de-bromofenol atingiu a marca de 9 cm, a partir da origem.

3.6. Revelação, fixação e secagem do gel

Terminada a corrida eletroforética, os géis foram fatiados longitudinalmente à espessura de 2 mm, com o auxílio de um fio de náilon número 20 e réguas plásticas superpostas, usadas como guias. Das cinco fatias obtidas, descartou-se a fatia superior, de baixa resolução, e as demais foram colocadas em bandejas de vidro tipo “pirex”, onde foi adicionada solução reveladora apropriada a cada sistema isozimático (Apêndice).

Foram analisados os sistemas isozimáticos fosfatase ácida (ACP), α -esterase (α -EST), β -esterase (β -EST), glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), peroxidase (PO), chiquimato desidrogenase (SKDH) e superóxido dismutase (SOD). Os sistemas tampão gel/eletrodo utilizados foram os propostos por SHAW e PRASAD (1970) e SOLTIS et al. (1983) e se encontram no Quadro 2.

O conjunto permanecia em incubação, a fim de favorecer a coloração. Na revelação dos sistemas ACP, α -EST, β -EST, GOT, SKDH e SOD, a cuba com os géis foi colocada em estufa a 37 °C, no escuro; enquanto que no sistema PO o gel foi submetido a 4 °C, em refrigerador, até a revelação das bandas, que ocorria em uma hora, aproximadamente.

Após a revelação, procedeu-se ao descarte da solução, à lavagem dos géis em água corrente e, em seguida, à sua fixação em solução de glicerina 10%, por cerca de 12 horas, em refrigerador a aproximadamente 4 °C. Os géis, após adquirirem consistência foram colocados entre duas folhas de papel celofane, que estavam previamente embebidas em água e, em seguida, o conjunto foi estendido em bastidor de madeira e mantido em posição vertical (conforme descrito em ALFENAS et al., 1991). Depois de seco, o gel foi removido do bastidor, devidamente identificado e seguiu-se a análise desses.

3.7. Leitura das bandas e confecção do zimograma

A análise dos géis foi feita com o auxílio de diafanoscópio e régua milimetrada. As zonas de atividade e respectivas bandas eletroforéticas foram esquematizadas em papel milimetrado, detalhando-se as distâncias de migração,

a largura e a intensidade das bandas. No conjunto de todas as bandas ou zimograma as regiões de atividade foram identificadas alfabeticamente em ordem decrescente de mobilidade, em relação à origem. A região com as bandas de maior mobilidade no sistema isozimático foi denominada de região *a* (uma região não necessariamente corresponde a um loco). Quanto aos valores de mobilidade relativa (*Mr*), a banda de maior migração recebeu o valor 1,0; as demais, seguiu-se a equivalência até a origem, tendo essa o valor zero. O conjunto de bandas de diferentes mobilidades eletroforéticas, em suas posições, nos respectivos indivíduos foi denominado de padrão.

3.8. Análise da divergência genética por padrões de bandas isozimáticas

A análise foi feita objetivando-se estimar a distância genética entre os indivíduos a partir de dados isozimáticos. Utilizaram-se a metodologia da análise multivariada do Índice de Similaridade de Jaccard e o Método de Otimização de Tocher, calculados por meio de recursos computacionais do programa GENES, desenvolvido pelo Professor Cosme Damião Cruz, do Setor de Genética do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa, cujas instruções operacionais encontram-se descritas em CRUZ (1997).

3.9. Estimação da Divergência Genética por Padrões isozimáticos

Utilizou-se o Índice de Similaridade de Jaccard, definido pela fórmula:

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

em que:

a = número de casos em que a banda está presente nos dois acessos, simultaneamente;

b = número de casos em que a banda está presente somente no acesso *i*;

c = número de casos em que a banda está presente somente no acesso *i'*
(SNEATH e SOKAL, 1973).

A dissimilaridade com base em dados isozimáticos foi obtida pelo Complemento Aritmético do Índice de Similaridade de Jaccard (CRUZ,1997), dado por:

$$C_{ii'} = 1 - I_{ii'}$$

em que

$C_{ii'}$ = medida de dissimilaridade;

$I_{ii'}$ = índice de Jaccard.

3.10. Método de Otimização de Tocher

Utilizou-se o método de Tocher, citado por RAO (1952). Nesse método adota-se o critério de que a média das medidas de dissimilaridade dentro do grupo deve ser menor do que as distâncias médias entre quaisquer grupos.

Esse método requer a obtenção da matriz de dissimilaridade, sendo utilizado o complemento aritmético do Índice de Similaridade de Jaccard.

Por meio da matriz de dissimilaridade, foi identificado o par de indivíduos mais similar, formando-se o grupo inicial. A inclusão de novos indivíduos no grupo foi feita mediante comparação do acréscimo no valor médio da distância dentro do grupo e o nível máximo permitido (α) a fim de que a distância média intragrupo seja inferior a qualquer distância intergrupo (CRUZ, 1997).

No limite de acréscimo de indivíduos em cada grupo (α) foi adotado o valor máximo da medida de dissimilaridade encontrado no conjunto das menores distâncias envolvendo cada indivíduo (CRUZ, 1997).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ajuste de metodologia

As enzimas presentes nas amostras preparadas conforme procedimento descrito na metodologia e armazenadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ permaneceram ativas e estáveis durante 7 dias. Entretanto, nas análises realizadas aos 15 dias, houve declínio da atividade enzimática, observando-se bandas de baixa resolução.

A perda de resolução após 15 dias foi observada por SOUZA (1996) ao analisar amostras de extratos de folhas de acerola (*Malpighia* sp.) mantidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Essa autora enfatizou a necessidade de melhoria da solução extratora a fim de conservar a atividade enzimática por maior período.

As combinações de tampões do gel e do eletrodo e a resolução obtida encontram-se no Quadro 2. Nos sistemas enzimáticos α -esterase (α -EST), peroxidase (PO) e superóxido dismutase (SOD) houve resolução satisfatória em dois sistemas.

Os sistemas enzimáticos foram selecionados pelo polimorfismo, atividade e resolução satisfatórios, permitindo sua interpretação genética. Nos sete sistemas, fosfatase ácida (ACP), α -esterase (α -EST), β -esterase (β -EST), glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), peroxidase (PO), chiquimato desidrogenase (SKDH) e superóxido dismutase (SOD), detectaram-se 72 bandas, sendo a maioria polimórfica. Essas foram utilizadas nas análises de diversidade genética.

Quadro 2 - Soluções-tampão utilizadas no preparo do gel destinado a eletroforese dos indivíduos de *Bidens pilosa* L. Viçosa-MG, 1995

Tampão do Eletrodo		Tampão do Gel		Enzima	Resolução (*)	Referência
Tris (0,135 M)	16,35 g	Solução-tampão do eletrodo	66,70 mL	ACP	+	SHAW e
Ácido cítrico (0,043 M)	9,04 g	Água destilada	1.000,00 mL	PO	+	PRASAD
Água destilada	1.000,00 mL			SKDH	+	(1970)
	pH 7,0		pH 7,0	SOD	-	
Ácido bórico (0,3 M)	18,55 g	Tris (0,015 M)	1,84 g	α -EST	+	SOLTIS et al.
NaOH (0,1 M)	4,00 g	Ácido cítrico (0,004 M)	0,69 g	β -EST	\pm	(1983)
Água destilada	1.000,00 mL	Água destilada	1.000,00 mL	GOT	\pm	
	pH 8,6		pH 7,8	PO	+	
				SOD	\pm	
LiOH (0,038 M)	1,60 g	LiOH (0,004 M)	0,019 g	α -EST	+	SOLTIS et al.
Ácido bórico (0,188 M)	11,60 g	Tampão Tris-citrato (5,45 g Tris 0,045 M,		β -EST	+	(1983)
Água destilada	1.000,00 mL	1,28 g Ácido cítrico 0,007 M)	900,00 mL	GOT	+	
Ajuste o pH utilizando os componentes secos até		Solução-tampão do eletrodo	100,00 mL	PO	\pm	
		Adicione NaOH (1,0 M) até		SOD	+	
	pH 8,3		pH 8,3			

(*) Resolução: + = atividade e resolução satisfatórias, \pm = atividade aceitável e resolução regular e - = atividade aceitável, mas resolução baixa.

Em todos os sistemas isozimáticos testaram-se dois tampões extratores, citados por ALFENAS et al. (1991): o de número 1 e o de número 3. O tampão extrator 1 foi melhor que o 3, nos sistemas testados, por revelar bandas bem nítidas e mais estáveis. Apenas o sistema SKDH teve resolução adequada quando a extração foi feita com o tampão 3.

A quantidade de tampão extrator foi testada em relação a massa de amostra foliar. As proporções empregadas foram 1:1 e 2:1 de tampão extrator (mL) em relação à massa de amostra de folhas (g). Nos sistemas isozimáticos observou-se que a proporção 2:1 é melhor do que 1:1, exceto no sistema PO. A proporção 2:1 provavelmente auxilia na extração mais eficiente e mantém a atividade enzimática, possivelmente devido a maior quantidade de conservante junto às enzimas extraídas. No caso da PO, a proporção 1:1 revelou bandas de maior e menor intensidade de coloração, enquanto que na proporção 2:1 somente as bandas de maior intensidade foram reveladas, pela provável diluição da amostra.

Na pré-corrida as amostras foram testadas nas condições de 15 e 20 mA. Houve substancial melhoria de resolução nos zimogramas, por meio do aumento da voltagem durante a migração inicial. A 20 mA as bandas revelaram maior nitidez e intensidade de coloração.

Os sistemas-tampão descritos por SHAW e PRASAD (1970) e SOLTIS et al. (1983) foram adequados ao tecido foliar de *B. pilosa* (Quadro 2). No sistema-tampão descrito por SHAW e PRASAD (1970) houve resolução satisfatória na maioria das enzimas. No sistema-tampão descrito por SOLTIS et al. (1983) a resolução foi regular na maioria das enzimas, sendo apenas aproveitados os géis com resolução satisfatória.

Na análise dos dois sistemas descritos por SOLTIS et al. (1983), verificou-se que nas bandas reveladas de esterases (α -EST e β -EST) em pH 8,3 do eletrodo a mobilidade foi menor, mantendo-se na metade superior do gel, em comparação com as reveladas em pH 8,6, que tiveram mobilidade maior. Com isso, as bandas de maior mobilidade em pH 8,3 não foram observadas em pH 8,6. Em tampão de pH 8,3, as bandas de β -EST tiveram maior intensidade de coloração, já as de α -

EST ficaram com menor espessura e menor coloração quando comparadas com as bandas obtidas em pH 8,6.

No sistema-tampão descrito por SHAW e PRASAD (1970), as bandas isozimáticas de ACP e SKDH tiveram resolução satisfatória, com bandas reveladas na posição mediana do gel. A atividade catodal das bandas de PO foram melhores no sistema SHAW e PRASAD (1970), já as bandas anodais, à semelhança do que ocorreu com SOD, tiveram migração até próximo ao fronte do gel (extremidade positiva), sendo difusas e por isso foram melhores visualizadas no sistema descrito por SOLTIS et al. (1983) cujas bandas foram detectadas na metade superior do gel.

No sistema-tampão descrito por SOLTIS et al. (1983), as bandas isozimáticas de GOT e SOD tiveram resolução satisfatória, com maior intensidade de coloração em pH 8,3 do eletrodo do que em pH 8,6. No pH 8,3 as bandas migraram até a metade do gel e ficaram mais nítidas, já no pH 8,6 as bandas migraram mais e ficaram deformadas, principalmente as das extremidades laterais do gel por migrarem mais que as da região central.

4.2. Avaliação dos padrões isozimáticos

Nos zimogramas, as bandas foram representadas de acordo com as distâncias de migração, largura e intensidade. Os padrões de cada sistema enzimático foram enumerados, agrupando-se os indivíduos correspondentes. Os padrões foram esquematizados em quadros de distribuição dos indivíduos e as respectivas bandas, com os números 0 e 1 indicando ausência e presença de bandas, respectivamente.

Foi obtida boa separação em todos os sistemas testados, estando as bandas anodais na porção mediana do gel.

Nos sete sistemas houve atividade isozimática anodal; PO teve também atividade catodal.

4.2.1. Fosfatase ácida (ACP)

O sistema ACP teve atividade nas folhas, revelando sete padrões (Figura 1), com a maioria dos indivíduos correspondendo ao padrão I (Quadro 3). Houve variação entre os indivíduos das altitudes e dentro das altitudes, com indivíduos da mesma altitude (450, 475 e 675 m) apresentando dois padrões de ACP.

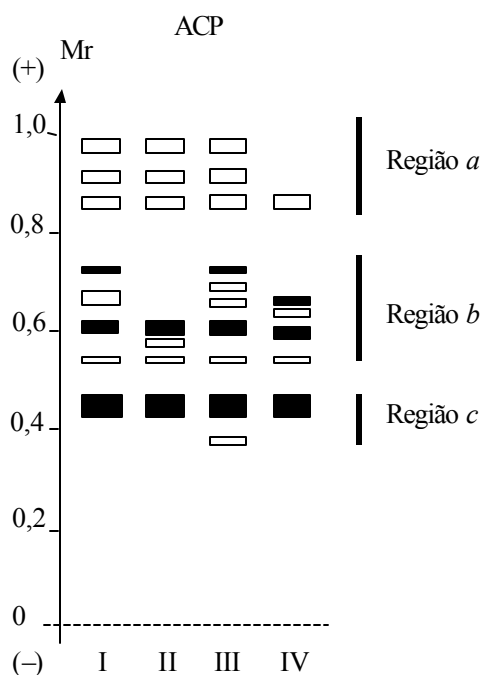


Figura 1- Zimograma do sistema enzimático fosfatase ácida (ACP), obtido por eletroforese em gel de amido, do tecido foliar de 46 indivíduos de *Bidens pilosa* L. de nove altitudes, com a respectiva mobilidade relativa (Mr). Viçosa-MG, 1999.

Quadro 3 - Padrões de bandeamento da enzima fosfatase ácida (ACP) nos 46 indivíduos de *Bidens pilosa* L.

Padrão	Bandas													Indivíduos (%)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	210	450	475	675	795	800	875	950	1.150		
I	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	-	80	14	67	100	100	100	100	100
II	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	-	-	-	33	-	-	-	-	-	
III	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	100	-	-	-	-	-	-	-	-	
IV	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	-	20	86	-	-	-	-	-	-

0 = ausência de bandas; 1 = presença de bandas.

Foi observada a coloração de 13 bandas no total, com 6 a 10 bandas presentes em cada padrão e, no intuito de facilitar a descrição, foi feita a divisão dessas em três regiões de atividade (Figura 1).

Todas as regiões apresentaram polimorfismo. Na região *a* foi detectada a presença de três bandas, com a ausência das duas primeiras no padrão IV. A região *b* foi a de maior número de bandas, oito bandas, com variação de intensidade de coloração, de espessura e de ausência e presença de bandas. A região *c* foi a menos polimórfica, cujas bandas revelaram variações de espessura, banda 12, e presença da banda 13 apenas no padrão III.

A interpretação genética dessas variantes não foi possível devido ao grande número de bandas e à diversidade de combinação ocorrida nas regiões de atividade. Entretanto, em trabalho realizado por OLIVEIRA e CASALI (1999) com essa espécie ficou claro o comportamento monomérico de ACP. Esses autores obtiveram padrões de bandas diferentes entre indivíduos coletados na menor e maior altitude, respectivamente 5 e 1.160 m, essas com dez e oito bandas. Esse mesmo número de bandas foi observado neste trabalho nos indivíduos da menor altitude e maior altitude, respectivamente, indivíduos 210 e 1.150 (Quadro 3).

Esse sistema serviu à separação dos indivíduos de 210 m de altitude dos demais.

4.2.2. α -Esterase (α -EST)

No sistema α -EST houve atividade nas folhas, revelando onze padrões (Figura 2), com a maioria dos indivíduos correspondendo ao padrão III (Quadro 4). Houve variação dos indivíduos entre altitudes e dentro das altitudes. Apesar disso, os indivíduos de 210 e 675 revelaram padrões distintos dos demais.

Foi observada a coloração de 16 bandas no total, com três a oito bandas por padrão, com a distinção de três regiões de atividade (Figura 2).

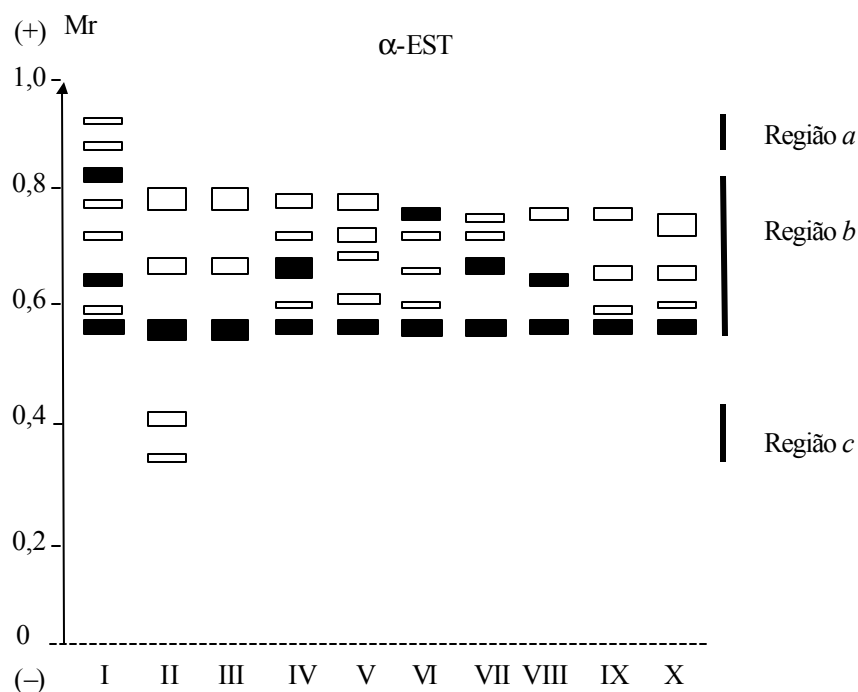


Figura 2 - Zimograma do sistema enzimático α -esterase (α -EST), obtido por eletroforese em gel de amido, do tecido foliar de 46 plantas de *Bidens pilosa* L. de nove altitudes, com a respectiva mobilidade relativa (Mr). Viçosa-MG, 1999.

Quadro 4 - Padrões de bandejamento da enzima α -esterase (α -EST) nos 46 indivíduos de *Bidens pilosa* L.

Padrão	Bandas																Indivíduos (%)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	210	450	475	675	795	800	875	950	1.150	
I	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	-	-	-	33	-	-	-	-	-	
II	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	25	-	-	-	-	-	-	-	-	
III	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	75	-	-	-	-	-	-	-	-	
IV	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	-	-	86	-	-	67	-	86	100	
V	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	-	-	-	-	-	33	-	14	-	
VI	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	-	-	-	50	-	-	-	-	-	
VII	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	-	-	-	17	-	-	-	-	-	
VIII	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	-	40	-	-	-	-	-	-	-	
IX	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	-	60	-	-	100	-	-	-	-	
X	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	-	-	14	-	-	-	100	-	-	

0 = ausência de bandas; 1 = presença de bandas.

Todas as regiões apresentaram polimorfismo de bandas. A região *a*, presente apenas no padrão I, foi composta por duas bandas de mesma espessura e intensidade de coloração. A região *b* revelou doze bandas tendo polimorfismo de espessura, de intensidade de coloração e de ausência e presença de bandas. A banda de menor migração nessa região (banda 15) é comum a todos os indivíduos, possui coloração intensa e apresenta variação em espessura. A região *c*, presente apenas no padrão II, apresentou polimorfismo de espessura e de ausência e presença de bandas.

Apesar da grande variação entre os padrões, há semelhança em espessura, em intensidade e em comportamento de presença e ausência de bandas entre as bandas reveladas neste trabalho e as observadas por OLIVEIRA e CASALI (1999) ao analisarem essa mesma espécie.

4.2.3. β -Esterase (β -EST)

O sistema β -EST apresentou atividade nas folhas, revelando seis padrões (Figura 3), com a maioria dos indivíduos correspondendo ao padrão I e III (Quadro 5). Houve variação entre os indivíduos das mesmas altitudes. Na altitude 675 m, o padrão I foi observado em 67% dos indivíduos e o II nos demais; na altitude 950 m observou-se o padrão I em 71% dos indivíduos e o IV nos demais. Nesse sistema obteve-se a separação dos indivíduos da altitude 795 m dos demais.

Foi detectada a coloração de nove bandas no total, contendo cada padrão duas a quatro bandas, e distinguidas duas regiões de atividade de β -EST (Figura 3).

Todas as regiões apresentaram polimorfismo de bandas e nenhuma banda foi comum a todos os padrões. A região *a* teve oito das nove bandas reveladas e com polimorfismo de espessura e de ausência e presença de bandas. A região *b* teve atividade apenas no padrão V, com uma banda.

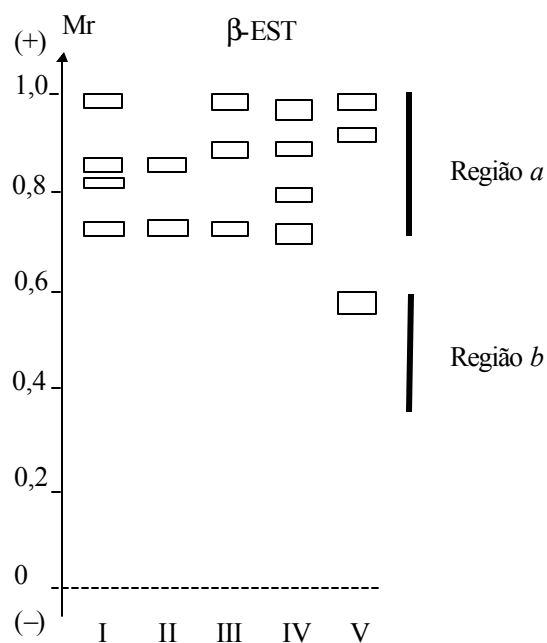


Figura 3 - Zimograma do sistema enzimático β -esterase (β -EST), obtido por eletroforese em gel de amido, do tecido foliar de 46 plantas de *Bidens pilosa* L. de nove altitudes, com a respectiva mobilidade relativa (Mr). Viçosa-MG, 1999.

Quadro 5 - Padrões de bandejamento da enzima β -esterase (β -EST) nos 46 indivíduos de *Bidens pilosa* L.

Padrão	Bandas									Indivíduos (%)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	210	450	475	675	795	800	875	950	1.150
I	1	0	0	0	1	1	0	1	0	-	-	-	67	-	100	100	71	-
II	0	0	0	0	1	0	0	1	0	100	-	-	33	-	-	-	-	-
III	1	0	0	1	0	0	0	1	0	-	100	100	-	-	-	-	-	100
IV	0	1	0	1	0	0	1	1	0	-	-	-	-	-	-	-	29	-
V	1	0	1	0	0	0	0	0	1	-	-	-	-	100	-	-	-	-

0 = ausência de bandas; 1 = presença de bandas.

4.2.4. Glutamato oxaloacetato transaminase (GOT)

O sistema glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), também denominado de aspartato aminotransferase (AAT), apresentou atividade anódica e dois padrões (Figura 4 e Quadro 6). Cada padrão revelou três bandas, sendo duas monomórficas e apenas as bandas 3 e 4 com variação de banda rápida e banda lenta (Figura 4). O padrão I estava presente nos 45 indivíduos e o padrão II apenas em um indivíduo (Quadro 6). A mobilidade relativa (Mr) das bandas isozimáticas da GOT foi a menor de todos os sistemas testados. Devido ao pequeno número de bandas e ao baixo polimorfismo não foi feita a delimitação das regiões de atividade.

O baixo polimorfismo de GOT indica que a condição dessa enzima foi conservada na quase totalidade dos indivíduos.

O polimorfismo de espessura e de banda rápida e lenta foi detectado por LOPES (1997) na erva-de-bicho (*Polygonum punctatum*), tendo esse sistema revelado 12 bandas naquela espécie.

Quanto à enzima GOT, GOTTLIEB (1982) relata que deve-se encontrar três ou quatro isozimas, pois essa é ativa em diversos compartimentos celulares. Além disso afirma se tratar de uma enzima de estrutura dimérica. Este comportamento dimérico foi determinado também por BALLVÉ (1992) em progênies de estévia (*Stevia rebaudiana*) e por FUENTES-GRANADOS et al. (1998) em hissopo aniz (*Agastache foeniculum*). Nos estudos de hissopo aniz, FUENTES-GRANADOS et al. (1998) detectaram a presença de três alelos no loco *Got-2*. O comportamento dimérico ficou evidente no heterozigoto, com a presença de três bandas, sendo a banda intermediária de maior espessura.

Apesar de ser atribuída presença de grande heterozigosidade isozimática nessa espécie, conforme estudo de SUN e GANDERS (1990), e as informações de tratar-se de uma enzima dimérica, neste caso em expressão heterozigótica por ter a banda intermediária (banda 2) maior espessura, não foi possível inferir sobre o comportamento dimérico da isozima GOT em *Bidens pilosa*.

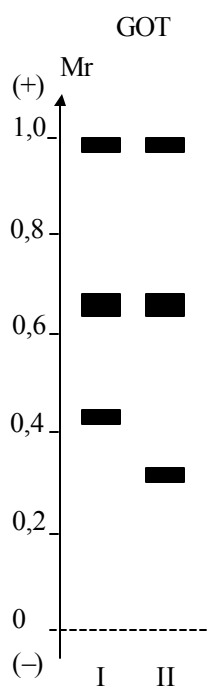


Figura 4 - Zimograma do sistema enzimático glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), obtido por eletroforese em gel de amido, do tecido foliar de 46 plantas de *Bidens pilosa* L. de nove altitudes, com a respectiva mobilidade relativa (Mr). Viçosa-MG, 1999.

Quadro 6 - Padrões de bandejamento da enzima glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) nos 46 indivíduos de *Bidens pilosa* L.

Padrão	Bandas				Indivíduos (%)								
	1	2	3	4	210	450	475	675	795	800	875	950	1.150
I	1	1	1	0	100	80	100	100	100	100	100	100	100
II	1	1	0	1	-	20	-	-	-	-	-	-	-

0 = ausência de bandas; 1 = presença de bandas.

4.2.5. Peroxidase (PO)

Nos dois sistemas-tampão eletrodo, a enzima PO teve melhor resolução das bandas catodais (-) no sistema descrito por SHAW e PRASAD (1970) e das bandas anodais (+) no descrito por SOLTIS et al. (1983), que possuía o pH 8,6 do eletrodo (Quadro 2).

A atividade anódica e catódica ocorreu no sistema peroxidase e foram denominadas de região *a* e *b*, respectivamente. Nota-se a presença de sete padrões (Figura 5), com a maioria dos indivíduos representada pelos padrões V e VII (Quadro 7). Houve variação entre os indivíduos das mesmas altitudes, com dois ou mais padrões observados em cada altitude.

O sistema PO revelou 15 bandas, com a presença de três a oito bandas por padrão. A região *a* revelou o maior número de bandas, treze bandas, com polimorfismo de espessura assim como ausência e presença de bandas. A região *b* (catodal) foi monomórfica com duas bandas, a banda 14, de maior espessura e coloração intensa e a banda 15, o inverso daquela.

Ao analisarem o sistema peroxidase dessa espécie, OLIVEIRA e CASALI (1999) encontraram apenas uma banda em todos os indivíduos e obtiveram dois padrões, um de banda rápida e outro de banda lenta, que permitiu separar o acesso de 1.160 m dos demais. Já nesta análise encontrou-se também a atividade de apenas uma banda, padrão VII, mas os indivíduos desse padrão tiveram origem em diversas altitudes, desde 475 até 1.150 m de altitude.

Apesar do grande número de bandas anodais, 13 bandas, apenas as catodais, bandas 14 e 15, estavam presentes em todos os indivíduos. Grandes números de bandas de PO também foram observadas por LOPES (1997), em erva-de-bicho (*Polygonum punctatum*). Essa pesquisadora obteve o total de onze bandas de peroxidase, sendo sete anodais e quatro catodais. De maneira semelhante ao observado em *Bidens pilosa*, no trabalho de LOPES (1997) houve apenas uma banda catodal que foi comum a todos os acessos de erva-de-bicho.

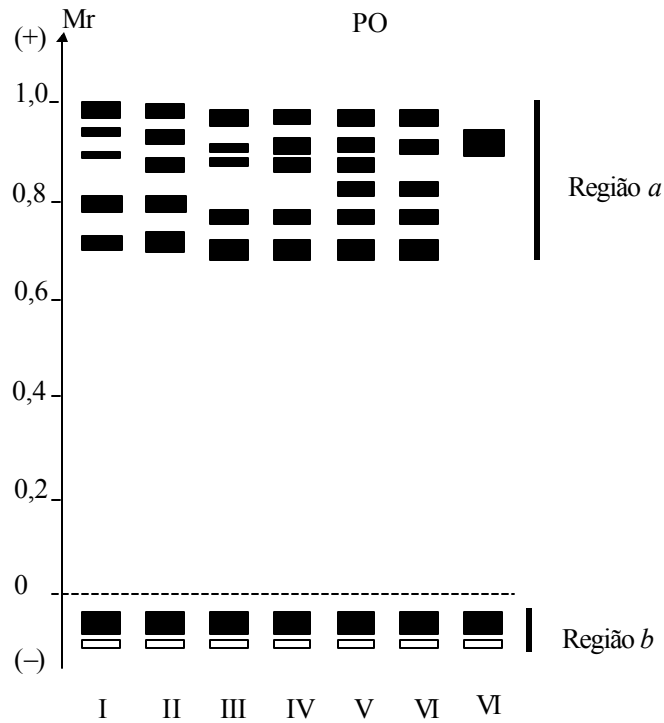


Figura 5 - Zimograma do sistema enzimático peroxidase (PO), obtido por eletroforese em gel de amido, do tecido foliar de 46 plantas de *Bidens pilosa* L. de nove altitudes, com a respectiva mobilidade relativa (Mr). Viçosa-MG, 1999.

Quadro 7 - Padrões de bandejamento da enzima peroxidase (PO) nos 46 indivíduos de *Bidens pilosa* L.

Padrão	Bandas															Indivíduos (%)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	210	450	475	675	795	800	875	950	1.150	
I	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	-	-	-	17	-	67	-	14	-	
II	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	-	-	-	-	33	-	14	14	50	
III	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	75	-	-	17	-	-	57	-	-	
IV	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	-	20	-	-	-	-	-	-	-	
V	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	-	80	86	-	-	33	-	-	25	
VI	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	25	-	-	17	-	-	-	-	-	
VII	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	-	-	14	50	67	-	29	72	25	

0 = ausência de bandas; 1 = presença de bandas.

Este amplo polimorfismo encontrado nas bandas anodais de peroxidase pode resultar da atividade enzimática em vários compartimentos da célula vegetal, seja no ambiente protoplastídico, como o glioxissomo e o vacúolo, ou fora dele, aderida à parede celular ou no espaço intercelular. Em cada local exerce papéis diversos na conversão de compostos orgânicos ou inorgânicos (SCANDALIOS, 1975; TORGGLER et al., 1995), características importantes na defesa e na adaptação individual do organismo ao ambiente (TORGGLER et al., 1995). É atribuída a ela, por exemplo, a proteção celular contra doenças e doses excessivas de irradiação (MURPHY et al., 1990), o que poderia estar ocorrendo simultaneamente em todos os ambientes de origem, em menor ou maior intensidade, daí a necessidade e uso do polimorfismo detectado.

4.2.6. Chiquimato desidrogenase (SKDH)

Foram revelados seis padrões no sistema SKDH (Figura 6), com a maioria dos indivíduos representada pelo padrão II. Com esse sistema não foi possível caracterizar nenhuma altitude individualmente, pois os indivíduos das mesmas altitudes se distribuíram em vários padrões, como pode ser visto indivíduos da altitude 450 m com três padrões (I, III e V); os de 675 m, com dois padrões (II e VI) e de 795 m, com dois padrões (II e IV) (Quadro 8).

Foi revelado o total de sete bandas e em cada padrão observou-se de uma a cinco bandas, padrão VI e padrões I e II, respectivamente (Figura 6).

Duas regiões de atividade foram observadas, cada uma contendo cinco bandas. Na região *a*, o polimorfismo foi na intensidade de coloração e ausência e presença de bandas. Na região *b*, o polimorfismo foi na espessura, intensidade de coloração e presença e ausência de bandas.

Nesse sistema não foi detectada nenhuma banda comum a todos os indivíduos.

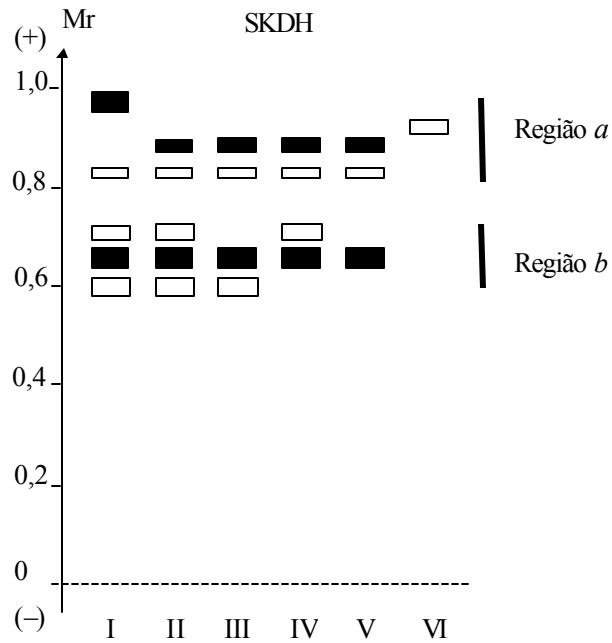


Figura 6 - Zimograma do sistema enzimático chiquimato desidrogenase (SKDH), obtido por eletroforese em gel de amido, do tecido foliar de 46 plantas de *Bidens pilosa* L. de nove altitudes, com a respectiva mobilidade relativa (Mr). Viçosa-MG, 1999.

Quadro 8 - Padrões de bandeamento da enzima chiquimato desidrogenase (SKDH) nos 46 indivíduos de *Bidens pilosa* L.

Padrão	Bandas							Indivíduos (%)								
	1	2	3	4	5	6	7	210	450	475	675	795	800	875	950	1.150
I	1	0	0	1	1	1	1	100	20	-	-	-	-	-	-	-
II	0	0	1	1	1	1	1	-	-	100	83	67	100	100	100	100
III	0	0	1	1	0	1	1	-	60	-	-	-	-	-	-	-
IV	0	0	1	1	1	1	0	-	-	-	-	33	-	-	-	-
V	0	0	1	1	0	1	0	-	20	-	-	-	-	-	-	-
VI	0	1	0	0	0	0	0	-	-	-	17	-	-	-	-	-

0 = ausência de bandas; 1 = presença de bandas.

4.2.7. Superóxido dismutase (SOD)

A revelação da enzima superóxido dismutase é negativa, ou seja, o gel fica colorido, exceto onde é detectada a atividade enzimática. Nesse caso, as bandas claras da Figura 7 representam maior atividade enzimática que as com coloração, nos dois padrões.

A análise do zimograma do sistema SOD pode ser feita seguindo o modelo de atividade de três regiões (Figura 7). A região *a* foi monomórfica, contendo três bandas de mesma espessura e intensidade de coloração. A região *b* foi polimórfica, com três bandas no padrão II e apenas a banda 4 no padrão I. A região *c* mostrou atividade em todos os indivíduos e duas bandas de mesma espessura, tendo a banda 8 maior intensidade de coloração que a banda 7, ou seja, a banda 7 contempla maior atividade. Essa variação na intensidade de coloração da enzima SOD também foi encontrada por RIBAS (1999), quando analisou um pomar de sementes de angico-gurucaia (*Parapiptadenia rigida*).

Os indivíduos coletados na mesma altitude distribuíram-se nos dois padrões, tendo a maioria o padrão I (Quadro 9).

O sistema SOD revelou seis bandas comuns a todos os indivíduos analisados, o que foi a maior quantidade de bandas monomórficas dentre os sete sistemas enzimáticos testados. Três bandas nas duas regiões (*a* e *b*) de maior migração foram encontradas em *Vicia faba* L. *minor* quando POLIGNANO et al. (1998) analisaram uma coleção de 33 acessos. A interpretação de cada região foi semelhante e esses autores admitiram ser isozima dimérica codificada por dois alelos em um só loco. Já a terceira região (região *c*) esteve representada por cinco bandas e tendo a atividade tetramérica de dois alelos de um mesmo loco. ALFENAS et al. (1991) também citam a atividade dimérica e tetramérica de SOD.

A interpretação genética dos indivíduos de *Bidens pilosa* não foi possível devido à pequena variação observada, mas poderia ser aceita a atividade dimérica na região *a* e inferir sobre a atividade tetramérica incluindo as regiões *b* e *c*, pois as bandas 4 e 8 estão em menor atividade e as bandas intermediárias (bandas 5 e 6) em maior atividade e espessura, o que pode caracterizar um protômero codificado por dois alelos.

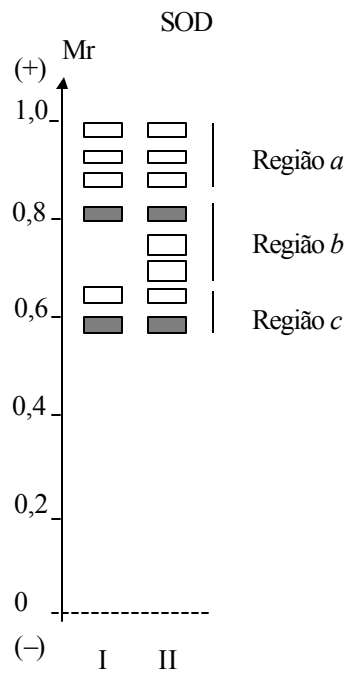


Figura 7 - Zimograma do sistema enzimático superóxido dismutase (SOD), obtido por eletroforese em gel de amido, do tecido foliar de 46 plantas de *Bidens pilosa* L. de nove altitudes, com a respectiva mobilidade relativa (Mr). Viçosa-MG, 1999.

Quadro 9 - Padrões de bandeamento da enzima superóxido dismutase (SOD) nos 46 indivíduos de *Bidens pilosa* L.

Padrão	Bandas								Indivíduos (%)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	210	450	475	675	795	800	875	950	1.150
I	1	1	1	1	0	0	1	1	-	20	43	100	100	100	100	100	100
II	1	1	1	1	1	1	1	1	100	80	57	-	-	-	-	-	-

0 = ausência de bandas; 1 = presença de bandas.

4.3. Análise dos indivíduos por padrões de bandas isozimáticas

No Quadro 10 constam os 36 padrões dos sistemas ACP, α -EST, β -EST, GOT, PO, SKDH e SOD em folhas de *Bidens pilosa*. Em todos os sete sistemas detectaram-se polimorfismos e ocorreram variações entre indivíduos entre e dentro das altitudes de coleta. Isso indica que *Bidens pilosa*, como a maioria das espécies medicinais espontâneas, possui grande variabilidade genética devido ao fato de ocorrer em ambientes variados e ter reprodução sexuada. Evidências experimentais têm demonstrado que a heterogeneidade ambiental influencia nos polimorfismos enzimáticos, ou seja, houve o favorecimento de determinados alelos em função dos ambientes diversos - e que as propriedades catalíticas das aloenzimas devem resultar em alterações fisiológicas e, conseqüentemente, em mudanças fenotípicas (TORGGLER et al., 1995). A variação dos padrões de ACP, EST, GOT, PO e SKDH entre e dentro de populações também foi detectada por AMARAL e CASALI (2000) quando analisaram duas populações de alfavaca (*Ocimum selloi*).

Nos sete sistemas cada altitude revelou nove ou mais padrões, sendo que os indivíduos da altitude 675 m revelaram 15 padrões. Os indivíduos mais estáveis foram da altitude 875 m que variaram apenas nos padrões de PO.

Indivíduos da altitude 210 m foram separados dos demais pelos sistemas ACP e α -EST, os da altitude 675 m pela α -EST e os da altitude 950 m pela β -EST. O sistema α -EST foi estável apenas aos indivíduos coletados nas altitudes de 795, 875 e 1.150 m (veja valor percentual no Quadro 10).

No Quadro 10 pode-se notar que os padrões isozimáticos de pelo menos um indivíduo coletado a 475 m correspondia a pelo menos um indivíduo coletado a 1.150 m. Essa mesma constatação pode ser observada entre indivíduos coletados a 800 e 950 m.

Quadro 10 - Grupos formados pelas 46 plantas de *Bidens pilosa* L., de nove altitudes, analisados por padrões revelados pelos sistemas isozimáticos polimórficos, ACP, α -EST β -EST, GOT, PO, SKDH e SOD na análise de tecidos foliares. Viçosa-MG, 1999

Sistema isozimático	Padrão	Padrão isozimático dos indivíduos em % do total coletado								
		Altitude de coleta (m)								
		210	450	475	675	795	800	875	950	1.150
ACP	I	-	80	14	67	100	100	100	100	100
	II	-	-	-	33	-	-	-	-	-
	III	100	-	-	-	-	-	-	-	-
	IV	-	20	86	-	-	-	-	-	-
α -EST	I	-	-	-	33	-	-	-	-	-
	II	25	-	-	-	-	-	-	-	-
	III	75	-	-	-	-	-	-	-	-
	IV	-	-	86	-	-	67	-	86	100
	V	-	-	-	-	-	33	-	14	-
	VI	-	-	-	50	-	-	-	-	-
	VII	-	-	-	17	-	-	-	-	-
	VIII	-	40	-	-	-	-	-	-	-
	IX	-	60	-	-	100	-	-	-	-
	X	-	-	14	-	-	-	100	-	-
β -EST	I	-	-	-	67	-	100	100	71	-
	II	100	-	-	33	-	-	-	-	-
	III	-	100	100	-	-	-	-	-	100
	IV	-	-	-	-	-	-	-	29	-
	V	-	-	-	-	100	-	-	-	-
GOT	I	100	80	100	100	100	100	100	100	100
	II	-	20	-	-	-	-	-	-	-
PO	I	-	-	-	17	-	67	-	14	-
	II	-	-	-	-	33	-	14	14	50
	III	75	-	-	17	-	-	57	-	-
	IV	-	20	-	-	-	-	-	-	-
	V	-	80	86	-	-	33	-	-	25
	VI	25	-	-	17	-	-	-	-	-
	VII	-	-	14	50	67	-	29	72	25
SKDH	I	100	20	-	-	-	-	-	-	-
	II	-	-	100	83	67	100	100	100	100
	III	-	60	-	-	-	-	-	-	-
	IV	-	-	-	-	33	-	-	-	-
	V	-	20	-	-	-	-	-	-	-
	VI	-	-	-	17	-	-	-	-	-
SOD	I	-	20	43	100	100	100	100	100	100
	II	100	80	57	-	-	-	-	-	-

475 _v	0010011010 1 1 0	0001001010 0 1 0 1 0 0	1001000 10	1110	0010000000 0 0 0 1 1	001111 1	111100 11
475 _{vi}	0010011010 1 1 0	0001001010 0 1 0 1 0 0	1001000 10	1110	0100101101 0 0 1 1 1	001111 1	111100 11
475 _{vii}	0010011010 1 1 0	0000010010 0 1 0 1 0 0	1001000 10	1110	0100101101 0 0 1 1 1	001111 1	111100 11
675 _i	1111010100 1 1 0	1111001001 0 0 1 1 0 0	0000100 10	1110	0010000000 0 0 0 1 1	001111 1	111100 11
675 _{ii}	1111010100 1 1 0	1111001001 0 0 1 1 0 0	0000100 10	1110	0010000000 0 0 0 1 1	001111 1	111100 11
675 _{iii}	1111010100 1 1 0	0000101010 0 0 0 1 0 0	1000110 10	1110	1001010010 0 1 0 1 1	001111 1	111100 11
675 _{iv}	1111010100 1 1 0	0000101010 0 1 0 1 0 0	1000110 10	1110	0010000000 0 0 0 1 1	001111 1	111100 11
675 _v	1110000101 1 1 0	0000101010 0 1 0 1 0 0	1000110 10	1110	0100100101 0 0 1 1 1	010000 0	111100 11
675 _{vi}	1110000101 1 1 0	0000101010 0 1 0 1 0 0	1000110 10	1110	0100101001 0 0 1 1 1	001111 1	111100 11

0 = ausência de bandas; 1 = presença de bandas.

950 _i	1 1 1 1 0 1 0 1 0 0 1 1 0	0 0 0 1 0 0 1 1 0 0 1 0 0 1 0 0	0 1 0 1 0 0 1 1 0	1 1 1 0	0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1	0 0 1 1 1 1 1	1 1 1 1 0 0 1 1
950 _{ii}	1 1 1 1 0 1 0 1 0 0 1 1 0	0 0 0 1 0 0 1 0 1 0 0 1 0 1 0 0	1 0 0 0 0 1 0 1 0	1 1 1 0	0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1	0 0 1 1 1 1 1	1 1 1 1 0 0 1 1
950 _{iii}	1 1 1 1 0 1 0 1 0 0 1 1 0	0 0 0 1 0 0 1 0 1 0 0 1 0 1 0 0	1 0 0 0 1 1 0 1 0	1 1 1 0	1 0 0 1 0 1 0 0 1 0 0 1 0 1 1	0 0 1 1 1 1 1	1 1 1 1 0 0 1 1
950 _{iv}	1 1 1 1 0 1 0 1 0 0 1 1 0	0 0 0 1 0 0 1 0 1 0 0 1 0 1 0 0	1 0 0 0 1 1 0 1 0	1 1 1 0	1 0 0 1 0 0 1 0 1 0 1 0 0 1 1	0 0 1 1 1 1 1	1 1 1 1 0 0 1 1
950 _v	1 1 1 1 0 1 0 1 0 0 1 1 0	0 0 0 1 0 0 1 0 1 0 0 1 0 1 0 0	1 0 0 0 1 1 0 1 0	1 1 1 0	0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1	0 0 1 1 1 1 1	1 1 1 1 0 0 1 1
950 _{vi}	1 1 1 1 0 1 0 1 0 0 1 1 0	0 0 0 1 0 0 1 0 1 0 0 1 0 1 0 0	1 0 0 0 1 1 0 1 0	1 1 1 0	0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1	0 0 1 1 1 1 1	1 1 1 1 0 0 1 1
950 _{vii}	1 1 1 1 0 1 0 1 0 0 1 1 0	0 0 0 1 0 0 1 0 1 0 0 1 0 1 0 0	0 1 0 1 0 0 1 1 0	1 1 1 0	0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1	0 0 1 1 1 1 1	1 1 1 1 0 0 1 1
1.150 _i	1 1 1 1 0 1 0 1 0 0 1 1 0	0 0 0 1 0 0 1 0 1 0 0 1 0 1 0 0	1 0 0 1 0 0 0 1 0	1 1 1 0	1 0 0 1 0 0 1 0 1 0 1 0 0 1 1	0 0 1 1 1 1 1	1 1 1 1 0 0 1 1
1.150 _{ii}	1 1 1 1 0 1 0 1 0 0 1 1 0	0 0 0 1 0 0 1 0 1 0 0 1 0 1 0 0	1 0 0 1 0 0 0 1 0	1 1 1 0	1 0 0 1 0 0 1 0 1 0 1 0 0 1 1	0 0 1 1 1 1 1	1 1 1 1 0 0 1 1
1.150 _{iii}	1 1 1 1 0 1 0 1 0 0 1 1 0	0 0 0 1 0 0 1 0 1 0 0 1 0 1 0 0	1 0 0 1 0 0 0 1 0	1 1 1 0	0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1	0 0 1 1 1 1 1	1 1 1 1 0 0 1 1
1.150 _{iv}	1 1 1 1 0 1 0 1 0 0 1 1 0	0 0 0 1 0 0 1 0 1 0 0 1 0 1 0 0	1 0 0 1 0 0 0 1 0	1 1 1 0	0 1 0 0 1 0 1 1 0 1 0 0 1 1 1	0 0 1 1 1 1 1	1 1 1 1 0 0 1 1

0 = ausência de bandas; 1 = presença de bandas.

4.4. Caracterização dos indivíduos por padrões isozimáticos

No Quadro 11 encontram-se os dados de presença (1) e ausência (0) de bandas isozimáticas dos sistemas ACP, α -EST, β -EST, GOT, PO, SKDH e SOD.

Verifica-se alto polimorfismo isozimático em *Bidens pilosa*, pois, das 72 bandas reveladas, apenas 14 estavam presentes em todos os indivíduos nos sistemas ACP (bandas 3, 11 e 12), α -EST (banda 14), GOT (bandas 1 e 2), PO (bandas 14 e 15) e SOD (bandas 1, 2, 3, 4, 7 e 8). Apenas SKDH não teve nenhuma banda em comum nos 46 indivíduos.

Padrão isozimático idêntico foi detectado entre os indivíduos de mesma altitude, sendo: 210_i idêntico a 210_{iii}; 450_i idêntico a 450_{ii}; 475_i e 475_{ii} idênticos a 475_{iv}; 675_i idêntico a 675_{ii}; 875_i, 875_{iv} e 875_{vi} idênticos a 875_{vii}; 875_{iii} idêntico a 875_v; 950_v idêntico a 950_{vi}; 1.150_i idêntico a 1.150_{ii}. Além desses foram obtidos padrões idênticos entre indivíduos de duas altitudes de coleta, sendo 800_{ii} idêntico a 950_{iii}.

Na maioria dos sistemas houve variação no número, na espessura, na intensidade de coloração das bandas. Essa variação pode estar relacionada ao grau de ploidia pois, como citado por BALLARD (1986) e MATSUMOTO e MARIN-MORALES (1996), *Bidens pilosa* possui graus de ploidia. A diferença no grau de ploidia revela no gel maior número de bandas ou aumento da intensidade e da espessura delas causado pela dose dos alelos presentes (GOTTLIEB, 1982). Em espécies poliplóides como trigo e centeio, foi possível detectar bandas de esterase de coloração e espessura diferenciadas, mas com mesma mobilidade (SALINAS e BENITO, 1985).

No quadro 12 encontra-se o número de bandas observadas nos sete sistemas analisados em todos os indivíduos. Nota-se que não é possível inferir sobre a tendência de variação do número de bandas de acordo com a altitude.

Quadro 12 - Número de bandas e o desvio-padrão de todos os 46 indivíduos analisados de *Bidens pilosa* L.

	Indivíduos (número de bandas)								
	210	450	475	675	795	800	875	950	1.150
Intervalo*	38-40	33-38	31-40	33-37	31-36	38-39	33-37	33-38	33-38
Média	38,5	36,6	36,6	35,17	33,00	38,33	35,86	35,00	36,25
Desvio-padrão	1,00	2,07	2,94	1,60	2,65	0,58	1,95	2,08	2,22

*Intervalo entre o maior e o menor número de bandas.

4.5. Análise da divergência genética por padrões isozimáticos

A partir dos dados isozimáticos verificou-se que havia padrões isozimáticos na maioria dos indivíduos analisados. Em razão desse fato procedeu-se o estudo de agrupamento com base na similaridade genética, envolvendo a combinação dos indivíduos, tomados dois a dois. A estimativa de similaridade foi obtida pelo Índice de Similaridade de Jaccard e, a partir dessa, calculou-se o Complemento Aritmético do Índice de Similaridade de Jaccard, obteve-se a estimativa da medida da dissimilaridade entre os indivíduos.

As medidas de dissimilaridade encontram-se no Quadro 13, no qual foram representados apenas um membro de cada indivíduo de mesma altitude com idêntico padrão isozimático e a esse indivíduo, adicionados os números dos indivíduos a que correspondiam.

Os valores de dissimilaridade variaram entre 0 e 0,5745, sendo, de maneira geral, observados menores valores de dissimilaridade entre indivíduos do mesmo acesso. A maior dissimilaridade, 0,5745, foi observada entre 675_v e 950_i.

Na análise do agrupamento por otimização, adotou-se como referencial a distância maior no conjunto das menores distâncias. Esse referencial, denominado α , foi 0,214 entre indivíduos (Quadro 14). Foram formados dez grupos (Quadro 15), sendo os grupos I e VI formados pelos indivíduos dos acessos 210 e 795, respectivamente, e os grupos VIII, IX e X por apenas um indivíduo cada e os demais grupos tinham dois ou mais indivíduos do mesmo acesso (grupos IV e VII) ou de vários (grupos II, III e V).

Quadro 13, Cont.

	795			800			875			950					1.150			
	i	ii	iii	i	ii	iii	i,iv, vi, vii	ii	iii, v	i	ii	iii	iv	v, vi	vii	i, ii	iii	iv
210 _{i, iii}	0,4667	0,4444	0,4583	0,4490	0,4167	0,2500	0,2558	0,4043	0,3864	0,4348	0,3864	0,4167	0,3830	0,3636	0,4000	0,4043	0,3864	0,2727
210 _{ii}	0,4667	0,4444	0,4898	0,4490	0,4167	0,2500	0,2955	0,4375	0,3864	0,4348	0,3864	0,4167	0,4167	0,3636	0,4000	0,4375	0,3864	0,2727
210 _{iv}	0,4894	0,4681	0,4800	0,4706	0,4400	0,2826	0,2889	0,4286	0,4130	0,4583	0,4130	0,4400	0,4082	0,3913	0,4255	0,4286	0,4130	0,3043
450 _{i, ii}	0,3571	0,3333	0,3556	0,4800	0,4490	0,2500	0,2558	0,4043	0,3864	0,4348	0,3864	0,4490	0,4167	0,4000	0,4000	0,3696	0,3488	0,1905
450 _{iii}	0,3415	0,3571	0,3778	0,5000	0,4694	0,2727	0,2791	0,4255	0,4091	0,4565	0,4091	0,4694	0,4375	0,4222	0,4222	0,3913	0,3721	0,2143
450 _{iv}	0,4545	0,4318	0,4468	0,5000	0,5000	0,3478	0,3182	0,4583	0,4444	0,4565	0,4444	0,5000	0,4694	0,4565	0,4565	0,4255	0,4091	0,2955
450 _v	0,5116	0,4884	0,5000	0,5510	0,5510	0,3636	0,3721	0,5106	0,5000	0,5111	0,5000	0,5510	0,5208	0,5111	0,5111	0,4783	0,4651	0,3095
475 _{i, ii, iv}	0,5319	0,5106	0,5200	0,5098	0,4490	0,2500	0,3333	0,4694	0,4565	0,4681	0,3864	0,4490	0,4167	0,4000	0,4000	0,3696	0,3488	0,1905
475 _{iii}	0,4222	0,4000	0,4167	0,4082	0,3404	0,1190	0,2093	0,3617	0,3409	0,3556	0,2619	0,3404	0,3043	0,2791	0,2791	0,2500	0,2195	0,0500
475 _v	0,4103	0,3846	0,4773	0,4318	0,3571	0,3721	0,4186	0,4186	0,3158	0,3333	0,2222	0,3571	0,3571	0,2432	0,2432	0,3000	0,1714	0,3171
475 _{vi}	0,5111	0,4889	0,5000	0,4898	0,4255	0,2143	0,3023	0,4468	0,4318	0,4444	0,3571	0,4255	0,3913	0,3721	0,3721	0,3409	0,3171	0,1500
475 _{vii}	0,5000	0,4773	0,4894	0,5400	0,4792	0,2791	0,2439	0,4000	0,3810	0,5000	0,4186	0,4792	0,4468	0,4318	0,4318	0,4000	0,3810	0,2195
675 _{i, ii}	0,3500	0,3250	0,4222	0,3409	0,3409	0,3556	0,4000	0,4000	0,3000	0,2750	0,2564	0,3409	0,3409	0,2308	0,2750	0,3636	0,2564	0,3778
675 _{iii}	0,3415	0,3171	0,2619	0,1250	0,0769	0,3111	0,3182	0,1951	0,2500	0,3864	0,2500	0,0769	0,1707	0,2250	0,3488	0,2381	0,2927	0,3696
675 _{iv}	0,2432	0,2162	0,3333	0,2857	0,2000	0,2195	0,2250	0,2250	0,0857	0,3000	0,0857	0,2000	0,2000	0,0571	0,2105	0,2683	0,1389	0,2857
675 _v	0,5116	0,5227	0,5625	0,5208	0,4565	0,2857	0,3333	0,4783	0,4286	0,5745	0,4286	0,4565	0,4565	0,4048	0,5111	0,5106	0,4651	0,3488
675 _{vi}	0,4186	0,3953	0,4130	0,4043	0,3333	0,1463	0,1500	0,3182	0,2927	0,4565	0,2927	0,3333	0,2955	0,2683	0,3864	0,3556	0,3333	0,2143

Quadro 14 - Limite de distância intergrupo obtido de medidas da dissimilaridade de dados isozimáticos entre pares de indivíduos de *Bidens pilosa* L.

Indivíduo	Distância mínima	
210	i	0,000
	ii	0,051
	iii	0,000
	iv	0,050
450	i	0,000
	ii	0,000
	iii	0,026
	iv	0,214
	v	0,162
475	i	0,000
	ii	0,000
	iii	0,050
	iv	0,000
	v	0,171
	vi	0,053
	vii	0,081
675	i	0,000
	ii	0,000
	iii	0,077
	iv	0,057
	v	0,205
	vi	0,146
795	i	0,031
	ii	0,031
	iii	0,162
800	i	0,100
	ii	0,000
	iii	0,075
875	i	0,000
	ii	0,077
	iii	0,000
	iv	0,000
	v	0,000
	vi	0,000
	vii	0,000
950	i	0,111
	ii	0,029
	iii	0,000
	iv	0,077
	v	0,000
	vi	0,000

	vii	0,086
1.150	i	0,000
	ii	0,000
	iii	0,059
	iv	0,050
Maior distância entre as mínimas (α)		0,214

Quadro 15 - Análise de agrupamento, pelo Método de Otimização de Tocher, de indivíduos de *Bidens pilosa* a partir dos dados isozimáticos

Grupos	Indivíduos
I	210 _{i, iii, iv, ii}
II	450 _{i, ii, iii} ; 475 _{iii} ; 1.150 _{iv} ; 800 _{iii} ; 875 _{i, iv, vi, vii} ; 675 _{vi}
III	475 _{i, ii, iv, vi, vii} ; 450 _v
IV	675 _{i, ii}
V	800 _{ii} ; 950 _{iii} ; 675 _{iii} ; 800 _i ; 950 _{iv} ; 875 _{ii} ; 1.150 _{i, ii} ; 950 _{v, vi, ii} ; 675 _{iv} ; 1.150 _{iii} ; 875 _{iii, v}
VI	795 _{i, ii, iii}
VII	950 _{i, vii}
VIII	475 _v
IX	450 _{iv}
X	675 _v

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Os sistemas isozimáticos ACP, α -EST, β -EST, GOT, PO, SKDH e SOD foram utilizados na caracterização e nas estimativas de distância genética entre 46 indivíduos de *Bidens pilosa*, coletados em nove altitudes.

Os resultados permitiram as seguintes conclusões:

- 1) Os sete sistemas testados foram polimórficos.
- 2) As variações ocorreram entre acessos e entre indivíduos do mesmo acesso.
- 3) A variabilidade detectada permitiu separar indivíduos de todos os acessos em padrões individuais.
- 4) O sistema α -EST foi o que melhor separou os acessos.
- 5) O sistema PO revelou maior variação entre os indivíduos de mesmo acesso.
- 6) O Método de Otimização de Tocher permitiu a formação de dez grupos: os grupos I e VI, respectivamente com indivíduos dos acessos 210 e 795; os grupos IV e VII, com indivíduos de mesmo acesso; os grupos II, III e V, com indivíduos de dois ou mais acessos e os grupos VIII, IX e X, com um indivíduo cada.
- 7) Em razão da diversidade isozimática detectada nessa espécie e devido à ocorrência em várias altitudes recomenda-se que estudos futuros sejam realizados com indivíduos de grupos dissimilares originados em diversas altitudes.

CAPÍTULO 2

MICROPROPAGAÇÃO E ACLIMATAÇÃO DE GENÓTIPOS DE *Bidens pilosa* L.

1. INTRODUÇÃO

A espécie medicinal *Bidens pilosa* L. é anual, herbácea e se propaga sexualmente por meio de frutos do tipo aquênios. A dispersão dos aquênios ocorre por possuírem pappus adaptados à adesão aos pêlos dos mamíferos e também às vestes do homem. Ao germinar, iniciará seu florescimento, dependendo da época do ano, em 45 dias. Nesse estágio a gema apical transforma-se em órgão reprodutivo e cessa o crescimento do ramo principal, esse com 6 a 10 nós (FELIPPE, 1978; TAMASHIRO e LEITÃO FILHO, 1978; BASTIDAS et al., 1989).

Como *Bidens pilosa* possui ciclo de vida curto (anual) e baixo número de nós formados antes do florescimento (6 a 10 nós), é difícil obter clones em estágio juvenil em quantidade suficiente por meio de estaquia. Esse problema, entretanto, é resolvido pela cultura de tecidos, que propicia a obtenção de plântulas em fase juvenil e em grande quantidade. A fase juvenil, considerado por MANTELL et al. (1994), é o estágio fisiológico em que a planta não floresce.

Havendo necessidade de plantas com homogeneidade genética, em fase juvenil e em quantidade suficiente, foi necessária a micropropagação de genótipos de *Bidens pilosa*, selecionados em grupos isozimáticos distintos e coletados nas altitudes 210, 450, 675, 950 e 1.150 m. O objetivo deste experimento foi clonar os seis genótipos por cultura de tecidos de gemas axilares,

analisar o efeito de BAP sobre a indução de brotações múltiplas e aclimatar os clones.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Propagação assexuada

A propagação assexuada é possível devido à divisão mitótica durante o crescimento e regeneração em pontos específicos de células, órgãos ou tecidos de várias espécies de plantas (HARTMANN et al., 1990), propiciando a formação de um clone. Clone é o resultado da propagação vegetativa de um único genótipo, possibilitando o estabelecimento de plantios uniformes de materiais a fim de estudar a resposta a estímulos bióticos ou abióticos (OLIVEIRA et al., 2001).

Dentre os processos de propagação assexuada, destaca-se a estaquia e a micropropagação via cultura de tecidos. Nos propágulos vegetativos há o desenvolvimento das raízes em um grupo de células que é capaz de se tornar meristemático. Em plantas herbáceas, essas células estão geralmente localizadas entre os feixes vasculares em pequenos grupos que, com divisão contínua, transformarão em primórdios de raízes. O sistema vascular se desenvolve conectado aos feixes vasculares adjacentes. O ápice da raiz continua a crescer para fora, através do córtex, emergindo da epiderme do caule (FAHN, 1990; HARTMANN et al., 1990). A propagação vegetativa de *Bidens pilosa* é citada por HADAC e HADACOVA (1969) e se processa naturalmente devido aos ramos ou mesmo a própria planta crescerem decumbentes e formarem raízes adventícias dando origem a novas plantas, denominadas de filiais, podendo assim formar quatro novas plantas ou mais a partir de uma única planta original.

2.2. Micropropagação

A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação, em função do tamanho dos explantes utilizados, é, indiscutivelmente, a aplicação mais concreta e de maior impacto da cultura de tecidos (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990). Essas técnicas consistem em selecionar fragmentos vegetais denominados explantes, desinfestá-los cultivando em meio nutritivo mantido em condições assépticas, sendo a multiplicação dos propágulos feita por sucessivos subcultivos em meio próprio. Os propágulos, ao desenvolverem os brotos e as raízes, formarão as plantas inteiras. Essas são transferidas a substratos adequados à aclimação e, subseqüentemente, levadas à casa de vegetação antes de serem transferidas ao campo em definitivo (TORRES e CALDAS, 1990; MANTELL et al., 1994; LOWE et al., 1996).

Essa técnica possibilita a produção de clones, ou seja, plantas homogêneas e uniformes, em larga escala, de rápida propagação, livres de patógenos, vigorosos e produtivos (SCHUMACHER, 1991). Esses clones podem ser úteis em estudos relacionados ao método de produção de fitofármacos pois, com plantas padronizadas, o trabalho torna-se mais fácil e os resultados mais confiáveis. Além disso, essa alternativa é útil quando se trata de plantas com ciclo de vida longo ou com dificuldade de reprodução ou que se encontram em perigo de extinção (SAKAMURA e SUGA, 1989; LOWE et al., 1996; OLIVEIRA et al., 2001). A aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) é exemplo de planta medicinal brasileira ameaçada de extinção e de ciclo de vida longo cujo protocolo de micropropagação *in vitro* foi estabelecida por ANDRADE et al. (2000).

A proliferação de gemas axilares abrange a maioria dos sistemas de micropropagação, envolvendo o isolamento de órgãos meristemáticos pré-formados (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990). Além da rápida multiplicação, a micropropagação pode ser realizada durante o ano todo, em grande quantidade, sem problemas de sazonalidade (CROCOMO, 1989).

Os genótipos a serem multiplicados devem estar em bom estado fitossanitário e é necessário que se faça descontaminação do explante durante o

isolamento. A grande dificuldade na etapa de desinfestação dos explantes reside em obter tecidos descontaminados sem conduzi-los à morte quando isolados. Várias substâncias com ação germicida podem ser utilizadas na desinfestação dos explantes, sendo o hipoclorito de sódio a substância mais utilizada (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990).

Com o estabelecimento do protocolo que permita a obtenção de plantas saudias, é possível a clonagem de materiais selecionados a fim de se estabelecer correlações com variáveis fenotípicas na produção de metabólitos secundários (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990).

O meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) tem sido utilizado com resultados satisfatórios em diversas espécies vegetais. Esse meio pode ser solidificado, geralmente com ágar, ou ser líquido.

Nas espécies mantidas em culturas *in vitro* há baixa taxa fotossintética, por disporem da fonte de carboidratos, normalmente sacarose. Apesar disso, a luz exerce importante função na morfogênese, cuja intensidade ótima em algumas culturas é em torno de 1.000 lux. A temperatura ótima no cultivo *in vitro*, na maioria das espécies vegetais, está entre 20 e 27 °C (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990).

2.3. BAP

Os reguladores de crescimento vegetais, como as auxinas, giberelinas, citocininas e etileno, estão envolvidos em diversos efeitos fisiológicos em diferentes órgãos vegetativos ou reprodutivos (GEORGE e SHERRINGTON, 1984; TAIZ e ZEIGER, 1991). Além desses reguladores de crescimento, os co-fatores (compostos fenólicos) atuam sinergicamente com as auxinas no processo do estímulo rizogênico. Esses co-fatores são produzidos pelas folhas e/ou gemas, e na porção basal de estaca com gemas (HARTMANN et al., 1990).

A citocinina BAP (6-benzilaminopurina) é muito eficaz na multiplicação de diversas espécies, quando em concentração entre 0,1 a 5,0 mg L⁻¹, por essa induzir o multibrotamento das partes aéreas. Porém, a aplicação de BAP promove hiperidricidade e formação de calos em plantas (GRATTAPAGLIA e

MACHADO, 1990), como detectado na concentração de 0,1 mg L⁻¹ por IKUTA (1998) nos explantes micropropagados de marcela (*Achyrocline satureioides*), ou a inibição da formação de raízes, como detectado na concentração de 1,0 mg L⁻¹ por ARIMURA (1997) em gengibre (*Zingiber officinale*).

2.4. Aclimação

As plântulas em fase vegetativa *in vitro*, enraizadas e em bom estado fisiológico, podem ser retiradas do meio de cultura e levadas a condições de ambiente externo. A adaptação dessas plântulas a esse ambiente deve ser lenta e gradativa e é denominada aclimação (GEORGE e SHERRINGTON, 1984). O processo ideal de aclimação é aquele que possibilita maior percentual de sobrevivência no transplântio das mudas obtidas *in vitro* (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990).

A aclimação de plantas oriundas de cultura de tecidos consiste em retirá-las das condições *in vitro* e transplantá-las em recipientes com substrato adequado, em casa de vegetação ou telado, objetivando prepará-las à mudança de ambiente a que serão submetidas quando forem transferidas ao local onde terão crescimento e desenvolvimento definitivos (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990). A exposição ao ambiente externo deve ser gradativa, pois a planta em cultura de tecidos encontra-se em ambiente com alta umidade, asséptico e com disponibilidade de nutrientes, o que lhe propicia comportamento heterotrófico, e no ambiente de aclimação há menor umidade, eventuais fitopatógenos e menor disponibilidade de nutrientes, que a induz ao retorno da condição de autotrofia. Durante o cultivo *in vitro* as plantas encontram-se com os estômatos permanentemente abertos, por isso, a manutenção da alta umidade e da temperatura amena é regra geral (GEORGE e SHERRINGTON, 1984; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Foram utilizados seis genótipos de *Bidens pilosa* selecionados, com base no método de divergência genética, em grupos isozimáticos divergentes (Quadro 1).

Quadro 1 - Altitude, local, área e *habitat* dos seis genótipos de *Bidens pilosa* L. e respectivos números do herbário (VIC). 1999

Altitude ⁽¹⁾	Local de Coleta	Área e <i>Habitat</i> de Coleta	VIC ⁽²⁾
210	Leopoldina (MG)	Urbana - terreno baldio, ensolarado e seco	25.311
450	Leopoldina (MG)	Rural - horta, sombreada e úmida	25.313
475	Oratórios (MG)	Rural - horta, ensolarada e úmida	25.312
675	Viçosa (MG)	Rural - horta, ensolarada e úmida	25.308
950	Araponga (MG)	Rural – horta, ensolarada e úmida	25.309
1.150	Araponga (MG)	Rural – horta, ensolarada e úmida	25.310

⁽¹⁾ Altitude em metros; ⁽²⁾ VIC = Herbário da Universidade Federal de Viçosa.

3.2. Micropropagação

Os genótipos selecionados foram levados ao Laboratório de Testes de Progenie do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG, onde foram cultivados *in vitro* em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962).

No preparo do meio de cultura foram dissolvidos os sais básicos de MS em água deionizada e ajustado ao pH 5,7 com soluções de KOH 1 N e/ou HCl 1 N, antes da adição de 7,0 g L⁻¹ de ágar. O ágar foi colocado em erlenmeyer e vertido à solução de pH 5,7. Agitou-se manualmente o erlenmeyer e colocou-o em cozimento em microondas obtendo, após a ebulição, meio sólido de cultivo. Neste momento, o erlenmeyer foi retirado, agitado e vertido seu conteúdo nos tubos de ensaio. Cada tubo de ensaio, de dimensões 24 x 150 mm, recebia 15 mL dessa solução gelatinosa. Em seguida, os tubos foram tampados com tampas plásticas autoclaváveis e levados à autoclave a fim de serem esterilizados. Esse material, após ser autoclavado, foi colocado dentro da câmara de fluxo de ar laminar estéril e, após seu completo resfriamento e geleificação, serviam à micropropagação de *Bidens pilosa*.

A assepsia prévia dos explantes foi feita em câmara de fluxo de ar laminar estéril, utilizando-se benomyl em solução aquosa (2 g L⁻¹), com agitação manual, durante oito minutos. Em seguida, lavou-se com água deionizada esterilizada e imediatamente transferiu os explantes à solução de hipoclorito de sódio (2,5%) onde permaneceram durante oito minutos em constante agitação. Após esse procedimento fizeram-se seis enxágües com água deionizada esterilizada. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio com meio MS. Os tubos foram tampados, lacrados com fita plástica e etiquetados.

Os tubos de ensaio foram mantidos na posição vertical em suporte de madeira perfurados, com espaçamento de 2,5 cm entre os tubos, de maneira a facilitar a recepção de luz pelo explante.

Estes explantes iniciais foram micropropagados e multiplicados com seguidos subcultivos em meio MS, em intervalos de três a quatro semanas, em câmara de fluxo de ar laminar estéril, utilizando-se pinças e bisturi. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento a 26±2 °C, em fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro em prateleiras com lâmpadas fluorescentes de intensidade luminosa de 2.000 lux (36 μmol cm² s⁻¹).

3.3. BAP

Os explantes caulinares já estabelecidos *in vitro*, com um nó e duas gemas e de 1,5 cm de comprimento foram utilizados na experimentação da atividade de multibrotamento de BAP. O delineamento foi inteiramente casualizado, com cinco concentrações de BAP e propágulos de seis genótipos clonados, com quatro repetições. A solução-estoque preparada com 2,0 mg L⁻¹ serviu como fonte de concentrações de BAP 0,0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mg L⁻¹ por tubo de ensaio destinado à colocação dos explantes.

Os dados de número de brotos, número de raízes, comprimento médio das raízes, altura média dos caules, massa fresca e seca do explante foram determinados após 30 dias de cultivo. Estes resultados foram submetidos à análise de variância e a comparação das médias foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os cálculos foram realizados pelos recursos computacionais do programa SAEG (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas) versão 5.0, desenvolvido na Universidade Federal de Viçosa, cujas instruções operacionais encontram-se descritas em GOMES (1992).

3.4. Aclimação

As plântulas micropropagadas com sucesso e com raízes pré-formadas em meio MS foram retiradas dos tubos de ensaio e, gradativamente, aclimatadas em condições de telado (sombrite 50%) e por último em pleno sol. O processo de aclimação foi feito em três fases.

- Fase 1 - Transferência das plântulas do tubo de ensaio ao substrato líquido. As plântulas foram retiradas do tubo de ensaio com o auxílio de uma pinça, lavadas suas raízes visando eliminar o resíduo do meio de cultura e acondicionadas em copos plásticos (200 mL) contendo cerca de 40 mL de água de fonte natural e cobertos individualmente com sacos plásticos transparentes (10 x 15 cm). Os copos contendo as plântulas foram mantidos em telado coberto com sombrite de 50%.

- Fase 2 - Transferência das plântulas do substrato líquido ao sólido. Após 7 dias as plântulas foram retiradas da água e transferidas a copos plásticos (200 mL) contendo areia com saturação de água. As plântulas foram mantidas eretas com auxílio de um tutor. No início, foi mantida a cobertura individual com saco plástico transparente. No terceiro dia dessa fase fez-se a perfuração do saco plástico, retirando 2 cm da borda superior. No quinto dia retirou-se a outra borda e no nono dia retirou-se toda a borda superior, mas a exposição das plântulas foi feita apenas no décimo dia. No décimo primeiro dia dessa fase, os plásticos foram abaixados e expôs-se metade das plântulas; já no dia seguinte retirou-se todo o plástico. Neste momento, todas as plântulas estavam aptas a serem transferidas à próxima fase.
- Fase 3 - Transferência das plântulas do substrato arenoso ao substrato contendo solo, areia, esterco e húmus (proporção de 6:2:1:1). Os copos plásticos de capacidade de 400 mL, com perfurações no fundo, foram preenchidos com substrato contendo solo, areia, esterco e húmus (proporção de 6:2:1:1). A manutenção do tutor foi necessária à maioria das plântulas por estarem estioladas, provavelmente por terem sido protegidas por sombrite. A cada dois dias o sombrite foi sendo retirado, começando pelas laterais e seguindo pelas partes superiores do telado. À medida que aumentava a exposição ao sol, os tutores foram sendo eliminados. Essa terceira etapa foi concluída em 15 dias, estando as plantas aclimatadas e apropriadas aos ensaios de campo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito da concentração de BAP em plântulas de *Bidens pilosa* L.

4.1.1. Cinco concentrações de BAP

A resposta das plântulas dos seis genótipos, submetidas a cinco concentrações de BAP, encontra-se nos Quadros 2, 3 e 4.

Houve diferença entre as concentrações de BAP e entre os genótipos analisados. A interação genótipo x BAP (Quadro 2) foi significativa apenas em número de brotos (NB), altura média do caule (AC) e massa seca (MS).

Quadro 2 - Resumo da análise de variância conjunta do número de brotos (NB), número de raízes (NR), comprimento médio das raízes (CR), altura média dos caules (AC), massa fresca (MF) e massa seca (MS) de plântulas de seis genótipos de *Bidens pilosa*, submetidas a cinco concentrações de BAP

FV	GL	Quadrados médios					
		NB	NR	CR	AC	MF	MS
Genótipos (G)	5	100,03**	0,67 ^{ns}	9,27 ^{ns}	4,50**	386295,30**	1363,15**
BAP	4	90,15**	70,41**	310,03**	27,12**	347774,20**	1391,42**
G x BAP	20	19,44**	0,67 ^{ns}	6,21 ^{ns}	3,65**	66438,30 ^{ns}	460,61*
Resíduo	90	8,15	1,22	4,04	0,86	43311,80	237,74
Média		6,71	0,86	1,77	2,32	412,99	36,83
CV (%)		42,55	128,95	113,31	40,01	50,39	41,86

* e ** = Significativos a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F; ns = não significativo, pelo teste F.

No Quadro 3 encontram-se as médias das características dos genótipos em relação aos cinco níveis de BAP. O BAP aumentou o número de brotos mas inibiu a formação das raízes (NR). Como é pela raiz que ocorre a absorção de nutrientes do meio, o meio sem BAP favoreceu o desenvolvimento de toda a plântula, sendo detectado valores significativamente maiores de crescimento do caule (AC), de massa fresca (MF) e seca (MS) das plântulas que cresceram em meio sem BAP, ou seja, as que formaram raízes.

Quadro 3 - Médias da análise conjunta do número de brotos (NB), número de raízes (NR), comprimento médio das raízes (CR), altura média do caule (AC), massa fresca (MF) e massa seca (MS) de plântulas de seis genótipos de *Bidens pilosa*, submetidas a cinco concentrações de BAP

BAP	NB	NR	CR	AC	MF	MS
0,0	3,71C	3,92A	8,19A	4,21A	603,88A	48,71A
0,5	7,71AB	0,25B	0,46B	1,84B	347,63B	33,92B
1,0	8,79A	0,13B	0,22B	2,02B	345,25B	32,63B
1,5	7,25AB	0,00B	0,00B	1,85B	458,25AB	39,63AB
2,0	6,08B	0,00B	0,00B	1,67B	309,96B	29,29B

As médias seguidas de uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. Médias de quatro repetições, sendo as medidas de CR e AC em centímetros; e as de MF e MS em miligrama.

Apesar dos níveis de BAP promoverem brotação (NB), a característica de multibrotação ocorre normalmente nessa espécie, o que pode ser observado nos valores médios de 3,71 brotos por explante sem adicionar BAP (concentração 0,0) (Quadro 2).

Quanto ao tamanho da parte aérea dos genótipos o máximo de 4,21 cm foi observado sem adição de BAP. Com a aplicação de BAP houve inibição da raiz. Sem o uso de BAP, o número de ramos (NR) e o comprimento médio das raízes (CR) foi cerca de 15 vezes superior aos contendo BAP. A inibição da formação das raízes por BAP já fora relatado em gengibre (*Zingiber officinale*) por SAKAMURA e SUGA (1989) e ARIMURA (1997).

Nos seis genótipos os níveis de BAP foram significativos (Quadro 2) e a comparação das médias das características está no Quadro 4. Há diferença entre

os genótipos nas características das partes aéreas, enquanto que nas raízes (NR e CR) o comportamento foi o mesmo em todos os genótipos.

A presença de BAP induziu a formação de calo na base do explante, de onde emergiram as brotações de tamanho pequeno, com aspecto hiperídrico e em roseta (Figura 1). Essa mesma resposta foi detectada por IKUTA (1998) quando aplicou 0,1 mg L⁻¹ de BAP em segmentos nodais de marcela (*Achyrocline satureioides*). Essa autora postulou que essa reação foi devida a alta concentração de BAP aplicado.

Quadro 4 - Médias da análise individual do número de brotos (NB), número de raízes (NR), comprimento médio das raízes (CR), altura média do caule (AC), massa fresca (MF) e massa seca (MS) de genótipos de *Bidens pilosa* originários de seis altitudes, submetidos a cinco concentrações de BAP

Genótipo	NB	NR	CR	AC	MF	MS
210	4,00C	0,75A	1,96A	2,42AB	326,65B	32,10BC
450	7,25B	1,05A	2,51A	2,44AB	490,05AB	48,05A
475	6,95B	0,90A	2,43A	2,33AB	348,25B	33,40BC
675	10,50A	1,00A	1,78A	1,97B	663,40A	46,20AB
950	6,55BC	0,55A	0,85A	1,68B	305,70B	27,80C
1.150	5,00BC	0,90A	1,11A	3,07A	343,90B	33,45BC

As médias seguidas de uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade,

pelo teste de Tukey. Médias de quatro repetições, sendo as medidas de CR e AC em centímetros; e as de

MF e MS em miligrama.

4.1.2. Análise dos explantes em meio sem BAP

O melhor resultado foi em meio sem BAP, cujos dados foram comparados dos seis genótipos (Quadro 5). Houve diferença entre os seis genótipos analisados. Diferenças significativas foram observadas apenas no número de brotos (NB), na altura média do caule (AC) e na massa seca (MS). Essas mesmas características foram significativas quando realizada a análise com todas as concentrações de BAP, conforme Quadro 2.

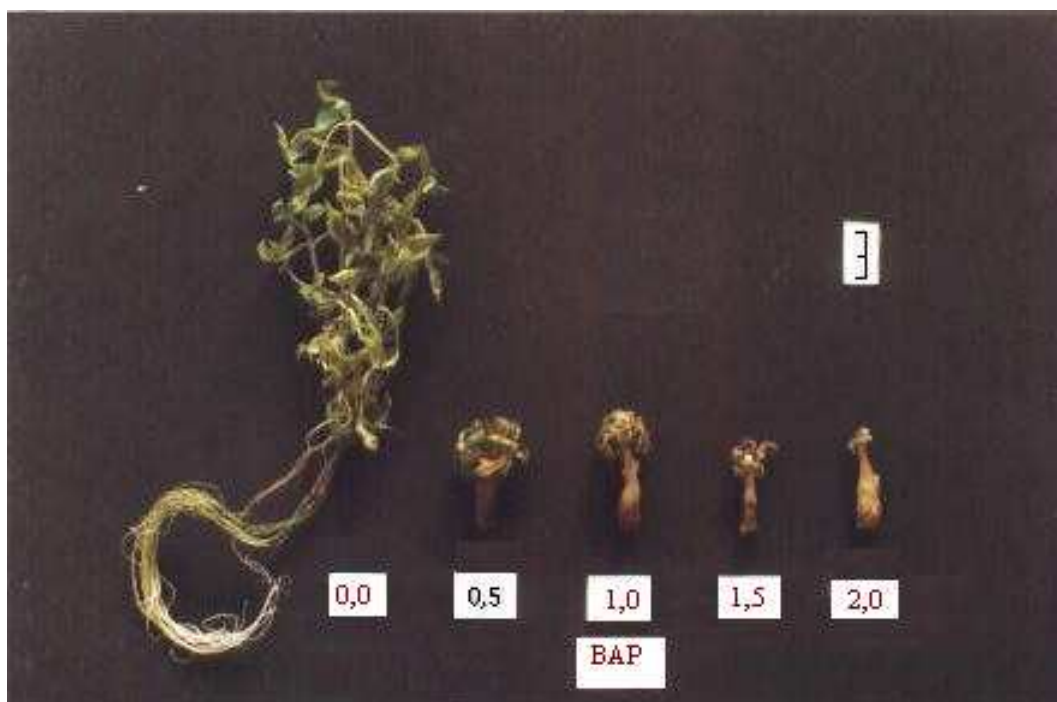


Figura 1 - Plântulas de *Bidens pilosa* cultivadas em meio MS suplementado com cinco concentrações de BAP, após 30 dias de cultivo.

Quadro 5 - Resumo da análise de variância conjunta do número de brotos (NB), número de raízes (NR), comprimento médio das raízes (CR), altura média do caule (AC), massa fresca (MF) e massa seca (MS) de plântulas de seis genótipos de *Bidens pilosa*, submetidas a meio MS sem BAP

FV	GL	Quadrados médios					
		NB	NR	CR	AC	MF	MS
Genótipo	5	11,04*	2,47 ^{ns}	29,97 ^{ns}	17,68**	254626,60**	1506,74**
Resíduo	18	3,65	5,53	17,87	3,76	41914,20	282,63
Média		3,71	3,92	8,19	4,21	603,88	48,71
CV (%)		51,54	60,03	51,59	46,11	33,90	34,52

* e ** = Significativos a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F; ns = não significativo, pelo teste F.

No Quadro 6 encontram-se as médias das características em todos os genótipos em relação ao meio sem adição de BAP. No genótipo 675 foi detectado maior número de brotos (NB), de raízes (NR) e de massa fresca (MF).

Quadro 6 - Médias da análise individual do número de brotos (NB), número de raízes (NR), comprimento médio das raízes (CR), altura média do caule (AC), massa fresca (MF) e massa seca (MS) de plântulas de seis genótipos de *Bidens pilosa*, submetidas ao meio MS sem BAP

Genótipo	NB	NR	CR	AC	MF	MS
210	3,75AB	3,75A	9,82A	4,12AB	700,00AB	59,75AB
450	4,00AB	4,00A	9,22A	4,03AB	702,00AB	75,00A
475	3,00AB	3,50A	11,44A	3,74B	547,00AB	41,75AB
675	6,00A	5,00A	8,90A	3,24B	997,50A	60,25AB
950	4,50AB	2,75A	4,23A	1,94B	327,00B	25,50B
1.150	1,00B	4,50A	5,55A	8,18A	349,75B	30,00B

As médias seguidas de uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. Médias de quatro repetições, sendo as medidas de CR e AC em centímetros; e as de MF e MS em miligrama.

Apesar da multibrotação na maioria dos genótipos, foi observado no genótipo 1.150 apenas um broto (NB), demonstrando dominância apical em seus explantes. Essa característica possibilitou a maior altura média do caule (AC) e, em consequência, provavelmente, maior número de nós desenvolvidos que poderiam ser usados na obtenção de explantes de gemas axilares, o que manteria a mesma produção de explantes a serem subcultivados que os demais genótipos.

Nos resultados anteriores houve diferenças de comportamento entre os genótipos, como número de brotos e altura média do caule, significando que os genótipos de grupos divergentes formados quando da análise dos sistemas isozimáticos têm comportamentos distintos *in vitro*.

Como o objetivo inicial foi obter os clones com uniformidade e em menor tempo, foi necessário aplicar o mesmo método a todos os genótipos, ou seja, adotar o subcultivo dos explantes sem o uso de BAP. Essa escolha foi devido a esse regulador de crescimento inibir a formação de raízes e a expansão das brotações e induzir a formação de calos e o aparecimento de características hiperídricas, fatos que dificultam o desenvolvimento dos genótipos e, conseqüentemente, aumentam o tempo de obtenção dos clones.

4.2. Aclimação das plântulas

As plântulas de *Bidens pilosa* foram obtidas por subcultivos dos explantes em meio MS a intervalos de três a quatro semanas. Os explantes utilizados nos subcultivos foram gemas axilares e apicais até atingir número suficiente de plântulas, a partir daí foram utilizados apenas os ápices caulinares dos explantes como medida de uniformização dos clones a serem aclimatados. Cada genótipo clonado forneceu no mínimo 340 plântulas viáveis à etapa de aclimação.

Após a obtenção dos clones fez-se a aclimação em telado no Grupo Entre Folhas - Plantas Medicinais. Testes preliminares foram realizados com substratos como água, areia, terra:areia:esterco (proporção 3:1:1), terra:areia:húmus (proporção 3:1:1) e terra:areia:esterco:húmus (proporção 6:2:1:1).

As três fases de aclimação duraram 34 dias, sendo as plântulas mantidas durante sete dias em substrato líquido, doze dias em substrato arenoso e quinze em substrato próprio ao cultivo.

Na transferência das plântulas do tubo de ensaio ao substrato líquido retirou-se o meio de cultura das raízes, pois favoreceria o crescimento de microorganismos, prejudicando a sobrevivência das plântulas.

A transferência das plântulas inicialmente ao meio aquoso foi necessária devido aos estômatos permanecerem, em culturas de tecidos, permanentemente abertos, não sendo possível regular a troca de água com o ambiente o que poderia levar, em condições de baixa umidade, ao estado de murcha permanente (GEORGE e SHERRINGTON, 1984). Além disso, a proteção dessas por sacos plásticos transparentes também foi no intuito de manter alta a umidade do ar, principalmente quando essa foi transferida ao substrato arenoso, apesar desse ter sido mantido com saturação de água.

Em ensaios preliminares determinaram-se 40 mL, a quantidade de água da fase 1, por copos de 200 mL, o suficiente a manter as raízes imersas. Nessa fase, houve necessidade de realizar uma troca da água no terceiro dia devido à coloração escura da água.

Nas fases 2 e 3 usou-se o tutor a fim de manterem eretas as plântulas, principalmente aquelas de maior altura, devido ao grau de estiolamento em que se encontravam, seja por terem vindo de ambiente de baixa luminosidade (sala de crescimento de cultura de tecidos) ou por estarem em ambiente protegido da luz solar direta (sombrite de 50%). As plântulas *in vitro* têm fotossíntese limitada a ponto de as plântulas mantidas naquele ambiente serem consideradas heterotróficas (PIERIK, 1987). A manutenção em ambiente protegido pode ter colaborado com este estágio fisiológico, entretanto, a permanência dessas plântulas protegidas em sombrite foi por necessitarem de tempo de adaptação do seu fotossistema à intensidade luminosa ambiente, seja pelo amadurecimento da clorofila ou pela conversão dos etioplastos em clorofila (TAIZ e ZEIGER, 1991).

Com a retirada dos sacos plásticos e a exposição das plântulas ao ambiente houve gradativo aumento de rigidez e de coloração verde-escuro nas folhas. Isso ocorreu próximo à transferência das plântulas do substrato arenoso ao substrato contendo solo, areia, esterco e húmus (proporção de 6:2:1:1). Na transferência a essa etapa, na maioria das plântulas foi mantido o tutor devido ao estiolamento, provavelmente por até então estarem sendo submetidas a menor intensidade luminosa que normalmente receberia na natureza. A cada dois dias o sombrite foi sendo retirado, iniciando pelas laterais e depois das partes superiores do telado. À medida que aumentava a exposição ao sol os tutores foram se tornando desnecessários. Essa etapa final foi concluída em 15 dias, estando as plantas aclimatadas e apropriadas aos ensaios de campo.

Os resultados da aclimação dos clones dos seis genótipos encontram-se no Quadro 7. Quando foram retiradas do tubo de ensaio, todas as plântulas estavam enraizadas, porém hiperídricas, principalmente as do genótipo 475, o que pode ter influenciado no processo de aclimação. Apesar da perda média de 23,50% de plântulas ao concluir as etapas de aclimação, foi possível obter número suficiente de plântulas que possibilitassem a seleção em alturas homogêneas visando o experimento de campo. Perda semelhante a essa foi obtida por IKUTA (1998) ao final do procedimento de aclimação de 40 dias em casa de vegetação, ou seja, 23% em marcela (*Achyrocline satureioides*) clonadas por cultivo *in vitro*.

Quadro 7 - Aclimação de plântulas clonadas em cultivo *in vitro* de genótipos de *Bidens pilosa* de seis altitudes

Genótipos	Substrato água		Substrato areia		Substrato terra:areia:esterco	
	N	%	N	%	N	%
210	352	100,00	352	100,00	294	83,52
450	368	100,00	330	89,67	292	79,35
475	340	100,00	288	84,71	210	61,76
675	368	100,00	340	92,39	309	83,97
950	374	100,00	340	90,91	274	73,26
1.150	376	100,00	364	96,81	290	77,13
Média				92,42		76,50

N= total de plantas do clone.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

O objetivo do presente trabalho foi obter clones de *Bidens pilosa* e estudar a influência de cinco níveis de BAP na multibrotação de explantes visando a obtenção de explantes em menor tempo. Os trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório de Testes de Progênies de Hortaliças da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

No estudo da influência do BAP foram utilizados explantes de 1,5 cm de comprimento e contendo um nó, com duas gemas. Os seis genótipos selecionados por meio de análises isozimáticas foram submetidos a cinco concentrações de BAP, 0,0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mg L⁻¹.

O estudo da aclimação das plantas obtidas da micropropagação foi feito em três fases: fase 1 com substrato líquido (água), fase 2 e fase 3 com substratos sólidos, respectivamente areia e terra:areia:húmus:esterco (proporção 6:2:1:1).

Nas condições em que os experimentos foram conduzidos, e pelos resultados, concluiu-se que:

- 1) A micropropagação de *Bidens pilosa* é viável, pois seu desenvolvimento é eficiente mesmo em meio básico MS sem adição de reguladores de crescimento.
- 2) Com ou sem BAP há multibrotamento dos explantes.
- 3) BAP causou efeito inibitório na formação das raízes e provocou formação de calo na extremidade do explante em contato com o meio, indicando efeito tóxico de BAP nas concentrações utilizadas.

- 4) Em meio MS sem BAP, os genótipos analisados tiveram comportamentos diferenciados quanto ao número de brotos e à altura média do caule, fatores diretamente relacionados ao número de explantes de cada subcultivo.
- 5) O método de aclimação foi eficiente, obtendo-se plântulas suficientes.

CAPÍTULO 3

PLASTICIDADE FENOTÍPICA DA MORFOLOGIA DE SEIS GENÓTIPOS DE *Bidens pilosa* L. CRESCIDOS EM QUATRO ALTITUDES E COLHIDOS EM QUATRO ESTÁDIOS REPRODUTIVOS

1. INTRODUÇÃO

As plantas, como quaisquer outros seres, recebem influências do meio que as cercam e podem reagir em resposta a essas interferências por meio do metabolismo primário e do secundário e essa resposta é denominada plasticidade. A plasticidade fenotípica é a variação fenotípica do genótipo em resposta às variações dos ambientes.

A plasticidade fenotípica é fundamental na medida em que gera respostas aos ambientes, expressa pela maior sobrevivência e aproveitamento vantajoso das variações ambientais. O crescimento e desenvolvimento vegetal dependem dos fatores ambientais que funcionam como estimulantes de certos estádios morfofisiológicos das plantas que respondem de forma adaptativa ao estímulo (OLIVEIRA et al., 2001). A quantidade de mudança dessa expressão é a medida de sua plasticidade e pode ser expressa tanto em caracteres reprodutivos quanto caracteres vegetativos (BRADSHAW, 1965), podendo ser quantificada por índices e coeficientes de plasticidade.

Como *Bidens pilosa* ocorre nos trópicos e subtropicais, próximo ao nível do mar até altitudes elevadas, desde seco até pouco drenado (FELIPE, 1978; BALLARD, 1986; OBARA et al., 1994), seria presumível que houvesse plasticidade fenotípica (CAPOTE et al., 1986) e essa desempenharia função relevante na estratégia de adaptação dessa espécie a altitudes.

Este trabalho teve como objetivo estudar a plasticidade fenotípica da morfologia de *Bidens pilosa* L., estimando-se a magnitude e o padrão de respostas plásticas de genótipos avaliados em quatro altitudes, bem como o grau de adaptação dos genótipos às altitudes de origem.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Bidens pilosa*

Bidens pilosa L., pertence à família Asteraceae, é cosmopolita, heliófila, anual, de porte herbáceo, ereta e pilosa. Tem folhas opostas, pecioladas, com bordas serradas e pêlos hialinos. Seu caule é tetragonal, tem crescimento limitado, com altura 0,3-1,8 m; é ramificada e as gemas apicais dos ramos transformam-se em capítulos. Os capítulos têm 25 a 40 flores e os frutos são do tipo aquênio, achatados e com papus contendo aristas que aderem aos pêlos dos mamíferos e servem à sua dispersão (KIRSZENZAFT, 1975, FERREIRA et al., 1995).

O florescimento é variável, as plantas com quatro semanas de idade podem ter os primeiros capítulos que, após duas semanas, mostram aquênios maduros, a maioria dos quais germina prontamente, o que garante três a quatro gerações por ano (LORENZI, 1982; KIRSZENZAFT, 1975; TAMASHIRO e LEITÃO FILHO, 1978; FERREIRA et al., 1995). A produção média estimada é de 1.500 aquênios por planta (LORENZI, 1982).

A grande produção de aquênios e a adaptação a diversos tipos de solos são suas características marcantes. *Bidens pilosa* L. é, segundo SUN e GANDERS (1990), espécie predominantemente autógama, de grande adaptabilidade e com variação em caracteres morfológicos, presentes em localidades de altitudes variadas (BALLARD, 1986). Admite-se que o México seja seu centro de dispersão e atualmente é espécie cosmopolita, de ocorrência principal em regiões

tropicais e subtropicais. Em todos os Estados do Brasil encontra-se como planta invasora de culturas e é de grande uso medicinal nos problemas hepáticos, como icterícia e hepatite (VASQUES et al., 1986b).

As espécies de ocorrência ruderal, como *Bidens pilosa*, que respondem às perturbações e/ou restrições do meio com crescimento vegetativo reduzido e com grande produção de sementes, são consideradas altamente plásticas (CAPOTE et al., 1986).

2.2. Plasticidade fenotípica

A plasticidade fenotípica foi definida, segundo BRADSHAW (1965), como a expressão da variação fenotípica do genótipo em resposta aos ambientes, sendo, portanto, a intensidade dessa mudança a expressão da plasticidade, específica do genótipo. Esse mesmo autor subdividiu a plasticidade em dois tipos fundamentais: fisiológico e morfológico. A primeira é reversível e associa-se a efeitos fisiológicos que não resultam em alterações morfológicas, ao passo que a segunda é irreversível e relaciona-se a efeitos fisiológicos que resultam em modificações morfológicas.

2.2.1 Características morfológicas plásticas

O grau de plasticidade pode estar relacionado à forma de desenvolvimento dos caracteres (BRADSHAW, 1965). Caracteres formados durante longo período de desenvolvimento, como altura, número de folhas e matéria seca total, são mais sujeitos à influência ambiental e, conseqüentemente, espera-se maior variação fenotípica, ou seja, são mais plásticas, quando comparadas com os caracteres desenvolvidos rapidamente, como estruturas reprodutivas e os demais caracteres formados durante os estádios de desenvolvimento (SANTOS, 1990). Sabe-se que características evolutivas responsáveis pela perpetuação da espécie, como estruturas reprodutivas, devam ser conservadas a fim de não comprometer a sobrevivência da espécie, por isso, é de esperar baixa plasticidade no florescimento (SCHLICHTING e LEVIN, 1984).

Vários trabalhos têm demonstrado que a biomassa da parte aérea vegetal é a mais plástica, enquanto a altura da planta é de plasticidade mediana, largura e comprimento da folha são de baixa plasticidade (SCHLICHTING e LEVIN, 1984; GUREVITCH, 1988; KAMADA et al., 1999).

2.2.2. Medidas de plasticidade

A plasticidade possui dois componentes de resposta plástica: a magnitude de resposta e o padrão de plasticidade. Essa resposta plástica é obtida ao se analisar dois ou mais genótipos em mais de um ambiente. A intensidade da plasticidade observada nestes ambientes é denominada de magnitude de resposta plástica. Ao se comparar o comportamento entre os indivíduos, a concordância ou discordância de resposta estabelece o padrão de plasticidade. O controle das respostas é genético e modificável pelo processo de crescimento e desenvolvimento vegetal e pela seleção (BRADSHAW, 1965; SCHEINER, 1993; KAMADA et al., 1999).

O índice de determinação ambiental (Ia^2) foi utilizado por KAMADA (1998) como estimador da proporção de variação total atribuída ao efeito ambiental e seus valores podem ser positivos ou negativos. Se positivos e grandes significa que há grande intensidade de plasticidade e se baixos ou negativos significa que a intensidade de plasticidade é pequena ou nula, ou seja, há pouca influência ambiental na característica.

Quando são comparados dois ou mais genótipos, é possível determinar similaridades ou divergências de respostas entre eles em cada característica. Na análise de dois genótipos em relação a uma ou mais características obtêm-se valores de alta ou baixa correlações. As altas correlações indicam que os genótipos têm respostas similares, ao passo que correlações baixas, ou negativas, indicam padrão de plasticidade divergente entre aqueles pares de genótipos em relação às características consideradas (SCHLICHTING e LEVIN, 1984).

O coeficiente de coincidência pode ser utilizado como estimador do grau de adaptação do genótipo ao ambiente de ocorrência natural. Essa coincidência é estimada ao se realizarem experimentos que representem os ambientes

semelhantes ao de ocorrência natural e os divergentes desses. As médias dos resultados dos caracteres são comparadas e, no ambiente de origem, é observada a máxima ou a mínima expressão do caráter que indica que esse apresenta coincidência. Segundo CRUZ (1997), esse coeficiente estima a concordância de ocorrência de observações superiores ou inferiores, em relação a cada par de características. A máxima ou mínima expressão do caráter indica a extrema adaptação do genótipo ao seu ambiente de origem.

Visando conhecer os fatores ambientais e genéticos que influenciam na produção das espécies medicinais, KAMADA (1998) estudou a plasticidade fenotípica da morfologia de três acessos de manjerição (*Ocimum* spp.): manjerição-branco, manjerição-roxo e basilicão, que foram crescidos em quatro ambientes de adubação: 1) sem adubação, 2) adubação orgânica, 3) adubação química e 4) adubação química e orgânica. Neste trabalho utilizou-se como parâmetros a análise da variação morfológica nos níveis de adubação. Os valores da plasticidade foram estimados pelo coeficiente de variação ambiental (CVa) e índice de determinação ambiental (Ia^2). O CVa foi utilizado na estimação da magnitude de plasticidade e o Ia^2 na representação da proporção de variação total atribuída ao efeito ambiental. Esse autor concluiu que os efeitos da plasticidade foram relevantes na produção de biomassa (matéria seca). Observou-se que nos acessos floridos, manjerição-branco e basilicão, os valores de plasticidade eram semelhantes, no acesso que não floresceu, manjerição-roxo, ocorreu maior plasticidade nos caracteres, concluindo que os efeitos ambientais sobre o crescimento e desenvolvimento foram específicos em cada acesso.

A quantificação da clorofila pode servir como indicador das condições da própria planta. Em geral, plantas saudáveis conterão mais clorofila que as menos saudáveis; entretanto, fatores como luminosidade interferem nessa condição (TAIZ e ZEIGER, 1991, JONES, 1994). Nas altitudes, as variações de intensidade luminosa podem interferir com a quantidade de clorofila, influenciando diretamente no crescimento e no desenvolvimento vegetal. Com o SPAD (Minolta Co. Ltd.) pode-se estimar a quantidade relativa de clorofila de folhas, com vantagem de ser rápido e não ser destrutivo, com a leitura realizada diretamente sobre a superfície da folha, mesmo quando essas estão ainda no

campo. O SPAD utiliza medidas em unidades de SPAD, que indicam a quantidade relativa de clorofila das folhas. A capacidade de medição varia de 0 até mais que 100 SPAD. A precisão de ± 1 SPAD é observada nos valores entre 0 e 50 SPAD, já nos valores acima de 50 a precisão diminui. Os valores de SPAD baseiam-se na quantidade de luz transmitida pela folha na região analisada, em dois comprimentos de onda, na qual a absorvância da clorofila é diferente dos carotenóides. O SPAD emite luz vermelha (aproximadamente 650 nm) e infravermelha (aproximadamente 940 nm). Na região do vermelho a absorvância é alta e não é afetada pelos carotenóides e na do infravermelho a absorvância é extremamente baixa. As dimensões de leitura são de 2 mm x 3 mm da superfície foliar e as medidas devem ser feitas fora das nervuras foliares, em folhas finas (espessura menor que 1,2 mm) (MINOLTA, 1989).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material experimental

Foi estudada a plasticidade fenotípica de genótipos de *Bidens pilosa*, coletados em seis altitudes. As exsicatas desses encontram-se depositadas no Herbário do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (VIC). A altitude de coleta foi usada para denominar os genótipos, ou seja, o genótipo coletado na altitude 210 m é referido como 210, o da altitude 450 m como 450 e assim os demais genótipos. No Quadro 1, consta o local e o *habitat* de coleta de cada genótipo, bem como o número do herbário (VIC).

Quadro 1 - Altitude, local, área e *habitat* dos seis genótipos de *Bidens pilosa* L. e respectivos números do herbário (VIC). 1999

Genótipo ⁽¹⁾	Local de Coleta	Área e <i>Habitat</i> de Coleta	VIC ⁽²⁾
210	Leopoldina (MG)	Urbana - terreno baldio, ensolarado e seco	25.311
450	Leopoldina (MG)	Rural - horta, sombreada e úmida	25.313
475	Oratórios (MG)	Rural - horta, ensolarada e úmida	25.312
675	Viçosa (MG)	Rural - horta, ensolarada e úmida	25.308
950	Araponga (MG)	Rural - horta, ensolarada e úmida	25.309
1150	Araponga (MG)	Rural - horta, ensolarada e úmida	25.310

⁽¹⁾ Genótipo = representado pela altitude de origem, em metros;

⁽²⁾ VIC = Herbário da Universidade Federal de Viçosa.

Os seis genótipos foram selecionados em grupos divergentes baseados em análise isozimática que consta do capítulo 1 dessa tese e cujos padrões, com seus respectivos números de bandas, encontram-se resumidos no Quadro 2.

Quadro 2 - Padrões isozimáticos e seus respectivos números de bandas que serviram à análise de divergência e à seleção dos seis genótipos (210, 450, 475, 675, 950 e 1150) de *Bidens pilosa* L. utilizados neste experimento

Isozimas/	Padrão	Número de bandas de isozimas dos padrões dos genótipos					
		210	450	475	675	950	1150
ACP	I				8	8	8
	III	10					
	IV		6	6			
α -EST	I				8		
	III	3					
	IV			5			5
	V					5	
	VIII		3				
β -EST	II	2			2		
	III		3	3			3
	IV					4	
GOT	I	3	3	3	3	3	3
	II						5
PO	V		6				
	VI	5					
	VII			1	1	1	
SKDH	I	5					
	II			5	5	5	5
	III		4				
SOD	I		6	6	6	6	6
	II	8					
Total		36	31	29	33	32	35

Cada genótipo foi clonado *in vitro* e aclimatado, gerando plantas homogêneas e em quantidade suficiente à realização dos experimentos.

Antes da montagem do experimento as plantas foram medidas e, no bloco, foram colocadas as de alturas semelhantes. No Quadro 3 encontram-se as análises de variância da altura das plantas antes da implantação do experimento. Valores significativos foram observados apenas entre os blocos, o que demonstra a uniformidade do experimento.

Quadro 3 - Resumo da análise de variância da altura da planta quando da implantação do experimento, considerando os quatro estádios reprodutivos dos seis genótipos de *Bidens pilosa* L. crescidos nas quatro altitudes

FV	GL	Quadrados médios
Bloco/Altitude	12	12,34**
Altitude (A)	3	0,03 ^{ns}
Genótipo (G)	5	0,07 ^{ns}
Estádio (E)	3	0,12 ^{ns}
A x G	15	0,07 ^{ns}
A x E	9	0,07 ^{ns}
G x E	15	0,08 ^{ns}
A x G x E	45	0,11 ^{ns}
Resíduo	276	3,54
Média		5,50
CV (%)		34,24

** = Significativos a 1% de probabilidade, pelo teste F; ns = não significativo, pelo teste F.

3.2. Substrato

Utilizaram-se quatro toneladas de substrato no experimento, as quais foram cuidadosamente preparadas no Grupo Entre Folhas, no campus da UFV, utilizando-se betoneira manual com capacidade de 200 L, preenchida com 110 L dos componentes do substrato. Os componentes utilizados foram solo, areia, esterco bovino curtido e húmus, na proporção 6:2:1:1. O solo foi passado em peneira de malha de 6 mm, com o cuidado de uniformizar as suas camadas durante o peneiramento. Após o preparo, o substrato foi transferido da betoneira à lona plástica e, nessa, foi feita a separação individual do volume destinado a cada vaso experimental. O volume de 5 L de substrato foi transferido a sacos plásticos de mesma capacidade os quais serviram ao transporte até os locais da implantação dos experimentos.

As mudas aclimatadas foram transportadas até os locais em copos plásticos de 200 mL, acondicionados em caixas de polietileno. Os vasos de polietileno preto foram levados emborcados e acondicionados em caixas de papelão. Lonas plásticas pretas foram levadas e, em cada local, foram estendidas sobre o terreno a ser montado o experimento.

As lonas, em todos os locais, foram postas na orientação Norte-Sul e os vasos colocados sobre elas. O solo, contido nos sacos plásticos, foi transferido aos vasos. Em seguida as mudas das plantas foram transferidas a esses vasos. Além das plantas do experimento, foram mantidos mais dois vasos, contendo uma planta cada, ao lado de cada bloco a fim de determinar a quantidade de água a ser utilizada na irrigação diária. Essa determinação foi feita diariamente, antes do início da irrigação, o que possibilitou manter as plantas, nos experimentos, nas mesmas condições de irrigação, ou seja, na capacidade de campo. A análise química do substrato foi realizada pelo Laboratório de Análise de Solo Viçosa, em Viçosa (MG) (Quadro 4) e a análise física no Laboratório de Física do Solo, do Departamento de Solos da UFV (Quadro 5), onde foi realizada também a análise de equivalência de umidade do substrato visando à estimação da capacidade (23,01%). A densidade do solo, obtida pelo método da proveta, foi 1,0381.

Quadro 4 - Resultado das análises químicas do substrato utilizado no plantio de *Bidens pilosa* L nas quatro altitudes

pH	P	K	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al	SB	CTC (t)	CTC (T)	V	m	MO
H ₂ O	mg dm ⁻³					cmolc dm ⁻³				%	dag kg ⁻¹	
5,2	49,4	280	1,9	1,1	0,0	3,1	3,72	3,72	6,82	55	0	2,63

pH em água, KCl e CaCl₂ - Relação 1:2,5

P,K - Extrator Mehlich 1

Ca, Mg, Al - Extrator KCl - 1 mol L⁻¹

H+Al - Extrator Acetato de Cálcio 0,5 mol L⁻¹ - pH 7,0

SB = Soma de Bases Trocáveis

CTC (t) = Capacidade de Troca Catiônica Efetiva

CTC (T) = Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0

V = Índice de Saturação de Bases

m = Índice de Saturação de Alumínio

MO = Matéria Orgânica = Carbono orgânico x 1,724 - Walkley-Black

Quadro 5 - Análise granulométrica do substrato utilizado no plantio de *Bidens pilosa* L nas quatro altitudes

Areia grossa (%)	Areia fina (%)	Silte (%)	Argila (%)	Classificação textural
47	9	4	40	argila-arenosa

3.3. Instalação e condução do experimento

O experimento foi instalado e conduzido, na Zona da Mata Mineira, em quatro locais, cujas altitudes são 198, 479, 739 e 962 m, no período de junho a outubro de 2000. A localização geográfica do experimento encontra-se no Quadro 6 e suas coordenadas serviram ao cálculo das distâncias, em linha reta, entre os locais (Quadro 7). As distâncias entre os locais foram inferiores a 10 km. O clima da região é do tipo Cwa, de acordo com a classificação de Köppen. O solo é de topografia acidentada.

Quadro 6 - Localização geográfica dos quatro experimentos de *Bidens pilosa* L.

Locais dos experimentos	Altitude	Latitude	Longitude
Itamarati de Minas (MG), zona urbana	198 m	21°25'10" S	42°49'20" W
Sítio Santa Cruz, Serra dos Caramonas, zona rural de Itamarati de Minas (MG)	479 m	21°24'80" S	42°51'75" W
Sítio Boa Vista, Serra dos Caramonas, zona rural de Itamarati de Minas (MG)	739 m	21°23'12" S	42°53'27" W
Sítio Boa Vista, Serra dos Menezes, zona rural de Astolfo Dutra (MG)	962 m	21°21'99" S	42°53'46" W

Os dados de altitude, latitude e longitude foram determinados com o aparelho GPS (Global Position System, modelo GPS 2000 XL, fabricado pela Magellan).

Quadro 7 - Distância, em linha reta, entre quatro locais da montagem do experimento de *Bidens pilosa* L.

	Local 2	Local 3	Local 4
Local 1	4.410 m	7.926 m	9.335 m
Local 2		4.063 m	5.969 m
Local 3			2.110 m

A plasticidade fenotípica foi avaliada por meio do cultivo dos seis clones nas quatro altitudes, analisando a variação fenotípica dos caracteres morfológicos em quatro estádios reprodutivos. Utilizou-se o delineamento estatístico em blocos casualizados, com quatro repetições e duas plantas por parcela.

Em cada unidade experimental, utilizaram-se vasos de polietileno de 5 L, preenchidos com substrato, de massa aproximada de 5 kg. Cada vaso recebeu uma planta. As mudas foram propagadas assexuadamente, a partir de uma única

fonte matriz, em cultura de tecidos. De cada genótipo foram selecionadas, por tamanho, 128 plantas a serem mantidas nas quatro altitudes. Cada altitude recebeu 32 plantas de cada genótipo, e 192 plantas ao considerar os seis genótipos. As 32 plantas foram separadas em quatro estádios reprodutivos, sendo cada estágio representado por duas plantas mantidas dentro do mesmo bloco. A posição dos blocos foi mantida com orientação Norte-Sul nas quatro altitudes, com o bloco 1 posicionado ao Norte e o bloco 4 ao Sul e os demais interpostos.

A padronização da irrigação em todas as altitudes foi feita utilizando-se oito vasos extras colocados na extremidade de cada bloco, em cada experimento. Os oito vasos, contendo uma planta cada, serviram ao doseamento da quantidade de água a irrigar cada vaso do experimento. O procedimento foi verter 50 mL de água em cada um dos oito vasos posicionados na frente dos blocos. Após cinco minutos foi verificado se a água atingiu a lona plástica sob os vasos. Caso a lona não apresentasse umedecimento, nova medida de 50 mL era vertida nesses vasos e assim sucessivamente até notar que a água umedeceu todo o substrato e atingiu a lona, mas sempre mantendo o intervalo de cinco minutos. Caso o teste de umidade indicasse a necessidade de 100 mL, então esse volume de água era usado em cada vaso do experimento. Esse procedimento, realizado diariamente nas quatro altitudes, possibilitou manter todas as plantas na capacidade de campo.

Nos experimentos, os vasos foram colocados sobre lonas plásticas pretas. Esse procedimento visou uniformizar os ambientes quanto à possível reflexão da luz solar diferenciada dos quatro locais e, além disso, serviu como barreira à penetração das raízes das plantas no solo do local, o que poderia interferir no experimento.

A colheita foi feita cortando-se o caule junto à superfície do solo. Essa colheita foi realizada nas plantas em quatro estádios reprodutivos. A primeira colheita foi feita 14 dias após o florescimento de 50% das plantas; as demais colheitas foram feitas em intervalos regulares de 14 dias após a primeira colheita. Na primeira colheita as plantas estavam no estágio de “florescimento”; na segunda colheita, no estágio de “início de frutificação”; na terceira colheita, no estágio de “frutificação plena” e na quarta colheita, no estágio de “senescência”.

3.4. Características avaliadas e coleta de dados

As características avaliadas foram as seguintes:

- a) Início do florescimento (IF) - o número de dias entre a implantação do experimento e a abertura da primeira inflorescência. Essa característica foi analisada antes das demais;
- b) Altura da planta (AP) - obtida em cm, a partir do solo até o maior ápice da planta;
- c) Comprimento do caule (CC) - a medida foi tomada em cm, a partir do nível do solo até o ápice caulinar; em alguns casos, o comprimento do caule e a altura da planta foram os mesmos;
- d) Número de nós (NO) - o número de nós foram contados, desde a base até o ápice do caule;
- e) Número de ramos (NR) – computaram-se os ramos com mais de dois nós;
- f) Número de capítulos (NC) - foram computados os capítulos floridos e em frutificação;
- g) Massa seca caulinar (MC) - foram considerados o caule e os ramos laterais e a secagem desses foi feita em estufa de circulação forçada de ar, à temperatura de 65 °C, mantida até a obtenção de massa constante. Os dados, em gramas, foram determinados em balanças analíticas;
- h) Biomassa aérea (BA) - obtida pela soma de MF e MC;
- i) SPAD (SP) - o valor do SPAD está correlacionado à quantidade de clorofila da folha e os determinados pelo aparelho SPAD-502 (Minolta Co. Ltd.), em medidas de SPAD, da média de 10 folhas analisadas aleatoriamente de cada planta;
- j) Número de folhas (NF) - na contagem do número de folhas, consideraram-se apenas as folhas verdes;
- k) Área foliar por planta (AF) - a área foliar foi determinada inicialmente pelo equipamento *Areameter*, com os valores tomados de 30 folhas de cada tipo: simples, tripartida e pentapartida; colhidas aleatoriamente e tomadas suas medidas de comprimento e largura. Em cada folha da amostra obteve-se os dados

que foram aplicados à equação abaixo visando obter fator de correção médio, a ser adotado na estimativa da área foliar de cada planta do experimento:

$Y = a \cdot x$; onde:

$Y = \text{Área Foliar}$ (obtida com o “Areometer”);

$a = \text{Fator de correção}$ (calculado em cada tipo de folha);

$x = C$ (comprimento) \times L (largura).

No cálculo da área foliar por planta, tomou-se, de cada tipo de folha, a medida do comprimento e de largura separadamente de folhas pequenas, médias e grandes, assim como o número correspondente a cada tamanho. Com as medidas de comprimento e largura e com o índice de correção, calculou-se a área foliar. Os valores encontrados em cada tipo e tamanho de folhas foram multiplicados pelo número de folhas obtendo a área foliar por planta, em cm^2 . A tomada das medidas foi logo após a colheita, no mesmo dia. No comprimento das folhas foi considerado o pecíolo e na largura foi considerada a porção mais larga da folha simples e nas folhas tri e pentapartida considerada a largura entre as extremidades opostas do segundo folíolo.

l) Área foliar média (AM) - este valor foi estimado a partir da área foliar por planta dividida pelo número total de folhas;

m) Massa seca foliar (MF) - a secagem das folhas foi feita em estufa de circulação forçada de ar, à temperatura de $65\text{ }^\circ\text{C}$, mantida até a obtenção de massa constante. Os dados, em gramas, foram determinados em balanças analíticas;

n) Número de folhas em 1 g (N1) - este valor foi estimado pela divisão do número de folhas (NF) pelo valor da massa seca foliar (MF).

Essas características foram tomadas pela média das duas plantas que compunham a parcela, exceto o “início do florescimento”, no qual considerou-se a média de oito plantas (duas plantas da parcela \times quatro épocas de colheita) como representando cada bloco. O “início do florescimento” foi analisado separadamente e apenas uma vez e as demais características foram avaliadas nos quatro estádios reprodutivos.

3.5. Análises estatísticas

Inicialmente foram feitas as análises de variância dos caracteres de cada genótipo isoladamente e, posteriormente, a análise conjunta dos genótipos.

A quantificação da plasticidade foi feita com base na magnitude de resposta e no padrão de resposta plástica. Foram utilizados três estimadores: coeficiente de variação ambiental, como estimador da magnitude da plasticidade; índice de determinação ambiental, como estimador da proporção da variação total atribuída ao efeito ambiental e coeficiente de correlação de Pearson, como estimador do padrão de plasticidade. Essa avaliação foi feita entre os genótipos e em cada característica. A adaptação dos genótipos às respectivas altitudes de origem foi estimada pelo Coeficiente de Coincidência.

3.5.1. Análises de variância

A análise de variância individual dos genótipos foi obtida inicialmente e, posteriormente, a análise conjunta dos seis genótipos. Nas análises individuais, foram verificadas as diferenças entre as altitudes de cultivo dentro do mesmo estádio reprodutivo e entre os quatro estádios reprodutivos na mesma altitude, além da interação entre altitude e estádio reprodutivo. A análise conjunta foi utilizada na verificação das diferenças de resposta plástica entre os seis genótipos.

3.5.1.1. Análise individual por altitude em cada estádio reprodutivo

No Quadro 8 está esquematizado o modelo estatístico da análise de variância individual dos seis genótipos. O fator altitude foi considerado de efeito fixo.

Quadro 8 - Esquema da análise de variância baseada nos dados da parcela

F.V.	G.L.	Q.M.	E(QM)
Altitude	a-1	QM1	$\sigma_r^2 + r\phi_A$
Resíduo	(a-1)r	QM2	σ_r^2
Total	ar-1		

Em que:

σ_r^2 = componente de variância associado ao erro experimental;

ϕ_A = componente quadrático associado aos efeitos da altitude.

3.5.1.2. Análise individual por altitude nos quatro estádios reprodutivos

No Quadro 9, apresenta-se o esquema da análise de variância individual de cada genótipo nos quatro estádios. Os fatores altitude e estádio reprodutivo foram considerados de efeitos fixos.

Quadro 9 - Esquema da análise de variância baseada nos dados da parcela

F.V.	G.L.	Q.M.	E(QM)
Altitude (A)	a-1	QM3	$\sigma_r^2 + e\phi_A$
Estádio (E)	e-1	QM4	$\sigma_r^2 + a\phi_E$
A x E	(a-1)(e-1)	QM5	$\sigma_r^2 + r\phi_{AE}$
Resíduo	ae(r-1)	QM6	σ_r^2
Total	era-1		

Em que:

σ_r^2 = componente de variância associado ao erro experimental;

ϕ_A , ϕ_E , ϕ_{AE} = componentes quadráticos associados aos efeitos de altitude, de estádio reprodutivo e da interação altitude x estádio reprodutivo, respectivamente.

3.5.1.3. Análise conjunta

No Quadro 10 está esquematizada a análise de variância conjunta dos seis genótipos. Os fatores altitude, genótipo e estádio reprodutivo foram considerados de efeitos fixos.

Quadro 10 - Esquema da análise de variância baseada nos dados da parcela

F.V.	G.L.	Q.M.	E(QM)
Bloco/Altitude	a(r-1)	QM7	
Altitude (A)	a-1	QM8	$\sigma_r^2 + erg\phi_A$
Genótipo (G)	g-1	QM9	$\sigma_r^2 + aer\phi_G$
Estádio (E)	e-1	QM10	$\sigma_r^2 + era\phi_E$
A x G	(a-1)(g-1)	QM11	$\sigma_r^2 + er\phi_{AG}$
A x E	(a-1)(e-1)	QM12	$\sigma_r^2 + gr\phi_{AE}$
G x E	(g-1)(e-1)	QM13	$\sigma_r^2 + ar\phi_{GE}$
A x G x E	(a-1)(g-1)(e-1)	QM14	$\sigma_r^2 + r\phi_{AGE}$
Resíduo	(r-1)a(ge-1)	QM15	σ_r^2
Total	rage-1		

Em que:

σ_r^2 = componente de variância associado ao erro experimental;

ϕ_A , ϕ_G , ϕ_E = componentes quadráticos associados aos efeitos da altitude, de genótipo e de estágio reprodutivo, respectivamente;

ϕ_{AG} , ϕ_{AE} , ϕ_{GE} , ϕ_{AGE} = componentes quadráticos associados aos efeitos das interações altitude x genótipo, altitude x estágio reprodutivo, genótipo x estágio reprodutivo e altitude x genótipo x estágio reprodutivo, respectivamente.

3.5.2. Estimadores de plasticidade

3.5.2.1. Magnitude de plasticidade

Na quantificação da magnitude da resposta plástica dos genótipos em relação ao ambiente utilizaram-se o coeficiente de variação ambiental (CVa) e o índice de determinação ambiental (Ia^2).

3.5.2.1.1. Coeficiente de variação ambiental (CVa)

O coeficiente de variação ambiental (CVa) serviu como estimador, em valores percentuais, da magnitude da resposta plástica, utilizando-se dos valores de desvio-padrão da média das altitudes (tratamentos) e da média do caráter. O

CVa das características de cada genótipo foi determinado pela fórmula (SCHLICHTING e LEVIN, 1984):

$$CV_{a_i} = \frac{s(\bar{x})}{\bar{X}} \times 100 = \frac{\sqrt{QMA/b}}{\bar{X}} \times 100$$

em que:

CV_{a_i} = coeficiente de variação ambiental do genótipo i;

s(\bar{x}) = desvio-padrão da média das altitudes (tratamentos) no genótipo i correspondente;

\bar{X} = média geral do genótipo i;

QMA = Quadrado médio de altitude (tratamento) das análises individuais;

b = número de blocos em cada altitude.

O valor de CVa foi considerado alto se fosse maior que 20%, médio se estivesse entre 10 e 20% e baixo se fosse menor que 10% (SCHLICHTING e LEVIN, 1984).

3.5.2.2. Índice de determinação ambiental (Ia²)

O índice de determinação ambiental (Ia²) foi preparado em analogia à herdabilidade e representa o efeito ambiental em relação à proporção total da variação. Nas estimativas do Ia², partiu-se da análise de variância individual e foi determinado por meio da seguinte fórmula:

$$Ia^2 = \frac{QMA - QMR}{QMA}$$

em que:

Ia² = índice de determinação ambiental;

QMA = quadrado médio da altitude (tratamento); e

QMR = quadrado médio do resíduo.

3.5.2.3. Padrão de plasticidade fenotípica

O padrão de respostas dos genótipos frente às mudanças, denominado de padrão de plasticidade fenotípica, foi avaliado por meio da análise de variância conjunta. Também foi avaliado o coeficiente de correlação de Pearson entre médias de características em cada par de genótipos.

3.5.2.3.1. Coeficiente de correlação de Pearson

O coeficiente de correlação de Pearson foi adotado visando estimar o padrão de resposta plástica das médias dos tratamentos entre pares de genótipos. A análise foi feita entre os genótipos, comparados dois a dois, em relação às médias de cada característica. Foi adotado o critério de altas correlações indicarem que os genótipos têm respostas similares, ao passo que correlações baixas, ou negativas, indicam padrão de plasticidade divergente entre aqueles pares de genótipos em relação às características consideradas, conforme SCHLICHTING e LEVIN (1984).

O coeficiente de correlação foi calculado por meio de recursos computacionais do programa SAEG (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas) versão 5.0, desenvolvido na Universidade Federal de Viçosa, cujas instruções operacionais foram descritas por GOMES (1992).

3.5.2.4. Coeficiente de coincidência (CCo)

O coeficiente de coincidência (CCo) serviu na estimação do grau de adaptação de um genótipo à altitude em que ele foi coletado. O coeficiente de coincidência, segundo CRUZ (1997), estima a concordância de observações superiores ou inferiores, em relação a cada par de características. No presente estudo, o par foi composto pelas características fenotípicas plásticas e a altitude onde foi coletado o genótipo. Esse índice estimou o grau de adaptação da planta ao seu ambiente de ocorrência natural. A máxima ou mínima expressão do caráter mede a extrema adaptação do genótipo à sua altitude de origem, quando

analisado em várias altitudes. A essa concordância de resposta plástica foi dada nota 1. Os valores intermediários aos extremos expressaram a discordância adaptativa, recebendo nota 0 (zero). A análise foi feita com base nas médias das características do genótipo nas quatro altitudes e nos quatro estádios reprodutivos. Com a análise das características foram gerados valores cuja soma é dividida pelo número de características consideradas, obtendo-se assim a média das notas. Essa média foi multiplicada por 100 a fim de obter o coeficiente de coincidência em porcentagem.

As médias do genótipo 210 devem ser comparadas com a altitude 198 m, as médias do 450 e do 475 com 479 m, as médias do 675 com 739 m e as médias do 950 e do 1150 com 962 m.

A adaptação do genótipo à altitude onde foi coletado foi estimada pelo CCo e varia de 0 a 100%. Ao avaliar genótipos em quatro altitudes, sendo uma altitude semelhante à sua altitude de origem, e admitindo não haver qualquer adaptação dos genótipos à altitude, espera-se que o CCo seja de 25%. Visando determinar a adaptação do genótipo ao local de origem (altitude), considerou-se:

- a) baixa adaptação, quando CCo for de 0 a 25%;
- b) adaptação intermediária, quando CCo for de 25 a 75%; e
- c) alta adaptação, quando CCo for de 75 a 100%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Plasticidade fenotípica do início de florescimento em relação à altitude

O início do florescimento foi analisado separadamente das demais características, antes das colheitas.

4.1.1. Análises de variância

Nos Quadros 11 e 12 encontram-se, respectivamente, os resultados das análises de variância individuais e da análise de variância conjunta da característica início do florescimento.

Quadro 11 - Resumo das análises de variância individuais dos genótipos 210, 450, 475, 675, 950 e 1150 de *Bidens pilosa* L., da característica início do florescimento

FV	GL	Quadrados médios					
		210	450	475	675	950	1150
Altitude	3	4,60**	1,30 ^{ns}	0,85 ^{ns}	0,14 ^{ns}	0,83 ^{ns}	16,35*
Resíduo	12	0,79	0,47	1,83	1,06	1,27	2,85
Média		50,50	60,64	61,48	60,93	62,65	63,94
CV (%)		1,75	1,13	2,20	1,69	1,80	2,64

* e ** = Significativos a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F; ns = não significativo, pelo teste F.

Quadro 12 - Resumo da análise de variância conjunta da característica início do florescimento, nos seis genótipos de *Bidens pilosa* L. crescidos em quatro altitudes

FV	GL	Quadrados médios Início do florescimento
Bloco/Altitude	12	2,96**
Altitude (A)	3	2,15 ^{ns}
Genótipo (G)	5	371,90**
A x G	15	4,38**
Resíduo	60	1,06
Média		60,02
CV (%)		1,71

* e ** = Significativos a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F; ns = não significativo, pelo teste F.

Observam-se, nos Quadros 11 e 12, coeficientes de variação (CV) menores que 3%. Os experimentos de campo com CV inferiores a 10% são considerados baixos por GOMES (1987), que postula que quanto menor o CV maior a precisão dos dados experimentais.

A plasticidade da característica início do florescimento consta da análise conjunta (Quadro 12) onde os quadrados médios da interação genótipo x altitude foram significativos. No Quadro 12, verifica-se que a altitude influenciou pouco o início de florescimento, mas que os genótipos tiveram comportamentos distintos. Essas diferenças são apresentadas no Quadro 11, ao observar que o genótipo 210, coletado na menor altitude, teve florescimento precoce (média de 50,50 dias) e o genótipo 1150, coletado na maior altitude, teve florescimento tardio (média de 63,94 dias). Esses dois genótipos foram os que tiveram resposta plástica de início do florescimento nas variações de altitudes.

Ao ser detectada plasticidade, essa pode ser estudada quanto a sua magnitude e padrão de resposta. Entretanto, como o intuito foi o de estudar a influência da altitude nos seis genótipos, foi desconsiderado se os genótipos tiveram ou não diferenças significativas nessa característica.

4.1.2. Magnitudes da plasticidade fenotípica

No Quadro 13, constam os valores do coeficiente de variação ambiental (CVa) e do índice de determinação ambiental (Ia^2), indicando as magnitudes da plasticidade fenotípica do início do florescimento. Nota-se que os valores mais expressivos foram os dos genótipos 210 e 1150, pois foram esses que tiveram respostas significativas nas análises de variância (Quadros 11 e 12).

Quadro 13 - Estimativas dos coeficientes de variação ambiental (CVa) e índices de determinação ambiental (Ia^2) do caráter início do florescimento dos seis genótipos de *Bidens pilosa* L. crescidos em quatro altitudes

	Genótipos						Média
	210	450	475	675	950	1150	
CVa	2,12	0,94	0,75	0,31	0,73	3,16	1,34
Ia^2	0,8302	0,6372	-	-	-	0,8258	0,7644

Pode-se observar, no Quadro 13, que os coeficientes de variação ambiental (CVa) com valores de 0,31 a 3,16 mostraram, com relação ao início do florescimento, a baixa plasticidade dos genótipos, conforme classificação citada por SCHLICHTING e LEVIN (1984): >20% alta, 10-20% média e < 10% baixa. Esses autores, estudando a plasticidade fenotípica do início do florescimento da planta anual *Phlox*, obtiveram plasticidade de 5%.

Os valores dos índices de determinação ambiental (Ia^2) demonstraram que a proporção da variação total atribuída aos efeitos da altitude foi alta nos genótipos extremos (genótipo 210 e 1150), com cerca de 83% da variação total atribuída à altitude (Quadro 13). Estimativas negativas do índice de determinação ambiental foram desconsideradas e representadas por traços.

Pode-se perceber que as maiores magnitudes de plasticidade do início do florescimento foram obtidas nos genótipos extremos, ou seja, genótipo 210 (CVa 2,12 e de Ia^2 0,8302) e genótipo 1150 (CVa 3,16 e de Ia^2 0,8258), sendo esses os únicos genótipos com plasticidade detectada nas análises de variância (Quadro 11).

Estes valores baixos de CVa e de Ia² são esperados devido ao florescimento ter ocorrido rapidamente e com isso recebe menor influência do ambiente (BRADSHAW, 1965; SANTOS, 1990).

4.1.3. Padrão de plasticidade fenotípica

O padrão de plasticidade foi estimado por meio do coeficiente de correlação de Pearson. Observa-se no Quadro 14 que os valores são baixos entre os genótipos. Analisando apenas a correlação entre os genótipos 210 e 1150, por demonstrarem plasticidade nesse caráter nas análises individuais (Quadro 11), observa-se que a resposta foi na mesma direção e no mesmo sentido, mas com baixa correlação, 0,08 (Quadro 14). Segundo SCHLICHTING e LEVIN (1984), as correlações baixas indicam que os genótipos têm respostas divergentes em relação à variável.

Quadro 14 - Estimativas dos coeficientes de correlação de Pearson do caráter início do florescimento dos seis genótipos de *Bidens pilosa* L. crescidos em quatro altitudes

Genótipos	450	475	675	950	1150
210	-0,23 ^{ns}	0,20 ^{ns}	-0,05 ^{ns}	0,35 ^{ns}	0,08 ^{ns}
450		0,38 ^{ns}	0,47*	-0,27 ^{ns}	0,04 ^{ns}
475			-0,10 ^{ns}	-0,02 ^{ns}	-0,05 ^{ns}
675				0,07 ^{ns}	0,43*
950					0,25 ^{ns}

* = Significativo a 5% de probabilidade; ns = não significativo, pelo teste T.

4.1.4. Coeficiente de coincidência (CCo)

No Quadro 15, pode-se detectar que o genótipo 210 floresceu mais precocemente e o da altitude 1150 foi, em geral, o mais tardio e de maneira menos sincrônica. Nota-se ainda que esses dois genótipos diferiram estatisticamente nesse caráter com relação à altitude (Quadro 15), sendo este resultado correspondente ao observado nas análises de variância individuais (Quadro 11). O florescimento precoce de plantas de baixas altitudes já foi observado em *Bidens pilosa* por SUN e GANDERS (1990).

O CCo foi utilizado na comparação das médias por meio do teste de Tukey (Quadro 15). Devido ao interesse em verificar a adaptação do genótipo e não da característica à altitude, o CCo do início de florescimento dos genótipos foi tratado juntamente com as demais características morfométricas analisadas no item seguinte.

Quadro 15 - Médias do caráter início do florescimento e estimativas dos coeficientes de coincidência (CCo) dos seis genótipos de *Bidens pilosa* L. crescidos em quatro altitudes

Altitudes	Genótipos					
	210	450	475	675	950	1150
198 m	50,47AB	60,00A	61,25A	61,00A	62,84A	66,44A
479 m	51,38A	60,50A	61,00A	61,09A	63,16A	64,22AB
739 m	51,16A	60,69A	62,06A	60,66A	62,50A	61,53B
962 m	49,00B	61,38A	61,59A	60,97A	62,09A	63,56AB

As médias seguidas de uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. Os retângulos delimitam as maiores ou menores médias que coincidem com as altitudes de coleta dos genótipos.

4.2. Plasticidade fenotípica dos demais caracteres morfométricos

Foi feita a análise conjunta dos genótipos em relação a cada característica estudada. A diferença entre genótipos na interação com o ambiente foi quantificada em magnitude pela resposta plástica.

4.2.1. Análises de variância

Os caracteres morfométricos com valores significativos nas interações genótipo x altitude na análise conjunta, foram submetidos à análise de variância individual, sendo realizado o desdobramento dos genótipos, considerando um estágio reprodutivo de cada vez, nas quatro altitudes.

A análise conjunta dos genótipos nos quatro estádios reprodutivos encontra-se nos Quadros 16, 17, 18 e 19. Na maioria dos caracteres morfométricos os quadrados médios da interação altitude x genótipo foram significativos, demonstrando que a resposta plástica foi diferente entre os genótipos de *Bidens pilosa* nas altitudes e nos quatro estádios reprodutivos.

Nesses quadros observam-se, na característica área foliar por planta (AF), os maiores coeficientes de variação (CV %).

No Quadro 16, constam as análises dos caracteres morfométricos referentes ao estágio de florescimento. Valores significativos em todas as variáveis foram observados nos genótipos 450, 475 e 675. O genótipo 210 foi o que teve menos variáveis com diferenças significativas, demonstrando menor plasticidade fenotípica nas altitudes.

Nas análises do estágio reprodutivo início de frutificação (Quadro 17), na maioria dos caracteres morfométricos os quadrados médios foram significativos, no entanto nenhum genótipo teve valores significativos em todas as variáveis. No início de frutificação, nota-se que o número de ramos (NR) e o número de folhas em 1 g (N1) foram as características que variaram menos nas análises individuais dos genótipos.

No estágio reprodutivo de plantas em plena frutificação, os quadrados médios foram significativos na maioria dos caracteres morfométricos (Quadro 18) e observa-se, em comparação com o estágio de início de frutificação (Quadro 17), nova etapa de desenvolvimento de gemas axilares, gerando diferenças significativas do número de ramos (NR) nos genótipos 450, 475 e 950. Interessante notar, no Quadro 18, que no valor do SPAD foliar (SPAD) a interação altitude x genótipo não foi significativa, porém foi significativa quando analisado cada genótipo individualmente, o que demonstra que as variações entre os genótipos são semelhantes em resposta plástica devido à altitude.

No estágio de plantas em senescência (Quadro 19), os quadrados médios foram significativos na maioria dos caracteres morfométricos. Nesse estágio, o número de capítulos (NC), a área foliar por planta (AF) e a massa seca foliar (MF) tiveram diferenças não significativas na interação altitude x genótipo e significativas em análise individual dos genótipos. Isso indica que a altitude influenciou de maneira semelhante essas variáveis em todos os genótipos.

Quadro 16 - Resumo da análise de variância conjunta com desdobramento das somas de quadrado da altitude e da interação altitude x genótipo nos genótipos 210, 450, 475, 675, 950 e 1150 de *Bidens pilosa* L. nas quatro altitudes, dos caracteres altura da planta (AP), comprimento do caule (CC), número de ramos (NR), número de capítulos (NC), massa seca caulinar (MC), biomassa seca aérea (BA), valor de SPAD foliar (SP), número de folhas por planta (NF), área foliar por planta (AF), área foliar média (AM), massa seca foliar (MF) e número de folhas em 1 grama (N1) no estágio reprodutivo de plantas em florescimento

FV	GL	Quadrados médios											
		AP	CC	NR	NC	MC	BA	SP	NF	AF	AM	MF	N1
Bloco/Altitude	12	19,49 ^{ns}	33,68 ^{ns}	9,48**	100,71**	2,01**	3,89**	41,65**	369,53**	30818,88**	2,27*	0,43**	28,00 ^{ns}
Altitude (A)	(3)	1349,28**	1127,42**	57,81**	336,27**	61,80**	130,17**	461,48**	4394,74**	1427872,00**	110,69**	13,51**	256,84**
Genótipo (G)	5	3538,27**	2330,59**	4,83*	205,16**	29,42**	57,77**	90,39**	365,91**	176335,80**	27,60**	5,51**	1488,62**
A x G	(15)	193,20**	56,88**	5,90**	166,27**	4,67**	6,27**	23,71**	219,53*	49399,71**	2,75**	0,28**	19,18 ^{ns}
A / G210	3	14,91 ^{ns}	14,91 ^{ns}	3,54 ^{ns}	166,79**	1,22 ^{ns}	3,13**	71,15**	934,64**	104615,30**	7,84**	0,53**	55,73*
A / G450	3	386,89**	386,89**	7,81**	86,43*	7,76**	17,77**	40,18**	889,17**	229549,70**	22,02**	2,05**	52,37*
A / G475	3	197,12**	161,43**	15,63**	97,04**	16,69**	33,47**	99,29**	1392,54**	514726,60**	27,30**	3,66**	64,36*
A / G675	3	285,61**	244,16**	15,19**	65,23*	15,12**	34,47**	98,19**	1590,61**	411548,40**	20,86**	4,55**	74,25*
A / G950	3	114,07**	307,76**	21,52**	286,23**	4,09**	9,27**	27,30**	27,06 ^{ns}	84788,43**	12,30**	1,34**	73,46*
A / G1150	3	1316,70**	296,68**	23,63**	465,89**	40,26**	63,39**	243,93**	658,35**	329642,30**	34,13**	2,76**	32,58 ^{ns}
Resíduo	60	16,19	18,92	1,70	21,85	0,46	0,70	4,87	107,71	11877,33	1,00	0,07	18,93
Média		48,30	45,04	12,28	15,69	4,01	6,69	50,81	76,66	540,06	6,83	2,68	31,06
CV (%)		8,33	9,66	10,62	29,80	16,93	12,54	4,34	13,54	20,18	14,67	10,06	14,01

* e ** = Significativos a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F; ns = não significativo, pelo teste F.

Quadro 17 - Resumo da análise de variância conjunta com desdobramento das somas de quadrado da altitude e da interação altitude x genótipo nos genótipos 210, 450, 475, 675, 950 e 1150 de *Bidens pilosa* L. nas quatro altitudes, dos caracteres altura da planta (AP), comprimento do caule (CC), número de ramos (NR), número de capítulos (NC), massa seca caulinar (MC), biomassa seca aérea (BA), valor de SPAD foliar (SP), número de folhas por planta (NF), área foliar por planta (AF), área foliar média (AM), massa seca foliar (MF) e número de folhas em 1 g (N1) no estágio reprodutivo de plantas em início de frutificação

FV	GL	Quadrados médios											
		AP	CC	NR	NC	MC	BA	SP	NF	AF	AM	MF	N1
Bloco/Altitude	12	59,54**	32,60*	11,46**	491,77**	4,11**	5,92**	30,30**	495,74*	43783,21**	1,97**	0,38*	31,95 ^{ns}
Altitude (A)	(3)	4318,88**	668,05**	11,02**	3756,29**	258,23**	374,44**	227,28**	6467,24**	1175714,00**	63,16**	11,07**	721,26**
Genótipo (G)	5	1907,89**	2093,98**	9,45**	550,25**	51,28**	76,03**	262,70**	1723,59**	160413,70**	9,84**	3,70**	491,58**
A x G	(15)	50,55**	23,89 ^{ns}	2,25 ^{ns}	565,91**	3,00**	4,73**	95,84**	841,93**	78472,90**	5,31**	1,04**	103,64**
A / G210	3	673,39**	32,77 ^{ns}	1,56 ^{ns}	669,19**	26,86**	37,06**	22,50*	3571,47**	191646,40**	5,24**	0,89**	172,26*
A / G450	3	933,95**	139,63**	2,60 ^{ns}	861,47**	38,20*	50,59**	81,14**	326,97 ^{ns}	70877,43**	4,42**	0,88**	107,85 ^{ns}
A / G475	3	485,79**	106,32**	4,69 ^{ns}	948,27**	68,78**	104,97**	161,04**	1747,22**	470875,20**	22,69**	4,32**	71,46 ^{ns}
A / G675	3	642,92**	158,38**	8,38*	1237,40**	63,47**	91,54**	75,54**	2143,46**	298925,80**	10,42**	2,88**	111,53 ^{ns}
A / G950	3	849,41**	189,04**	2,68 ^{ns}	515,72**	27,28**	57,10**	125,43**	1978,13**	392716,80**	30,31**	6,52**	743,35**
A / G1150	3	986,18**	161,35**	2,35 ^{ns}	2353,77**	48,63**	56,81**	240,85**	909,64*	143036,70**	16,61**	0,80**	32,98 ^{ns}
Resíduo	60	15,37	16,95	2,06	83,83	0,81	1,23	7,92	222,82	15920,58	0,62	0,16	43,08
Média		67,42	45,49	12,68	60,95	8,31	11,00	45,16	81,80	526,35	6,18	2,69	32,26
CV (%)		5,82	9,05	11,32	15,02	10,84	10,07	6,23	18,25	23,97	12,77	14,67	20,35

* e ** = Significativos a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F; ns = não significativo, pelo teste F.

Quadro 18 - Resumo da análise de variância conjunta com desdobramento das somas de quadrado da altitude e da interação altitude x genótipo nos genótipos 210, 450, 475, 675, 950 e 1150 de *Bidens pilosa* L. nas quatro altitudes, dos caracteres altura da planta (AP), comprimento do caule (CC), número de ramos (NR), número de capítulos (NC), massa seca caulinar (MC), biomassa seca aérea (BA), valor de SPAD foliar (SP), número de folhas por planta (NF), área foliar por planta (AF), área foliar média (AM), massa seca foliar (MF) e número de folhas em 1 g (N1) no estágio reprodutivo de plantas em plena frutificação

FV	GL	Quadrados médios											
		AP	CC	NR	NC	MC	BA	SP	NF	AF	AM	MF	N1
Bloco/Altitude	12	71,36**	35,96**	11,09**	1185,65**	5,49**	5,93**	10,25 ^{ns}	315,82*	11966,06*	1,36 ^{ns}	0,19*	68,41 ^{ns}
Altitude (A)	(3)	4376,88**	823,52**	28,07**	12035,19**	300,83**	335,75**	377,95**	4655,71**	275449,90**	41,40**	4,16**	7008,15**
Genótipo (G)	5	1852,09**	1893,21**	15,63**	2785,93**	44,16**	48,52**	100,09**	1202,59**	8258,30 ^{ns}	5,41**	0,33**	677,44**
A x G	(15)	45,90**	37,15**	4,75**	458,13**	2,73**	2,97**	20,28 ^{ns}	430,70**	19199,10**	2,08*	0,30**	316,88*
A / G210	3	573,34**	19,84 ^{ns}	3,52 ^{ns}	4710,23**	32,32**	38,75**	74,68**	1708,13**	18870,92*	1,86 ^{ns}	0,44**	992,32**
A / G450	3	710,60**	179,13**	5,85**	979,06**	41,44**	44,37**	121,46**	773,68**	57190,27**	7,80**	1,09**	1174,88**
A / G475	3	508,38**	165,00**	15,27**	1860,75**	56,74**	66,14*	48,64**	1701,38**	191599,90**	17,19**	2,10**	845,44*
A / G675	3	883,28**	188,19**	14,88**	3514,27**	56,77**	59,33**	121,92**	1541,81**	13978,14 ^{ns}	3,35*	0,06 ^{ns}	841,79**
A / G950	3	932,38**	221,45**	4,35*	638,18**	55,53**	64,74**	65,33**	777,27**	56850,64**	10,99**	1,42**	4096,06**
A / G1150	3	998,38**	235,67**	7,93 ^{ns}	2623,33**	71,66**	77,25**	47,31*	306,93 ^{ns}	32955,61**	10,63**	0,53**	642,05**
Resíduo	60	14,41	13,47	1,38	137,27	0,95	1,21	11,55	126,94	5544,85	0,95	0,10	62,81
Média		69,62	44,87	13,21	107,78	9,50	11,00	36,36	58,48	219,43	3,74	1,50	43,08
CV (%)		5,45	8,18	8,88	10,87	10,28	10,01	9,34	19,26	33,94	26,01	20,77	18,40

* e ** = Significativos a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F; ns = não significativo, pelo teste F.

Quadro 19 - Resumo da análise de variância conjunta com desdobramento das somas de quadrado da altitude e da interação altitude x genótipo nos genótipos 210, 450, 475, 675, 950 e 1150 de *Bidens pilosa* L. nas quatro altitudes, dos caracteres altura da planta (AP), comprimento do caule (CC), número de ramos (NR), número de capítulos (NC), massa seca caulinar (MC), biomassa seca aérea (BA), valor de SPAD foliar (SP), número de folhas por planta (NF), área foliar por planta (AF), área foliar média (AM), massa seca foliar (MF) e número de folhas em 1 g (N1) no estágio reprodutivo de plantas em senescência

FV	GL	Quadrados médios											
		AP	CC	NR	NC	MC	BA	SP	NF	AF	AM	MF	N1
Bloco/Altitude	12	51,66*	21,31 ^{ns}	6,24**	672,00**	4,07**	3,06**	16,61 ^{ns}	303,91*	3095,99 ^{ns}	0,76 ^{ns}	0,22**	311,10*
Altitude (A)	(3)	4764,54**	934,93**	25,47**	21228,88**	250,19**	280,41**	102931**	2908,69**	57606,08**	8,89**	2,61**	5626,03**
Genótipo (G)	5	1727,90**	2171,74**	15,42**	2893,25**	37,80**	44,65**	86,83**	797,21**	4048,48 ^{ns}	0,91 ^{ns}	0,39**	997,20**
A x G	(15)	55,32**	55,27**	3,11 ^{ns}	301,57 ^{ns}	2,45**	2,41**	53,03**	569,99**	2335,72 ^{ns}	1,93**	0,08 ^{ns}	477,68**
A / G210	3	477,98**	11,15 ^{ns}	2,02 ^{ns}	4437,38**	23,64**	27,85**	42,54*	2723,06**	6752,55*	4,64**	0,31**	3684,37**
A / G450	3	1064,93**	134,68**	3,52 ^{ns}	2554,81**	37,71**	43,04**	328,59**	670,93**	6254,27*	2,12**	0,31**	1486,04**
A / G475	3	416,76**	113,24**	13,46**	3140,02**	42,38**	49,10**	263,47**	383,04 ^{ns}	13719,20**	2,43**	0,40**	242,15 ^{ns}
A / G675	3	663,22**	156,54**	5,94 ^{ns}	6000,18**	45,84**	49,38**	245,67**	833,35**	11266,33**	1,51*	0,36**	587,20*
A / G950	3	1263,16**	416,51**	15,06**	1934,19**	59,77**	64,79**	210,61**	914,47**	23128,60**	6,30**	0,97**	1262,69**
A / G1150	3	1155,06**	379,18**	1,02 ^{ns}	4670,14**	53,10**	58,28**	203,56**	233,77 ^{ns}	8163,72*	1,55*	0,65**	751,99**
Resíduo	60	21,61	11,35	2,19	262,04	0,78	0,83	10,21	139,92	2062,85	0,51	0,06	159,50
Média		69,18	44,86	12,44	129,57	9,07	10,22	35,95	58,02	131,86	2,31	1,14	55,68
CV (%)		6,72	7,51	11,91	12,49	9,76	8,92	8,89	20,39	34,45	30,76	20,59	22,68

* e ** = Significativos a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F; ns = não significativo, pelo teste F.

Nas análises conjuntas dos caracteres (Quadro 20), os quadrados médios da interação genótipo x altitude foram significativos indicando que a resposta plástica fenotípica foi diferente entre os genótipos, exceto na característica número de nós (NO). A interação significativa genótipo x estágio reprodutivo demonstra que a resposta plástica fenotípica dos genótipos foi diferente, exceto com relação ao comprimento do caule (CC), número de nós (NO) e número de folhas em 1 grama (N1).

4.2.3. Magnitudes da plasticidade fenotípica

No Quadro 21, estão as estimativas do coeficiente de variação ambiental (CVa) e, no Quadro 22, as do índice de determinação ambiental (Ia^2), que indicam as magnitudes da plasticidade fenotípica dos genótipos em relação às características morfométricas observadas nos quatro estádios reprodutivos.

Adotando a classificação das magnitudes de plasticidade citada por SCHLICHTING e LEVIN (1984) (CVa>20% alta, CVa 10-20% média e CVa<10% baixa), pode-se admitir que em doze características as magnitudes de plasticidade foram altas, CVa = 26,49 (Quadro 21). O menor coeficiente de variação ambiental (CVa) médio foi estimado no número de ramos (NR) e o maior na área foliar por planta (AF), respectivamente, 11,23 e 46,02.

Os índices de determinação ambiental (Ia^2) demonstraram que a variação total atribuída aos efeitos de altitude foi alta nos genótipos, cuja média foi 0,8358 (Quadro 22). Os caracteres morfométricos foram altos, exceto o número de ramos (NR, 0,5657). O genótipo 950 teve o maior índice (0,9279, no estágio senescente) e o genótipo 210 teve o menor (0,4921, no estágio de início de frutificação).

Quadro 20 - Resumo das análises de variância conjunta dos caracteres altura da planta (AP), comprimento do caule (CC), número de nós (NO), número de ramos (NR), número de capítulos (NC), massa seca caulinar (MC), biomassa seca aérea (BA), valor de SPAD foliar (SP), número de folhas por planta (NF), área foliar por planta (AF), área foliar média (AM), massa seca foliar (MF) e número de folhas em 1 grama (N1) dos quatro estádios reprodutivos dos seis genótipos de *Bidens pilosa* L., mantidos em cultivo nas quatro altitudes

FV	GL	Quadrados médios												
		AP	CC	NO	NR	NC	MC	BA	SP	NF	AF	AM	MF	N1
Bloco/Altitude	12	156,20**	82,54**	8,78**	31,76**	1754,76**	11,41**	13,92**	30,68**	416,64**	22938,83*	2,43**	0,32**	145,03*
Altitude (A)	3	13971,16**	3503,58**	1,89*	96,46**	26111,65**	806,87**	1073,32**	901,47**	7879,00**	181729,00**	154,79**	20,87**	8614,80**
Genótipo (G)	5	8552,29**	8443,55**	61,33**	35,65**	3192,21**	158,10**	220,76**	371,62**	3103,39**	191216,30**	25,87**	6,78**	3324,82**
Estádio (E)	3	10111,17**	8,41 ^{ns}	0,84 ^{ns}	15,98**	247002,60**	611,27**	406,69**	4990,63**	14514,37**	4216871,00**	426,67**	61,35**	12615,14**
A x G	15	182,65**	130,67**	0,48 ^{ns}	9,30**	871,45**	7,13**	8,67**	33,29**	478,07**	39713,70**	5,01**	0,63**	417,72**
A x E	9	279,48**	16,78 ^{ns}	0,44 ^{ns}	8,64**	3748,34**	21,40**	15,82**	398,19**	3515,80**	373127,60**	23,12**	3,49**	1665,83**
G x E	15	157,96**	15,32 ^{ns}	0,50 ^{ns}	3,23*	1080,80**	1,52*	2,07*	56,13**	328,64*	52613,44**	5,97**	1,05**	110,01 ^{ns}
A x G x E	45	54,11**	14,17 ^{ns}	0,45 ^{ns}	2,23 ^{ns}	206,80*	1,90**	2,56**	53,19**	528,02**	36564,52**	2,35**	0,35**	166,55**
Resíduo	276	16,69	14,98	0,55	1,88	140,01	0,84	1,08	10,47	176,32	10597,94	0,84	0,12	74,61
Média		63,63	45,07	8,59	12,65	78,50	7,73	9,73	42,07	68,74	354,42	4,77	2,00	40,52
CV (%)		6,42	8,59	8,62	10,83	15,07	11,87	10,66	7,69	19,32	29,05	19,24	17,43	21,32

* e ** = Significativos a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F; ns = não significativo, pelo teste F.

Quadro 21 - Estimativas dos coeficientes de variação ambiental (CVa) dos caracteres morfométricos nos quatro estádios reprodutivos (plantas em florescimento (FL), em início de frutificação (IF), em frutificação plena (FP) e em senescência (SE)) dos seis genótipos de *Bidens pilosa* L. crescidos em quatro altitudes

Estádios	Genótipos	AP	CC	NR	NC	MC	BA	SP	NF	AF	AM	MF	N1	Média
FL	210	9,02	9,02	8,18	43,05	34,50	27,68	7,80	19,20	46,34	32,76	22,91	7,39	22,32
	450	21,36	21,36	11,61	43,88	40,37	35,69	5,96	20,53	48,06	35,05	29,15	12,08	27,09
	475	14,20	13,38	15,06	27,75	44,71	38,58	9,80	24,39	61,07	36,31	32,65	14,71	27,72
	675	16,80	16,34	32,15	14,11	44,73	38,65	10,00	23,59	49,53	31,25	32,86	16,04	27,17
	950	9,32	16,62	19,18	53,50	22,10	20,33	5,31	3,47	25,30	22,94	19,90	16,10	19,51
	1150	27,77	15,72	19,64	51,01	57,32	47,08	16,28	17,90	49,28	37,18	28,42	11,34	31,58
IF	210	27,62	12,69	5,47	24,09	52,43	44,47	4,70	36,90	54,50	24,07	24,83	15,38	27,26
	450	21,46	12,07	6,43	27,58	40,18	34,03	9,17	10,26	24,60	17,26	16,98	15,82	19,65
	475	17,13	10,68	7,98	23,80	46,64	43,35	13,97	24,82	55,37	34,19	35,52	14,23	27,31
	675	18,11	13,10	10,82	27,67	42,37	37,55	9,83	23,96	41,33	24,12	25,38	17,93	24,35
	950	19,38	13,31	6,44	17,60	28,04	32,07	13,96	32,76	69,04	45,55	51,75	42,39	31,02
	1150	20,45	11,86	6,15	36,74	36,18	30,46	18,63	20,67	39,37	31,12	16,35	10,74	23,23
PF	210	23,88	9,57	8,09	28,00	44,48	40,59	10,63	30,45	36,03	24,32	26,07	28,56	25,89
	450	18,27	14,59	8,76	16,53	35,30	31,11	14,55	22,56	55,62	40,69	32,99	40,38	27,61
	475	17,54	13,46	14,15	21,54	39,07	36,13	9,91	37,76	86,65	49,73	44,83	38,83	34,13
	675	19,84	14,21	13,53	23,47	36,65	32,30	16,33	28,81	24,64	25,67	12,82	33,63	23,49
	950	19,60	14,50	7,85	12,50	34,16	32,50	11,64	28,05	56,78	39,47	40,45	74,33	30,99
	1150	20,37	14,54	11,24	25,11	39,65	36,40	9,57	17,91	43,54	38,09	25,98	34,00	26,37
SE	210	22,00	7,61	5,99	24,16	39,56	37,75	8,49	47,63	36,59	47,23	32,76	43,06	29,40
	450	22,47	12,99	7,47	23,43	35,62	33,37	24,60	22,22	27,05	28,29	23,02	36,72	24,77
	475	15,47	10,94	13,10	21,40	33,49	32,15	24,90	16,62	44,92	34,80	26,89	15,17	24,16
	675	17,76	12,96	9,33	26,20	34,71	31,79	23,13	20,34	37,57	30,67	23,06	20,74	24,02
	950	23,16	19,60	16,38	17,67	38,76	36,12	20,26	27,51	51,53	47,98	42,15	33,88	31,25
	1150	21,91	18,17	4,47	26,58	35,61	33,52	18,72	15,22	39,82	28,84	34,87	28,00	25,48
Média		19,37	13,72	11,23	27,39	39,03	35,15	13,25	23,90	46,02	33,65	29,28	25,89	26,49

Quadro 22 - Estimativas dos índices de determinação ambiental (Ia^2) dos caracteres morfométricos nos quatro estádios reprodutivos (plantas em florescimento (FL), em início de frutificação (IF), em frutificação plena (FP) e em senescência (SE)) dos seis genótipos de *Bidens pilosa* L. crescidos em quatro altitudes

Estádios	Genótipos	AP	CC	NR	NC	MC	BA	SP	NF	AF	AM	MF	NI	Média
FL	210	0,4416	0,4416	0,1794	0,9005	0,9220	0,9359	0,9094	0,8193	0,9599	0,9130	0,9318	0,2146	0,7141
	450	0,9269	0,9269	0,2922	0,8763	0,9770	0,9724	0,8055	0,6597	0,9488	0,9418	0,9463	0,5618	0,8196
	475	0,9202	0,9105	0,8967	0,5411	0,9726	0,9703	0,8776	0,9482	0,9400	0,9187	0,9560	0,6832	0,8779
	675	0,9337	0,8761	0,4548	0,7346	0,9203	0,9342	0,9059	0,9029	0,9454	0,9611	0,9542	0,8024	0,8605
	950	0,9176	0,9473	0,9359	0,8229	0,6981	0,8253	0,2258	-	0,8617	0,8947	0,8788	0,8436	0,8047
	1150	0,9850	0,8964	0,8929	0,8886	0,9714	0,9711	0,9622	0,8064	0,9722	0,9710	0,9577	0,7120	0,9156
IF	210	0,9857	0,7191	-	0,9536	0,9809	0,9774	0,4698	0,7339	0,7287	0,8577	0,8695	0,2104	0,7715
	450	0,9790	0,9502	-	0,8687	0,9676	0,9579	0,9056	0,7176	0,8896	0,9106	0,7923	0,8380	0,8888
	475	0,9370	0,6036	0,5578	0,8156	0,9876	0,9882	0,8836	0,9091	0,9457	0,9626	0,9680	0,8957	0,8712
	675	0,9590	0,8841	0,5460	0,8610	0,9856	0,9833	0,8201	0,9623	0,9486	0,8477	0,9558	0,8680	0,8851
	950	0,9683	0,8962	-	0,6631	0,9229	0,9363	0,9514	0,8759	0,9686	0,9916	0,9339	0,9153	0,9112
	1150	0,9764	0,8694	-	0,8954	0,9476	0,9527	0,9507	0,9101	0,9280	0,9244	0,7984	0,7350	0,8989
PF	210	0,9626	0,0415	0,0030	0,9233	0,9871	0,9843	0,7111	0,7528	0,7555	0,8438	0,7656	0,9052	0,7197
	450	0,9492	0,9231	0,2046	0,7932	0,9657	0,9595	0,9526	0,9005	0,9075	0,8773	0,9514	0,9762	0,8634
	475	0,9789	0,9467	0,8083	0,8609	0,9805	0,9790	0,8421	0,9240	0,9581	0,9309	0,9495	0,8894	0,9207
	675	0,9646	0,8831	0,8130	0,8008	0,9736	0,9793	0,9300	0,9151	0,0123	0,3414	0,1781	0,8923	0,7236
	950	0,9713	0,9028	0,5509	0,7490	0,9374	0,9288	0,7426	0,8923	0,8986	0,9127	0,8703	0,9881	0,8621
	1150	0,9828	0,9228	0,7275	0,9279	0,9673	0,9694	0,8391	0,6502	0,9337	0,9531	0,8432	0,9573	0,8895
SE	210	0,9276	0,2457	-	0,9359	0,9653	0,9667	0,7328	0,9102	0,8119	0,9242	0,7745	0,9578	0,8321
	450	0,9664	0,9052	0,4704	0,9165	0,9566	0,9630	0,9492	0,8438	0,7253	0,7501	0,8143	0,8408	0,8418
	475	0,9662	0,9106	0,8847	0,9131	0,9834	0,9872	0,9722	0,3620	0,7614	0,5929	0,9186	0,4803	0,8111
	675	0,9556	0,8617	0,0509	0,9219	0,9632	0,9742	0,9405	0,8495	0,8351	0,6822	0,6924	0,5834	0,7759
	950	0,9842	0,9783	0,9132	0,8497	0,9880	0,9925	0,9777	0,8059	0,8964	0,9641	0,9140	0,8708	0,9279
	1150	0,9776	0,9576	-	0,9032	0,9543	0,9606	0,9363	0,5424	0,6454	0,5400	0,7847	0,7569	0,8145
Média		0,9382	0,8083	0,5657	0,8465	0,9532	0,9604	0,8414	0,8084	0,8408	0,8503	0,8500	0,7658	0,8358

4.3. Caracteres morfométricos

4.3.1. Altura da planta (AP)

Nas análises individuais (Quadros 16, 17, 18 e 19) os valores foram significativos nas altitudes e não significativos na interação genótipo 210 x altitude, no estágio de florescimento, por esse genótipo ter florescido rapidamente (em cerca de 50 dias, Quadro 15) provocando parada de crescimento antes de ser detectado efeito da altitude.

Os coeficientes de variação ambiental (CVa) indicaram plasticidade fenotípica média, CVa 19,37 (Quadro 21). No estágio de plantas em florescimento (FL), o menor CVa, 9,02 (genótipo 210) e o maior CVa, 27,77 (genótipo 1150), correspondem, respectivamente, a magnitudes de plasticidade baixa (CVa <10) e alta (CVa >20). KAMADA (1998), em manjerição (*Ocimum* sp.), detectou CVa baixo em manjerição branco (CVa = 8,23), médio em basilicão (CVa=12,04) e alto em manjerição-roxo (CVa = 24,19).

Os índices de determinação ambiental (Ia^2) foram, em média, altos ($Ia^2 = 0,9382$) (Quadro 22). O maior e o menor valor de Ia^2 foi detectado no genótipo 210, respectivamente no florescimento (0,9857) e início da frutificação (0,4416). KAMADA et al. (1999) detectaram no manjerição semelhança de resposta no CVa e Ia^2 na altura da planta, o que não foi observado neste estudo.

O padrão de plasticidade, na característica altura da planta, foi divergente durante o florescimento e semelhante nos demais estádios reprodutivos (Quadro 23).

4.3.2. Comprimento do caule (CC)

De acordo com os Quadros 16, 17, 18 e 19, ocorreram valores significativos nas quatro altitudes nos genótipos e efeito não significativo na interação genótipo 210 x altitude, no estágio de florescimento, frutificação plena e senescência. Esse fato pode estar relacionado ao florescimento precoce e sincronizado do genótipo 210 nas altitudes, pois a gema apical do ramo principal se diferencia primeiro em flor e cessa o crescimento do caule.

Quadro 23 - Matrizes contendo os coeficientes de correlação de Pearson dos caracteres altura da planta (AP), comprimento do caule (CC), número de ramos (NR), número de capítulos (NC), massa seca caulinar (MC), biomassa seca aérea (BA), valor de SPAD foliar (SP), número de folhas por planta (NF), área foliar por planta (AF), área foliar média (AM), massa seca foliar (MF) e número de folhas em 1 grama (N1) dos seis genótipos de *Bidens pilosa* L. crescidos nas altitudes de 198, 479, 739 e 962 m e analisados nos quatro estádios reprodutivos

Caráter AP																				
Genótipos	Florescimento					Início da frutificação					Frutificação plena					Senescência				
	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150
210	0,4824	-	-	-	0,3493	0,8296	0,7124	0,8598	0,8297	0,7989	0,9021	0,8693	0,8932	0,9194	0,9421	0,8410	0,8769	0,8602	0,8832	0,8496
	*	0,3837	0,0058	0,1084	ns	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
		ns	ns	ns																
450		0,3788	0,5881	0,4885	0,7830		0,9037	0,9041	0,9481	0,9415		0,8148	0,8939	0,9619	0,8972		0,8388	0,8731	0,9058	0,9109
		ns	*	*	*		*	*	*	*		*	*	*	*		*	*	*	*
475			0,7344	0,6634	0,5997			0,8336	0,9284	0,8687			0,8084	0,8391	0,8895			0,9296	0,9324	0,9053
			*	*	*			*	*	*			*	*	*			*	*	*
675				0,6231	0,6441				0,9134	0,9151				0,9205	0,8869				0,8765	0,9020
				*	*				*	*				*	*				*	*
950					0,6825					0,9282					0,9316					0,8982
					*					*					*					*

Caráter CC																				
Genótipos	Florescimento					Início da frutificação					Frutificação plena					Senescência				
	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150
210	0,4824	-	0,2127	0,1326	0,1945	0,2925	0,0272	0,2172	0,1335	0,1927	0,4221	0,0604	0,3012	0,3121	0,2313	0,2136	0,4435	-	0,3491	0,2788
	*	0,0973	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	0,0523	ns	ns
		ns																ns		
450		0,6767	0,7857	0,6695	0,7101		0,6664	0,7910	0,7681	0,7194		0,6173	0,7464	0,8641	0,6995		0,6848	0,6100	0,7686	0,7710
		*	*	*	*		*	*	*	*		*	*	*	*		*	*	*	*
475			0,7023	0,7716	0,6946			0,4970	0,5978	0,6296			0,7031	0,7956	0,6906			0,6617	0,9017	0,8446
			*	*	*			ns	*	*			*	*	*			*	*	*

675	0,7653	0,7324	0,8473	0,8190	0,8368	0,7934	0,7156	0,7432
	*	*	*	*	*	*	*	*
950		0,7902		0,7631		0,7252		0,8968
		*		*		*		*

Caráter NR

Genótipos	Florescimento					Início da frutificação					Frutificação plena					Senescência				
	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150
210	-	-	0,3671	-	-	0,523	0,3048	0,3275	0,1894	0,2964	0,4228	0,0733	0,2947	0,0018	0,0284	0,2095	0,2235	0,3638	-	0,3256
	0,0822	0,0820	ns	0,0741	0,0810	9*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,2032	ns
	ns	ns		ns	ns														ns	
450		0,680	0,639	0,559	0,632		0,4198	0,657	0,1940	0,2685		0,556	0,759	0,600	0,584		0,470	0,696	0,595	0,1829
		1*	6*	2*	7*		ns	8*	ns	ns		9*	7*	7*	8*		7*	3*	4*	ns
475			0,822	0,877	0,839			0,674	0,2666	0,510			0,792	0,448	0,821			0,556	0,546	0,3645
			4*	3*	4*			0*	ns	1*			9*	0*	1*			3*	5*	ns
675				0,749	0,767				0,546	0,675				0,616	0,796				0,435	0,4043
				3*	7*				6*	8*				3*	8*				5*	ns
950					0,675					0,603					0,612					0,438
					2*					0*					9*					7*

* = Significativo a 5% de probabilidade; ns = não significativo, pelo teste T.

Quadro 23 - Cont.

Caráter NC																				
Genótipos	Florescimento					Início da frutificação					Frutificação plena					Senescência				
	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150
210	0,765 8*	0,0059 ns	0,3543 ns	0,2312 ns	0,3306 ns	0,782 9*	0,585 3*	0,605 1*	0,0268 ns	0,733 2*	0,788 5*	0,873 7*	0,814 8*	0,727 0*	0,813 5*	0,824 6*	0,873 9*	0,807 1*	0,611 8*	0,836 9*
450		0,2411 ns	0,5548 *	0,4247 ns	0,2950 ns		0,704 1*	0,660 1*	0,2703 ns	0,691 3*		0,791 9*	0,706 9*	0,774 0*	0,635 7*		0,726 9*	0,824 0*	0,594 5*	0,737 8*
475			0,4007 ns	0,2629 ns	0,0489 ns			0,766 1*	- 0,1188 ns	0,725 8*			0,885 2*	0,725 6*	0,859 3*			0,810 5*	0,691 1*	0,737 8*
675				0,639 6*	0,3937 ns				- 0,0319 ns	0,867 3*				0,665 1*	0,895 6*				0,700 1*	0,805 3*
950					- 0,1778 ns					- 0,1512 ns					0,712 5*					0,664 8*

Caráter MC																				
Genótipos	Florescimento					Início da frutificação					Frutificação plena					Senescência				
	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150
210	0,700 9*	0,3611 ns	0,4054 ns	0,1614 ns	0,625 1*	0,882 9*	0,971 1*	0,948 6*	0,887 8*	0,793 6*	0,911 3*	0,936 9*	0,850 8*	0,890 8*	0,860 3*	0,913 7*	0,915 8*	0,897 5*	0,902 1*	0,852 0*
450		0,853 7*	0,846 8*	0,655 6*	0,965 0*		0,946 3*	0,897 5*	0,930 8*	0,946 5*		0,919 7*	0,898 7*	0,866 3*	0,867 8*		0,893 1*	0,929 7*	0,906 4*	0,916 1*
475			0,832 0*	0,631 0*	0,842 8*			0,968 9*	0,930 4*	0,859 7*			0,949 0*	0,933 7*	0,954 5*			0,934 9*	0,956 7*	0,837 2*
675				0,716 2*	0,881 1*				0,888 6*	0,829 6*				0,888 8*	0,938 8*				0,949 7*	0,932 8*

950	0,743 4*					0,891 7*					0,930 5*					0,843 5*				
Caráter BA																				
	Florescimento					Início da frutificação					Frutificação plena					Senescência				
Genótipos	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150
210	0,812 1*	0,673 1*	0,636 5*	0,507 8*	0,769 1*	0,870 8*	0,954 8*	0,916 4*	0,870 1*	0,777 1*	0,895 6*	0,893 4*	0,865 8*	0,894 1*	0,856 9*	0,924 9*	0,918 8*	0,898 7*	0,913 8*	0,849 8*
450		0,913 9*	0,900 0*	0,822 8*	0,980 2*		0,933 6*	0,869 0*	0,959 8*	0,943 4*		0,886 2*	0,893 2*	0,845 5*	0,845 1*		0,907 6*	0,928 6*	0,913 5*	0,900 9*
475			0,856 8*	0,791 8*	0,896 5*			0,964 5*	0,917 1*	0,854 7*			0,951 6*	0,908 2*	0,956 2*			0,952 7*	0,960 4*	0,846 0*
675				0,773 4*	0,908 5*				0,859 6*	0,809 8*				0,887 9*	0,942 2*				0,947 9*	0,926 8*
950					0,843 9*					0,919 7*					0,928 3*					0,843 7*

* = Significativo a 5% de probabilidade; ns = não significativo, pelo teste T.

Quadro 23 - Cont.

Caráter SP																				
Genótipos	Florescimento					Início da frutificação					Frutificação plena					Senescência				
	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150
210	0,741 2*	0,754 4*	0,871 6*	0,689 6*	0,838 0*	0,453 5*	0,689 9*	0,3039 ns	- 0,3893 ns	0,437 1*	0,3367 ns	0,2309 ns	0,2068 ns	- 0,1249 ns	0,1498 ns	0,438 5*	0,522 9*	0,525 1*	0,527 0*	0,1527 ns
450		0,815 9*	0,661 3*	0,740 3*	0,619 9*		0,729 1*	0,646 7*	- 0,6962 *	0,775 0*		0,656 9*	0,862 4*	0,679 9*	0,748 3*		0,879 1*	0,881 6*	0,876 4*	0,515 3*
475			0,702 6*	0,677 4*	0,705 7*			0,775 6*	- 0,5523 *	0,723 5*			0,735 7*	0,3612 ns	0,483 5*			0,859 3*	0,890 6*	0,583 6*
675				0,687 1*	0,810 5*				- 0,4178 ns	0,674 7*				0,593 8*	0,782 3*				0,828 8*	0,627 8*
950					0,704 6*					- 0,7998 *					0,695 7*					0,3394 ns

Caráter NF																				
Genótipos	Florescimento					Início da frutificação					Frutificação plena					Senescência				
	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150
210	0,579 5*	0,800 2*	0,654 4*	0,519 5*	0,740 4*	0,3285 ns	0,3864 ns	0,1836 ns	0,440 6*	0,2846 ns	0,486 9*	0,3618 ns	0,2953 ns	0,438 7*	0,4007 ns	0,592 2*	0,3161 ns	0,2107 ns	0,0884 ns	0,0494 ns
450		0,451 1*	0,640 8*	0,3989 ns	0,780 0*		0,562 2*	0,718 6*	0,454 7*	0,593 5*		0,702 6*	0,683 0*	0,696 8*	0,4066 ns		0,0975 ns	0,510 4*	0,2141 ns	0,0296 ns
475			0,581 1*	0,478 8*	0,743 1*			0,785 7*	0,615 7*	0,771 3*			0,500 4*	0,644 1*	0,3097 ns			0,3838 ns	0,653 6*	0,586 8*

675	0,3198 ns	0,629 7*	0,2869 ns	0,823 5*	0,811 7*	0,497 3*	0,677 5*	0,2950 ns
950		0,632 3*		0,4078 ns		0,770 8*		0,444 1*

Caráter AF

Genótipos	Florescimento					Início da frutificação					Frutificação plena					Senescência				
	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150
210	0,871 3*	0,815 1*	0,896 3*	0,753 3*	0,871 8*	0,716 9*	0,667 3*	0,652 9*	0,558 6*	0,3710 ns	0,467 7*	0,456 0*	0,435 7*	0,638 9*	0,3839 ns	0,641 1*	0,3893 ns	0,678 1*	0,4011 ns	0,515 3*
450		0,620 4*	0,943 3*	0,796 8*	0,890 7*		0,759 7*	0,723 6*	0,697 6*	0,434 1*		0,706 3*	0,551 7*	0,720 6*	0,663 8*		0,4034 ns	0,613 6*	0,546 2*	0,614 3*
475			0,726 3*	0,596 6*	0,740 3*			0,774 4*	0,722 3*	0,552 3*			0,469 3*	0,770 0*	0,714 2*			0,435 3*	0,588 5*	0,1953 ns
675				0,806 0*	0,869 9*				0,541 2*	0,439 7*				0,567 4*	0,3773 ns				0,626 3*	0,587 0*
950					0,817 7*					0,769 1*					0,759 2*					0,429 3*

* = Significativo a 5% de probabilidade; ns = não significativo, pelo teste T.

Quadro 23 - Cont.

Caráter AM																				
Genótipos	Florescimento					Início da frutificação					Frutificação plena					Senescência				
	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150
210	0,870 1*	0,706 1*	0,819 9*	0,736 1*	0,945 3*	0,529 3*	0,603 3*	0,726 5*	0,628 6*	0,669 0*	0,456 9*	0,2273 ns	0,609 0*	0,434 0*	0,578 5*	0,625 5*	- 0,3132 ns	- 0,0312 ns	0,0274 ns	0,4019 ns
450		0,658 7*	0,891 2*	0,748 9*	0,874 3*		0,862 9*	0,704 8*	0,698 0*	0,3713 ns		0,543 7*	0,559 0*	0,732 3*	0,753 3*		- 0,1129 ns	0,3421 ns	0,4092 ns	0,598 1*
475			0,734 3*	0,547 0*	0,729 9*			0,782 4*	0,730 4*	0,4013 ns			0,3381 ns	0,689 5*	0,681 8*			0,2593 ns	0,3888 ns	0,1266 ns
675				0,738 1*	0,865 5*				0,607 3*	0,4002 ns				0,557 0*	0,575 3*				0,611 0*	0,447 8*
950					0,779 1*					0,692 2*					0,710 5*					0,3099 ns
Caráter MF																				
Genótipos	Florescimento					Início da frutificação					Frutificação plena					Senescência				
	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150
210	0,818 1*	0,908 8*	0,837 8*	0,858 1*	0,872 1*	0,564 2*	0,494 5*	0,4220 ns	0,605 0*	0,0238 ns	0,541 4*	0,3990 ns	0,2300 ns	0,751 2*	0,3667 ns	0,646 6*	0,640 7*	0,580 6*	0,643 0*	0,496 0*
450		0,935 8*	0,915 0*	0,866 7*	0,968 5*		0,702 9*	0,594 5*	0,817 6*	0,4162 ns		0,592 7*	0,3780 ns	0,685 5*	0,702 5*		0,813 7*	0,786 5*	0,731 6*	0,698 8*
475			0,867 0*	0,901 6*	0,934 1*			0,919 1*	0,691 8*	0,600 0*			0,1894 ns	0,652 9*	0,616 5*			0,676 2*	0,763 1*	0,527 1*
675				0,820 7*	0,920 8*				0,553 7*	0,473 7*				0,444 5*	0,571 6*				0,773 8*	0,594 2*
950					0,887					0,458					0,724					0,674

Caráter N1	4*					0*				8*				8*						
	Florescimento					Início da frutificação				Frutificação plena				Senescência						
Genótipos	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150
210	0,1674 ns	0,490 3*	0,2349 ns	0,3417 ns	0,3243 ns	0,0482 ns	- 0,0919 ns	- 0,1186 ns	0,2303 ns	0,2031 ns	0,643 4*	0,531 6*	0,576 8*	0,635 8*	0,651 4*	0,658 6*	0,0398 ns	0,434 6*	0,591 1*	0,517 8*
450	- 0,0021 ns	0,548 8*	0,2243 ns	0,4018 ns			0,610 2*	0,771 5*	0,757 6*	0,3106 ns		0,719 9*	0,785 3*	0,928 2*	0,907 6*		0,2392 ns	0,703 5*	0,453 2*	0,818 0*
475			0,1451 ns	0,679 3*	0,3893 ns			0,683 6*	0,642 2*	0,2121 ns			0,609 5*	0,817 2*	0,808 2*			0,483 1*	0,3292 ns	0,4142 ns
675				0,3881 ns	0,2753 ns				0,590 2*	0,4082 ns				0,775 5*	0,687 2*				0,427 4*	0,603 0*
950					0,601 2*					0,2898 ns					0,862 7*					0,482 2*

* = Significativo a 5% de probabilidade; ns = não significativo, pelo teste T.

Pela magnitude da plasticidade fenotípica estimada pelos coeficientes de variação ambiental (CVa) detectou-se variabilidade na plasticidade. A média de 13,72 indica magnitude média (CVa 10-20) (Quadro 21). Nas análises detectaram-se baixa e alta magnitudes, respectivamente na senescência do genótipo 210 (7,61) e no florescimento do genótipo 450 (21,36).

A média do índice de determinação ambiental (Ia^2) foi de 0,8083. Os valores variaram de 0,0415 (genótipo 210, frutificação plena) a 0,9783 (genótipo 950, senescência) indicando que pode ser encontrada plasticidade desde muito baixa até muito alta, demonstrando que deve-se avaliar a plasticidade fenotípica em várias características. Os valores dos índices de determinação ambiental (Ia^2) demonstraram que a proporção da variação total atribuída aos efeitos da altitude foi baixa no genótipo 210 por ter florescido precocemente e o tempo foi insuficiente ao efeito do ambiente, enquanto que o genótipo 950 floresceu duas semanas após o genótipo 210 o que proporcionou maior variação devido à altitude. Esse fato pode ser verificado nos valores da análise de variância não serem significativos no genótipo 210 (florescimento, frutificação plena e senescência) (Quadros 17, 18 e 19).

O padrão de plasticidade do genótipo 210 foi divergente em relação aos demais genótipos, entretanto, no comprimento do caule não houve grandes semelhanças entre os demais genótipos, significando maior influência genética do que ambiental (Quadro 23).

4.3.3. Número de ramos (NR)

Os valores dos quadrados médios dos ambientes nos estádios reprodutivos foram significativos, não se detectando significância no início da frutificação (Quadro 17). Nos quatro estádios, entre os genótipos 210 e 450 não houve diferenças significativas.

A dominância apical em *Bidens pilosa* é perdida quando a gema apical se diferencia em capítulo estimulando o desenvolvimento das gemas laterais e produção dos ramos. O florescimento, além de determinar o final do desenvolvimento apical, foi adotado como início da época de colheita, e nessa

fase todas as plantas estavam aptas a terem seus ramos desenvolvidos desde o florescimento, cujo estímulo ocorreu amplamente em todas as plantas, gerando concordância de resposta na maioria dos estádios.

Apesar da maioria dos quadrados médios terem sido não significativos, os valores dos coeficientes de variação ambiental (CVa) indicaram variabilidade na plasticidade fenotípica (Quadro 21). Nos seis genótipos e nos quatro estádios reprodutivos, foi detectada média plasticidade fenotípica (CVa 11,23). O genótipo 1150 teve o maior CVa (19,64) no florescimento e o menor, (CVa 5,47), foi observado no genótipo 210 no início da frutificação.

Os valores dos índices de determinação ambiental (Ia^2) foram positivos e negativos com a menor média dos caracteres morfométricos (0,5657) (Quadro 22). Estimativas negativas do Ia^2 foram desconsideradas e observadas no início da frutificação e em plena frutificação. Os menores valores de Ia^2 foram observados no genótipo 210 e demonstram que a proporção da variação total atribuída aos efeitos da altitude foi baixa e que a maior proporção da variação foi devido ao genótipo e não ao ambiente, o que pode ser verificado pelos valores não significantes na análise de variância do genótipo 210 (Quadros 16, 17, 18 e 19).

Houve divergente padrão de plasticidade, sendo o genótipo 210 o mais divergente (Quadro 23).

4.3.4. Número de capítulos (NC)

Houve valores significativos dos quadrados médios das altitudes nos estádios reprodutivos variados, não sendo detectados valores significativos no florescimento, nos genótipos 475 e 675, e início da frutificação, no genótipo 950 (Quadro 17).

Por computar o número de capítulos em floração e em frutificação, constata-se que a altitude influenciou o número de capítulos na altitude correspondente, sendo os maiores valores de coeficientes de variação respectivamente 29,80 e 15,02 (Quadros 16 e 17).

Houve magnitude da plasticidade fenotípica, com média de 27,39, indicando alta magnitude (CVa >20) (Quadro 21). Foram detectadas magnitudes médias e, principalmente, altas. A menor e a maior magnitude foi no genótipo

950, respectivamente na frutificação plena (12,50) e florescimento, (53,50). SCHLICHTING e LEVIN (1984), estudando a plasticidade fenotípica da planta anual *Phlox*, obtiveram valores de plasticidade de cerca de 20% quanto ao número de capítulos.

Os índices de determinação ambiental (Ia^2) foram altos, principalmente na senescência, e a média dessa característica foi de 0,8465. O valor maior, 0,9536, foi no genótipo 210, no início da frutificação e o menor valor, 0,5411, no genótipo 475, no florescimento (Quadro 22). Os altos valores de Ia^2 indicam que esse caráter é fortemente influenciado pelo local de cultivo e, por isso, a proporção da variação total é, em média, 84,65% devido à altitude.

No Quadro 23 encontram-se as estimativas de padrão de plasticidade, sendo mantido padrão semelhante nos genótipos 210 e 450. As semelhanças foram aumentando, com o avançar dos estádios reprodutivos, entre os pares de genótipos 210 e 475, 210 e 1150 e 450 e 675.

A influência da altitude na produção de capítulos foi observada em funcho (*Foeniculum vulgare*), que ao nível do mar produzem mais aquênios e esses com maior massa, do que quando cultivado em altitudes mais elevadas (MATTOS, 1984). A explicação possível dessa diminuição do número de capítulos com o aumento da altitude pode ser devido à radiação solar. Segundo JONES (1994), a radiação solar aumenta com a altitude e, principalmente, os raios UV, promovendo o fechamento estomatal e inibindo o desenvolvimento vegetal.

4.3.5. Massa seca caulinar (MC)

Ocorreram valores significativos nos genótipos nas quatro altitudes e efeito não significativo na interação genótipo 950 x altitude no florescimento (Quadros 16, 17, 18 e 19). Isso evidencia a plasticidade dos genótipos nas altitudes de cultivo.

A magnitude da plasticidade fenotípica estimada pelos coeficientes de variação ambiental (CVa) e índices de determinação ambiental (Ia^2) indicaram alta plasticidade fenotípica (valor médio de CVa 39,03 e de Ia^2 0,9532) (Quadros 21 e 22). O CVa estima que a resposta de cada genótipo é diferente nas altitudes

e estádios reprodutivos (Quadro 21). O alto valor de Ia^2 demonstra que a quase totalidade da variação total é atribuída aos efeitos da altitude nos genótipos (Quadro 22). KAMADA (1998) observou alta magnitude de plasticidade em manjerição (*Ocimum* sp.), com valores de CVa maiores que 50%.

O genótipo 210, no florescimento, teve padrão de plasticidade divergente dos demais. A semelhança entre os genótipos foi alta no início da frutificação, na frutificação plena e na senescência. Nota-se forte influência ambiental nessa característica, estando o padrão de plasticidade correlacionado com a adaptabilidade a altitudes (Quadro 23).

4.3.6. Biomassa aérea seca (BA)

Os valores dos quadrados médios de BA foram significativos nas altitudes e nos estádios reprodutivos (Quadros 16, 17, 18 e 19).

As diferenças de biomassa aérea seca que compreende as massas caulinares e foliares refletem a plasticidade das plantas de mesmo genótipo entre as altitudes, sendo que a magnitude da plasticidade fenotípica, estimada pelos coeficientes de variação ambiental (CVa) (35,15) e índice de determinação ambiental (Ia^2) (0,9604), indicaram alta magnitude de plasticidade (Quadros 21 e 22). Os altos valores de CVa comprovam que a altitude influencia a produção de biomassa aérea (Quadro 21). SCHLICHTING e LEVIN (1984), estudando a plasticidade fenotípica da planta anual *Phlox*, detectaram valores de plasticidade de cerca de CVa 30% na BA.

Os índices de determinação ambiental (Ia^2) foram altos, principalmente na senescência, com o máximo 0,9536 no genótipo 210 (início da frutificação), e o mínimo 0,5411 no genótipo 475 (florescimento) (Quadro 22). Os valores altos de Ia^2 revelam que a variação possui a maior parte atribuída aos efeitos da altitude (Quadro 22), causando respostas genotípicas confirmadas pelos valores da análise de variância significativos nos genótipos (Quadros 16, 17, 18 e 19).

No Quadro 23 estão as estimativas de padrão de plasticidade, com destaque ao genótipo 950 que diferiu, em direção e sentido, no florescimento e início da frutificação e em sentido nos demais estádios reprodutivos. Há tendência de valores crescentes observados do florescimento até a senescência.

Essa tendência plástica na mesma direção e sentido indica que a altitude influencia uniformemente os genótipos.

4.3.7. Valor de SPAD foliar (SP)

O SPAD estima a quantidade relativa de clorofila das folhas de maneira rápida e não destrutiva, sendo essas detectadas sobre a superfície da folha. Essa quantificação foi utilizada como indicador das condições dos genótipos. O valor de SPAD foliar foi determinado pelo aparelho SPAD-502 (Minolta Co. Ltd.) e pode variar de 0 até mais de 100 SPAD (unidade de medida) (MINOLTA, 1989). Nas altitudes e estádios, apenas os genótipos 210, no início da frutificação e frutificação plena; e 950, no florescimento, foram não significativos (Quadros 16, 17 e 18). As médias de SPAD foram decrescentes em relação aos estádios reprodutivos, indicando o avançar da senilidade das folhas e, conseqüentemente, das plantas. Nos Quadros 16 a 19, observam-se valores de 50,81, 45,16, 36,36 e 35,95, respectivamente no florescimento, início de frutificação, frutificação plena e senescência.

Os valores dos coeficientes de variação ambiental (CVa) foram baixos (CVa <10) a médios (CVa 10-20), no florescimento, início de frutificação e frutificação plena, sendo médios a altos (CVa >20) na senescência (Quadro 21). Nos genótipos, obteve-se o valor médio de SPAD de 13,25, indicando média plasticidade fenotípica. No genótipo 210, foi detectado o menor valor de CVa, 4,70 (início da frutificação) e no genótipo 475 o maior valor, 24,90 (senescência).

Os valores dos índices de determinação ambiental (Ia^2) foram altos, indicando altas magnitudes de plasticidade (0,8414 em média) (Quadro 22). Interessante notar os valores mínimo e máximo de Ia^2 do genótipo 950, respectivamente, 0,2258 no florescimento e 0,9777 na senescência, indicativos de que a resposta da plasticidade expressa-se no tempo de exposição do genótipo à variável ambiental (plasticidade fenotípica temporal). Os valores de Ia^2 demonstram que a proporção da variação total atribuída aos efeitos da altitude foi alta nos genótipos (Quadro 22) e que a maior proporção da variação total desse caráter é devida ao ambiente. Quando a maior proporção da variação deve-se ao

genótipo, pode-se verificar ausência de significância do caráter na análise de variância, como o caso do genótipo 950, no florescimento (Quadro 16).

O padrão de plasticidade foi divergente entre os genótipos, considerando as altitudes. O genótipo 950, no florescimento, diferiu de todos em direção e sentido de padrão de resposta plástica. A variação genotípica nos estádios reprodutivos pode enfatizar os graus de senilidade intrínsecos nos genótipos ou causados por estímulos ambientais (Quadro 23).

4.3.8. Número de folhas (NF)

Os valores dos quadrados médios das altitudes nos genótipos foram significativos, exceto nos genótipos 450 (no florescimento), 475 (na senescência), 950 (no florescimento) e 1150 (na frutificação e senescência) (Quadros 16, 18 e 19). Nos Quadros 16 a 19 é observado crescente coeficiente de variação de acordo com o estágio reprodutivo.

As diferenças no número de folhas refletem a plasticidade dos genótipos frente às altitudes, cuja magnitude da plasticidade fenotípica estimada pelo coeficiente de variação ambiental (CVa) foi de baixa a alta no florescimento e média a alta nos demais estádios reprodutivos (Quadro 21). Os valores de CVa tiveram a amplitude variada, sendo de 3,47 no genótipo 950 (florescimento) a 47,63 no genótipo 210 (senescência).

Os valores dos índices de determinação ambiental (Ia^2) demonstraram que a proporção da variação total atribuída aos efeitos da altitude foi, em média, alta nos genótipos ($Ia^2 = 0,8084$) (Quadro 22). O genótipo 675, em início de frutificação, teve o maior valor de Ia^2 (0,9623). Apenas o genótipo 950 (florescimento) teve valor negativo sendo desconsiderado porque a maior proporção da variação total foi então devido ao genótipo e não ao ambiente, fato que pode ser verificado nos valores da análise de variância não serem significativos no genótipo 950, no florescimento (Quadro 16).

No Quadro 23 encontram-se estimativas de padrão de plasticidade, havendo menor similaridade na senescência. O padrão de plasticidade foi divergente nos genótipos nos quatro estádios e apenas o par de genótipos 450 e

675 mantiveram o padrão de resposta similar, com mesma direção mas com diferente sentido, comprovando que essa característica é influenciada pela altitude em todas os estádios reprodutivos (Quadro 23).

4.3.9. Área foliar por planta (AF)

A área foliar por planta está intimamente relacionada à captação de energia luminosa pelas folhas e à produção de matéria orgânica, por meio da fotossíntese. A área foliar da cultura é expressa pela superfície total das folhas vivas (PENNING DE VRIES, 1989). A equação empregada na estimação da área foliar foi citada anteriormente e três fatores de correção foram utilizados, um a cada tipo foliar de *Bidens pilosa*: o fator de correção de 0,458044 ($R^2=0,9911$) foi utilizado no cálculo da área foliar das folhas simples; o 0,335963 ($R^2=0,9915$), nas trifoliadas e o 0,486000 ($R^2=0,9256$), nas pentafoliadas.

Nos Quadros 16 a 19 encontram-se os quadrados médios da área foliar (AF) e os desdobramentos dos genótipos. Essa característica foi significativa nos genótipos, exceto nos 675 (em frutificação plena) e 1150 (em senescência) (Quadros 18 e 19). De acordo com o estágio reprodutivo são observados crescentes valores de coeficiente de variação e progressiva diminuição na média de área foliar por planta (Quadros 16 a 19).

As diferenças na área foliar refletem a plasticidade dos genótipos frente às altitudes, cuja magnitude da plasticidade fenotípica estimada pelo coeficiente de variação ambiental (CVa) foi a maior dentre todas as características (média de CVa 46,02) (Quadro 21).

A magnitude da plasticidade estimada pelo índice de determinação ambiental (Ia^2) foi alta, exceto no genótipo 675 (em frutificação plena), cujo valor estimado foi 0,0123 (Quadro 22). Esse mesmo genótipo teve valores não significativos na análise de variância indicando que a maior parte da variação total foi genotípica e não devido à altitude (Quadro 18).

A tendência do padrão de plasticidade foi diminuir a similaridade com o avanço do desenvolvimento da planta (Quadro 23). O padrão de plasticidade variou nos quatro estádios reprodutivos, não mantendo o padrão de resposta em

nenhum par de genótipos, comprovando que essa característica é fortemente afetada pela altitude.

4.3.10. Área foliar média (AM)

O cálculo da área foliar média (AM) foi feito pela divisão da área foliar por planta (AF) pelo número de folhas (NF), em cada genótipo e estágio reprodutivo. Houve quadrados médios significativos nas altitudes nos estádios e nos genótipos, exceto na frutificação plena, no genótipo 675 e na senescência, nos genótipos 475, 675 e 1150 (Quadros 16 a 19). Nestes mesmos quadros observa-se o crescente valor do coeficiente de variação de acordo com o estágio reprodutivo, concomitantemente com a diminuição média da área ocupada por uma folha, ou seja, a diminuição da área das folhas à medida que avançam as etapas pós-florescimento dos genótipos. Essa característica é importante do ponto de vista de conhecer o doseamento da planta medicinal quando de sua recomendação se referir a quantidade de folhas a ser utilizada no preparo de remédios caseiros.

A diferença da área foliar reflete a plasticidade dos genótipos frente às altitudes de cultivo. A magnitude da plasticidade fenotípica, estimada pelo coeficiente de variação ambiental (CVa) e pelo índice de determinação ambiental (Ia^2), foi alta. Na estimativa do CVa, obtiveram-se valores altos (CVa >20), exceto no genótipo 450 (início de frutificação) (Quadro 21). O valor de CVa médio foi 33,65 e o máximo, observado no genótipo 475 (plena frutificação), de 49,73.

O valor médio do índice de determinação ambiental (Ia^2) foi 0,8503. O menor Ia^2 foi 0,3414 (genótipo 675, na frutificação plena), e o maior na senescência (vários genótipos). O maior valor observado nessa característica foi 0,9916, no genótipo 950 (início de frutificação) (Quadro 22). Como a média de Ia^2 foi alta, indica que a área foliar foi muito influenciada pela altitude e grande parte da proporção da variação total desse caráter é devido ao ambiente.

O padrão de plasticidade apresentou similaridade no florescimento e dissimilaridade na senescência. O padrão de plasticidade teve, na maioria dos

pares de genótipos, direção semelhante (valores positivos) e sentido divergente (baixa correlação). A variação entre os estádios reprodutivos considerando o mesmo par de genótipos comprova que essa característica é afetada pela altitude de maneira diferente em cada genótipo em todos os estádios reprodutivos (Quadro 23).

4.3.11. Massa seca foliar (MF)

Os valores dos quadrados médios das altitudes nos genótipos foram significativos, exceto no genótipo 675 (frutificação plena e senescência) (Quadros 16 a 19). Houve tendência de aumento do coeficiente de variação e diminuição das médias no decorrer dos estádios reprodutivos. As diferenças significativas indicam plasticidade dos genótipos.

A magnitude da plasticidade fenotípica, estimada pelo coeficiente de variação ambiental (CVa) e pelo índice de determinação ambiental (Ia^2), foi alta. O valor médio de CVa foi 29,28 e de Ia^2 foi de 0,8500 (Quadros 21 e 22, respectivamente). A parte da variação total devido ao efeito da altitude foi alta na maioria dos genótipos, entretanto, no genótipo 675 (frutificação plena) houve baixa variação (CVa 12,82 e $Ia^2 = 0,1781$) (Quadros 21 e 22, respectivamente), observando valores não significativos na análise de variância de MF, na frutificação plena (Quadro 18).

No Quadro 23 estão as estimativas de padrão de plasticidade, com o mesmo genótipo alternando entre similaridade e divergência.

4.3.12. Número de folhas em 1 grama (N1)

O número de folhas em 1 grama (N1) foi calculado pela divisão do número de folhas (NF) pelo valor da massa seca foliar (MF). Os quadrados médios das altitudes nos genótipos foram significativos, principalmente na frutificação plena. Foram observados valores não significativos nos genótipos 210 (florescimento e início de frutificação), 450 (florescimento), 475 (florescimento e senescência), 675 (senescência) e 1150 (florescimento)

(Quadros 16 a 19). Apenas no genótipo 950 os quadrados médios foram significativos em todos os estádios reprodutivos.

A plasticidade dos genótipos foi estimada, em magnitude, pelo coeficiente de variação ambiental (CVa) e índice de determinação ambiental (Ia^2). Os valores de CVa foi baixo a alto, o genótipo 210 teve o menor valor e o genótipo 950 o maior valor, respectivamente 7,39 (no estádio de florescimento) e 74,33 (no estádio de plena frutificação) (Quadro 21). Os valores de Ia^2 variaram de 0,2104 a 0,9881, tendo o genótipo 950 valores altos nos quatro estádios reprodutivos (Quadro 22), e esse é o único genótipo cujos valores na análise de variância foram significativos nas quatro estádios (Quadros 16 a 19).

Houve divergência nos pares de genótipos, quanto ao padrão de plasticidade considerando os quatro estádios reprodutivos, o que comprova o efeito da altitude sobre os componentes de N1 (Quadro 23).

4.4. Padrão de plasticidade fenotípica

O padrão de plasticidade fenotípica foi avaliado entre pares de genótipos pelo coeficiente de correlação de Pearson a fim de determinar se, entre os pares, havia mesma direção e o mesmo sentido de resposta aos ambientes.

4.4.1. Coeficiente de correlação de Pearson

No Quadro 23, encontram-se as matrizes de correlação entre os pares de genótipos em relação a cada característica.

O padrão de plasticidade variou entre os quatro estádios reprodutivos. Padrão de respostas em mesma direção e sentido foi observado nas características MC e BA; no mesmo sentido mas com direção contrária ou mesma foi observado nas características NF, AF e MF; com padrão de resposta divergente nas características AP, CC, NR, NC, SP, AM e N1.

4.5. Coeficiente de coincidência (CCo)

As características morfométricas são expressas ao longo do crescimento e desenvolvimento vegetal. Devido a isso, a coincidência pode ser mais evidenciada em uma fase de desenvolvimento, ou seja, em um estágio do que em outro. Essa coincidência foi quantificada com base nas médias contidas nos Quadros 15, 24, 25, 26 e 27, nos quais os retângulos delimitam as maiores ou menores médias que coincidem com as altitudes de coleta dos genótipos, sendo os valores dos CCo mostrados no Quadro 28.

A adaptação dos genótipos às altitudes onde foi coletado foi medida pelo CCo e varia de 0 a 100%. Como, na média dos seis genótipos, o CCo foi 53,33, evidenciou-se adaptação intermediária (CCo de 25 a 75%) dos genótipos às altitudes de origem (Quadro 28). Notam-se, no Quadro 28, quatro genótipos com adaptação intermediária (CCo de 25 a 75%), genótipos 210, 450, 950 e 1150, e dois com alta adaptação (CCo de 75 a 100%), genótipos 475 e 675.

No número de dias até o florescimento (IN) os genótipos 475, 675 e 950 foram coincidentes (CCo 100,00, Quadro 28), tendo o menor número de dias até o início de florescimento (Quadro 15). Apesar da coincidência das médias dessa característica nesses três genótipos, as diferenças não foram estatisticamente significativas (Quadro 15).

Nos primeiros estádios reprodutivos (florescimento e início de frutificação), os genótipos de menor altitude (210, 450 e 475) tiveram maior CCo, já os de maior altitude (675, 950 e 1150) tiveram nos últimos (frutificação plena e senescência) (Quadro 28). Em geral, os maiores coeficientes foram os dos genótipos das altitudes intermediárias (genótipos 450, 475 e 675). O maior valor, 91,67, foi detectado no início de frutificação nos genótipos 450 e 475, e o menor coeficiente, 16,67, detectado nos genótipos 950 e 1150, respectivamente, no início de frutificação e florescimento.

No florescimento (Quadro 24), as características que mantiveram maior coincidência foram AP, CC, MC e NF em quatro genótipos e suas altitudes de origem. As menores coincidências foram as características MF e N1, com apenas duas.

No início de frutificação (Quadro 25), a maior coincidência foi em NC e N1, com coincidência entre a altitude de origem e cinco genótipos. As menores coincidências foram nas características AP, CC, MC, BA, SP, AF, AM e MF, com três altitudes cada.

Nas plantas de frutificação plena (Quadro 26) e senescentes (Quadro 27), a característica de maior coincidência foi NF, que coincidiu todos os genótipos e suas altitudes de origem e as menores foram nas características AF, AM e MF, com apenas uma coincidência cada.

A folha é o órgão vegetal mais plástico e, por isso, é o que mais reflete o ambiente (CUTTER, 1986). Houve variações, quanto à coincidência, entre a altitude de origem do genótipo e altitude. Em média, o número de folhas (NF) e a massa seca foliar (MF) tiveram, respectivamente, a maior e a menor coincidência nos quatro estádios reprodutivos.

Comparando-se os valores de área foliar por planta (AF) dos genótipos nos quatro estádios reprodutivos (Quadros 24 a 27), observa-se área foliar maior na menor altitude (198 m) quando comparada com a maior altitude (962 m). GUREVITCH (1988) observou em mil folhas (*Achillea millefolium*) a diminuição da área foliar com o aumento da altitude, com maior área foliar na altitude de 1.417 m comparada com 2.890 m.

No Quadro 27 é verificado que nos genótipos, em geral, os valores de SPAD (SP) foram crescentes de acordo com o aumento da altitude. Isso pode ser devido ao fato de que nas altas elevações a concentração de CO₂ é diminuída. A concentração de CO₂ ao nível do mar é de 340 vppm (340 cm³ de CO₂ por m³ de ar) e na altitude de 1.000 m é de 290 vppm (PENNING DE VRIES, 1989). Além disso, em maiores altitudes a pressão diminui, decrescendo o coeficiente de difusão dos gases, o que dificulta a disponibilidade desse à planta (JONES, 1994), acarretando menor taxa fotossintética. Isso causa aumento da quantidade de clorofila, principalmente em plantas tipo C3, a fim de compensar a menor concentração de CO₂ (PENNING DE VRIES, 1989).

Quadro 24 - Médias dos caracteres altura da planta (AP), comprimento do caule (CC), número de ramos (NR), número de capítulos (NC), massa seca caulinar (MC), biomassa seca aérea (BA), valor de SPAD foliar (SP), número de folhas por planta (NF), área foliar por planta (AF), área foliar média (AM), massa seca foliar (MF) e número de folhas em 1 g (N1), no estágio reprodutivo de plantas em florescimento, dos seis genótipos de *Bidens pilosa* L. crescidos nas altitudes de 198, 479, 739 e 962 m

Genótipos	Altitude	AP	CC	NR	NC	MC	BA	SP	NF	AF	AM	MF	N1
210	198	23,18A	23,18A	11,13A	19,63A	2,12A	3,88A	50,19B	82,38AB	475,67A	5,87A	1,76A	46,70A
	479	22,16A	22,16A	11,25A	14,63A	1,96AB	3,99A	52,63B	100,00A	501,41A	5,04A	2,03A	49,36A
	739	21,55A	21,55A	12,88A	19,75A	1,42BC	2,74B	60,04A	66,00B	199,00B	3,05B	1,32B	50,30A
	962	18,68A	18,68A	10,75A	6,00B	0,90C	2,17B	53,30B	70,00B	219,83B	3,14B	1,27B	55,60A
450	198	48,39AB	48,39AB	12,75A	11,88A	3,72B	6,37B	50,03B	75,63A	707,97A	9,52A	2,66B	28,46A
	479	58,98A	58,98A	13,63A	10,88AB	5,31A	8,70A	54,79AB	91,13A	700,64A	7,72A	3,38A	26,64A
	739	37,78B	37,78B	10,63A	15,38A	2,34C	4,19C	56,84A	55,38A	256,51B	4,66B	1,85C	29,63A
	962	39,04B	39,04B	11,13A	4,25B	2,43C	4,36C	51,13AB	68,38A	328,60B	4,87B	1,93C	35,05A
475	198	48,44A	48,44AB	13,75AB	11,13A	3,91BC	7,16B	48,53B	72,88B	605,24B	8,19AB	3,24B	22,87A
	479	55,30A	55,30A	15,63A	23,00A	7,42A	11,57A	50,53B	103,50A	1088,22A	10,44A	4,14A	25,03A
	739	39,90B	39,90C	11,25B	18,88A	2,60C	4,77C	57,90A	68,63B	343,47B	5,01C	2,18C	31,56A
	962	54,08A	46,24BC	11,88B	18,00A	4,34B	6,49BC	46,46B	61,00B	312,80B	5,15BC	2,15C	29,61A
675	198	49,69A	49,69AB	12,63AB	9,50A	3,79B	7,26B	46,34B	91,03AB	874,99A	9,57A	3,47B	26,57AB
	479	57,29A	57,29A	15,25A	17,00A	7,09A	11,76A	48,01B	107,63A	967,96A	8,97A	4,67A	23,17B
	739	38,59B	38,59B	11,63AB	17,50A	2,50B	4,94B	56,93A	60,25C	327,34B	5,42B	2,44C	24,71B
	962	55,58A	45,64B	10,75B	11,25A	4,01B	6,43B	46,99B	79,25BC	420,09B	5,26B	2,42C	32,97A
950	198	58,78A	58,78A	12,38B	8,50B	4,34AB	7,47AB	47,85A	74,00A	679,32A	9,20A	3,13AB	24,43AB
	479	61,45A	61,45A	15,00A	12,75B	5,84A	9,47A	48,14A	78,88A	714,68A	9,03AB	3,63A	21,78B
	739	49,49B	43,01B	9,38C	28,00A	3,40B	5,77B	53,15A	74,13A	497,39A	6,68BC	2,37B	31,19A
	962	59,56A	47,85B	11,63BC	14,00AB	4,72AB	7,24AB	47,81A	73,13A	410,15B	5,66C	2,52B	29,06A
1150	198	78,36A	59,53A	13,63AB	27,25AB	6,19B	9,50B	43,16B	75,63AB	841,48A	11,22A	3,31A	22,87A
	479	81,69A	62,50A	15,00A	33,25A	9,67A	13,58A	41,73B	88,13A	820,47A	9,38A	3,91A	22,54A

739	42,95C	42,95B	11,38BC	12,63BC	2,36C	4,59C	58,96A	61,00B	326,82B	5,36B	2,23B	27,73A
962	58,31B	54,11AB	9,50C	11,50C	3,91C	6,16C	47,99B	62,00B	341,33B	5,47B	2,24B	27,55A

As médias seguidas de uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. Os valores de AP, CC foram determinados em cm; AF em cm²; BA, MC, MF em gramas; NC, NO, NF, NR contados; SP, em SPAD; IF em dias; AM e N1 calculados. Os retângulos delimitam as maiores ou menores médias que coincidem com as altitudes de coleta dos genótipos.

Quadro 25 - Médias dos caracteres altura da planta (AP), comprimento do caule (CC), número de ramos (NR), número de capítulos (NC), massa seca caulinar (MC), biomassa seca aérea (BA), valor de SPAD foliar (SP), número de folhas por planta (NF), área foliar por planta (AF), área foliar média (AM), massa seca foliar (MF) e número de folhas em 1 g (N1), no estágio reprodutivo de plantas em início de frutificação, dos seis genótipos de *Bidens pilosa* L. crescidos nas altitudes de 198, 479, 739 e 962 m

Genótipo	Altitude	AP	CC	NR	NC	MC	BA	SP	NF	AF	AM	MF	N1
s													
210	198	46,45B	24,03AB	10,75A	66,00A	4,59B	6,40B	47,86A	63,13A	376,24AB	5,91A	1,82B	35,01A
	479	65,40A	25,14A	11,38A	63,38A	8,69A	11,22A	50,00A	125,63A	717,98A	5,47A	2,54A	48,13A
	739	36,38C	22,48AB	11,25A	45,38B	2,90C	4,29C	53,60A	65,75A	274,26AB	4,22AB	1,39B	48,15A
	962	39,70C	18,59B	12,25A	40,00B	3,59BC	5,46BC	50,21A	69,38A	237,96B	3,41B	1,87AB	39,41A
450	198	81,09A	52,55A	13,25A	63,88A	8,35B	11,16B	46,75B	85,88AB	540,60B	6,28AB	2,81AB	30,74B
	479	86,13A	54,94A	12,75A	66,00A	11,77A	15,16A	45,88B	97,00A	727,13A	7,48A	3,39A	28,74B
	739	52,76C	41,96B	12,75A	48,38AB	4,94C	7,25C	55,74A	93,25AB	474,22B	5,08B	2,31B	40,42A
	962	64,88B	46,29B	11,38A	34,63B	5,70C	8,22BC	48,16B	76,50B	422,45B	5,52B	2,52AB	31,36B
475	198	70,96AB	48,80A	13,88A	70,75AB	8,85B	11,84B	43,19B	88,88A	661,00B	7,40B	2,99B	29,84AB
	479	74,29A	54,41A	14,50A	82,00A	14,71A	19,04A	43,18B	105,38A	1079,33A	10,16A	4,33A	24,31B
	739	49,56C	41,81A	13,88A	45,88B	5,32C	7,84C	54,76A	87,25A	454,97BC	5,22C	2,52BC	34,64A
	962	62,56B	48,10A	12,00A	60,13AB	6,67C	8,55C	40,58B	55,38B	283,46C	5,08C	1,87C	30,01AB
675	198	76,43AB	51,66A	14,38A	66,50AB	9,20B	12,56B	44,61AB	96,75A	694,56B	7,24AB	3,35B	28,80B
	479	83,40A	54,20A	14,50A	86,75A	15,06A	19,56A	41,63B	114,13A	998,37A	8,73A	4,50A	25,45B
	739	54,41C	40,03B	13,25A	46,00B	6,09C	9,10C	50,18A	111,75A	620,03B	5,58B	3,01BC	37,10A
	962	65,71B	46,18AB	11,38A	55,00B	7,26BC	9,76C	40,44B	63,88B	333,02C	5,23B	2,50C	26,48B
950	198	83,65A	52,83A	13,75A	60,63A	9,25B	12,49B	43,99A	88,13A	733,38A	8,34A	3,24AB	27,48B
	479	89,70A	59,25A	12,75A	59,50A	12,99A	16,71A	43,93A	85,88A	706,70A	8,16A	3,72A	23,55B
	739	56,96C	42,56B	12,63A	81,38A	7,05B	7,92C	32,09B	45,75B	114,47B	2,57C	0,87C	52,46A
	962	70,43B	51,89A	11,75A	56,63A	7,96B	10,00BC	40,46A	51,75B	260,75B	5,10B	2,05BC	25,14B
1150	198	87,39A	55,39A	12,50A	83,88A	11,47A	14,62A	36,08B	77,63A	729,26A	9,45A	3,16A	24,84A
	479	92,09A	60,69A	13,00A	89,50A	13,62A	16,50A	35,64B	80,25A	509,80B	6,28B	2,89AB	28,12A

739	58,46C	45,44B	13,00A	40,75B	6,26B	9,03B	52,25A	83,38A	394,70BC	4,75B	2,78AB	30,10A
962	69,21B	52,61AB	11,38A	50,00B	7,21B	9,32B	42,68B	50,63B	287,69C	5,71B	2,11B	23,92A

As médias seguidas de uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. Os valores de AP, CC em cm; AF em cm²; BA, MC, MF em gramas; NC, NO, NF, NR contados; SP, em SPAD; IF em dias; AM e N1 calculados. Os retângulos delimitam as maiores ou menores médias que coincidem com as altitudes de coleta dos genótipos.

Quadro 26 - Médias dos caracteres altura da planta (AP), comprimento do caule (CC), número de ramos (NR), número de capítulos (NC), massa seca caulinar (MC), biomassa seca aérea (BA), valor de SPAD foliar (SP), número de folhas por planta (NF), área foliar por planta (AF), área foliar média (AM), massa seca foliar (MF) e número de folhas em 1 g (N1), no estágio reprodutivo de plantas em frutificação plena, dos seis genótipos de *Bidens pilosa* L. crescidos nas altitudes de 198, 479, 739 e 962 m

Genótipos	Altitude	AP	CC	NR	NC	MC	BA	SP	NF	AF	AM	MF	N1
210	198	55,31A	26,20A	10,63A	135,50AB	6,31B	7,80B	40,71A	95,13A	258,73A	2,76AB	1,49A	62,85AB
	479	64,09A	23,76A	11,00A	164,75A	10,29A	11,80A	34,53A	71,50AB	235,00AB	3,27A	1,51A	48,89BC
	739	36,99B	21,76A	12,13A	100,75BC	3,55C	4,34C	44,18A	57,38AB	109,73B	1,86B	0,80B	72,38A
	962	44,16B	21,33A	12,63A	89,25C	5,42B	6,73B	43,11A	47,50B	158,99AB	3,33A	1,31AB	36,47C
450	198	82,73A	49,39AB	14,63A	101,00AB	10,25B	12,26A	35,31BC	77,13A	361,94A	4,66A	2,01A	38,47B
	479	85,18A	53,35A	13,75A	110,63A	13,12A	14,48A	32,25C	43,38B	139,56BC	3,26AB	1,36B	33,00B
	739	57,13B	38,79C	14,75A	93,25AB	5,99C	6,94B	38,90B	64,25A	98,44C	1,53B	0,95B	67,67A
	962	66,83B	41,89BC	12,13A	73,75B	7,12C	9,14B	45,08A	61,88A	259,99AB	4,28A	2,02A	30,62B
475	198	66,05B	45,60BC	14,50AB	118,25A	10,81B	13,45A	32,25B	83,00A	576,12A	6,87A	2,64A	31,39B
	479	77,83A	55,13A	15,75A	116,25A	14,42A	15,80A	32,93B	35,13B	132,57B	3,66BC	1,38B	29,28B
	739	50,41C	40,06C	13,88AB	93,50AB	6,11C	7,05B	35,60AB	55,25B	106,58B	1,86C	0,94B	59,21A
	962	62,74B	50,13AB	11,13B	72,50B	7,21C	8,71B	39,94A	45,13B	195,09B	4,29B	1,50B	29,90B
675	198	87,43A	50,61A	14,00AB	152,00A	12,45A	14,21A	28,90B	80,25A	322,75A	4,04A	1,76A	46,18AB
	479	86,29A	55,84A	15,50A	149,00A	14,47A	16,16A	30,89B	48,88B	184,64A	3,38A	1,68A	29,14B
	739	56,25C	39,49B	15,88A	114,00AB	7,03B	8,51B	34,00B	89,25A	216,42A	2,36A	1,47A	62,15A
	962	69,60B	47,15AB	11,63B	90,13B	7,16B	8,81B	41,48A	54,25B	235,99A	4,46A	1,65A	35,10B
950	198	89,04A	51,99A	14,00A	100,50AB	11,32B	13,44AB	31,66B	63,50A	385,16A	5,96A	2,12A	31,05B
	479	92,43A	60,06A	13,88A	114,25A	16,01A	17,55A	34,20AB	38,13B	167,17B	4,33A	1,54AB	26,23B
	739	60,91B	41,88B	13,50A	105,25AB	7,80B	8,48C	32,46AB	59,88A	117,80B	1,96B	0,68B	90,85A
	962	69,20B	51,34AB	11,75A	84,13B	8,50B	10,05BC	40,58A	37,25B	169,76B	4,55A	1,55AB	24,07B
1150	198	86,98A	55,81AB	12,88AB	121,00A	12,75A	14,58A	34,53B	58,13A	335,53A	5,81A	1,83A	32,40B
	479	94,73A	61,19A	13,75A	122,50A	15,63A	16,99A	33,78B	47,88A	172,58B	3,62B	1,36AB	35,29B
	739	61,80B	43,10C	13,00AB	96,50AB	7,45B	8,40B	34,43B	52,25A	123,34B	2,29B	0,95B	55,35A

962	66,74B	51,00BC	10,50B	68,00B	6,87B	8,33B	41,09A	37,38A	202,43B	5,40A	1,46AB	26,00B
-----	--------	---------	--------	--------	-------	-------	--------	--------	---------	-------	--------	--------

As médias seguidas de uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. Os valores de AP, CC em cm; AF em cm²; BA, MC, MF em gramas; NC, NO, NF, NR contados; SP, em SPAD; IF em dias; AM e N1 calculados. Os retângulos delimitam as maiores ou menores médias que coincidem com as altitudes de coleta dos genótipos.

Quadro 27 - Médias dos caracteres altura da planta (AP), comprimento do caule (CC), número de ramos (NR), número de capítulos (NC), massa seca caulinar (MC), biomassa seca aérea (BA), valor de SPAD foliar (SP), número de folhas por planta (NF), área foliar por planta (AF), área foliar média (AM), massa seca foliar (MF) e número de folhas em 1 g (N1), no estágio reprodutivo de plantas em senescência, dos seis genótipos de *Bidens pilosa* L. crescidos nas altitudes de 198, 479, 739 e 962 m

Genótipo	Altitude	AP	CC	NR	NC	MC	BA	SP	NF	AF	AM	MF	N1
210	198	54,94AB	24,06A	11,63A	165,50A	6,26B	7,26B	36,95AB	88,88A	159,69A	1,92B	0,99A	88,05AB
	479	61,46A	22,51A	11,63A	165,63A	9,39A	10,39A	35,46B	59,88AB	118,23AB	1,97B	0,99A	62,41B
	739	36,30C	20,58A	12,88A	121,63B	3,59C	4,03C	38,28AB	41,75B	59,55B	1,39B	0,43B	99,98A
	962	46,08BC	20,65A	11,25A	98,75B	5,33BC	6,29B	43,00A	28,63B	111,66AB	3,85A	0,96AB	31,50C
450	198	84,61A	49,18A	13,25A	130,63A	9,59B	10,94B	27,03C	75,63A	187,38A	2,52AB	1,35A	56,02AB
	479	88,18A	50,10A	13,38A	123,50A	12,54A	13,97A	34,28BC	56,75AB	160,83AB	2,79AB	1,43A	40,24B
	739	54,78B	38,63B	12,25A	103,00AB	6,13C	6,93C	37,28B	56,50AB	93,56B	1,61B	0,81B	78,24A
	962	62,90B	40,84B	11,38A	74,25B	6,22C	7,48C	48,81A	44,25B	142,97AB	3,36A	1,26AB	35,49B
475	198	71,79A	50,14AB	13,75AB	157,00A	10,11B	11,54B	25,38C	67,50A	184,61A	2,68A	1,43A	47,41A
	479	76,76A	55,20A	16,00A	151,38AB	14,16A	15,56A	31,14B	59,13A	177,45A	3,06A	1,40A	42,52A
	739	54,20B	42,75C	14,63A	116,88BC	6,93C	7,68C	29,65BC	45,13A	80,89A	1,90A	0,75B	59,87A
	962	61,10B	46,41BC	11,63B	98,38C	7,68C	8,81C	44,20A	63,75A	78,58A	1,32A	1,13A	55,31A
675	198	77,71AB	47,95AB	13,50A	174,13AB	10,86B	12,23B	26,73B	88,25A	200,08A	2,31A	1,37A	65,53A
	479	87,60A	55,55A	13,63A	183,75A	14,05A	15,48A	31,99B	59,38B	156,27AB	2,67A	1,42A	46,35A
	739	58,09C	40,31B	13,88A	133,88BC	6,95C	7,81C	31,78B	58,75B	72,41B	1,27A	0,86A	71,66A
	962	66,63BC	49,26AB	11,25A	99,63C	7,15C	8,69C	45,06A	77,50AB	136,28AB	1,77A	1,54A	50,12A
950	198	86,35B	54,63B	12,88AB	138,00A	10,57B	11,90B	28,73C	63,63AB	196,37A	3,08AB	1,33A	48,06B
	479	96,65A	65,21A	14,00A	143,00A	15,21A	16,45A	32,28BC	48,38AB	191,69A	4,00A	1,25A	39,69B
	739	58,70C	42,10C	10,75BC	122,63AB	6,80C	7,27D	36,75B	37,13B	35,15B	1,03C	0,47B	78,59A
	962	65,20C	46,26C	9,75C	94,13B	7,32C	8,94C	45,53A	70,75A	167,09A	2,35B	1,62A	43,42B
1150	198	90,29A	56,85AB	11,63A	168,13A	12,71A	14,06A	34,78B	54,00A	151,16A	2,77A	1,35AB	44,30AB
	479	93,18A	64,59A	11,75A	144,88AB	13,98A	15,19A	43,01A	49,75A	113,79A	2,17A	1,21AB	42,73AB

739	57,99C	41,40C	11,25A	107,75BC	6,81B	7,39B	29,70B	39,75A	49,83A	1,30A	0,58B	69,33A
962	68,76B	51,54B	10,63A	93,38C	7,42B	8,91B	44,95A	57,38A	139,01A	2,38A	1,49A	39,54B

As médias seguidas de uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. Os valores de AP, CC em cm; AF em cm²; BA, MC, MF em gramas; NC, NO, NF, NR contados; SP, em SPAD; IF em dias; AM e N1 calculados. Os retângulos delimitam as maiores ou menores médias que coincidem com as altitudes de coleta dos genótipos.

Quadro 28 - Estimativas dos coeficientes de coincidência (CCo) dos caracteres morfométricos nos seis genótipos de *Bidens pilosa* L. crescidos em quatro altitudes no início do florescimento (IN) e colhidos em quatro estádios reprodutivos (plantas em florescimento (FL), em início de frutificação (IF), em frutificação plena (FP) e em senescência (SE))

Estádio	Genótipos						Média
	210	450	475	675	950	1150	
IN ^(*)	0,00	0,00	100,00	100,00	100,00	0,00	50,00
FL	50,00	66,67	83,33	66,67	33,33	16,67	52,78
IF	50,00	91,67	91,67	58,33	16,67	41,67	58,34
FP	33,33	58,33	58,33	75,00	41,67	58,33	54,17
SE	33,33	50,00	58,33	75,00	41,67	50,00	51,39
Média	33,33	53,33	78,33	75,00	46,67	33,33	53,33

^(*) IN, refere-se às médias do Quadro 15; FL, IF, FP e SE, referem-se às médias dos Quadros 24, 25, 26 e 27, respectivamente.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Seis genótipos de *Bidens pilosa*, selecionados com base na divergência de padrões isozimáticos, foram clonados e estudados quanto à plasticidade fenotípica influenciada pela altitude e pelos estádios reprodutivos. Os genótipos foram coletados em seis localidades, de altitudes de 210, 450, 475, 675, 950 e 1.150 m e foram crescidos nas altitudes 198, 479, 739 e 962 m.

Avaliaram-se características morfométricas durante o crescimento e na colheita das plantas. Durante o crescimento e o desenvolvimento das plantas foi avaliado o início do florescimento. Os caracteres morfométricos quantificados após a colheita foram altura da planta, comprimento do caule, número de nós, número de ramos, número de capítulos, massa seca caulinar, biomassa seca aérea, valor de SPAD foliar, número de folhas por planta, área foliar por planta, área foliar média, massa seca foliar, número de folhas em 1 grama; esses caracteres foram avaliados em quatro estádios reprodutivos.

Utilizou-se o delineamento em blocos casualizados com quatro repetições e duas plantas por parcela. As análises de variância dos caracteres por genótipo indicaram que houve resposta plástica dos genótipos com as variações de altitude e que os genótipos se diferenciam com relação a essa plasticidade. A plasticidade foi estudada quanto à magnitude e ao padrão de resposta. A magnitude foi estimada por meio do coeficiente de variação ambiental (CVa) e do índice de determinação ambiental (Ia^2). O CVa estimou a magnitude da plasticidade. As características com valores de CVa menores que 10 foram consideradas de baixa magnitude, entre 10 a 20 de média magnitude e acima de

20 de alta magnitude. Os valores de Ia^2 representaram a quantidade da variação total atribuída ao efeito ambiental.

Além desses índices foi calculado o coeficiente de coincidência (CCo) entre as altitudes de origem dos genótipos e as altitudes de cultivo.

O início de florescimento nas altitudes foi a característica adotada na determinação da primeira colheita. As plantas da maior e da menor altitude, respectivamente genótipo 210 e 1150, foram as únicas que tiveram diferença significativa de florescimento. O início da floração em planta de inflorescência terminal, como é o caso de *Bidens pilosa*, limita o número de nós e, conseqüentemente, os valores de número de nós não foram significativos. Essa limitação do número de nós interfere no número de folhas no eixo principal, que possui folhas maiores, mas promove o crescimento dos ramos laterais que produzem folhas menores e em maior número.

Os resultados permitiram as seguintes conclusões:

- 1) A altitude influencia os caracteres morfométricos de *Bidens pilosa*.
- 2) A mesma característica nos genótipos pode variar em função da altitude e do estágio reprodutivo, demonstrando plasticidade fenotípica espacial (altitude) e temporal (estádio). Os mesmos pares de genótipos são afetados em suas características pela altitude de maneira particular nos estádios reprodutivos em cada genótipo.
- 3) A magnitude e o padrão de plasticidade foram específicos em cada genótipo, podendo diferir entre os estádios reprodutivos e estimou-se que cerca de 83% da variação foi devido ao efeito da altitude.
- 4) Na verificação do grau de adaptação dos genótipos às suas altitudes de coleta, utilizando-se o CCo, determinou-se que os caracteres coincidiram em cerca de 53% com a resposta à altitude semelhante à de coleta, o que corresponde a adaptação intermediária à respectiva altitude de origem.
- 5) A folha foi o órgão adaptativo mais plástico, tendo o número de folhas (NF) o maior CCo e a massa seca foliar (MF), o menor.
- 6) Os valores de SPAD (SP), que mede a quantidade relativa de clorofila, foram crescentes, de acordo com o aumento da altitude e decrescentes, de acordo com o estágio reprodutivo.

- 7) Os efeitos da plasticidade foram relevantes com relação ao número de folhas em 1 grama (N1) e à área foliar (AF), bem como ao número de folhas por planta (NF), significando que importa a altitude de cultivo e o estágio reprodutivo da planta a ser utilizado nos preparados medicinais e considerar esses parâmetros quando da seleção dos melhores genótipos.

CAPÍTULO 4

PLASTICIDADE FENOTÍPICA DO ÁCIDO CLOROGÊNICO E DO ÁCIDO CAFÉICO DE GENÓTIPOS DE *Bidens pilosa* L.

1. INTRODUÇÃO

Bidens pilosa L., planta medicinal da família Asteraceae, tem ampla dispersão nos trópicos e subtropicais, desde o nível do mar até cerca de 3.000 m de altitude (BALLARD et al., 1986). Por onde ocorre é adotada na fitoterapia, principalmente nos problemas hepáticos (hepatite e icterícia), sendo preferido o uso das folhas (VASQUES et al., 1986b). A folha é o órgão que mais responde às variações ambientais. A resposta ao ambiente é elaborada no metabolismo secundário vegetal e as substâncias produzidas interessam a quem trabalha com planta medicinal, por terem efeito terapêutico. Entre os compostos amplamente difundidos no reino vegetal, com atividade hepatoprotetora, encontram-se o ácido clorogênico e o ácido caféico (HARBORNE, 1980; CARVALHO et al., 1999). O ácido clorogênico e o ácido caféico podem ter sua biossíntese induzida pelas condições ecológicas e pelo desenvolvimento vegetal. A altitude destaca-se por ser composta de variantes de temperatura, umidade, pressão atmosférica, luminosidade, dentre outras (JONES, 1994). No desenvolvimento vegetal há expressão gênica regulatória da biossíntese desses compostos promovendo o acúmulo em órgãos que estejam na fase apropriada, sendo provável que a altitude interfira nesses genes e varie a produção de ácido clorogênico e caféico. Como esses compostos auxiliam na adaptação vegetal ao local de ocorrência (DIXON e

PAIVA, 1995), espera-se que as altitudes de crescimento e desenvolvimento das plantas promovam respostas de plasticidade.

Estes compostos, presentes nas folhas de *Bidens pilosa*, foram objetos de estudo da plasticidade fenotípica de plantas crescidas em quatro altitudes. A plasticidade fenotípica é a expressão da variação fenotípica do genótipo em resposta aos ambientes (KAMADA et al., 1999). O estudo da plasticidade dos fitofármacos ácido clorogênico e ácido caféico foi feito pela estimação da magnitude e do padrão de respostas plásticas em *Bidens pilosa* cultivadas em quatro altitudes. Foi estimado o coeficiente de coincidência e determinado o grau de adaptação dos genótipos. Foram obtidas correlações entre as características e alguns fatores climáticos de cada altitude.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Bidens pilosa* L.

2.1.1 Dispersão

Na história da humanidade, as espécies de plantas medicinais que tiveram mais chances de serem usadas pelo homem foram as ruderais e as presentes o ano todo. Nesse grupo de espécies encontra-se *Bidens pilosa*, o popular picão, de ocorrência em todo o Brasil e nas regiões tropicais e subtropicais do globo (BALLARD, 1986). A ampla dispersão dessa espécie se faz pela disseminação de seus frutos (aquênios) aderidos aos pêlos dos mamíferos e do homem, bem como às suas vestes (STRANG et al., 1980; MITICH, 1994). Seu emprego fitoterápico é favorecido pela facilidade de identificação e localização dessa espécie entre as demais de ocorrência espontânea, pois suas flores e seus frutos estão presentes o ano todo.

2.1.2. Fitoterapia

Na fitoterapia adota-se *Bidens pilosa* desde o recém-nascido até o adulto, internamente ou externamente, devido à propriedade colagoga, colerética, depurativa, emoliente, vermífuga, antisséptica, antidiarréica, antileucorréica, antiescorbútica, estimulante, diurético, antidiabética e cicatrizante. A planta inteira é utilizada, mas as folhas são as preferidas (GRANDI e SIQUEIRA,

1981/1982, GAVILANES et al., 1981/1982; VASQUES et al., 1986b). Os indígenas do sul do Brasil usam-na nos casos de anemia, sarna e diabetes (MARQUESINI e MOREIRA, 1996) e os indígenas peruanos usam-na nas dores de dente (bochecho do sumo) e na hemicrania, ou seja, dor na metade da cabeça que é lavada com o decocto da planta (FÉO, 1991).

Em países, como México, Peru e Brasil, usam-se as folhas de *Bidens pilosa* externamente em dores de cabeça e seu sumo nas micoses de pele. No Peru, é feita a decocção das raízes a serem usadas na dismenorréia e como diurética, nos problemas de anúria (KLINAR et al., 1995). Na Nigéria, o decocto das folhas serve ao tratamento de colites e diarreias e o sumo quente de toda a planta é usado em dores no ouvido e em conjuntivites (AKAH e EKEKWE, 1995). Como hemostático, em cortes e lesões da pele, no Arquipélago da Madeira usam o sumo das folhas (RIVERA e OBÓN, 1995) e no Nepal o sumo da planta toda (MANANDHAR, 1993). No oeste da África e em Zâmbia, serve, ao mastigar seus brotos, ao tratamento de problemas reumáticos e ao alívio da dor, ao friccionar as cinzas de seus aquênios carbonizados em incisões feitas no corpo do paciente (BENHURA e CHITSIKU, 1997).

O emprego de *Bidens pilosa* nos problemas hepáticos, como hepatite e icterícia, é o mais divulgado pelo Brasil (YOMURA et al., 1988). Nesses casos, pode-se usar a planta toda ou apenas as folhas, na forma de chá ou banho (CORRÊA, 1984). Como auxiliares ao tratamento, as folhas frescas são usadas em saladas ou colocadas sobre o colchão onde se repousa o enfermo.

Os indígenas da Amazônia usam-na como antimalárica. Ao testar essa atividade, BRANDÃO et al. (1997) comprovaram que os extratos das raízes, após o estágio de florescimento, eram ativos e identificaram poliacetilenos e flavonóides.

A medicina popular de Ruanda (África) utiliza *Bidens pilosa* nos casos de doenças pulmonares e, devido a isso, foi averiguada sua ação antibiótica contra *Mycobacterium tuberculosis*, bactéria causadora de pneumonia. Nesse estudo foi comprovado a atividade antimicobacteriana *in vitro* do extrato foliar na concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (PUYVELDE et al., 1994).

A inibição *in vitro* do crescimento de *Staphylococcus aureus* foi obtida usando-se extratos de plantas no estágio de cotilédone, na concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$; de duas folhas, na concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; de juvenilidade antes do florescimento, na concentração de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e de adulto com capítulos formados, na concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e floridos, na concentração de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Essa atividade foi observada em plantas de origem variada (MACHADO et al., 1988).

Na China, *Bidens pilosa* é utilizada nos casos de enterite, disenteria e faringite e por isso seu extrato aquoso (50 g de planta seca em 500 mL de água deionizada) foi testado *in vitro* contra bactérias causadoras dessas enfermidades e detectou-se média atividade antibacteriana. Como o uso dessa espécie naquele país está associado ao de outras plantas é aceitável, segundo WONG-LEUNG (1988), seu uso popular nessas doenças. Esses autores atribuem que essa atividade seja devido aos poliacetilenos por terem propriedades antibióticas, antivirais e moluscicidas. A atividade antiviral, contra o vírus da hepatite B, foi verificada *in vitro* por LUCCHETTI e SILVA (1996).

A atuação no fígado foi avaliada por YOMURA et al. (1988). Esses autores utilizaram a solução aquosa de *Bidens pilosa* e verificaram o fluxo biliar de ratos. O aumento na quantidade ingerida da solução aquosa ocasionava aumento de fluxo biliar. Com base nesses resultados, os autores sugeriram que o efeito estimulante da função hepática é atribuído a um ou mais princípios ativos que resultam no efeito colerético e colagogo.

2.1.3. Compostos Químicos de *Bidens pilosa*

Dos estudos químicos realizados em *Bidens pilosa*, há relatos de flavonóides (principalmente chalconas e auronas), cumarinas, poliacetilenos (alifáticos, aromáticos e tiofênicos), fenilpropanóides, derivados do ácido caféico, terpenos (mono, sesqui e diterpenos), esteróides, glicosídeos e hidrocarbonetos (HOFFMANN e HÖLZL, 1988; OGAWA e SASHIDA, 1992; ZULUETA et al., 1995; ZOLLO et al., 1995, BRANDÃO et al. 1997). As

saponinas estão presentes nas folhas e no caule (MANANDHAR, 1993). Inúmeros efeitos biológicos têm sido atribuídos a esses compostos químicos.

2.2. Compostos fenólicos: ácido caféico e ácido clorogênico

Os compostos fenólicos são substâncias aromáticas formadas pelo metabolismo secundário nas rotas do ácido chiquímico ou do ácido mevalônico. Os vegetais sintetizam os compostos fenólicos na rota do ácido chiquímico e os fungos e bactérias, na do ácido mevalônico (TAIZ e ZEIGER, 1991). A rota do ácido chiquímico inicia em carboidratos simples, tendo como precursores o oxaloacetato, e são produzidos variados compostos que contêm um grupo fenol e uma hidroxila funcional no anel aromático (HARBORNE, 1980).

O ácido cinâmico é o precursor do ácido caféico e do ácido clorogênico (Figuras 1 e 2). O ácido caféico é o precursor do ácido clorogênico, cuja reação é reversível (DIXON e PAIVA, 1995). Durante o desenvolvimento vegetal, a fenilalanina é preferencialmente incorporada na síntese protéica antes de se tornar disponível em quantidade e ser incorporada na síntese dos compostos secundários, como flavonóides e compostos fenólicos pela enzima fenilalanina amônia liase (PAL). Presumivelmente, nas condições em que a síntese protéica é mínima, maior quantidade de fenilalanina torna-se disponível para ser convertida em compostos fenólicos. Esse fato pode ocorrer na fase final do florescimento, especialmente em espécies anuais. Nas plantas com 20% de déficit hídrico houve produção de poucos compostos fenólicos, pois o Ciclo de Calvin, nessa condição, fornece pouca quantidade de carboidratos (HARBORNE, 1980; TAIZ e ZEIGER, 1991).

Fenóis simples são amplamente distribuídos nas plantas vasculares e são adaptativos por participarem das interações planta-herbívoros, planta-fungo e planta-planta (TAIZ e ZEIGER, 1991). Interferências nestes mecanismos de interações, como ativação ou desativação destes compostos, são executadas pelas peroxidases por atuarem como oxidantes de compostos fenólicos (SCANDALIOS, 1975).

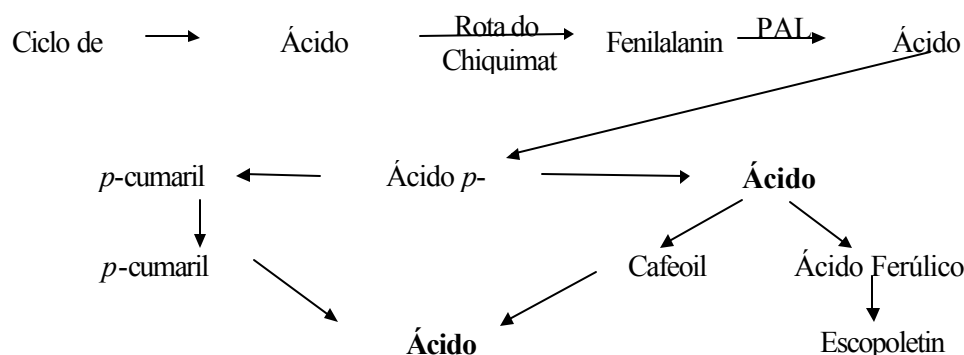


Figura 1 - Rota biossintética do ácido cafêico e do ácido clorogênico (Adaptado de HARBORNE, 1980).

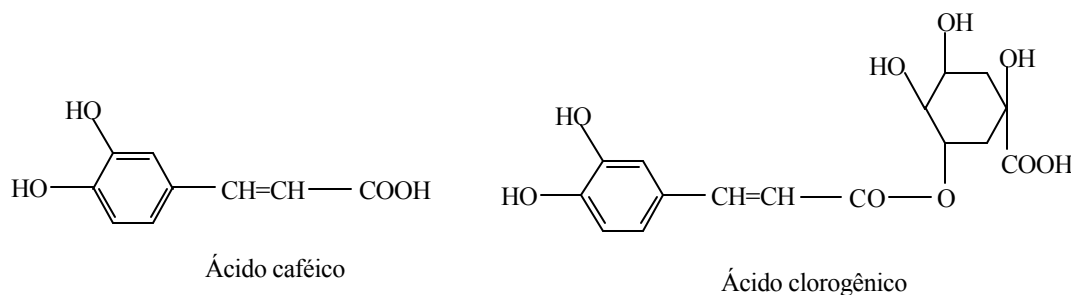


Figura 2 - Estrutura do ácido cafêico e do ácido clorogênico.

A biossíntese de ácido clorogênico pode ocorrer devido a danos por cortes ou na interação planta-herbívoros. O ácido clorogênico pode atuar diretamente na defesa ou pode servir como precursor da síntese de lignina, suberina e outras barreiras fenólicas. A taxa de desenvolvimento de lesões fúngicas é grande em plantas contendo níveis reduzidos dos compostos fenólicos constitutivos (DIXON e PAIVA, 1995). A defesa é mais intensa em plantas silvestres comparadas com as domesticadas e o ácido clorogênico pode ser o mais importante componente antimicrobiano correspondendo, na batata, a 90% dos componentes fenólicos de defesa (DAO e FRIEDMAN, 1992)

O ácido cafêico é amplamente difundido no reino vegetal, com sua detecção desde os musgos (Bryophyta) até as plantas superiores (Angiospermae) (GOTTLIEB et al., 1996). Sua participação na interação planta-planta ocorre por ter atividade alelopática que inibe a germinação de sementes e o crescimento das plantas. Esse ácido ocorre no solo em quantidades significativas, devido ao seu escape pelas raízes ou pelas folhas caídas (TAIZ e ZEIGER, 1991).

Ácido caféico possui grande ocorrência como éster simples de ácido quínico, como o ácido clorogênico, ou éster dicafeil de ácido quínico, como a cinarina (HARBORNE, 1980). O ácido caféico, o ácido clorogênico e a cinarina estão presentes na alcachofra (*Cynara scolymus*), espécie utilizada em problemas hepáticos, sendo atribuída a atividade hepatoprotetora principalmente à cinarina. Nessa espécie foi observada interação entre o ácido clorogênico e a cinarina. Nas folhas, o conteúdo de ácido clorogênico diminui e o de cinarina aumenta durante o desenvolvimento da planta até atingir o estágio de diferenciação dos capítulos (SOUZA et al., 1991).

A atividade medicinal do ácido caféico e do ácido clorogênico foi detectada como antioxidante (OHNISHI et al., 1994, CARVALHO et al., 1999). Ao ácido caféico foi atribuída a propriedade citoprotetora de células hepáticas por ULRICHOVÁ et al. (1995), quando analisaram frações fenólicas de quatro espécies de *Colchicum*. Ao ácido clorogênico e à trigonelina, presentes nas folhas de café (*Coffea arabica*), é atribuída a ação hepatoprotetora do chá de suas folhas. Além das folhas, o ácido clorogênico encontra-se nas raízes e nas sementes jovens de café e sua concentração nas folhas é de 5 a 10% (GERMOSÉN-ROBINEAU, 1996). Folhas maduras de *Chrysanthemum coronarium* têm maiores concentrações de ácido clorogênico que as folhas jovens (CHUDA et al., 1998). *Bidens pilosa*, planta útil como hepatoprotetora, possui ácido caféico e ácido clorogênico.

Outras propriedades são atribuídas ao ácido caféico, como a antisséptica e ao ácido clorogênico, como a antifúngica (GERMOSÉN-ROBINEAU, 1996). Esses compostos são depositados nos vacúolos das células vegetais (TAIZ e ZEIGER, 1991) e, por serem solúveis na água, podem estar presentes nos chás e banhos e, dessa maneira, contribuir com suas propriedades coleréticas, antibacterianas e antioxidantes ao melhor funcionamento do organismo. O ácido clorogênico é exemplo de éster vegetal, que pode ser hidrolisado no sistema gástrico liberando monômeros de ácido caféico e ácido quínico. O ácido caféico liberado atua bloqueando os efeitos dos agentes carcinogênicos (HARRIS e MAGGERTY, 1993).

A presença de ácido clorogênico nas infusões (chás) se deve à integridade desse em altas temperaturas (CHUDA et al., 1998; RODRIGUEZ de SOTILLO et al., 1994).

Diversas técnicas estão descritas na literatura na determinação de ácido caféico e de ácido clorogênico, dentre essas a cromatografia em camada delgada (CCD) (WAGNER e BLADT, 1996) e de espectrofotometria (DAO e FRIEDMAN, 1992; GRIFFITHS et al., 1992) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (DAO e FRIEDMAN, 1992; CHUDA et al., 1998; ESCARPA e GONZÁLES, 1998), que é a preferida devido à alta resolução. O ácido caféico e o ácido clorogênico possuem a máxima absorvância no comprimento de onda de 325 nm (DAO e FRIEDMAN, 1992; ESCARPA e GONZÁLES, 1998).

2.3. Plantas medicinais e altitude

As plantas interagem com o ambiente, modificam-no e são por ele modificadas. Essa interação é intensa e as plantas crescem e se desenvolvem à medida que respondem aos estímulos ambientais, sejam temperatura, altitude, regimes de chuva, umidade, luminosidade, fotoperíodo, vento, herbivoria, biota associada, poluição atmosférica, tipo e fertilidade do solo. A necessidade de resposta a esses estímulos faz com que a planta altere a composição e concentração dos metabólitos secundários produzidos (GOTTLIEB et al., 1996). Concomitantemente, podem ocorrer variações desses metabólitos de acordo com a fase do ciclo de vida da planta. Isso exemplifica a importância em se determinar o órgão a ser colhido, o estágio reprodutivo e o ambiente onde crescem as plantas medicinais. O cultivo de espécies vegetais de diferentes regiões climáticas e o estudo das variações produzidas em seu metabolismo secundário estão sendo feitos em diversos centros de pesquisa, conforme cita BRAGA (1997).

Há espécies medicinais que necessitam ser cultivadas em altitudes, como por exemplo a *Cinchona* (Quina), produtora do alcalóide quinina. As plantas de *Cinchona succirubra* crescem bem a baixas altitudes mas praticamente não produzem esses alcalóides (BALBAA, 1983). De acordo com TÉTÉNYI (1983),

a *Arnica montana* produz altos teores de flavonóides a 1.800 m de altitude, sendo este o seu *habitat* ótimo.

Exemplos da influência da altitude e dos estádios de desenvolvimento dos vegetais na produção de esteróides entre indivíduos da mesma espécie estão no Quadro 1.

Quadro 1 - Relação entre altitude e estádios de desenvolvimento de cinco espécies produtoras de esteróides (Adaptado de CHATTERJEE et al., 1983)

Espécie	Altitude (m)	Biomassa (kg/ha)	% Diosgenina-Solasodina		
			Vegetativo	Reprodutivo	Pós-reprodutivo
<i>Dioscorea composita</i>	50	5500	2,00	3,00	3,25
	500	4800	2,26	3,50	3,92
<i>Dioscorea floribunda</i>	50	4550	2,33	3,54	3,86
	500	4100	2,46	3,79	4,12
<i>Dioscorea prazeri</i>	50	2000	0,70	2,00	2,51
	500	1100	0,86	2,20	2,78
<i>Costus speciosus</i>	50	2250	0,95	1,21	0,74
	500	1200	1,52	1,85	1,02
<i>Solanum laciniatum</i> (frutos)	50	625	-	0,96	1,32
	500	950	-	1,49	1,76

Nessas espécies, CHATTERJEE et al. (1983) observaram que a síntese de esteróides (diosgenina e solasodina) aumentava em altitudes mais elevadas e esse fato manteve-se associado, exceto em *Solanum laciniatum*, à menor produção de biomassa. Os estádios pós-reprodutivos de desenvolvimento revelaram altos conteúdos de diosgenina-solasodina nas espécies de *Dioscorea* e *Solanum*, enquanto em *Costus speciosus* a diosgenina foi alta durante o estágio reprodutivo.

A altitude de crescimento influenciou os compostos fenólicos presentes nas folhas de *Inga densiflora* e *Inga punctata*. Nas maiores altitudes, tanto as folhas jovens quanto as velhas continham maiores concentrações desses compostos, o que motivou KOPTUR (1985) a sugerir que isso foi adaptação de defesa contra os predadores ou o aumento da luz UV nas altas altitudes.

Em *Solanum tuberosum*, foi verificado que a luz aumenta a atividade da enzima fenilalanina amônia liase (PAL), seguida do aumento na atividade de hidroxicinamoil-CoA:quinato hidroxicinamoil transferase (HQT), gerando o acúmulo de ácido clorogênico (LUCKNER, 1980). Quanto ao ácido caféico,

GOTTLIEB et al. (1996) comentam que seu acúmulo é notavelmente maior em plantas de latitudes maiores.

2.4. Plasticidade fenotípica

A plasticidade fenotípica é a habilidade do genótipo particular produzir fenótipos específicos dependendo do contexto ambiental, significando que os efeitos genéticos e ambientais não são independentes, pois as respostas fenotípicas dos genótipos podem diferir segundo as variações ambientais (SCHEINER, 1993).

Ao estudar os efeitos dos ambientes no genótipo observa-se variáveis fenotípicas quanto a características morfológicas ou químicas. Os efeitos ambientais podem alterar as características morfológicas (plasticidade morfológica) e a concentração dos constituintes ativos (plasticidade fisiológica) (BRADSHAW, 1965) das plantas medicinais e essas modificações afetarem suas propriedades medicinais e as colocarem fora das especificações farmacêuticas (TRENTINI, 1997). Os pesquisadores de plantas medicinais atualmente estão voltados, preferencialmente, ao estudo das espécies que produzem os fitofármacos desejados, ignorando os processos genéticos e ambientais que influenciam na produção destes (KAMADA et al., 1999).

A plasticidade fenotípica assume grande importância devido a sua aplicabilidade no planejamento de estratégias pelos melhoristas, significando aproveitar a flexibilidade dos genótipos em resposta às variáveis ambientais, objetivando as combinações superiores. Hoje, apesar de ter sido realizado pouco estudo sobre plasticidade fenotípica em plantas medicinais, é essencial este conhecimento a fim de conseguir uniformidade de produção. A importância disso, está na qualidade da matéria fresca e/ou seca destinada ao uso *in natura*, matérias-primas a fim de obter confiáveis fitofármacos e medicamentos industriais (OLIVEIRA et al., 2001).

A concentração das substâncias bioativas nas plantas pode ser ou não alterada por fatores bióticos e abióticos encontrados no meio ambiente. Os fatores bióticos são expressos pelas interações entre indivíduos, tais como:

alelopatia, simbiose, parasita-hospedeiro, etc. Os fatores abióticos são expressos pelas condições climáticas (luz, temperatura, umidade, pluviosidade, altitude, latitude, longitude) e edáficas (composição, tipo e textura do solo) em que as plantas são submetidas durante seu crescimento e desenvolvimento (GERSHENZON, 1984). Pelo exposto, pode-se atentar sobre a importância do papel da interação genótipo x ambiente, cujo conhecimento permite determinar o meio mais adequado de produção desejada e estável.

Dessa forma, o ambiente possui importância primordial no emprego de uma planta como medicinal. Muitos fatores ambientais influenciam nesse metabolismo, e dentre eles está a altitude, cuja variação implica, principalmente, em diferenças de temperatura e luminosidade. A planta que ocorre em altitudes pode variar os seus constituintes químicos e dessa forma pode variar o uso de acordo com sua procedência. Os estudos da influência da altitude sobre os compostos metabolicamente ativos ainda são incipientes.

Há muitos métodos de quantificar a plasticidade em resposta à variação ambiental. As estimativas se tornam mais precisas quanto menor for a variação genética dentro do tratamento. Por meio de esperanças de quadrado médio, pode-se estimar a variância do tratamento, a qual, sendo significativa (Teste F), indica que o caráter em questão é plástico (SCHLICHTING, 1986). Com a análise de variância (conjunta) pode-se comparar as plasticidades de dois ou mais genótipos cultivados em ambientes. Dessa análise, pode-se separar três componentes principais de variação: variância atribuída ao genótipo, variância atribuída aos ambientes e variância atribuída à interação genótipo x ambiente. A variância ambiental e a interação resultam de resposta plástica. O termo de interação significativo indica que não somente há plasticidade, como também diferenças entre genótipos na plasticidade. Este termo pode ser significativo, mesmo quando o ambiente não o é (SANTOS, 1990).

As plasticidades podem diferir quanto ao caráter, ou seja, diferentes caracteres podem ter comportamentos distintos no mesmo ambiente. Portanto, não se justifica determinar a plasticidade de um caráter e ter idéia do grau de plasticidade de todo o grupo taxonômico. Quando dois caracteres respondem diferentemente ao estímulo ambiental, indica que a plasticidade envolve

organização de relacionamento entre caracteres, no intuito de manter a integração fenotípica na mudança ambiental (SANTOS, 1990).

SCHLINCHTING e LEVIN (1984), estudando a planta anual *Phlox*, estimaram a magnitude da plasticidade fenotípica em coeficiente de variação ambiental (CVa) e classificaram em magnitude alta, $CVa > 20\%$, média, CVa entre 10 e 20%, e baixa, $CVa < 10\%$. KAMADA et al. (1999) adotaram essa classificação ao estudar a plasticidade fenotípica de três acessos de manjeriço (*Ocimum* spp.): manjeriço-branco, manjeriço-roxo e basilicão. Neste trabalho, foram testadas adubações químicas e orgânicas e a plasticidade foi estimada pelos caracteres dos óleos essenciais: teor, composição química e concentrações do terpinoleno e eugenol. Os valores da plasticidade foram estimados pelo coeficiente de variação ambiental (CVa) e índice de determinação ambiental (Ia^2). O CVa foi utilizado na estimação da magnitude de plasticidade e o Ia^2 na representação da proporção de variação total atribuída ao efeito ambiental. O CVa indicou magnitude média e o Ia^2 demonstrou que o ambiente teve influência alta na variação total.

Estudos visando associar a variabilidade genética com a plasticidade fenotípica demonstraram que as correlações são variáveis de acordo com a espécie e o caráter em questão. COUNTS (1993), analisando as populações de *Zizania* spp., desenvolvidas ao longo de gradiente de altitude, observou que a magnitude da plasticidade não estava correlacionada com o grau de heterozigose das populações. SACCO et al. (1992) avaliaram a variabilidade genética e a plasticidade fenotípica na progênie F_1 de *Mentha viridis* com relação aos constituintes do óleo essencial e observaram que o constituinte de maior variabilidade genética foi diferente do de maior plasticidade fenotípica. Pelos resultados foi sugerido que as três hipóteses podem explicar a magnitude e o padrão de plasticidade e que, nenhuma, sozinha, seria suficiente a essa explicação. Não foi possível considerar uma hipótese como sendo a principal com relação à resposta quantitativa ou qualitativa de plasticidade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Testes preliminares

Os testes foram feitos em plantas de *Bidens pilosa* nos três estádios reprodutivos: antes, durante e depois do florescimento. Em cada estágio foram analisados três órgãos: folha, caule e raiz.

O local de coleta das plantas foi a Horta Biodinâmica, em Viçosa-MG, cuja análise do solo está no Quadro 2.

Quadro 2 - Resultado das análises químicas do solo da Horta Biodinâmica onde foram coletadas as plantas de *Bidens pilosa* L. Viçosa-MG

pH	P	K	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H + Al	CTC	V
H ₂ O	mg/dm ³		cmolc/dm ³					%
5,4	14	740	2,3	1,0	0,0	5,47	9,0	39

pH em água, KCl e CaCl₂ - Relação 1:2,5;

P, K - Extrator Mehlich 1;

Ca, Mg, Al - Extrator KCl - 1 mol L⁻¹;

H + Al - Extrator Acetato de Cálcio 0,5 mol L⁻¹ - pH 7,0;

CTC = Capacidade de Troca Catiônica;

V = Índice de Saturação de Bases.

As plantas foram coletadas dia 16/12/1999, no período da manhã, com três repetições e cada uma contendo três plantas. As três plantas de cada repetição foram analisadas individualmente e consideradas as médias dos dados.

O estágio antes do florescimento caracterizou-se por plantas na fase vegetativa; o estágio durante o florescimento, por plantas contendo apenas

inflorescências e o estágio depois do florescimento, por plantas em frutificação na maior parte dos ápices reprodutivos. A coleta das plantas foi feita com auxílio de enxadão, obtendo as raízes. As folhas, o caule e as raízes foram separados e, imediatamente, iniciada a secagem artificial, em sala com desumidificador, no Grupo Entre Folhas - Plantas Medicinais, campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV). As raízes foram lavadas antes da secagem.

A massa seca de cada órgão e a massa seca total da planta foram determinadas em balança de precisão. A extração e a análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram feitas no Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA), do Departamento de Química da UFV. Os extratos dos três órgãos foram analisados de maneira semelhante aos extratos foliares descritos no item 3.5 e 3.6 deste capítulo.

3.2. Material experimental

Seis genótipos de *Bidens pilosa* foram selecionados de grupos divergentes com vistas ao estudo de plasticidade fenotípica dos fitofármacos: ácido clorogênico e ácido cafêico. Cada genótipo foi representado por plantas propagadas vegetativamente pela técnica de cultura de tecidos e aclimatadas em telado. Os grupos divergentes foram determinados pela análise isozimática descrita no capítulo 1 e a micropropagação descrita no capítulo 2. Os genótipos foram cultivados em quatro altitudes e coletados em quatro estádios reprodutivos (conforme descrito no capítulo 3).

No Quadro 3, é descrito o local e o *habitat* de coleta, além do número do herbário (VIC). A altitude de coleta foi adotada como representativa do genótipo, ou seja, o genótipo 210 foi coletado na altitude 210 m, o genótipo 450 foi coletado na altitude 450 m e assim os demais.

Quadro 3 - Altitude, local, área e *habitat* de coleta dos 6 genótipos de *Bidens pilosa* L. e seus respectivos números do herbário (VIC)

Genótipo	Local de Coleta	Área e <i>Habitat</i> de Coleta	VIC
210	Leopoldina (MG)	Urbana - terreno baldio, ensolarado e seco	25.311
450	Leopoldina (MG)	Rural – horta, sombreada e úmida	25.313
475	Oratórios (MG)	Rural – horta, ensolarada e úmida	25.312
675	Viçosa (MG)	Rural – horta, ensolarada e úmida	25.308
950	Araponga (MG)	Rural – horta, ensolarada e úmida	25.309
1150	Araponga (MG)	Rural – horta, ensolarada e úmida	25.310

Genótipo = representado pela altitude de origem, em metros; VIC = Herbário da Universidade Federal de Viçosa.

3.3. Instalação e condução do experimento

O presente trabalho foi instalado e conduzido em quatro locais, cujas altitudes são: 198, 479, 739 e 962 m, no período de junho a outubro de 2000.

Utilizou-se o delineamento estatístico em blocos casualizados, com três repetições, e os seguintes tratamentos: seis genótipos, quatro altitudes, quatro estádios reprodutivos, sendo a parcela constituída de duas plantas, cada uma em um vaso de 5 L.

Foram feitas anotações manuais diárias das condições atmosféricas referentes à temperatura máxima e mínima do ar, capacidade evaporativa do ar e precipitação. Os instrumentos foram instalados ao lado dos experimentos a 1,5 m de altura do solo. Os dados são relativos e serviram à comparação entre as quatro altitudes de cultivo.

As medidas de temperaturas do ar foram feitas em termômetro de máximas e mínimas, as de capacidade evaporativa do ar em atmômetro de Piche e as de precipitação em pluviômetro. Os termômetros e os atmômetros foram mantidos na posição vertical dentro de abrigos. Os abrigos, os pluviômetros, e os atmômetros utilizados neste experimento foram construídos e seguindo descrição de TUBELIS e NASCIMENTO (1980) e com orientação e auxílio do Professor Hélio Vieira (Professor aposentado do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa). Os atmômetros foram aferidos com os da estação climatológica da UFV com os valores de correlação média de 0,9932. Os

abrigos foram fabricados de maneira a proporcionar proteção contra a radiação solar, a chuva e os animais, e permitir, entretanto, a livre circulação de ar. Os pluviômetros e os abrigos foram colocados próximos aos experimentos e mantidos a cerca de 1,5 m de altura do solo.

3.4. Análise estatística e estimadores da plasticidade

Foram feitas análises de variância conjunta com desdobramento das somas de quadrado da altitude e da interação altitude x genótipo submetidos à análise de variância individual, contendo as variáveis estudadas nos seis genótipos nas quatro altitudes, considerando um estádio reprodutivo de cada vez. A diferença entre genótipos na interação com o ambiente que revela plasticidade foi quantificada pela resposta plástica. A quantificação da plasticidade foi feita com base na magnitude de resposta e no padrão de resposta plástica. A magnitude foi estimada pelo coeficiente de variação ambiental (CVa) (SCHLICHTING e LEVIN, 1984) e pelo índice de determinação ambiental (Ia^2) (KAMADA, 1999). Estimativas negativas dos índices de determinação ambiental foram desconsideradas e representadas por traços. O padrão de plasticidade foi estimado pelo coeficiente de correlação de Pearson. O coeficiente de coincidência (CCo) foi estimado, de acordo com CRUZ (1997), pelas médias submetidas ao teste de Tukey. Esses estimadores encontram-se descritos no capítulo 3.

3.4.1. Magnitude de plasticidade

A magnitude da plasticidade foi utilizada na quantificação da resposta plástica dos genótipos em relação ao ambiente por meio do coeficiente de variação ambiental (CVa) e do índice de determinação ambiental (Ia^2), descritos no Capítulo 3.

3.4.2. Padrão de plasticidade fenotípica

A direção e o sentido da resposta aos ambientes de um genótipo são denominados de padrão de plasticidade fenotípica. Esse padrão pode ser estimado pelo coeficiente de correlação de Pearson ao se analisar os pares de genótipos. O cálculo desse coeficiente foi feito por recursos computacionais do programa SAEG (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas) versão 5.0, desenvolvido na Universidade Federal de Viçosa, cujas instruções operacionais estão descritas em GOMES (1992).

3.4.3. Coeficiente de coincidência (CCo)

O CCo serviu à estimação do grau de adaptação do genótipo ao seu local de origem, ou seja, a altitude de onde foi coletado. Esse coeficiente, segundo CRUZ (1997), estima a concordância de ocorrência de observações superiores ou inferiores, em relação a cada par de características do genótipo. No presente estudo, o par foi composto pelas características fenotípicas plásticas e pelas altitudes de cultivo semelhantes à da coleta do genótipo.

A análise foi feita com base nas médias, pelo teste de Tukey, das características do genótipo nas quatro altitudes e nos quatro estádios reprodutivos.

A concordância (máxima ou mínima) de resposta plástica recebe nota 1 e os demais valores intermediários expressam a discordância adaptativa e recebe nota 0 (zero). A média das características é multiplicada por 100 a fim de determinar o coeficiente de coincidência em porcentagem.

Visando determinar a adaptação do genótipo ao local de origem (altitude), considerou-se:

- d) baixa adaptação, quando CCo for de 0 a 25%;
- e) adaptação intermediária, quando CCo for de 25 a 75%; e
- f) alta adaptação, quando CCo for de 75 a 100%.

3.4.4. Dados climáticos e sua correlação com ácido clorogênico e ácido cafêico

Dados de temperatura máxima e mínima do ar, capacidade evaporativa do ar e precipitação foram anotados diariamente nas altitudes de 198, 479, 739 e 962 m e serviram à comparação entre as quatro altitudes de cultivo e entre os quatro estádios reprodutivos dentro de cada altitude.

3.4.5. Influência da altitude e do estágio reprodutivo na produção de ácido clorogênico e ácido cafêico

Analisou-se a produção do ácido clorogênico e do ácido cafêico em função das variações no espaço (altitude) e no tempo (estádio reprodutivo), nas quatro altitudes e nos quatro estádios reprodutivos.

3.5. Coleta das plantas e características avaliadas

As plantas colhidas em quatro altitudes e em quatro estádios reprodutivos foram colocadas em sacos de papel identificados, acondicionadas em embalagens plásticas e transportadas ao Grupo Entre Folhas - Plantas Medicinais, onde foram submetidas à secagem artificial em sala de secagem (temperatura média de 30 °C) e ficaram armazenadas até a análise dos fitofármacos. As características avaliadas foram massa seca foliar, teores de ácido clorogênico e de ácido cafêico por grama de folha e por massa seca foliar da planta e porcentagem de ácido clorogênico em relação à soma de ácido clorogênico e ácido cafêico.

3.6. Análise dos fitofármacos

As folhas de cada planta foram moídas separadamente, acondicionadas em sacos de papel e, dentro de embalagens plásticas, foram levadas ao Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA) da Universidade Federal de Viçosa onde foi feita a pesagem de 0,25 g em balança analítica. As duas plantas da parcela foram reunidas, obtendo 0,5 g, e colocadas em tubo de ensaio onde foram feitas as extrações em etanol 80% à temperatura ambiente.

No tubo de ensaio contendo 0,5 g de folhas foi adicionado 7,5 mL de etanol (80%). A cada 24 horas o sobrenadante foi retirado e adicionado mais 7,5 mL de etanol 80%. Foi feita quatro vezes essa extração totalizando 30 mL de etanol 80% adicionados a cada 0,5 g de folhas, proporção de 1:60 (massa foliar: extrator). O extrato recolhido a cada extração foi colocado em frasco de vidro, etiquetado e envolvido em papel laminado, e mantido em refrigeração (5 °C). Foram avaliados 96 tratamentos, compreendendo seis genótipos de *Bidens pilosa*, quatro altitudes de cultivo e quatro estádios reprodutivos, sendo realizadas três repetições.

3.6.1. Preparo da amostra a ser analisada em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Foi retirada a clorofila do extrato obtido pela eluição em cartucho de extração em fase sólida, contendo 500 mg de sorvente C18 e com capacidade de 3 mL (Fabricante PR Cola). O cartucho foi acoplado ao erlenmeyer e a filtração de 3 mL de extrato foi feita sob pressão de 200 mm Hg. Após a extração, a clorofila retida nesse cartucho foi retirada com a eluição de 3 mL de acetona e, a seguir, recuperou-se o cartucho com a eluição de 3 mL de etanol (80%). Após eluir todo o etanol, o cartucho encontrava-se novamente apto a filtrar outra amostra. O volume final do extrato filtrado foi colhido em frasco de vidro envolvido por papel laminado e, a seguir, foi mantido refrigerado (5 °C) até o momento da análise cromatográfica.

3.6.2. Diluição da amostra

Antes da aplicação da amostra no CLAE foi feita a diluição do extrato filtrado em etanol (80%). Utilizou-se amostras de 100 µL de extrato e 900 µL de etanol (80%). Após a diluição fez-se a filtração utilizando membrana de “nylon” (0,45 µm x 47 mm de malha, Supelco) acoplada à seringa de vidro que continha ponteira do tipo “luer-lock”.

3.6.3. Análise dos constituintes do extrato das folhas de *Bidens pilosa*

A análise dos extratos foi feita no LASA utilizando o CLAE. A identificação do ácido caféico e do ácido clorogênico foi por co-injeção de padrão em CLAE. Os dados cromatográficos das áreas dos picos foram integrados após 30 minutos do início da corrida. A quantificação foi feita mediante os valores correspondentes às áreas dos picos de cada composto serem inseridos na sua respectiva equação de reta determinada pelas curvas padrão. Na análise dos fitofármacos quantificou-se dois componentes químicos e considerou-se também a relação desses com a massa seca foliar.

A curva padrão foi feita a partir da solução-estoque de 20,0 ppm dos padrões de ácido caféico (Aldrich) e ácido clorogênico (Aldrich). Com essas soluções preparou-se as concentrações: 0,0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,2, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 10,0, 14,0, 16,0 e 20,0 ppm. No mesmo dia em que foi feita a solução, foi feita a curva padrão. A curva foi feita ao iniciar a análise das amostras.

Foi utilizado o aparelho Shimadzu Liquid Chromatograph (Shimadzu Co.), modelo LC 10-AD, equipado com duas bombas, “loop” de 20 μ L, detector SPD-10AV (leitura no UV-Visível) e acoplado pela unidade CBM-10A ao computador. A pré-coluna usada foi a Hibar Pre-Packed Column RT 250-4 e a coluna foi LChrosorb RP-18, de 250 mm de comprimento, 4 mm de diâmetro interno e preenchida com partículas de 5 μ m (Merck, Darmstadt, Germany).

A análise foi feita em temperatura ambiente, fluxo de 1 mL min⁻¹, comprimento de onda de 325 nm e fase móvel acetonitrila (grau espectroscópico, EMScience, Gibbstown, N.J., EUA) e água purificada em Mili-Q System (Millipore Inc.) com 2% de ácido acético. O tempo de análise foi 30 minutos. O gradiente de eluição empregado foi de: 0 a 25 minutos com acetonitrila de 10 a 90%; de 26 a 30 minutos com acetonitrila de 90 a 10%. Depois do final do gradiente, manteve-se a concentração de acetonitrila em 10% por mais seis minutos a fim de estabilizar a coluna, observada no equilíbrio da linha de base. Assim, o tempo entre uma injeção e outra foi 36 minutos.

3.6.4. Características analisadas

A quantificação do ácido clorogênico e do ácido caféico foi feita a partir da inserção dos valores das áreas de seus picos nas suas respectivas equações de reta. A partir destes valores foi feita a análise estatística e a quantificação da plasticidade fenotípica dos fitofármacos, considerando-se também a relação desses com a massa seca foliar.

3.6.4.1. Teor de ácido clorogênico por grama de massa foliar (CLg)

Ao fazer a curva padrão foi possível calcular o teor de ácido clorogênico em miligrama por grama de massa foliar (CLg) baseado na área dos picos gerados quando da injeção e análise das amostras do extratos etanólicos das folhas de *Bidens pilosa* por CLAE.

3.6.4.2. Teor de ácido caféico por grama de massa foliar (CFg)

O teor de ácido caféico em miligrama por grama de massa foliar (CFg) foi baseado na área dos picos das amostras as quais foram comparadas com valores da curva padrão.

3.6.4.3. Massa seca foliar (MF)

Essa característica foi analisada no capítulo 3 mas, como neste experimento foram consideradas apenas três blocos, foi analisada novamente. A massa seca foliar, em gramas, foi determinada em balanças analíticas. Os valores expressos são relativos à média das duas plantas da parcela.

3.6.4.4. Rendimento de ácido clorogênico por massa seca foliar (CLmf)

O rendimento foi estimado pela multiplicação do valor observado da massa seca foliar pelo teor de ácido clorogênico de cada grama de folha.

3.6.4.5. Rendimento de ácido caféico por planta (CFmf)

O rendimento foi estimado pela multiplicação do valor observado da massa seca foliar pelo teor de ácido caféico de cada grama de folha.

3.6.4.6. Percentual de ácido clorogênico na soma de ácido clorogênico e ácido caféico (%CL)

O valor foi determinado pela divisão do teor de ácido clorogênico pela soma dos teores de ácido clorogênico e ácido caféico e multiplicado por 100.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Testes preliminares

O ácido clorogênico foi detectado nos extratos de *Bidens pilosa* por cromatografia em camada delgada. Devido ao ácido caféico ser precursor do ácido clorogênico e ambos terem atividade hepatoprotetora e a *Bidens pilosa* ser atribuída essa atividade (GERMOSÉN-ROBINEAU, 1996; CARVALHO et al., 1999; YOMURA et al., 1988), foram realizados estudos de quantificação dessas substâncias durante o desenvolvimento vegetal, com o objetivo de verificar em qual fase e em qual órgão há maior acúmulo desses compostos. As análises foram feitas em plantas de *Bidens pilosa* nos três estádios: antes, durante e depois do florescimento. Em cada estágio analisaram-se os três órgãos: folha, caule e raiz.

4.1.1. Análise do estágio reprodutivo e do órgão vegetal onde há acúmulo de ácido clorogênico e ácido caféico em *Bidens pilosa* L.

O pico do ácido clorogênico foi identificado com tempo de retenção de cerca de 8,1 minutos e o de ácido caféico, com cerca de 9,3 minutos. Baseado na área obtida da integração dos picos de padrões nas 14 concentrações de 0 a 20 ppm foi determinada a equação $y = 53,662x - 8,248$ que relacionou a concentração do ácido clorogênico com a resposta do detector com alto grau de correlação, $R^2 = 0,9989$, e a equação $y = 99,939x - 4,018$ que quantifica o ácido

caféico com $R^2 = 0,9996$ (Figura 3). Nessas equações, a variável “x” corresponde a área do pico, em absorvância, e a variável “y” corresponde à concentração, em ppm, de ácido clorogênico ou ácido caféico. Os valores dos ácidos clorogênico e caféico em ppm foram transformados em mg por g de massa seca e em mg por massa total do órgão, a fim de determinar teor e produtividade, respectivamente.

O resumo da análise de variância está contido no Quadro 4. Os caracteres tiveram valores significativos, demonstrando que os estádios fenológicos e os órgãos considerados possuem diferença significativa na quantidade de ácidos clorogênico e caféico.

A avaliação das médias das variáveis (Quadro 5) indicou que a massa seca (MS) aumenta em todos os órgãos e que depois do florescimento o caule tem massa significativamente maior que os demais estádios e órgãos. Este aumento de massa do caule após o florescimento foi observado em *Bidens pilosa* por BASTIDAS et al. (1989) e está relacionado ao maior rendimento de ácido clorogênico (CLplanta) nesse órgão e não nas folhas, como ocorreu com o ácido caféico (CFplanta). Enfatizando essa observação, pode-se constatar, nos dados de porcentagem de massa seca de cada órgão sobre a massa total da planta na mesma fase fenológica (%MS/org), que depois do florescimento a massa do caule correspondeu a 75,75% da massa seca da planta e as folhas a apenas 13,87%. Como as raízes na %MS/org tiveram pequena alteração no decorrer dos estádios, então o aumento de massa do caule foi devido à diminuição percentual das folhas.

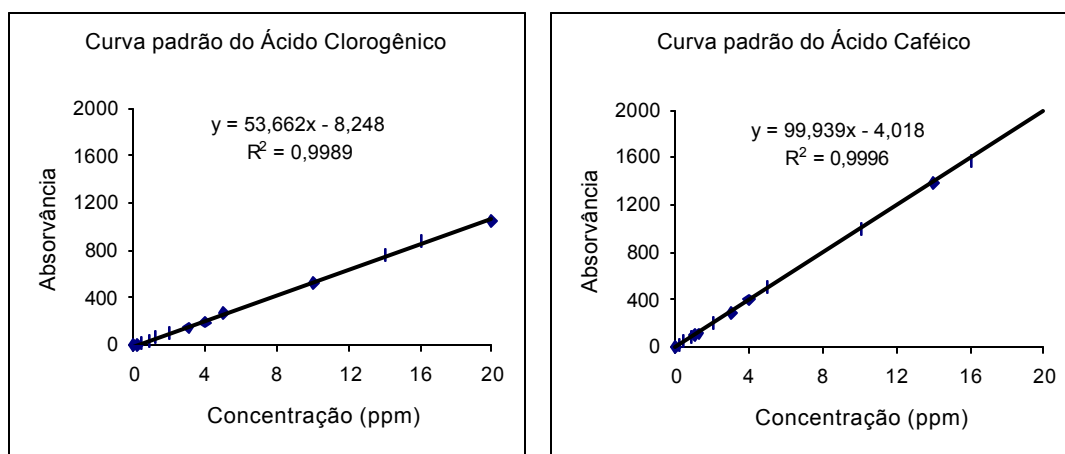


Figura 3 - Curvas padrão de ácido clorogênico e ácido caféico e respectivas equações de regressão.

Quadro 4 - Resumo da análise de variância dos caracteres de massa seca do órgão (MS), porcentagem da massa seca de cada órgão sobre a massa total da planta na mesma fase fenológica (%MS/org), teor de ácido clorogênico (mg/g matéria seca) (CLteor), teor de ácido caféico (mg/g matéria seca) (CFteor), teor de ácido clorogênico + ácido caféico (mg/g matéria seca) (CL+CF), percentual de ácido clorogênico na soma de ácido clorogênico e caféico (%CL), rendimento de ácido clorogênico por planta (mg/g de matéria seca) (CLplanta) e rendimento de ácido caféico por planta (mg/g matéria seca) (CFplanta) em três órgãos e três estádios de desenvolvimento de *Bidens pilosa* L.

FV	GL	Quadrados médios							
		MS	%MS/org	CLteor	CFteor	CL+CF	%CL	CLplanta	CFplanta
Tratamento	8	368,46**	1619,47**	6,96**	4,49**	22,53**	538,44**	260,92**	91,71**
Resíduo	18	12,76	27,45	0,37	0,17	0,98	9,45	45,73	9,51
Média		7,66	33,33	1,70	0,98	2,68	74,63	10,26	5,90
CV (%)		46,61	15,72	35,98	41,54	36,84	4,12	65,91	59,93

** = Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F.

No Quadro 5 mostra-se que o rendimento de ácido clorogênico e de ácido caféico por planta (CLplanta e CFplanta) é crescente com o avançar do estágio fenológico, sendo antes do florescimento menor que durante que é menor que depois do florescimento. O teor de ácido clorogênico e de ácido caféico (CLteor, CFteor e CL+CF) é maior nas folhas. Os órgãos acumulam mais ácido clorogênico do que ácido caféico, independente da fase fenológica, com proporção mantida dentro do órgão. O percentual de ácido clorogênico na soma de ácido clorogênico e ácido caféico no órgão (%CL) quantitativamente segue a ordem na raiz é menor que no caule que é menor que na folha. Nos três órgãos há aumento do rendimento de ácido clorogênico (CLplanta) e ácido caféico por planta (CFplanta), o que está relacionado ao aumento da massa seca de cada órgão (MS). Esses resultados foram úteis na padronização do estágio reprodutivo a ser feita a colheita do experimento de plasticidade. Além disso, serviu como alerta ao estágio de desenvolvimento da planta a ser usada na infusão ou decocção. As plantas depois do florescimento têm maior quantidade de ácido clorogênico e ácido caféico que as de outras fases e produz efeito pronunciado, caso os efeitos sejam atribuídos a esses componentes. Por outro lado, se a quantidade a ser utilizada em massa seca for fixa em relação ao órgão vegetal de interesse (folha, caule ou raiz), há maior confiabilidade de uso nos três estádios pois é mantido o teor de ácido clorogênico e de ácido caféico por grama de massa seca (CLteor e CFteor, respectivamente) nas três fases fenológicas nos três órgãos. Daí que a confiabilidade de uso aumenta com a determinação do órgão vegetal a ser utilizado e o doseamento terapêutico.

No Quadro 6 é demonstrado que a quantidade de ácido clorogênico e de ácido caféico por grama de material é maior nas folhas que é maior que no caule que é maior que na raiz. A maior porcentagem de ácido caféico nas folhas em relação aos outros órgãos é marcante. Já a quantidade de ácido clorogênico nas folhas é maior quando se considera a mesma massa, entretanto, com o avanço das fases fenológicas, há aumento considerável da massa do caule, como observado no Quadro 5, o que resulta em maior quantidade desse componente no caule nas plantas depois do florescimento (Quadro 6). Há maior concentração de ácido

Quadro 5 - Médias das análises dos caracteres de massa seca do órgão (MS), porcentagem de massa seca de cada órgão em relação à massa total da planta na mesma fase fenológica (%MS/org), teor de ácido clorogênico (CLg), teor de ácido caféico (CFg), teor de ácido clorogênico + ácido caféico (CL+CF), percentual de ácido clorogênico na soma de ácido clorogênico e caféico no órgão (%CL), rendimento de ácido clorogênico por planta (CLplanta) e rendimento de ácido caféico por planta (CFplanta) em três órgãos e três estádios de desenvolvimento de *Bidens pilosa* L.

Órgão	Fase de florescimento	MS	%MS/org	CLteor	Cfteor	CL+CF	%CL	CLplanta	CFplanta
Folhas	Antes	3,23B	40,61BC	4,21A	2,85 ^A	7,06A	59,63C	13,70ABC	9,23ABC
	Durante	4,15B	32,14C	3,53A	2,68A	6,21A	57,06C	14,54ABC	10,77AB
	Depois	6,48B	13,87D	3,25A	2,24A	5,50A	58,96C	22,28AB	15,06A
Caulo	Antes	3,77B	47,16B	0,80B	0,29B	1,09B	73,76B	3,10BC	1,14CD
	Durante	7,13B	55,40B	1,43B	0,41B	1,84B	77,49B	10,49ABC	3,06BCD
	Depois	36,73A	75,75A	0,66B	0,19B	0,85B	77,15B	24,97A	6,66ABCD
Raiz	Antes	0,97B	12,23D	0,62B	0,06B	0,69B	90,94A	0,60C	0,06D
	Durante	1,62B	12,47D	0,41B	0,05B	0,47B	88,10A	0,72C	0,09D
	Depois	4,87B	10,38D	0,39B	0,05B	0,44B	88,56A	1,94C	0,24D

As médias seguidas de uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

As médias de CLteor, Cfteor e CL+CF são em miligrama por grama de matéria seca; as de CLplanta e CFplanta são em miligrama por massa seca total de cada órgão vegetal.

Quadro 6 - Percentual de ácido clorogênico e ácido caféico de cada órgão vegetal, em relação à soma desses dois componentes, e considerando a massa das plantas de *Bidens pilosa* L. em três estádios de desenvolvimento. Os dados são médias de três repetições, cada uma com três plantas

Estádio de florescimento	Por grama de material						Por planta					
	Ácido Clorogênico (%)			Ácido Caféico (%)			Ácido Clorogênico (%)			Ácido Caféico (%)		
	Folha	Caule	Raiz	Folha	Caule	Raiz	Folha	Caule	Raiz	Folha	Caule	Raiz
Antes	74,56	14,30	11,14	88,89	9,13	1,97	78,25	18,25	3,49	88,30	11,11	0,58
Durante	65,89	26,45	7,66	85,28	12,93	1,79	56,71	40,57	2,72	77,47	21,89	0,64
Depois	73,80	16,13	10,08	89,88	7,90	2,23	44,91	50,45	4,64	65,62	33,07	1,30
Média geral	71,42	18,96	9,63	88,02	9,99	2,00	59,96	36,42	3,62	77,13	22,03	0,84

clorogênico nas folhas jovens ou maduras do que no caule em *Chrysanthemum coronarium* (CHUDA et al., 1998).

A correlação foi calculada entre os caracteres. Não houve correlação entre massa seca (MS) e o teor de ácido clorogênico (CLteor) (-0,1682) e de ácido caféico (CFteor) (-0,1825). O mesmo ocorreu entre porcentagem de massa seca de cada órgão sobre a massa total da planta na mesma fase fenológica (%MS/org) e o teor de ácido clorogênico (CLteor) (0,0373), o de ácido caféico (CFteor) (-0,0322) e o de ácido clorogênico + ácido caféico (CL+CF) (0,0067). A correlação positiva foi observada entre CLteor x CFteor (0,9783) e o aumento do ácido caféico há oportunidade de aumento proporcional de ácido clorogênico. o que já foi relatado por DAO e FRIEDMAN (1992).

4.2. Quantificação de ácido clorogênico e de ácido caféico

A quantificação de ácido clorogênico e de ácido caféico foi feita a partir da inserção dos valores das áreas de seus picos nas suas respectivas equações de reta. A equação de ácido clorogênico utilizada foi $y = 53662x - 8247,7$ ($R^2 = 0,9989$) e a de ácido caféico determinada foi $y = 99939x - 4000,7$ ($R^2 = 0,9996$). A partir desses valores foi feita análise estatística e a quantificação da plasticidade fenotípica dos fitofármacos, considerando-se também a relação desses com a massa seca foliar.

4.3. Análise estatística e estimadores da plasticidade fenotípica

4.3.1. Análises de variância

Foram feitas análises de variância conjunta com desdobramento das somas de quadrado da altitude e da interação altitude x genótipo submetidos à análise de variância individual, contendo as variáveis estudadas nos seis genótipos nas quatro altitudes, analisando separadamente cada estágio reprodutivo: florescimento, início de frutificação, frutificação plena e senescência, respectivamente Quadros 7, 8, 9 e 10. As análises conjunta dos genótipos nos quatro estádios reprodutivos encontram-se no Quadro 11.

Quadro 7 - Resumo da análise de variância conjunta com desdobramento das somas de quadrado da altitude e da interação altitude x genótipo nos genótipos 210, 450, 475, 675, 950 e 1150 de *Bidens pilosa* L. nas quatro altitudes, dos caracteres teor de ácido clorogênico (CLg), teor de ácido caféico (CFg), massa seca foliar (MF), rendimento de ácido clorogênico por planta (CLmf), rendimento de ácido caféico por planta (CFmf) e percentual de ácido clorogênico na soma de ácido clorogênico e caféico (%CL) em plantas no estágio reprodutivo de florescimento

FV	GL	Quadrados médios					
		CLg	CFg	MF	CLmf	CFmf	%CL
Bloco/Altitude	8	2,91**	0,34*	0,42**	24,70**	2,68 ^{ns}	154,37*
Altitude (A)	(3)	30,93**	1,66**	12,29**	144,78**	22,19**	2918,40**
Genótipos (G)	5	2,34**	1,51**	4,32**	26,10**	22,39**	261,98**
A x G	(15)	1,91**	0,42**	0,26**	10,90**	4,56**	86,39 ^{ns}
A / G210	3	4,16**	0,52*	0,53**	5,26 ^{ns}	0,53 ^{ns}	1002,92**
A / G450	3	19,52**	1,13**	1,84**	60,43**	5,79**	418,32**
A / G475	3	2,04**	0,64**	3,72**	23,36**	15,08**	371,95**
A / G675	3	2,01**	0,12 ^{ns}	3,83**	26,89**	10,11**	405,46**
A / G950	3	8,31**	1,15**	1,27**	63,49**	10,25**	577,57**
A / G1150	3	4,42**	0,17 ^{ns}	2,42**	19,82**	3,24 ^{ns}	574,12**
Resíduo	40	0,40	0,13	0,06	3,50	1,29	61,71
Média		1,64	1,16	2,70	4,20	3,19	53,09
CV (%)		38,80	31,07	9,27	44,56	35,49	14,80

* e ** = Significativos a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F; ns = não significativo, pelo teste F.

CLg e CFg valores em miligrama por grama de matéria seca; MF em gramas; CLmf e CFmf em miligrama por massa seca total das folhas.

Quadro 8 - Resumo da análise de variância conjunta com desdobramento das somas de quadrado da altitude e da interação altitude x genótipo nos genótipos 210, 450, 475, 675, 950 e 1150 de *Bidens pilosa* L. nas quatro altitudes, dos caracteres teor de ácido clorogênico (CLg), teor de ácido caféico (CFg), massa seca foliar (MF), rendimento de ácido clorogênico por planta (CLmf), rendimento de ácido caféico por planta (CFmf) e percentual de ácido clorogênico na soma de ácido clorogênico e caféico (%CL) em plantas no estágio reprodutivo de início de frutificação

FV	GL	Quadrados médios					
		CLg	CFg	MF	CLmf	CFmf	%CL
Bloco/Altitude	8	1,35**	0,43 ^{ns}	0,31*	18,40**	4,58 ^{ns}	86,39*
Altitude (A)	(3)	14,44**	6,23**	10,57**	85,03**	145,67**	807,24**
Genótipos (G)	5	9,91**	18,27**	2,36**	92,44**	169,67**	215,04**
A x G	(15)	1,42**	2,49**	0,86**	15,19**	31,67**	59,50 ^{ns}
A / G210	3	1,42**	0,88 ^{ns}	0,97**	5,21 ^{ns}	3,43 ^{ns}	108,94*
A / G450	3	5,54**	1,56*	1,15**	26,60**	10,94 ^{ns}	199,81**
A / G475	3	1,86**	2,46**	3,54**	11,99*	52,11**	178,92**
A / G675	3	8,72**	0,71 ^{ns}	1,92**	22,37**	13,24 ^{ns}	308,78**
A / G950	3	2,21**	0,44 ^{ns}	6,47**	71,82**	41,47**	84,11 ^{ns}
A / G1150	3	1,77**	12,65**	0,81**	22,98**	182,81**	224,19**
Resíduo	40	0,30	0,39	0,12	3,16	4,88	35,23
Média		2,25	2,51	2,71	6,13	7,06	46,93
CV (%)		24,36	24,77	12,79	29,02	31,31	12,65

* e ** = Significativos a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F; ns = não significativo, pelo teste F.

CLg e CFg valores em miligrama por grama de matéria seca; MF em gramas; CLmf e CFmf em miligrama por massa seca total das folhas.

Quadro 9 - Resumo da análise de variância conjunta com desdobramento das somas de quadrado da altitude e da interação altitude x genótipo nos genótipos 210, 450, 475, 675, 950 e 1150 de *Bidens pilosa* L. nas quatro altitudes, dos caracteres teor de ácido clorogênico (CLg), teor de ácido caféico (CFg), massa seca foliar (MF), rendimento de ácido clorogênico por planta (CLmf), rendimento de ácido caféico por planta (CFmf) e percentual de ácido clorogênico na soma de ácido clorogênico e caféico (%CL) em plantas no estágio reprodutivo de frutificação plena

FV	GL	Quadrados médios					
		CLg	CFg	MF	CLmf	CFmf	%CL
Bloco/Altitude	8	0,21 ^{ns}	1,73*	0,09 ^{ns}	0,75 ^{ns}	8,40**	158,53**
Altitude (A)	(3)	2,73**	10,78**	3,73**	11,69**	78,57**	657,65**
Genótipos (G)	5	0,46*	3,75**	0,23 ^{ns}	2,17**	10,32**	345,14**
A x G	(15)	0,31 ^{ns}	2,51**	0,25*	1,32*	9,20**	87,94**
A / G210	3	0,16 ^{ns}	1,21 ^{ns}	0,32*	0,64 ^{ns}	3,63 ^{ns}	18,86 ^{ns}
A / G450	3	0,69*	1,49 ^{ns}	0,93**	3,55**	8,62*	110,17*
A / G475	3	0,52*	3,73**	1,78**	3,08**	37,04**	383,55**
A / G675	3	2,10**	2,41*	0,11 ^{ns}	6,73**	7,96*	171,71**
A / G950	3	0,47 ^{ns}	4,77**	1,41**	1,86*	18,79**	255,08**
A / G1150	3	0,35 ^{ns}	9,71**	0,40*	2,40**	48,54**	157,96**
Resíduo	40	0,18	0,58	0,10	0,53	2,78	28,18
Média		1,18	2,33	1,52	1,83	3,71	35,90
CV (%)		36,38	32,74	21,03	39,65	44,93	14,78

* e ** = Significativos a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F; ns = não significativo, pelo teste F.

CLg e CFg valores em miligrama por grama de matéria seca; MF em gramas; CLmf e CFmf em miligrama por massa seca total das folhas.

Quadro 10 - Resumo da análise de variância conjunta com desdobramento das somas de quadrado da altitude e da interação altitude x genótipo nos genótipos 210, 450, 475, 675, 950 e 1150 de *Bidens pilosa* L. nas quatro altitudes, dos caracteres teor de ácido clorogênico (CLg), teor de ácido caféico (CFg), massa seca foliar (MF), rendimento de ácido clorogênico por planta (CLmf), rendimento de ácido caféico por planta (CFmf) e percentual de ácido clorogênico na soma de ácido clorogênico e caféico (%CL) em plantas no estágio reprodutivo de senescência

FV	GL	Quadrados médios					
		CLg	CFg	MF	CLmf	CFmf	%CL
Bloco/Altitude	8	0,41 ^{ns}	0,96**	0,06 ^{ns}	0,73 ^{ns}	1,44 ^{ns}	65,27 ^{ns}
Altitude (A)	(3)	1,26*	7,17**	2,03**	5,39**	18,03**	2434,45**
Genótipos (G)	5	1,35**	0,67*	0,32**	2,54**	2,00 ^{ns}	826,65**
A x G	(15)	0,42 ^{ns}	1,27**	0,08 ^{ns}	0,81 ^{ns}	1,49 ^{ns}	211,41**
A / G210	3	0,10 ^{ns}	0,92*	0,16 ^{ns}	0,14 ^{ns}	0,81 ^{ns}	92,58 ^{ns}
A / G450	3	1,46**	2,51**	0,26**	0,72 ^{ns}	3,31*	230,69*
A / G475	3	0,44 ^{ns}	1,98**	0,26**	2,12*	3,78**	761,17**
A / G675	3	0,59 ^{ns}	1,92**	0,40**	1,72*	3,27*	503,64**
A / G950	3	0,57 ^{ns}	2,60**	0,87**	3,26**	7,45**	976,48**
A / G1150	3	0,22 ^{ns}	3,57**	0,49**	1,47 ^{ns}	6,83**	926,94**
Resíduo	40	0,33	0,22	0,06	0,52	0,87	66,76
Média		1,13	1,70	1,09	1,32	1,85	41,18
CV (%)		50,95	27,75	21,60	54,53	50,41	19,84

* e ** = Significativos a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F; ns = não significativo, pelo teste F.

CLg e CFg valores em miligrama por grama de matéria seca; MF em gramas; CLmf e CFmf em miligrama por massa seca total das folhas.

Quadro 11 - Resumo da análise de variância conjunta dos caracteres teor de ácido clorogênico (CLg), teor de ácido cafêico (CFg), massa seca foliar (MF), rendimento de ácido clorogênico por planta (CLmf), rendimento de ácido cafêico por planta (CFmf) e percentual de ácido clorogênico na soma de ácido clorogênico e cafêico (%CL) nos seis genótipos de *Bidens pilosa* L. crescidos em quatro altitudes e colhidos em quatro estádios reprodutivos

FV	GL	Quadrados médios					
		CLg	CFg	MF	CLmf	CFmf	%CL
Bloco/Altitude	8	2,80**	1,50**	0,22*	24,66**	7,28**	236,61**
Altitude (A)	3	28,51**	6,19**	17,14**	127,82**	113,57**	4419,35**
Genótipo (G)	5	7,79**	14,54**	5,19**	70,83**	117,78**	914,16**
Estádio (E)	3	19,32**	27,36**	48,87**	357,21**	352,70**	3947,98**
A x G	15	0,90**	2,88**	0,46**	9,34**	19,87**	112,47**
A x E	9	6,95**	6,55**	3,82**	39,69**	50,30**	799,46**
G x E	15	2,09**	3,22**	0,68**	17,47**	28,87**	244,88**
A x G x E	45	1,05**	1,27**	0,33**	6,29**	9,01**	110,92**
Resíduo	184	0,36	0,37	0,10	2,54	2,56	51,62
Média		1,55	1,93	2,01	3,37	3,95	44,28
CV (%)		38,53	31,70	15,97	47,32	40,48	16,23

* e ** = Significativos a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Valores de CLg, CFg e CLCFg em miligrama por de matéria seca; de MF, em gramas e de CLmf e CFmf, em miligrama por massa seca total das folhas.

Na maioria dos caracteres morfométricos os quadrados médios da interação altitude x genótipo foram significativos, demonstrando que a resposta plástica foi diferente entre os genótipos de *Bidens pilosa* nas altitudes e nos quatro estádios reprodutivos. Nesses quadros observa-se no percentual de ácido clorogênico na soma de ácido clorogênico e caféico (%CL) os menores valores de coeficiente de variação (CV %).

Valores significativos em todas as variáveis foram observados no genótipo 475 no florescimento, início de frutificação e frutificação plena (Quadros 7, 8 e 9), nos genótipos 450 e 950 apenas no florescimento (Quadro 7) e no genótipo 1150, em início de frutificação (Quadro 8).

Considerando cada genótipo individualmente, as análises de variâncias mostram que há diferenças significativas entre as altitudes dentro de cada genótipo, em todos os genótipos e em todas as altitudes.

No Quadro 7 estão as análises referentes ao estágio de florescimento. Interessante notar que na variável %CL a interação altitude x genótipo não foi significativa, porém foi significativa na análise individual por genótipo o que demonstra que as variações entre os genótipos são semelhantes em resposta plástica devido à altitude.

No estágio de início de frutificação os resultados das análises individuais (Quadro 8) tiveram a maioria dos quadrados médios significativos e nota-se que as variáveis teor de ácido clorogênico (CLg) e massa seca foliar (MF) foram significativas em todos os genótipos, significando que cada genótipo respondia de maneira particular em cada altitude.

A maioria dos quadrados médios das características teve valores significativos no estágio de frutificação plena, sendo que no genótipo 210 apenas a variável massa seca foliar (MF) foi significativa (Quadro 9).

No estágio de senescência (Quadro 10), a maioria dos caracteres avaliados têm quadrados médios significativos, sendo o teor de ácido caféico (CFg) significativo em todos os genótipos, indicando plasticidade fenotípica relacionada às altitudes.

A análise de variância dos genótipos em todas as altitudes (Quadro 11) revela que houve diferenças significativas, a 1% de probabilidade, entre

genótipos e entre altitudes. A interação genótipo x altitude, também significativas a 1% de probabilidade, indica que os efeitos dos fatores genótipo e altitude não explicam toda a variação encontrada na produção de ácido clorogênico e ácido cafêico demonstrando que a resposta da plasticidade fenotípica foi diferente entre os genótipos. Os valores significativos observados na interação genótipo x estágio reprodutivo demonstram que a resposta da plasticidade fenotípica foi diferente entre os genótipos em relação aos estádios reprodutivos.

4.3.2. Magnitudes da plasticidade fenotípica

A interação dos genótipos individuais com as altitudes foi significativa, demonstrando que os genótipos têm plasticidade fenotípica nas características. A análise quantitativa da resposta plástica da magnitude foi avaliada pelo coeficiente de variação ambiental (CVa) e índice de determinação ambiental (Ia^2).

No Quadro 12, estão os valores do coeficiente de variação ambiental (CVa) e no Quadro 13, o índice de determinação ambiental (Ia^2), indicando as magnitudes da plasticidade fenotípica das características observadas nos quatro estádios reprodutivos.

Adotando a classificação das magnitudes de plasticidade citada por SCHLICHTING e LEVIN (1984) (CVa > 20% alta, 10-20% média e < 10% baixa), foi observado que, em média, as características têm altas magnitudes de plasticidade, CVa = 44,47 (Quadro 12). Em média, o menor coeficiente de variação ambiental (CVa) foi observado no percentual de ácido clorogênico na soma de ácido clorogênico e cafêico (%CL) e o maior foi no rendimento de ácido clorogênico por massa seca foliar da planta (CLmf), respectivamente, 23,50 e 59,02.

Os valores dos índices de determinação ambiental (Ia^2) demonstraram que a variação total atribuída aos efeitos ambientais (altitude) foi alta nos genótipos, média de 0,7603 (Quadro 13). Em média, os caracteres tiveram Ia^2 altos, com o maior valor observado na característica massa seca foliar (MF) e o menor na característica teor de ácido clorogênico (CLg), respectivamente 0,8549 e 0,6956.

Quadro 12 - Estimativas dos coeficientes de variação ambiental (CVa) dos fitofármacos de extratos foliares nos estádios reprodutivos de florescimento (FL), início de frutificação (IF), frutificação plena (FP) e senescência (SE) de seis genótipos de *Bidens pilosa* L. cultivados em quatro altitudes

Estádios	Genótipos	Características						Média
		CLg	CFg	MF	CLmf	CFmf	%CL	
FL	210	113,69	66,26	26,42	93,89	48,30	31,60	63,36
	450	114,94	59,82	31,36	94,44	57,41	20,02	63,00
	475	61,33	38,99	37,83	72,92	63,66	22,66	49,57
	675	56,30	19,39	34,32	62,83	51,72	21,33	40,98
	950	83,00	42,11	22,22	82,34	44,81	27,92	50,40
	1150	68,45	14,76	30,48	53,15	22,19	28,61	36,27
IF	210	120,44	90,95	29,68	118,49	91,71	13,43	77,45
	450	60,67	38,65	22,28	50,02	37,24	15,50	37,39
	475	38,05	32,20	37,19	34,94	50,94	17,80	35,19
	675	55,53	18,30	24,53	30,03	24,77	19,80	28,83
	950	33,35	13,72	55,89	72,05	53,54	11,24	39,96
	1150	25,99	47,33	18,90	34,11	62,76	20,42	34,92
FP	210	26,21	31,32	25,77	39,85	41,56	8,07	28,80
	450	41,51	39,12	34,83	58,51	56,75	15,04	40,96
	475	37,45	52,58	48,53	56,70	91,49	29,33	52,68
	675	58,93	43,82	11,70	62,36	46,68	17,59	40,18
	950	35,64	46,25	44,43	47,86	62,34	29,58	44,35
	1150	24,59	54,77	24,80	41,89	76,10	23,18	40,89
SE	210	34,46	35,77	30,18	47,62	44,00	21,50	35,59
	450	47,75	56,83	25,87	30,40	57,98	18,15	39,50
	475	26,55	41,35	25,26	48,26	48,59	35,38	37,56
	675	37,72	57,40	29,26	51,14	62,48	27,24	44,21
	950	39,97	55,59	48,08	77,54	83,54	44,37	58,18
	1150	24,70	54,94	36,19	55,18	67,72	44,30	47,17
Média		52,80	43,84	31,50	59,02	56,18	23,50	44,47

Quadro 13 - Estimativas dos índices de determinação ambiental (I_a^2) dos fitofármacos de extratos foliares nos estádios reprodutivos de florescimento (FL), início de frutificação (IF), frutificação plena (FP) e senescência (SE) de seis genótipos de *Bidens pilosa* L. cultivados em quatro altitudes

Estádios	Genótipos	Características						Média
		CLg	CFg	MF	CLmf	CFmf	%CL	
FL	210	0,9453	0,9621	0,9238	0,9072	0,8495	0,8947	0,9138
	450	0,9556	0,9655	0,9410	0,9432	0,9885	0,8299	0,9373
	475	0,5616	0,4023	0,9899	0,4978	0,7760	0,6575	0,6475
	675	0,6050	-	0,9338	0,7094	0,8013	0,8658	0,7831
	950	0,7582	0,7820	0,8812	0,7255	0,8272	0,9157	0,8150
	1150	0,9676	0,2850	0,9427	0,9351	0,4432	0,9031	0,7461
IF	210	0,9407	0,8969	0,8702	0,9279	0,8749	0,5785	0,8482
	450	0,9301	0,9040	0,9367	0,8703	0,8783	0,8975	0,9028
	475	0,8616	0,8041	0,9456	0,6676	0,9397	0,5373	0,7926
	675	0,8939	0,2588	0,9657	0,6001	0,4825	0,9520	0,6922
	950	0,6326	-	0,9626	0,8159	0,8382	0,0975	0,6693
	1150	0,7853	0,9554	0,7409	0,8152	0,9425	0,8991	0,8564
FP	210	0,5107	0,6067	0,7801	0,6737	0,7297	0,1607	0,5769
	450	0,6786	0,4253	0,9535	0,8524	0,4796	0,6291	0,6697
	475	0,3752	0,5772	0,9258	0,7375	0,7519	0,7888	0,6927
	675	0,8599	0,3977	0,0494	0,8484	0,3153	0,4715	0,4903
	950	0,9100	0,9697	0,8792	0,9153	0,9621	0,8935	0,9216
	1150	0,5136	0,9854	0,8095	0,7200	0,9696	0,7228	0,7868
SE	210	0,5156	0,8482	0,8167	0,4945	0,9011	0,4255	0,6669
	450	0,1149	0,8387	0,8635	-	0,7084	0,7522	0,6555
	475	0,5758	0,6784	0,9272	0,7395	0,6524	0,8411	0,7357
	675	0,5924	0,9412	0,8626	0,8212	0,9219	0,8811	0,8367
	950	0,5902	0,8590	0,9629	0,8352	0,8070	0,9546	0,8348
	1150	0,6193	0,8869	0,6522	0,8159	0,7469	0,9314	0,7754
Média		0,6956	0,7378	0,8549	0,7769	0,7745	0,7284	0,7603

Os valores negativos de Ia^2 dos genótipos 450 (na senescência), 675 (no florescimento) e 950 (no início da frutificação) foram desconsiderados. O maior valor, $Ia^2 = 0,9899$, foi observado no genótipo 475 (no florescimento) na característica de massa seca foliar (MF).

4.4. Características avaliadas, respostas em magnitude e padrão de plasticidade

4.4.1. Teor de ácido clorogênico por grama de massa seca de folha (CLg)

O teor de ácido clorogênico em miligrama por grama de massa foliar (CLg) apresentou, nas análises individuais (Quadro 7, 8, 9 e 10), quadrados médios significativos no conjunto dos genótipos nos quatro estádios reprodutivos. Essas diferenças foram, principalmente, entre genótipos, pois na senescência os genótipos tiveram resposta não significativa e o conjunto apresentou valor significativo (Quadro 10). Os valores não significativos observados nos quatro estádios reprodutivos podem relacionar-se ao alto valor do coeficiente de variação observado nessa variável (de 24,36 a 50,95) (Quadro 7, 8, 9 e 10).

No Quadro 12 encontram-se coeficientes de variação ambiental (CVa) altos, variando de 24,59 a 120,44, com média de 52,80, que indicam variabilidade na plasticidade fenotípica dessa característica.

Os valores dos índices de determinação ambiental (Ia^2) foram, em média, altos (0,6956) e variando entre os estádios reprodutivos. Os maiores valores foram observados no florescimento e início da frutificação e os menores, na senescência (Quadro 13).

No Quadro 14, observa-se que o teor de ácido clorogênico por grama de massa foliar teve padrão de plasticidade semelhante no florescimento e início da frutificação, porém divergentes em plena frutificação e senescente. Isso indica que as altitudes influenciam continuamente na plasticidade dos fitofármacos e, após o florescimento (plena frutificação e senescente), as alternativas individuais de produção desses componentes tomam direção e sentido de respostas divergentes.

Quadro 14 - Matrizes contendo os coeficientes de correlação de Pearson dos caracteres teor de ácido clorogênico (CLg), teor de ácido caféico (CFg), massa seca foliar (MF), rendimento de ácido clorogênico por planta (CLmf), rendimento de ácido caféico por planta (CFmf) e percentual de ácido clorogênico na soma de ácido clorogênico e caféico (%CL) dos seis genótipos de *Bidens pilosa* L., cultivados nas altitudes de 198, 479, 739 e 962 m e analisados nos quatro estádios reprodutivos

Caráter CLg																				
Genótipos	Florescimento					Início da frutificação					Frutificação plena					Senescência				
	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150
210	0,886 1*	0,3801 ns	0,4636 ns	0,505 6*	0,860 7*	0,804 1*	0,688 9*	0,774 7*	0,4610 ns	0,1611 ns	0,0876 ns	0,3291 ns	- 0,0301 ns	- 0,0101 ns	0,591 3*	- 0,2025 ns	0,543 4*	0,0689 ns	0,4774 ns	0,4941 ns
450		0,678 7*	0,762 2*	0,789 9*	0,942 3*		0,977 9*	0,942 0*	0,687 5*	0,2729 ns		0,4817 ns	0,4300 ns	0,616 8*	0,0917 ns		- 0,0906 ns	- 0,0316 ns	0,2365 ns	- 0,1921 ns
475			0,855 4*	0,941 0*	0,723 7*			0,916 1*	0,655 8*	0,3076 ns			0,545 7*	0,2626 ns	0,533 2*			0,745 2*	0,4215 ns	0,4710 ns
675				0,947 0*	0,709 6*				0,661 8*	0,0616 ns				0,703 6*	0,3381 ns				0,0753 ns	0,0729 ns
950					0,798 6*					0,2206 ns					0,3356 ns					0,557 3*
Caráter CFg																				
Genótipos	Florescimento					Início da frutificação					Frutificação plena					Senescência				
	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150
210	0,3326 ns	0,1460 ns	- 0,1914 ns	0,2259 ns	0,3159 ns	0,498 7*	0,3912 ns	0,3544 ns	0,1772 ns	- 0,2934 ns	- 0,1119 ns	0,0254 ns	- 0,1899 ns	- 0,4328 ns	0,0425 ns	- 0,2293 ns	- 0,4797 ns	- 0,4048 ns	- 0,2439 ns	- 0,3072 ns
450		0,2820 ns	0,1377 ns	0,725 3*	0,1234 ns		0,718 8*	0,626 9*	0,0064 ns	0,2608 ns		0,700 3*	0,687 7*	0,703 1*	0,1618 ns		0,657 3*	0,751 7*	0,626 8*	0,715 2*
475			0,3643 ns	0,805 6*	0,0112 ns			0,532 4*	0,1296 ns	0,4859 ns			0,741 2*	0,4827 ns	0,575 3*			0,4633 ns	0,608 2*	0,638 8*

675	0,4139 ns	- 0,3950 ns	- 0,0795 ns	0,2162 ns	0,640 1*	0,1067 ns	0,662 7*	0,592 4*
950		0,0831 ns		- 0,4927 ns		0,1911 ns		0,870 2*

Caráter MF

Genótipos	Florescimento					Início da frutificação					Frutificação plena					Senescência				
	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150
210	0,818 1*	0,908 8*	0,837 8*	0,858 1*	0,872 1*	0,564 2*	0,494 5*	0,4220 ns	0,6050 *	0,0238 ns	0,541 4*	0,3990 ns	0,2300 ns	0,751 2*	0,3667 ns	0,646 6*	0,640 7*	0,580 6*	0,643 0*	0,496 0*
450		0,935 8*	0,915 0*	0,866 7*	0,968 5*		0,702 9*	0,594 5*	0,817 6*	0,4162 ns		0,592 7*	0,3780 ns	0,685 5*	0,702 5*		0,813 7*	0,786 5*	0,731 6*	0,698 8*
475			0,867 0*	0,901 6*	0,934 1*			0,919 1*	0,691 8*	0,600 0*			0,1894 ns	0,652 9*	0,616 5*			0,676 2*	0,763 1*	0,527 1*
675				0,820 7*	0,920 8*				0,553 7*	0,473 7*				0,444 5*	0,571 6*				0,773 8*	0,594 2*
950					0,887 4*					0,458 0*					0,724 8*					0,674 8*

* = Significativo a 5% de probabilidade; ns = não significativo, pelo teste T.

Quadro 14- Cont.

Caráter CLmf																				
Genótipos	Florescimento					Início da frutificação					Frutificação plena					Senescência				
	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150
210	0,711 1*	0,0596 ns	0,1509 ns	0,3716 ns	0,721 8*	0,722 5*	0,0385 ns	0,652 1*	0,1564 ns	- 0,1958 ns	0,1985 ns	0,3185 ns	- 0,1504 ns	0,2989 ns	0,4965 ns	- 0,0452 ns	0,684 1*	0,4296 ns	0,562 0*	0,3553 ns
450		0,546 3*	0,665 5*	0,790 9*	0,827 6*		0,644 9*	0,862 5*	0,577 9*	0,1420 ns		0,682 3*	0,568 4*	0,579 8*	0,4424 ns		0,0434 ns	0,0220 ns	0,0149 ns	0,0163 ns
475			0,854 6*	0,923 5*	0,596 8*			0,592 1*	0,865 3*	0,606 9*			0,4381 ns	0,564 1*	0,4858 ns		0,772 9*	0,585 4*	0,3136 ns	
675				0,898 0*	0,656 2*				0,546 5*	0,1060 ns				0,4606 ns	0,2704 ns				0,4197 ns	0,2789 ns
950					0,795 1*					0,614 3*					0,837 0*					0,852 4*
Caráter CFmf																				
Genótipos	Florescimento					Início da frutificação					Frutificação plena					Senescência				
	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150
210	- 0,2624 ns	- 0,3352 ns	- 0,4936 ns	- 0,2277 ns	- 0,4063 ns	0,3702 ns	- 0,0921 ns	- 0,0003 ns	0,0492 ns	- 0,3395 ns	0,1963 ns	0,2695 ns	- 0,1341 ns	0,0664 ns	0,1736 ns	0,0432 ns	- 0,0709 ns	0,1120 ns	0,3859 ns	0,2238 ns
450		0,517 8*	0,4316 ns	0,773 9*	- 0,1375 ns		0,581 9*	0,4667 ns	0,4007 ns	0,3790 ns		0,837 4*	0,695 2*	0,734 3*	0,4377 ns		0,501 8*	0,749 3*	0,4867 ns	0,714 7*
475			0,607 0*	0,853 0*	0,2257 ns			0,581 6*	0,781 3*	0,589 4*			0,582 4*	0,853 0*	0,603 6*		0,4486 ns	0,780 7*	0,3204 ns	
675				0,524 9*	0,2151 ns				0,3407 ns	0,543 2*				0,4610 ns	0,1157 ns				0,632 0*	0,638 3*

Caráter %CL																				
Genótipos	Florescimento					Início da frutificação					Frutificação plena					Senescência				
	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150
950	0,0573 ns					0,2998 ns					0,802 2*					0,4666 ns				
210	0,4787 ns	0,3860 ns	0,735 8*	0,736 7*	0,690 4*	0,628 2*	0,2370 ns	0,631 1*	0,1180 ns	0,4089 ns	- 0,2429 ns	- 0,3327 ns	- 0,0240 ns	- 0,2497 ns	- 0,1929 ns	- 0,1096 ns	- 0,0392 ns	0,0149 ns	- 0,3101 ns	- 0,0625 ns
450		0,838 4*	0,774 8*	0,777 4*	0,674 9*		0,4652 ns	0,816 9*	0,501 7*	0,851 4*		0,719 6*	0,739 4*	0,707 4*	0,513 6*		0,4908 ns	0,610 0*	0,569 5*	0,617 4*
475			0,638 6*	0,803 7*	0,586 4*			0,629 5*	0,1536 ns	0,613 7*			0,775 4*	0,813 9*	0,555 5*			0,863 9*	0,630 0*	0,693 6*
675				0,837 4*	0,691 6*				0,2484 ns	0,752 5*				0,783 1*	0,522 3*				0,671 6*	0,892 8*
950					0,857 7*					0,3723 ns					0,711 8*					0,805 0*

* = Significativo a 5% de probabilidade; ns = não significativo, pelo teste T.

No início da frutificação (Quadro 14), o padrão de resposta do genótipo 1150 foi divergente dos demais. Ainda nesse quadro, observa-se que nos quatro estádios reprodutivos, os menores valores foram os das correlações do genótipo 210, tendo valores negativos nas plantas com plena frutificação e senescente.

4.4.2. Teor de ácido caféico por grama de massa foliar (CFg)

Nos Quadros 7, 8, 9 e 10, encontram-se valores significativos do teor de ácido caféico em miligrama por grama de massa foliar (CFg) nas quatro altitudes considerando o conjunto dos genótipos e efeito não significativo na interação entre genótipos individuais x altitudes, como foi observado, por exemplo, a interação não significativa entre o genótipo 475 x altitude, no florescimento, na plena frutificação e em senescência, e na interação genótipo 675 x altitudes, no florescimento, no início da frutificação e na plena frutificação.

Foi alta a magnitude de plasticidade fenotípica estimada pelos coeficientes de variação ambiental (CVa) em todos os genótipos ($CVa > 20$), com valor médio de 43,84 (Quadro 12). O menor e o maior valor de CVa foram determinados na mesmo estágio reprodutivo (início da frutificação) nos genótipos 950 e 210, respectivamente, 13,72 e 90,95.

O índice de determinação ambiental (Ia^2) teve valores positivos e negativos. Esse índice quantifica quanto da resposta observada foi devido à altitude. Os valores menores e os negativos indicam que as diferenças observadas foram devido ao genótipo e, no Quadro 13, foram observados principalmente no florescimento e início da frutificação. Esse fato indica que a expressão da plasticidade dos fitofármacos pode variar no espaço (altitude) e no tempo (estádio reprodutivo). Os valores médios de Ia^2 foram de 0,7378 e indicaram que 73,78% da variação observada deveram-se à altitude de cultivo.

Quanto ao teor de ácido caféico por grama de massa foliar (CFg), os valores de padrão de plasticidade foram pequenos e negativos (Quadro 14). Essa característica não apresentou grandes semelhanças entre genótipos, entretanto, na senescência há tendência de respostas mais similares. O genótipo 210 foi

divergente aos demais genótipos, indicando que suas respostas podem se dever mais à influência genética do que à ambiental.

4.4.3. Massa seca foliar (MF)

Quanto à massa seca foliar (MF) os valores dos quadrados médios das altitudes em todos os genótipos foram significativos, exceto no genótipo 675 (frutificação plena) e 1150 (no início da frutificação e senescente) (Quadros 7, 8, 9 e 10). Observa-se a tendência de aumento do coeficiente de variação e diminuição das médias no decorrer dos estádios reprodutivos. As diferenças significativas na massa seca foliar indicam plasticidade dos genótipos quando submetidos a variações de altitude.

A magnitude da plasticidade fenotípica, estimada pelo coeficiente de variação ambiental (CVa) e pelo índice de determinação ambiental (Ia^2), foi alta. O valor médio de CVa foi 31,50 e de Ia^2 foi 0,8549 (Quadros 12 e 13, respectivamente). A parte da variação total devido ao efeito da altitude é alta, entretanto, no genótipo 675 (plena frutificação) houve baixa variação, $Ia^2 = 0,0494$ (Quadro 13), e por isso os valores foram não significativos na análise de variância, na frutificação plena (Quadro 9).

No Quadro 14 estão as estimativas de padrão de plasticidade, com genótipos alternando entre similaridade e divergência.

4.4.4. Rendimento de ácido clorogênico nas folhas (CLmf)

O rendimento de ácido clorogênico nas folhas (CLmf) foi estimado pela multiplicação do teor de ácido clorogênico, em cada grama, pela massa seca foliar. Considerando os genótipos em conjunto houve valores significativos em todos os estádios reprodutivos, no entanto, o efeito não significativo foi observado quando considerou, individualmente, a interação genótipo x altitude, e todos os genótipos em pelo menos um estágio reprodutivo e no genótipo 475 em todos os estádios reprodutivos (Quadros 7, 8, 9 e 10). Isso realça a diferença de

resposta dos fitofármacos de cada genótipo, mas, pode estar relacionado também ao valor alto de coeficiente de variação nas quatro altitudes (29,02 a 54,53).

Alta magnitude de plasticidade fenotípica foi estimada pelos coeficientes de variação ambiental (CVa) em todos os genótipos (CVa > 20), com valor médio de 59,02 (Quadro 12). No início da frutificação foram detectados o menor e o maior valor de CVa. O menor CVa foi o do genótipo 675 (CVa 30,03) e o maior o do genótipo 210 (CVa 118,49).

O índice de determinação ambiental (Ia^2) representa quanto da variação foi devido ao efeito ambiental, sendo estimado que, em média, cerca de 78% da variação deveu-se à altitude (Quadro 13). Valores de Ia^2 foram positivos e negativos, os negativos e pequenos indicam que as diferenças devem-se ao genótipo e os positivos e elevados ao ambiente. Interessante notar que a plasticidade do genótipo 450, com o maior valor de Ia^2 (0,9432) e o valor negativo, respectivamente no florescimento e na senescência. Este fato enfatiza que a plasticidade dos fitofármacos variou no espaço (altitude) e no tempo (estádio reprodutivo).

Padrão de plasticidade semelhante foi observado entre os genótipos 950 e 1150, nos quatro estádios reprodutivos (Quadro 14). Nos demais genótipos os comportamentos foram variáveis, sendo observado sentido divergente (valores negativos) nos pares formados com o genótipo 210, o que indica que o genótipo 210 responde com padrão divergente à mesma influência ambiental.

4.4.5. Rendimento de ácido caféico nas folhas (CFmf)

Os valores de rendimento de ácido caféico nas folhas foram significativos no florescimento, início da frutificação e plena frutificação, nas quatro altitudes, considerando o conjunto dos genótipos (Quadro 7, 8, 9 e 10). Na senescência foi observado efeito não significativo na interação entre o conjunto dos genótipos com as altitudes, mas, valores significativos foram observados nos genótipos 210, 675 e 950. O que pode ter ocorrido é que o alto valor do coeficiente de variação interferiu na análise, além disso, as respostas semelhantes dos genótipos

na senescência podem ser devido ao mesmo padrão de comportamento entre os genótipos nas quatro altitudes.

A magnitude da plasticidade fenotípica estimada pelo coeficiente de variação ambiental (CVa) foi alta nos genótipos (CVa > 20), com valor médio de 56,18 (Quadro 12). A maior magnitude foi observada no início da frutificação no genótipo obtido na menor altitude (genótipo 210, CVa 91,71) e a menor no florescimento no genótipo obtido na maior altitude (genótipo 1150, CVa 22,19).

Os valores do coeficiente de determinação ambiental (Ia^2) foram positivos e variou de 0,9885 (genótipo 450, florescimento), até 0,3153 (genótipo 675, frutificação plena) (Quadro 13). Em média, 77,45% da variação foram devido à altitude.

O rendimento de ácido caféico na massa foliar (CFmf) apresentou padrão de plasticidade com valores de correlações pequenos e negativos no genótipo 210 (Quadro 14). Nos quatro estádios reprodutivos foram observados padrões de resposta semelhantes entre os genótipos 475 e 950. Nessa característica não houve grandes semelhanças entre genótipos, entretanto, na senescência há tendência de respostas mais similares. Essa semelhança na senescência evidencia os valores não significativos observados na interação entre o conjunto dos genótipos com as altitudes (Quadro 10).

4.4.6. Percentual de ácido clorogênico na soma de ácido clorogênico e caféico (%CL)

O percentual de ácido clorogênico na soma de ácido clorogênico e ácido caféico serviu à verificação da plasticidade fenotípica entre esses fitofármacos. Nesse percentual os valores dos quadrados médios das altitudes no conjunto dos genótipos foram significativos. Valores significativos foram observados na maioria dos genótipos individuais, principalmente no florescimento e senescência. Foram não significativos os percentuais nos genótipos 210 (no início da frutificação, plena frutificação e senescente), 450 (frutificação plena), 475 (no florescimento e início da frutificação), 675 (frutificação plena), 950 (início da frutificação) e 1150 (frutificação plena) (Quadros 7, 8, 9 e 10).

A plasticidade dos genótipos frente às altitudes de cultivo foi estimada, em magnitude, pelo coeficiente de variação ambiental (CVa) e índice de determinação ambiental (Ia^2). A média de CVa foi de 23,50 que, segundo a classificação de SCHLICHTING e LEVIN (1984), é considerada de alta magnitude (CVa > 20). O menor CVa foi do genótipo coletado na menor altitude, genótipo 210, na frutificação plena (CVa 8,07) e os maiores valores foram dos genótipos coletados nas maiores altitudes, genótipo 950 (CVa 44,37) e 1150 (CVa 44,30) no estágio de senescência (Quadro 12). Foram estimados valores de Ia^2 desde baixos (0,1607) a altos (0,9546), com a média de 0,7284 (Quadro 13).

O padrão de plasticidade foi divergente nos pares formados com o genótipo 210, com valores negativos nas altitudes, no início da frutificação e plena frutificação (Quadro 14). A variação observada nos genótipos indica padrões de respostas diferenciadas em cada estágio reprodutivo.

Como estes dois compostos pertencem à mesma via metabólica e o ácido caféico é o precursor do ácido clorogênico (DAO e FRIEDMAN, 1992) a interdependência entre o ácido clorogênico e o ácido caféico fica evidente devido aos baixos valores de coeficiente de variação observados nos Quadros 7, 8, 9 e 10.

4.5. Coeficiente de coincidência (CCo)

Devido às características variarem ao longo do crescimento e desenvolvimento vegetal, a coincidência pode variar entre as fases de desenvolvimento, ou seja, entre os estágios reprodutivos. A quantificação dessas coincidências foi baseada nas médias das características encontradas nos Quadros 15, 16, 17 e 18, nos quais os retângulos delimitam as maiores ou menores médias que coincidem os genótipos e suas respectivas altitudes de origem. Por essas coincidências estimou-se o CCo (Quadro 19).

A adaptação dos genótipos às altitudes onde foi coletado foi medida pelo CCo e varia de 0 a 100%. A coincidência entre os genótipos e respectivas altitudes de origem foi, em média, de 45,14% (Quadro 19), evidenciando-se adaptação intermediária (CCo entre 25 e 75%).

Quadro 15 - Médias dos caracteres teor de ácido clorogênico (CLg), teor de ácido cafêico (CFg), massa seca foliar (MF), rendimento de ácido clorogênico por planta (CLmf), rendimento de ácido cafêico por planta (CFmf) e percentual de ácido clorogênico na soma de ácido clorogênico e cafêico (%CL), no estágio de florescimento dos seis genótipos de *Bidens pilosa* L. cultivados nas altitudes de 198, 479, 739 e 962 m

Genótipo	Altitude	CLg	CFg	MF	CLmf	CFmf	%CL
210	198	0,40B	0,35B	1,79A	0,71B	0,63AB	55,81AB
	479	0,43B	0,20B	2,08A	0,90B	0,42B	68,36A
	739	0,52B	1,05A	1,26B	0,64B	1,33A	32,99B
	962	2,80A	0,91A	1,22B	3,39A	1,10AB	74,29A
450	198	0,37B	0,34C	2,70AB	0,99B	0,90C	52,59B
	479	1,67B	1,12B	3,52A	5,55B	3,87A	55,67AB
	739	0,87B	0,84BC	1,94BC	1,69B	1,63B	51,23B
	962	5,96A	1,81A	1,83C	10,78A	3,28A	76,48A
475	198	0,39A	0,53A	3,46B	1,37A	1,81B	45,57A
	479	1,83A	1,60A	4,26A	7,61A	6,80A	47,92A
	739	0,95A	1,34A	2,18C	2,14A	2,99AB	38,38A
	962	2,21A	1,28A	1,88C	4,18A	2,48AB	64,69A
675	198	0,96A	0,99A	3,53AB	3,42A	3,57AB	52,09AB
	479	1,90A	1,33A	4,79A	8,29A	6,12A	55,09AB
	739	0,59A	0,85A	2,33B	1,40A	2,01B	41,34B
	962	2,36A	0,99A	2,52B	5,94A	2,50AB	69,54A
950	198	0,48A	0,65B	3,34AB	1,55A	2,13B	42,23BC
	479	2,96A	1,79AB	3,61A	1,69A	6,31A	57,27AB
	739	0,73A	1,36AB	2,34B	10,07A	3,17AB	34,40C
	962	3,86A	2,08A	2,40B	9,03A	4,90AB	64,88A
1150	198	0,88B	1,70A	3,35A	2,94B	5,78A	35,15B
	479	1,66B	1,33A	4,02A	6,45A	5,31A	54,38AB
	739	1,03B	1,56A	2,26B	2,38B	3,55A	38,95B
	962	3,52A	1,90A	2,15B	7,59A	4,09A	64,94A

As médias seguidas de uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Os valores de CLg e CFg são expressos em miligrama por grama de matéria seca; MF em grammas; CLmf e CFmf em miligrama por massa seca total das folhas. Os retângulos delimitam as maiores ou menores médias que coincidem com as altitudes de coleta dos genótipos analisados.

Quadro 16 - Médias dos caracteres teor de ácido clorogênico (CLg), teor de ácido cafêico (CFg), massa seca foliar (MF), rendimento de ácido clorogênico por planta (CLmf), rendimento de ácido cafêico por planta (CFmf) e percentual de ácido clorogênico na soma de ácido clorogênico e cafêico (%CL), no estágio de início de frutificação dos seis genótipos de *Bidens pilosa* L. cultivados nas altitudes de 198, 479, 739 e 962 m

Genótipo	Altitude	CLg	CFg	MF	CLmf	CFmf	%CL
210	198	0,17B	0,28B	1,79AB	0,31B	0,51B	39,61A
	479	0,31B	0,42B	2,67A	0,83B	1,12AB	43,67A
	739	0,20B	0,27B	1,30B	0,26B	0,35B	42,63A
	962	1,60A	1,40A	1,92AB	3,05A	2,69A	53,52A
450	198	1,56B	2,13A	2,86B	4,31B	5,99A	41,86B
	479	1,97B	1,71AB	3,62A	7,09AB	6,21A	52,34AB
	739	1,21B	0,96B	2,38B	2,85B	2,27B	54,99A
	962	4,22A	2,66A	2,25B	9,56A	6,04A	61,47A
475	198	1,79B	3,17AB	3,03B	5,29A	9,48AB	36,10A
	479	1,90AB	3,07AB	4,36A	8,31A	13,33A	37,79A
	739	1,39B	1,49B	2,50BC	3,47A	3,71C	52,22A
	962	3,21A	3,53A	1,80C	5,81A	6,20BC	47,43A
675	198	2,14B	3,04A	3,41B	7,25A	10,32A	40,95C
	479	2,18B	2,42A	4,26A	9,18A	10,22A	46,15C
	739	2,34B	2,08A	3,01BC	7,02A	6,21A	53,53B
	962	5,63A	3,08A	2,35C	12,92A	7,18A	64,35A
950	198	1,56A	2,27A	3,42A	5,10AB	7,18AB	42,25A
	479	3,19A	2,76A	4,20A	13,49A	11,68A	51,90A
	739	2,18A	2,88A	0,91B	1,89B	2,63B	42,80A
	962	3,38A	3,19A	1,98B	6,68AB	6,29AB	51,46A
1150	198	3,01AB	7,06A	3,23A	9,76AB	23,01A	29,67B
	479	3,81A	4,71B	2,98AB	11,11A	13,66B	44,63A
	739	1,94B	2,38C	2,75AB	5,30B	6,50B	45,93A
	962	3,07AB	3,21BC	2,03B	6,28AB	6,58B	49,08A

As médias seguidas de uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Os valores de CLg e CFg são expressos em miligrama por grama de matéria seca; MF em gramas; CLmf e CFmf em miligrama por massa seca total das folhas. Os retângulos delimitam as maiores ou menores médias que coincidem com as altitudes de coleta dos genótipos analisados.

Quadro 17- Médias dos caracteres teor de ácido clorogênico (CLg), teor de ácido cafêico (CFg), massa seca foliar (MF), rendimento de ácido clorogênico por planta (CLmf), rendimento de ácido cafêico por planta (CFmf) e percentual de ácido clorogênico na soma de ácido clorogênico e cafêico (%CL), no estágio de frutificação plena dos seis genótipos de *Bidens pilosa* L. cultivados nas altitudes de 198, 479, 739 e 962 m

Genótipo	Altitude	CLg	CFg	MF	CLmf	CFmf	%CL
210	198	0,94A	1,86A	1,60A	1,48A	2,99AB	33,32A
	479	1,01A	2,58A	1,48AB	1,47A	3,69A	27,73A
	739	0,55A	1,20A	0,88B	0,49A	1,10B	32,62A
	962	1,06A	2,47A	1,13AB	1,20A	2,80AB	30,59A
450	198	0,90A	2,09A	2,14A	1,97AB	4,66A	33,74A
	479	0,64A	0,75A	1,27B	0,85B	0,99A	45,46A
	739	1,36A	2,26A	0,98B	1,29B	2,21A	36,57A
	962	1,71A	2,10A	1,99A	3,34A	4,08A	45,45A
475	198	0,96A	3,14A	2,67A	2,58A	8,58A	28,58B
	479	0,79A	0,66A	1,27B	0,92A	0,75A	54,75A
	739	0,99A	1,86A	0,88B	0,91A	1,67A	34,40AB
	962	1,73A	2,82A	1,53B	2,75A	4,37A	36,47AB
675	198	0,82B	2,04A	1,87A	1,53B	3,74A	35,95A
	479	0,79B	0,79A	1,49A	1,19B	1,17A	51,54A
	739	1,49AB	2,56A	1,51A	2,36AB	4,10A	37,37A
	962	2,58A	2,80A	1,81A	4,53A	4,95A	47,17A
950	198	0,90B	2,87A	2,38A	2,11AB	6,87A	24,05B
	479	0,72B	0,91B	1,52AB	1,12BC	1,37B	43,83A
	739	1,22AB	3,72A	0,71B	0,85C	2,56B	24,61B
	962	1,62A	3,41A	1,56AB	2,50A	5,26A	32,20AB
1150	198	1,51A	5,71A	1,91A	2,93A	10,83A	20,88A
	479	1,28A	1,95C	1,34AB	1,76A	2,61BC	37,69A
	739	0,97A	1,89C	1,05B	1,05A	2,04C	33,62A
	962	1,77A	3,59B	1,59AB	2,80A	5,67B	33,05A

As médias seguidas de uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Os valores de CLg e CFg são expressos em miligrama por grama de matéria seca; MF em gramas; CLmf e CFmf em miligrama por massa seca total das folhas. Os retângulos delimitam as maiores ou menores médias que coincidem com as altitudes de coleta dos genótipos analisados.

Quadro 18 - Médias dos caracteres teor de ácido clorogênico (CLg), teor de ácido caféico (CFg), massa seca foliar (MF), rendimento de ácido clorogênico por planta (CLmf), rendimento de ácido caféico por planta (CFmf) e percentual de ácido clorogênico na soma de ácido clorogênico e caféico (%CL), no estágio de senescência dos seis genótipos de *Bidens pilosa* L. cultivados nas altitudes de 198, 479, 739 e 962 m

Genótipo	Altitude	CLg	CFg	MF	CLmf	CFmf	%CL
210	198	0,56A	1,43AB	1,00A	0,57A	1,42AB	26,97A
	479	0,53A	1,08B	0,88AB	0,49A	0,95BC	32,48A
	739	0,31A	1,33B	0,45B	0,13A	0,59C	19,03A
	962	0,76A	2,35A	0,77AB	0,59A	1,78A	24,87A
450	198	1,59A	2,41A	1,32A	2,13A	3,24A	39,64B
	479	0,96A	1,09AB	1,28A	1,26A	1,43A	47,21AB
	739	2,39A	2,35A	0,70B	1,94A	1,82A	45,94AB
	962	0,90A	0,59B	1,27A	1,14A	0,75A	60,50A
475	198	1,90A	2,32A	1,46A	2,89A	3,49A	45,48AB
	479	1,01A	2,25A	1,27A	1,28A	2,85A	30,86B
	739	1,29A	2,54A	0,76B	0,97A	1,99A	36,60B
	962	1,58A	0,76A	1,18A	1,84A	0,90A	67,15A
675	198	1,64A	2,20A	1,48A	2,41A	3,19A	42,88B
	479	0,60A	0,90B	1,20AB	0,74B	1,18B	42,08B
	739	1,35A	1,94A	0,76B	1,01AB	1,46B	38,51B
	962	1,11A	0,54B	1,57A	1,77AB	0,85B	66,79A
950	198	1,33A	2,96A	1,35AB	1,84AB	4,18A	30,89B
	479	0,54A	1,52AB	1,01B	0,54B	1,52AB	26,13B
	739	0,97A	1,50AB	0,43C	0,42B	0,62B	39,13B
	962	1,53A	0,73B	1,69A	2,58A	1,23AB	66,50A
1150	198	1,33A	3,29A	1,29A	1,58AB	4,20A	28,51B
	479	0,96A	2,24AB	1,06A	0,97AB	2,62A	31,72B
	739	0,78A	1,75AB	0,58A	0,46B	1,05A	32,58B
	962	1,31A	0,67B	1,53A	2,06A	1,04A	65,92A

As médias seguidas de uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Os valores de CLg e CFg são expressos em miligrama por grama de matéria seca; MF em gramas; CLmf e CFmf em miligrama por massa seca total das folhas. Os retângulos delimitam as maiores ou menores médias que coincidem com as altitudes de coleta dos genótipos analisados.

Quadro 19 - Estimativas dos coeficientes de coincidência (CCo) dos fitofármacos analisados de seis genótipos de *Bidens pilosa* L. cultivados em quatro altitudes e coletados nos estádios reprodutivos de florescimento (FL), início de frutificação (IF), frutificação plena (FP) e senescência (SE)

Estádio	Genótipos						Média
	210	450	475	675	950	1150	
FL	16,67	33,33	66,67	100,00	50,00	83,33	58,33
IF	33,33	33,33	50,00	50,00	33,33	33,33	38,89
FP	50,00	83,33	66,67	0,00	33,33	16,67	41,67
SE	16,67	0,00	33,33	33,33	83,33	83,33	41,67
Média	29,17	37,50	54,17	45,83	50,00	54,17	45,14

O florescimento, em média, proporcionou maior coincidência dos genótipos com as altitudes de origem (CCo 58,33) (Quadro 19), sendo as maiores nos genótipos 475 e 1150, CCo 54,17. Interessante notar que no genótipo da maior altitude (1150) detectou-se o maior CCo 54,17 e no da menor altitude (210), o de menor CCo 29,17, entretanto, todas as estimativas de CCo encerram-se no intervalo de 25 a 75%, o que revela adaptação intermediária.

Interessante notar a variação do genótipo 675, que no florescimento teve coincidência total (100%) e na frutificação plena teve discordância total (0%).

O ácido caféico não teve coincidência com o genótipo 210 (CFg e CFmf) e com o 950 (CFmf) (Quadros 15 a 18). Houve variações de coincidência entre os genótipos e os estádios reprodutivos e nenhuma característica coincidiu em todos os estádios com todos os genótipos. Essa evidência demonstra a plasticidade foliar, já enfatizada por CUTTER (1986).

4.6. Dados climáticos e sua correlação com ácido clorogênico e ácido caféico

No Quadro 20 encontram-se resumidos os dados que compreendem os intervalos dos estádios reprodutivos em cada altitude e de cada genótipo particular. Os dados da colheita de cada genótipo diferiram, pois o início do florescimento variou entre os genótipos e as altitudes (ver capítulo 3 desta tese). Os dados climáticos são relativos e refletem o microclima de cada experimento.

Quadro 20 - Médias, relativas aos intervalos dos estádios reprodutivos (Er) de florescimento (FL), frutificação (IF), frutificação plena (FP) e senescência (SE)) de cada genótipo (Gen) de *Bidens pilosa* nas altitude de cultivo (198, 479, 739 e 962 m), das temperaturas máximas (Tmax), mínimas (Tmin) e amplitude (Tmax-Tmin), pluviosidade e evaporação

Er	Gen	Tmax				Tmin				Tmax – Tmin				Pluviosidade (mL)				Evaporação (mL)			
		198 m	479 m	739 m	962 m	198 m	479 m	739 m	962 m	198 m	479 m	739 m	962 m	198 m	479 m	739 m	962 m	198 m	479 m	739 m	962 m
FL	210	28,5	24,1	21,6	22,7	13,6	10,5	12,7	11,6	14,9	13,7	8,9	11,1	0,4	0,4	0,9	0,3	3,4	2,5	4,3	4,2
	450	29,3	25,0	23,1	22,9	13,8	11,1	13,2	12,1	15,5	13,9	9,9	10,9	0,3	0,3	0,7	0,3	3,4	2,6	4,2	4,2
	475	29,3	25,0	23,1	24,4	13,8	11,1	13,2	12,8	15,5	13,9	9,9	11,7	0,3	0,3	0,7	0,7	3,4	2,6	4,2	4,1
	675	29,3	25,0	23,1	24,4	13,8	11,1	13,2	12,8	15,5	13,9	9,9	11,7	0,3	0,3	0,7	0,7	3,4	2,6	4,2	4,1
	950	29,3	25,0	23,1	24,4	13,8	11,1	13,2	12,8	15,5	13,9	9,9	11,7	0,3	0,3	0,7	0,7	3,4	2,6	4,2	4,1
	1150	28,8	25,4	24,2	24,4	14,1	12,0	14,2	12,8	14,6	13,4	10,0	11,7	0,6	0,6	1,0	0,7	3,3	2,6	4,0	4,1
IF	210	29,2	27,2	28,2	27,0	14,9	14,3	16,5	14,5	14,3	12,9	11,7	12,5	0,8	0,8	1,1	1,1	3,0	2,8	3,6	3,9
	450	29,9	23,1	24,7	30,1	15,7	14,9	16,5	14,1	14,2	8,2	8,2	16,0	1,6	8,3	6,7	6,8	2,3	1,7	2,1	2,0
	475	29,9	23,1	24,7	28,9	15,7	14,9	16,5	13,9	14,2	8,2	8,2	15,0	1,6	8,3	6,7	5,8	2,3	1,7	2,1	1,6
	675	29,9	23,1	24,7	28,9	15,7	14,9	16,5	13,9	14,2	8,2	8,2	15,0	1,6	8,3	6,7	5,8	2,3	1,7	2,1	1,6
	950	29,9	23,1	24,7	28,9	15,7	14,9	16,5	13,9	14,2	8,2	8,2	15,0	1,6	8,3	6,7	5,8	2,3	1,7	2,1	1,6
	1150	33,9	22,8	22,6	28,9	17,2	14,4	15,6	13,9	16,6	8,4	7,1	15,0	2,7	7,5	5,7	5,8	1,7	1,6	2,0	1,6
FP	210	33,9	22,8	22,6	28,9	17,2	14,4	15,6	13,9	16,6	8,4	7,1	15,0	2,7	7,5	5,7	5,8	1,7	1,6	2,0	1,6
	450	33,4	26,6	26,1	27,4	19,9	16,1	17,9	15,5	13,4	10,5	8,1	11,9	2,9	1,2	1,2	1,1	2,3	2,5	2,9	2,5
	475	33,4	26,6	26,1	26,9	19,9	16,1	17,9	14,7	13,4	10,5	8,1	12,2	2,9	1,2	1,2	3,2	2,3	2,5	2,9	2,2
	675	33,4	26,6	26,1	26,9	19,9	16,1	17,9	14,7	13,4	10,5	8,1	12,2	2,9	1,2	1,2	3,2	2,3	2,5	2,9	2,2
	950	33,4	26,6	26,1	26,9	19,9	16,1	17,9	14,7	13,4	10,5	8,1	12,2	2,9	1,2	1,2	3,2	2,3	2,5	2,9	2,2
	1150	33,2	26,1	25,9	26,9	22,2	16,2	17,6	14,7	11,0	9,9	8,3	12,2	2,1	3,3	3,5	3,2	3,2	2,3	2,3	2,2
SE	210	33,2	26,1	25,9	26,9	22,2	16,2	17,6	14,7	11,0	9,9	8,3	12,2	2,1	3,3	3,5	3,2	3,2	2,3	2,3	2,2
	450	35,5	28,5	27,0	27,5	22,5	14,5	16,9	14,2	13,0	14,0	10,1	13,3	1,2	2,0	2,5	2,3	3,4	2,4	2,6	3,1
	475	35,5	28,5	27,0	29,3	22,5	14,5	16,9	15,2	13,0	14,0	10,1	14,1	1,2	2,0	2,5	2,1	3,4	2,4	2,6	3,4
	675	35,5	28,5	27,0	29,3	22,5	14,5	16,9	15,2	13,0	14,0	10,1	14,1	1,2	2,0	2,5	2,1	3,4	2,4	2,6	3,4
	950	35,5	28,5	27,0	29,3	22,5	14,5	16,9	15,2	13,0	14,0	10,1	14,1	1,2	2,0	2,5	2,1	3,4	2,4	2,6	3,4
	1150	38,4	30,2	28,7	29,3	21,7	15,9	18,1	15,2	16,7	14,3	10,6	14,1	1,0	3,2	2,4	2,1	3,3	2,4	2,8	3,4

Os dados de pluviosidade foram obtidos com pluviômetros e os de evaporação com atmômetros de Piche.

Os valores das correlações entre os dados climáticos e os caracteres nos seis genótipos e nos quatro estádios reprodutivos encontram-se no Quadro 21 e de cada genótipo no Quadro 22.

Quadro 21 - Correlação entre as médias dos dados climáticos e dos fitofármacos nos quatro estádios reprodutivos dos seis genótipos de *Bidens pilosa* L. crescidos nas altitudes de 198, 479, 739 e 962 m

Caracteres	Tmax	Tmin	Tmax-Tmin	Pluvi	Evapo
CLg	-0,1379 ^{ns}	-0,2253*	-0,1909*	0,3091*	-0,1408 ^{ns}
CFg	0,2737*	0,3483*	0,3322*	0,3883*	-0,4402*
MF	-0,1649 ^{ns}	-0,3849*	-0,2826*	0,1021 ^{ns}	-0,1254 ^{ns}
CLmf	-0,2130*	-0,3294*	-0,2860*	0,3578*	-0,2458*
CFmf	0,0980 ^{ns}	0,0478 ^{ns}	0,0826 ^{ns}	0,3886*	-0,4222*
%CL	-0,3111*	-0,5373*	-0,4442*	-0,0945 ^{ns}	0,2848*

* = Significativo a 5% de probabilidade; ns = não significativo, pelo teste T.

Caracteres: CLg = teor de ácido clorogênico, CFg = teor de ácido caféico, MF = massa seca foliar, CLmf = rendimento de ácido clorogênico por planta, CFmf = rendimento de ácido caféico por planta e %CL = percentual de ácido clorogênico na soma dos ácidos clorogênico e caféico.

Dados climáticos: temperatura máxima (Tmax), temperatura mínima (Tmin) e amplitude de temperatura (Tmax-Tmin), pluviosidade (Pluvi) e evaporação (Evapo).

Os resultados da análise conjunta indicam que nenhum componente do clima contribui de maneira marcante na produção dos fitofármacos, apesar de serem detectados valores significativos pelo teste T (Quadro 21). Foram detectadas correlação positiva com a pluviometria e negativa com a evaporação em todas as características, exceto na do percentual de ácido clorogênico na soma dos ácidos clorogênico e caféico (%CL).

O Quadro 22 mostra que no genótipo 210, exceto com a evaporação, todas as correlações positivas foram observadas com o ácido caféico (CFg e CFmg) e as negativas com o ácido clorogênico (CLg e CLmg) e massa seca foliar (MF). Há correlação significativa entre pluviosidade e ácido caféico (CFg e CFmg). A tendência observada é que a evaporação atua favorecendo o acúmulo de ácido clorogênico (CLg e CLmg) e contra o ácido caféico (CFg e CFmg).

Quadro 22 - Correlação entre as médias dos dados climáticos e dos fitofármacos nos quatro estádios reprodutivos dos genótipos 210, 450, 475, 675, 950 e 1150 de *Bidens pilosa* L. cultivados nas altitudes de 198, 479, 739 e 962 m

Caracteres	Genótipo 210 – dados climáticos					Genótipo 450 - dados climáticos					Genótipo 475 - dados climáticos				
	Tmax	Tmin	Tmax-Tmin	Pluvi	Evapo	Tmax	Tmin	Tmax-Tmin	Pluvi	Evapo	Tmax	Tmin	Tmax-Tmin	Pluvi	Evapo
CLg	- 0,2263 ^{ns}	- 0,3121 ^{ns}	-0,2897 ^{ns}	- 0,0032 ^{ns}	0,2512 ^{ns}	- 0,2199 ^{ns}	- 0,2863 ^{ns}	-0,2704 ^{ns}	0,1408 ^{ns}	0,1862 ^{ns}	0,0019 ^{ns}	- 0,1595 ^{ns}	-0,0764 ^{ns}	0,4082 ⁿ s	- 0,2971 ⁿ s
CFg	0,0624 ^{ns}	0,2133 ^{ns}	0,1402 ^{ns}	0,7772*	- 0,5602*	0,3720 ^{ns}	0,4711*	0,4511*	0,2054 ^{ns}	- 0,2376 ^{ns}	0,2579 ^{ns}	0,2608 ^{ns}	0,2814 ^{ns}	0,5040 *	- 0,6482 *
MF	0,0967 ^{ns}	- 0,4112 ^{ns}	-0,1342 ^{ns}	- 0,4626*	0,1946 ^{ns}	- 0,2045 ^{ns}	- 0,4087 ^{ns}	-0,3200 ^{ns}	0,3250 ^{ns}	- 0,3163 ^{ns}	- 0,2142 ^{ns}	- 0,3658 ^{ns}	-0,3063 ^{ns}	0,2344 ⁿ s	- 0,2159 ⁿ s
CLmf	- 0,1622 ^{ns}	- 0,3666 ^{ns}	-0,2753 ^{ns}	- 0,1258 ^{ns}	0,3095 ^{ns}	- 0,2787 ^{ns}	- 0,4234 ^{ns}	-0,3719 ^{ns}	0,3456 ^{ns}	- 0,0456 ^{ns}	- 0,2534 ^{ns}	- 0,3573 ^{ns}	-0,3257 ^{ns}	0,4641 *	- 0,4016 ⁿ s
CFmf	0,1211 ^{ns}	0,0592 ^{ns}	0,1039 ^{ns}	0,5995* 0,4121 ^{ns}	-	0,1542 ^{ns}	0,0557 ^{ns}	0,1198 ^{ns}	0,4772*	- 0,4865*	- 0,0171 ^{ns}	- 0,0199 ^{ns}	-0,0199 ^{ns}	0,5536 *	- 0,5724 *
%CL	- 0,2300 ^{ns}	-0,6431*	-0,4488*	- 0,6324*	0,5262*	- 0,5349*	- 0,7325*	-0,6752*	0,1210 ^{ns}	0,3151 ^{ns}	- 0,1604 ^{ns}	- 0,2763 ^{ns}	-0,2305 ^{ns}	- 0,0967 ⁿ s	0,3737 ⁿ s

Caracteres	Genótipo 675 - dados climáticos					Genótipo 950 - dados climáticos					Genótipo 1150 - dados climáticos				
	Tmax	Tmin	Tmax-Tmin	Pluvi	Evapo	Tmax	Tmin	Tmax-Tmin	Pluvi	Evapo	Tmax	Tmin	Tmax-Tmin	Pluvi	Evapo
CLg	-	-	-0,1317 ^{ns}	0,5135*	-	-	-	-0,4101 ^{ns}	0,4275*	-	-	-	-0,2767 ^{ns}	0,4641	-

	0,0573 ^{ns}	0,2001 ^{ns}			0,4719*	0,3671 ^{ns}	0,3909 ^{ns}			0,2017 ^{ns}	0,2110 ^{ns}	0,3278 ^{ns}	*	0,3410 ⁿ	
CFg	0,1835 ^{ns}	0,3221 ^{ns}	0,2667 ^{ns}	0,4935*	- 0,6266*	0,0941 ^{ns}	0,3817 ^{ns}	0,2420 ^{ns}	0,4523*	- 0,4394*	0,4193 ^{ns}	0,4363*	0,4576*	0,3067 ⁿ	- 0,4381
MF	- 0,3588 ^{ns}	-0,5105*	-0,4633*	0,2020 ^{ns}	- 0,1682 ^{ns}	- 0,1498 ^{ns}	- 0,4339*	-0,3008 ^{ns}	0,0648 ^{ns}	- 0,0547 ^{ns}	- 0,2525 ^{ns}	- 0,4878*	-0,3721 ^{ns}	- 0,0357 ⁿ	- 0,1227 ⁿ
CLmf	- 0,2480 ^{ns}	- 0,3971 ^{ns}	-0,3418 ^{ns}	0,5536*	- 0,4979*	- 0,3853 ^{ns}	- 0,4556*	-0,4525*	0,3727 ^{ns}	- 0,2257 ^{ns}	- 0,2528 ^{ns}	- 0,3984 ^{ns}	-0,3340 ^{ns}	0,3805 ⁿ	- 0,3774 ⁿ
CFmf	- 0,1290 ^{ns}	- 0,1147 ^{ns}	-0,1331 ^{ns}	0,5565*	- 0,5954*	- 0,0743 ^{ns}	- 0,0841 ^{ns}	-0,0854 ^{ns}	0,4900*	- 0,4330*	0,2177 ^{ns}	0,1151 ^{ns}	0,1898 ^{ns}	0,2694 ⁿ	- 0,4500
%CL	- 0,2150 ^{ns}	-0,5174*	-0,3806 ^{ns}	0,0726 ^{ns}	0,1524 ^{ns}	- 0,3485 ^{ns}	- 0,5643*	-0,4834*	0,1039 ^{ns}	0,1245 ^{ns}	- 0,5074*	- 0,7084*	-0,6312*	0,0066 ⁿ	0,1922 ⁿ

* = Significativo a 5% de probabilidade; ns = não significativo, pelo teste T.

CLg = teor de ácido clorogênico, CFg = teor de ácido caféico, MF = massa seca foliar, CLmf = rendimento de ácido clorogênico por planta, CFmf = rendimento de ácido caféico por planta e %CL percentual de ácido clorogênico na soma dos ácidos clorogênico e caféico.

Dados climáticos: temperatura máxima (Tmax), temperatura mínima (Tmin) e amplitude de temperatura (Tmax-Tmin), pluviosidade (Pluvi) e evaporação (Evapo).

No genótipo 450 (Quadro 22) houve correlação positiva entre a pluviosidade e todas as características, sendo os maiores valores com relação ao ácido caféico. A evaporação, de maneira contrária, teve maior correlação com o acúmulo de ácido clorogênico.

No Quadro 22 é mostrado que no genótipo 475 a pluviosidade se correlacionou positivamente com todas as características, exceto %CL, sendo os maiores valores observados em ácido caféico. A evaporação comportou-se de maneira contrária, e teve maior correlação com o acúmulo de ácido clorogênico, %CL. As temperaturas (Tmax, Tmin e Tmax-Tmin) favorecem ao acúmulo de ácido caféico.

Os genótipos 675 e 950 (Quadro 22) tiveram dados semelhantes. Os dados de pluviosidade correlacionaram-se positivamente com os caracteres e, de maneira semelhante, com os ácidos clorogênico e caféico. As temperaturas (Tmax, Tmin e Tmax-Tmin) favorecem ao acúmulo de ácido caféico.

No Quadro 22 vê-se que no genótipo 1150 há tendência de correlação favorável entre o ácido clorogênico com a pluviosidade e a evaporação, sendo observado a pluviosidade com maiores valores positivos e a evaporação com menores valores negativos.

O aumento de ácido clorogênico está vinculado com a diminuição do ácido caféico, o que significa que os dois estão na mesma via e possuem o mesmo precursor.

Percebe-se a importância da compreensão das relações entre as plantas e o meio ambiente. Esse conhecimento é complexo, principalmente, se considerado o fato de que todas as interações bióticas e abióticas podem estar ocorrendo simultaneamente. Há mecanismos nas plantas visando adequar o seu crescimento e desenvolvimento às mudanças ambientais, entretanto, esses mecanismos têm sido pouco estudados, principalmente em plantas medicinais.

Como citado por HARBORNE (1980), no déficit hídrico há menor produção de fenólicos, então, neste caso, o aumento da disponibilidade de água pelas chuvas (pluviometria) favoreceu a produção tanto de ácido clorogênico quanto de ácido caféico em proporções semelhantes, o que é evidenciado pelo baixo valor de %CL (Quadro 21). A menor disponibilidade de água faz com que ocorra aumento da concentração de ácido clorogênico, como foi observado por DEL MORAL (1972), em girassol (*Helianthus annuus*).

4.7. Influência da altitude e do estágio reprodutivo na produção de ácido clorogênico e ácido caféico

Na maior altitude (962 m) ocorreu maior acúmulo de ácido clorogênico (CLg 2,48) e na menor altitude (198 m) ocorreu maior acúmulo de ácido caféico (CFg 2,28) (Quadro 23). Variações semelhantes em fitofármacos influenciados pela altitude foram relatados por MUÑOZ-COLLAZOS et al. (1993). Esses autores, ao analisarem, na Bolívia, os componentes do óleo essencial de *Mintostachys andina*, detectaram que com o aumento da altitude ocorria acúmulo de pulegona em detrimento da mentona.

Houve aumento do teor de ácido clorogênico (CLg) e ácido caféico (CFg), com a detecção do máximo teor no início da frutificação, e, em seguida, houve diminuição. O teor de ácido clorogênico e de ácido caféico no início da frutificação foi de, respectivamente, 2,25 mg g⁻¹ e 2,51 mg g⁻¹. O percentual de ácido clorogênico foi maior no florescimento (53,09), diminuindo nos demais estádios (Quadro 23). A baixa produção de fitofármacos em plantas senescentes pode estar relacionada à diminuição da quantidade de clorofila nas folhas, diminuindo a atividade fotossintética e gerando menos fotoassimilados ao Ciclo de Calvin (TAIZ e ZEIGER, 1991), que proporciona baixos teores de ácido clorogênico e ácido caféico nesta fase. Determinar o estágio reprodutivo quando deve ser feita a coleta de plantas medicinais, tem como intuito estabelecer o máximo teor de fitofármacos e, nesse estágio, realizar a seleção dos melhores genótipos (AMARAL et al., 1999).

Quadro 23 Médias dos caracteres teor de ácido clorogênico (CLg), teor de ácido caféico (CFg), massa seca foliar (MF), rendimento de ácido clorogênico por planta (CLmf), rendimento de ácido caféico por planta (CFmf) e percentual de ácido clorogênico na soma de ácido clorogênico e caféico (%CL) nos seis genótipos de *Bidens pilosa* L. crescidos em quatro altitudes e colhidos nos estádios de florescimento (FL), início de frutificação (IF), frutificação plena (FP) e senescência (SE)

Tratamentos		Características*					
		CLg	CFg	MS	CLms	CFms	%CL
Altitudes (m)	198	1,17B	2,28A	2,35A	2,79B	5,36A	37,70C
	479	1,40B	1,63B	2,48A	4,23A	4,42B	45,28B
	739	1,15B	1,75B	1,45C	1,78C	2,40D	39,18C
	962	2,48A	2,04A	1,75B	4,68A	3,62C	54,95A
Estádios	FL	1,64B	1,16C	2,70A	4,20B	3,19B	53,09A
	IF	2,25A	2,51A	2,71A	6,13A	7,06A	46,93B
	FP	1,18C	2,33A	1,52B	1,83C	3,71B	35,90D
	SE	1,13C	1,70B	1,09C	1,32C	1,85C	41,18C

As médias seguidas de uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

* Médias de quatro repetições, sendo as medidas de MS em grama e as de CLg, CFg, CLCFg, CLms, CFms e CLCFms em miligrama.

Observa-se a tendência em diminuir a massa seca foliar e aumentar o teor de ácido clorogênico (CLg) e ácido caféico (CFg) (Quadro 23). Estes resultados indicam que os compostos fenólicos, assim como outros metabólitos secundários, podem responder a influências de fatores externos e a sua produção pode acontecer independentemente da máxima produção de matéria seca. Nos estudos de LI et al. (1996), por exemplo, foi observado que altos níveis de radiação solar limitam o crescimento de tomilho e, ao mesmo tempo, aumentam a produção de óleo essencial.

Na maior altitude determinou-se a maior concentração de ácido clorogênico e ácido caféico, 4,52 mg g⁻¹, ao somar as médias de teor de ácido clorogênico (CLg 2,48) e de ácido caféico (CFg 2,04), o que coincide com

KOPTUR (1985), ou seja, há maiores concentrações de compostos fenólicos nas folhas de *Inga densiflora* e *Inga punctata* em altas altitudes do que em baixas.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

O objetivo do presente trabalho foi estudar a influência da altitude em seis clones de *Bidens pilosa* coletados nas altitudes de 210, 450, 475, 675, 950 e 1.150 m. Foi instalado experimento em que as plantas foram crescidas em vasos mantidos em quatro altitudes: 198, 479, 739 e 962 m e os resultados avaliados em quatro colheitas representando os estádios reprodutivos. Após cada colheita, as folhas foram submetidas à extração em etanol (80%), o extrato obtido foi analisado em cromatografia líquida de alta eficiência. Foram identificados e quantificados o ácido clorogênico e o ácido caféico. Foi feita a estimação da magnitude e do padrão de respostas plásticas desses compostos. Foi estimado o coeficiente de coincidência (CCo), determinado o grau de adaptação dos genótipos e a correlação entre os caracteres e os dados climáticos de cada altitude.

Nas condições em que os experimentos foram conduzidos, e pelos resultados, concluiu-se que:

- 1) *Bidens pilosa* possui plasticidade fenotípica passível de ser detectada quimicamente.
- 2) A folha é o órgão que possui maior quantidade de ácido clorogênico e caféico por grama de matéria seca.
- 3) Pelos estimadores da plasticidade as altitudes influenciam a produção dos fitofármacos e cada genótipo apresentou resposta de acordo com a altitude.
- 4) A magnitude e o padrão de plasticidade foram específicos em cada genótipo, podendo diferir dentro do mesmo genótipo em função do estágio reprodutivo.

- 5) Pelo CCo, os caracteres coincidiram em cerca de 45% com a resposta à altitude semelhante à de coleta, revelando adaptação intermediária dos genótipos às altitudes de origem.
- 6) O ácido clorogênico e o ácido caféico têm correlação negativa com a temperatura e a evaporação e positiva com a pluviosidade.
- 7) Há diferença de produção desses compostos nos estádios de desenvolvimento da planta, sendo o estágio de início de frutificação o melhor.
- 8) Na maior altitude a produção conjunta desses compostos é maior.

Conclui-se que a altitude influencia na plasticidade fenotípica e que seu estudo em plantas medicinais é importante na seleção de genótipos, pois a resposta dos fitofármacos está intimamente relacionada à recomendação medicinal das plantas.

CAPÍTULO 5

PLASTICIDADE FENOTÍPICA DA ANATOMIA FOLIAR DE GENÓTIPOS DE *Bidens pilosa* L. EM QUATRO ALTITUDES

1. INTRODUÇÃO

A expressão diferencial de genes induzidos e condicionados pelo ambiente intra e extracelular promovem variações plásticas do genótipo em etapas cruciais do crescimento e desenvolvimento vegetal e podem ser detectadas nas análises fisiológicas e/ou morfológicas (SUZUKI et al., 1992; SULTAN, 1995). A diferenciação dos órgãos e tecidos gera alterações morfológicas e essas diferenciações podem ser detectadas macro ou microscopicamente. Variações anatômicas dos tecidos fotossintéticos se refletem na plasticidade fenotípica em vários órgãos vegetais e não apenas nas folhas, devido aos fotoassimilados fornecidos servirem como substratos às demais sínteses induzidas ou promovidas por produtos gênicos em outros tecidos. A interação do genótipo com o ambiente pode gerar variações na epiderme foliar, diretamente relacionadas à proteção dos tecidos fotossintéticos vegetais (CUTTER, 1986). Nas análises realizadas no capítulo 3 detectou-se alta plasticidade fenotípica na morfologia das folhas de *Bidens pilosa*. O estudo da variação anatômica dos tecidos foliares auxilia nos estudos da interação genótipo x ambiente em nível microscópico. Objetivou-se neste trabalho:

- 1) estudar a anatomia de folhas de genótipos de *Bidens pilosa* crescidos em quatro altitudes, considerando a espessura foliar total, dos parênquimas

paliádico e lacunoso, do mesofilo, das epidermes e as relaões percentuais entre os tecidos;

2) estimar a magnitude e o padrão de respostas plásticas dos caracteres anatômicos;

3) estimar o grau de adaptação dos genótipos às altitudes de origem pelo coeficiente de coincidência;

4) Obter correlações entre as características anatômicas e climáticas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Bidens pilosa*

A espécie medicinal *Bidens pilosa* L. é anual, herbácea e se propaga na natureza sexuadamente por semente natural, o que é típico da Asteraceae. A estrutura de propagação dessa espécie é o aquênio com pappus, por sua adaptação anatômica-morfológica servir à sua dispersão ectozoocórica preso à pelagem dos mamíferos, principalmente à do homem, no qual também se adere às vestes (LORENZI, 1982; BASTIDAS et al., 1989). No Brasil, popularmente, essa planta é conhecida como picão ou picão-preto, é utilizada na fitoterapia em casos de problemas hepáticos, sendo as folhas o órgão preferido (VASQUES et al., 1986b).

As folhas de *Bidens pilosa* são pecioladas, opostas, simples ou decompostas, 3 a 5 pinadas, segmentos ovados, agudos e serrados, com pêlos curtos e hialinos (STRANG et al., 1980; VASQUES et al., 1986a, b).

2.2. A altitude e a plasticidade fenotípica da anatomia das folhas

2.2.1. A altitude

A altitude é a altura da superfície do solo em relação ao nível do mar. Ao longo do gradiente de altitude, mudam concomitantemente muitos fatores ambientais, tais como temperatura, precipitação, umidade, velocidade do vento e

outros. À medida que há aumento de altitude, aumentam a velocidade do vento, a pluviosidade e a radiação solar e diminuem a temperatura e a pressão atmosférica (JONES, 1994). Por isso, as variações nas altitudes interferem no desenvolvimento das plantas e na produção de fitofármacos de interesse (CORRÊA JÚNIOR et al., 1994), pois favorecerem a expressão de genes que determinam respostas a cada estímulo ambiental.

Em condições naturais, a temperatura decresce, em média, 0,006 °C a cada elevação de um metro de altitude, dependendo da temperatura do ar (JONES, 1994). Baixas temperaturas reduzem a taxa fotossintética e, conseqüentemente, a taxa de crescimento (PENNING DE VRIES, 1989). Com a elevação da altitude, a temperatura diminui e interfere nas fases fenológicas dos acessos de camomila (*Chamomilla recutita*). Na primavera e verão, há o florescimento dos acessos de elevadas altitudes que começam a florir mais tardiamente que os da baixa altitude (SALAMON, 1994). A mil-folhas (*Achillea millefolium*) cultivada a partir de 1.000 metros de altitude tem menor porte e maior teor de óleos essenciais (CORRÊA JÚNIOR et al., 1994), sendo por isso preferida as sumidades floridas colhidas em regiões montanhosas (PANIZZA, 1997).

A diminuição de altura das plantas com o aumento da altitude pode ser devido à redução da fotossíntese foliar, seja pelo decréscimo da concentração volumétrica de CO₂ com a altitude. Ao nível do mar essa concentração é 340 vppm (340 cm³ de CO₂ por m³ de ar), na altitude de 1.000 m é de 290 vppm e na de 2000 m é de 256 vppm (PENNING DE VRIES, 1989). Com o aumento da altitude ocorre diminuição da pressão atmosférica, o que desfavorece a troca gasosa e diminui o coeficiente de difusão dos gases, dificultando a disponibilidade de CO₂ à planta (PENNING DE VRIES, 1989; JONES, 1994), acarretando a menor taxa fotossintética. O ambiente com menor quantidade de CO₂ causa menor resistência foliar. Como resposta, a planta aumenta a quantidade de clorofila à medida que há elevação de altitude a fim de compensar a menor concentração de CO₂. Como resultado, a fotossíntese em culturas C3 decresce com o aumento da altitude (PENNING DE VRIES, 1989).

JONES (1994) enfatiza que a radiação solar aumenta com a altitude, principalmente os raios UV que promovem o fechamento estomatal e

freqüentemente inibe o crescimento vegetal e, como consequência, em muitas espécies verifica-se que as plantas crescidas em elevadas altitudes têm menor altura, menor área foliar e produzem menos sementes.

2.2.2. A plasticidade fenotípica anatômica das folhas

O desenvolvimento vegetal possui natureza plástica fisiológica, química, anatômica e morfológica, pelo fato das plantas terrestres permanecem fixas ao solo. Esta resposta plástica expressa as condições locais presentes durante seu desenvolvimento. A capacidade de resposta plástica depende da constituição gênica e varia entre espécies e dentro da espécie dependendo do contexto ambiental. A plasticidade nem sempre é detectada na morfologia, mas pode estar presente nos tecidos constitutivos dos órgãos (INGROUILLE, 1992). As variações da planta estão intimamente relacionadas à fotossíntese foliar. As folhas adotam estratégias plásticas morfológicas como respostas adaptativas ao ambiente. O ambiente é constituído pelas condições edafoclimáticas, antrópicas e patogênicas que afetam o desenvolvimento das plantas e que não são de origem genética (BORÉM, 1997). A plasticidade morfológica, proposta por BRADSHAW (1965), ocorre durante o desenvolvimento e portanto são permanentes no órgão envolvido. As variações dos tecidos foliares estendem-se desde a forma, a espessura dos tecidos, a deposição de substâncias nas paredes ou sobre a superfície foliar e a formação de tricomas (CUTTER, 1986; FAHN, 1990). Comumente, fatores climáticos estão correlacionados com caracteres anatômicos e esses ao potencial genético de cada espécie (INGROUILLE, 1992). A relação entre clima e tecido foliar tem recebido atenção dos ecologistas (GUREVITCH, 1988). Espécies medicinais têm plasticidade foliar que as condicionam crescer em condições ambientais de altitudes extremas. Neste contexto, há relatos de *Achillea millefolium* e *Taraxacum officinale* (RAVEN et al.; 1978; GUREVITCH, 1988).

Outros fatores climáticos variam com as altitudes, dentre eles destaca-se a chuva, a umidade, a irradiação solar e a temperatura do solo e ar. Nas maiores altitudes há diminuição de temperatura do ar e do solo, menor precipitação e

maior incidência luminosa que em baixas temperaturas. A umidade relativa do ar tende a aumentar com o aumento da altitude. A menor incidência luminosa promove o crescimento do caule e das folhas, aumentando a área foliar e diminuindo a espessura (JONES, 1994). O aumento da área foliar serve como compensação da baixa luminosidade. Folhas finas crescem mais rápido que as folhas grossas e a taxa máxima de fotossíntese foliar aumenta proporcionalmente com o engrossamento das folhas (WHATLEY e WHATLEY, 1982; PENNING DE VRIES, 1989). Os tecidos fotossintéticos das folhas, parênquima paliçádico e lacunoso, têm variações nem sempre proporcionais (FAILS et al., 1982).

O parênquima paliçádico localiza-se logo abaixo da epiderme superior e é a camada fotossintética mais importante da folha, pois suas células colunares maximizam a interceptação da luz. No parênquima lacunoso, há espaços intercelulares amplos e neles se mantêm o vapor d'água e o dióxido de carbono (CO₂) utilizáveis na fotossíntese. A combinação entre parênquima paliçádico e lacunoso produz a unidade fotossintética (INGROUILLE, 1992). As variações dessa unidade influenciam características plásticas gerais do genótipo.

A variedade de formas encontrada na mesma espécie dependentes das condições ambientais ocorre devido à duração da atividade diferenciada dos meristemas ativos das folhas. A atividade do meristema marginal estabelece o número de camadas de células do mesofilo foliar. O mesofilo compreende o parênquima paliçádico e o parênquima lacunoso e localiza-se entre a epiderme superior e inferior. O paliçádico encontra-se, geralmente, na parte superior do mesofilo e é formado por células alongadas no plano transversal e densamente reunidas. O lacunoso localiza-se na parte inferior do mesofilo e é constituído de células irregulares e ramificadas, separadas por grandes espaços de ar. No parênquima paliçádico são detectados numerosos cloroplastos enquanto no parênquima lacunoso detectam-se poucos (CUTTER, 1986; FAHN, 1990).

A espessura do limbo foliar é variável e é fortemente influenciada pelo meio, estando envolvido a síntese de DNA e mitoses. A síntese de DNA e as mitoses geralmente continuam por mais tempo no parênquima paliçádico do que em qualquer outro lugar da folha. A luz e a temperatura podem afetar a divisão e expansão celular no desenvolvimento foliar. Altos níveis de luminosidade,

geralmente, diminuem a área foliar e aumentam a espessura das folhas (CUTTER, 1986).

A plasticidade fenotípica pode ser estimada durante e depois do desenvolvimento dos caracteres (BRADSHAW, 1965). Caracteres formados durante longo período de desenvolvimento, como as folhas, estão mais sujeitos à influência ambiental e, conseqüentemente, espera-se maior variação fenotípica, ou seja, são mais plásticas, quando comparadas com os caracteres desenvolvidos rapidamente, como estruturas reprodutivas e os demais caracteres formados durante os estádios de desenvolvimento (SANTOS, 1990). Os estimadores de plasticidade, como a magnitude e o padrão de plasticidade, servem à comparação entre dois ou mais genótipos em mais de um ambiente. A magnitude de resposta é estimada pelo coeficiente de variação ambiental (CVa), que quantifica a intensidade da plasticidade nestes ambientes, e pelo índice de determinação ambiental (Ia^2), que determina o quanto da variação deveu-se ao efeito ambiental (SANTOS, 1990; KAMADA, 1999). O valor de CVa é considerado alto se for maior que 20%, médio se estiver entre 10 e 20% e baixo se for menor que 10% (SCHLICHTING e LEVIN, 1984). O Ia^2 pode ter valores positivos ou negativos. Se positivos e altos significa que grande parte da variação é devida ao ambiente, se baixos ou negativos significa que as variações são atributos do genótipo. Ao comparar o comportamento entre os genótipos, obtém-se concordância ou discordância de resposta sendo denominado padrão de plasticidade. Quando são comparados dois ou mais genótipos é possível determinar similaridades ou divergências de respostas entre eles em cada característica. Considerando dois genótipos em relação a uma ou mais características, pode haver alta ou baixa correlação. As altas correlações indicam que os genótipos têm respostas similares, ao passo que correlações baixas, ou negativas, indicam padrão de plasticidade divergente entre aqueles pares de genótipos em relação à característica (SCHLICHTING e LEVIN, 1984).

O grau de adaptação do genótipo em relação ao seu local de origem pode ser estimado pelo coeficiente de coincidência (CCo) desde que reproduzido vegetativamente o genótipo e cultivado em ambiente semelhante ao de origem e em variantes desse ambiente (CRUZ, 1997). Se no local semelhante ao de origem

for observado fenótipo com variações extremas nas características, ou seja, valores máximos ou mínimos, indicando que, naquele ambiente, foi possível a máxima expressão do caráter ou, por outro lado, devido a sua adaptação estar consolidada, foi necessário menor gasto de energia. Como os valores extremos comprovam coincidência, os valores intermediários revelam discordância.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta do material vegetal

Seis genótipos de *Bidens pilosa* foram selecionados de grupos divergentes e serviram a este estudo de plasticidade fenotípica da anatomia foliar. Cada genótipo foi representado por plantas propagadas vegetativamente pela técnica de cultura de tecidos e aclimatadas em telado. Os genótipos foram crescidos em vasos em quatro altitudes de 198, 479, 739 e 962 m. Utilizou-se o delineamento estatístico em blocos casualizados, com quatro repetições e duas plantas por parcela. As plantas nos experimentos foram mantidas nas mesmas condições de solo, irrigação e disposição dos blocos.

As folhas destinadas à análise anatômica foram coletadas nos ramos laterais desenvolvidos a partir de gemas do 3º ou 4º nó, contados do ápice à base do ramo principal. Essas estavam com três folíolos e na região de maior largura do folíolo principal, entre a nervura central e a borda da lâmina, foi retirada amostra de 1,5 x 1,0 cm e acondicionada em frascos contendo solução de FAA a 50% (formaldeído, álcool 50% e ácido acético, na proporção de 1:9:1). As plantas encontravam-se em início de senescência e as folhas fotossinteticamente ativas foram as escolhidas.

No Quadro 1, está descrito o local de coleta das plantas, além do número do herbário (VIC). A altitude de coleta foi adotada como representativa do genótipo, ou seja, o genótipo 210 foi coletado na altitude 210 m, o genótipo 450 na altitude 450 m e assim os demais.

Quadro 1 - Altitude, local, área e *habitat* de coleta dos 6 genótipos de *Bidens pilosa* L. e seus respectivos números do herbário (VIC)

Altitude	Local de Coleta	Área e <i>Habitat</i> de Coleta	VIC
210	Leopoldina (MG)	Urbana – terreno baldio, ensolarado e seco	25.311
450	Leopoldina (MG)	Rural - horta, sombreada e úmida	25.313
475	Oratórios (MG)	Rural - horta, ensolarada e úmida	25.312
675	Viçosa (MG)	Rural - horta, ensolarada e úmida	25.308
950	Araponga (MG)	Rural - horta, ensolarada e úmida	25.309
1.150	Araponga (MG)	Rural - horta, ensolarada e úmida	25.310

Altitude = representando a origem da altitude, em metros, do genótipo.

VIC = Herbário da Universidade Federal de Viçosa.

3.2. Preparo das lâminas permanentes

Os estudos foram realizados no laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa.

As amostras foliares fixadas em FAA (50%) foram desidratadas em série etílica progressiva até álcool 100% (BERLY e MITKSCHE, 1976), passando por série butílica até inclusão em parafina e cera (8%) e seccionados transversalmente em micrótomo rotatório modelo AO (American Optical), com 14 mm de espessura. Os cortes foram fixados às lâminas com cola, desparafinizados em série butílica seguida de série alcoólica até álcool 50%, corados com fucsina (por 5 minutos), azul de astra (por 30 segundos) (JOHANSEN, 1940) e montados, entre lâmina e lamínula, em bálsamo do Canadá.

Estes cortes anatômicos foram utilizados na comparação da espessura dos tecidos foliares entre os genótipos e as altitudes. Fez-se a medição, ao acaso, de 4 cortes cuja média correspondeu a um bloco. A análise total foi de quatro blocos por genótipo em cada altitude.

Na medição da espessura dos tecidos foliares utilizou-se o Sistema de Análise de Imagens, com as lâminas observadas em microscópio OLYMPUS BX-60 e as imagens capturadas e digitalizadas pela câmera digital acoplada ao microscópio, enviadas ao microcomputador e trabalhadas no Software Image-Pro Plus 4.0. A espessura dos tecidos foliares foi analisada na objetiva de 10x.

A documentação fotográfica foi realizada em microscópio OLYMPUS AX-70 com sistema U-PHOTO.

3.3. Características anatômicas

As características avaliadas foram as espessuras, em μm , do parênquima paliçádico (PP), do parênquima lacunoso (PL), do mesofilo (MESO), das epidermes (EP), da espessura foliar total (EF), porcentagem do parênquima paliçádico em relação ao mesofilo (PPM), porcentagem do parênquima paliçádico em relação à folha total (PPF), porcentagem do parênquima lacunoso em relação à folha total (PLF) e porcentagem da epiderme em relação à folha total (EPF).

3.4. Análises estatísticas e estimadores da plasticidade fenotípica

Foram feitas análises de variância conjunta com desdobramento das somas de quadrado da altitude e da interação altitude x genótipo submetidos à análise de variância individual, contendo as variáveis estudadas nos seis genótipos nas quatro altitudes. A diferença entre genótipos na interação com o ambiente que revela plasticidade foi quantificada pela resposta plástica. A quantificação da plasticidade foi feita com base na magnitude de resposta e no padrão de resposta plástica. A magnitude foi estimada pelo coeficiente de variação ambiental (CVA) (SCHLICHTING e LEVIN, 1984) e pelo índice de determinação ambiental (Ia^2) (KAMADA, 1999). Estimativas negativas dos índices de determinação ambiental foram desconsideradas e representadas por traços. O padrão de plasticidade foi estimado pelo coeficiente de correlação de Pearson. O coeficiente de coincidência (CCo) foi estimado, de acordo com CRUZ (1997), pelas médias submetidas ao teste de Tukey. Estes estimadores encontram-se descritos no capítulo 3. Foi obtida a correlação entre dados climáticos e características anatômicas. Os dados climáticos, de quatro medições, referem-se à pressão atmosférica (mmHg), radiação solar incidente (lux) e umidade relativa do ar (%) nas quatro altitudes onde cresciam as plantas em vasos. As medidas de altitudes

foram obtidas com GPS (Global Position System) modelo 2000 XL (Magellan), as de pressão atmosférica com Weather Monitor II (Davis Instruments Corp.) e as de radiação solar incidente com Luxímetro Digital modelo Lutron LX-101 (Lutron). As instruções de medição de cada aparelho foram seguidas e a radiação solar incidente foi verificada com a superfície do sensor de luz do luxímetro posicionada perpendicularmente à incidência solar. Os dados foram digitados no programa Microsoft Excel 5.0 (Microsoft Co.) e a análise realizada no programa estatístico SAEG 5.0 - Sistema para Análises Estatísticas (FUNARBE - UFV), cujas instruções operacionais encontram-se descritas em GOMES (1992).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Descrição anatômica da folha

O corte transversal do limbo foliar revelou a epiderme superior uniestratificada, com pêlos não glandulares, pluricelulares, e não ramificados. O mesofilo é do tipo heterogêneo dorsiventral, com uma camada de parênquima paliçádico, com células alongadas clorofiladas que se dispõem de modo compacto, e três a cinco camadas de células parênquima lacunoso, com espaços intercelulares, percorridos longitudinalmente por canais secretores. Abaixo do mesofilo encontra-se a epiderme inferior, uniestratificada, com células de dimensões menores que as da epiderme superior (Figura 1). Essas observações conferem com as de MACIEL (1980), NEVES e HERMETO (1981-1982) e VASQUES et al. (1986b).

4.2. Análise estatística e estimadores da plasticidade fenotípica

4.2.1. Análises de variância

A análise de variância conjunta dos genótipos nas altitudes revela que houve diferença significativa entre genótipos e altitudes na maioria das características avaliadas (Quadro 2). A interação genótipo x altitude não foi significativa em nenhuma característica e indica que os efeitos dos fatores genótipo e altitude explicam toda a variação encontrada na anatomia foliar.

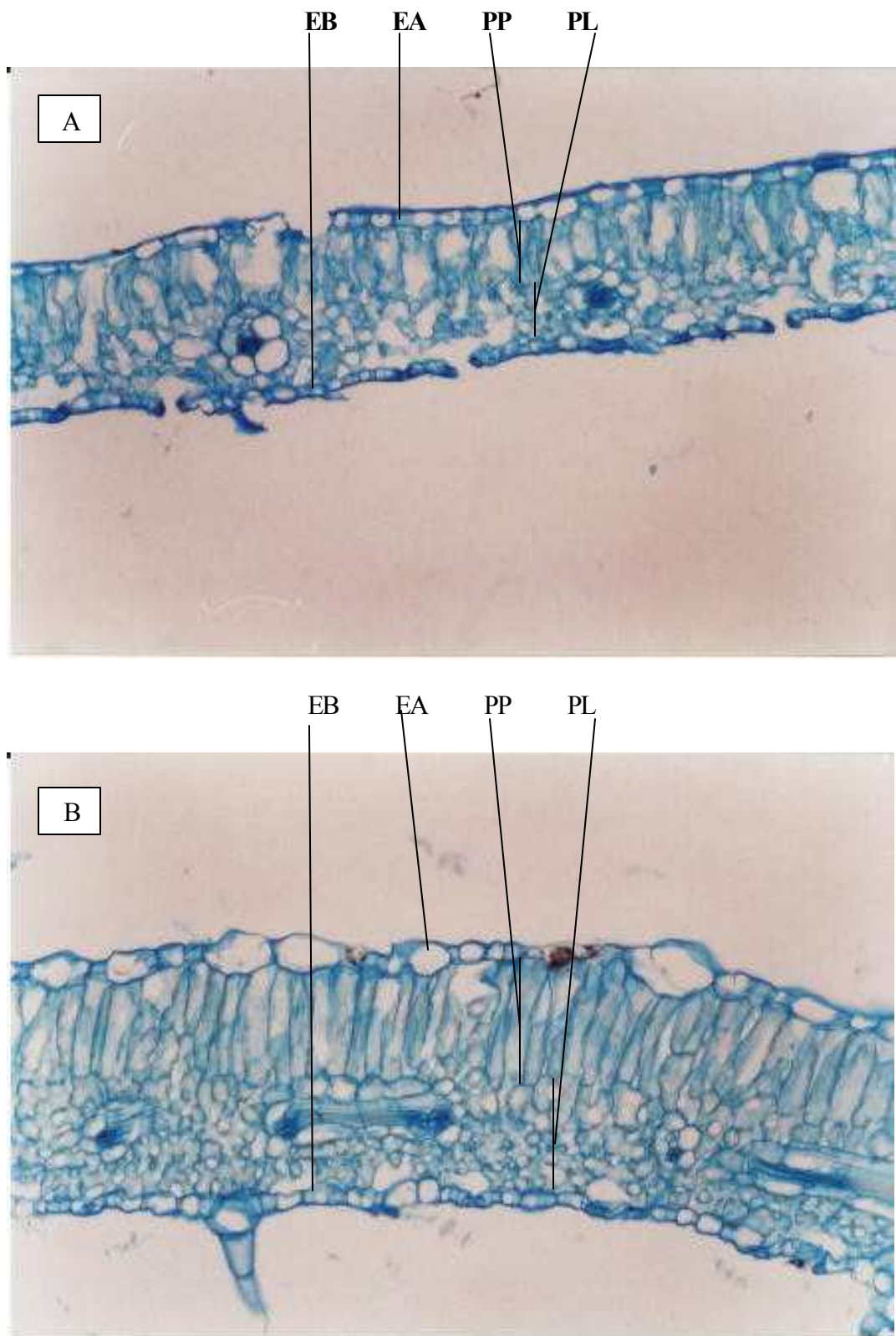


Figura 1 - Cortes transversais de folhas do genótipo 950 de *Bidens pilosa* crescido na altitude de 198 m (foto A) e 962 m (foto B). Epiderme adaxial (EA), parênquima paliçádico (PP), parênquima lacunoso (PL) e epiderme abaxial (EB). Barra $\text{—} = 100 \mu\text{m}$

As somas de quadrado da altitude e da interação altitude x genótipo da análise conjunta foram submetidos à análise de variância individual, sendo realizado o desdobramento dos seis genótipos nas quatro altitudes (Quadro 2).

No genótipo 210, 475 e 675 as variáveis não foram significativas. Os menores valores de CV (%) foram nas relações percentuais entre os tecidos. Nas análises de variância, as características do genótipo 1150 tiveram diferenças significativas em todas as altitudes, com valores não significativos apenas no percentual de parênquima paliçádico em relação ao mesofilo e à folha toda.

No Quadro 2, os quadrados médios não significativos na maioria das variáveis demonstram que as altitudes de crescimento não influenciaram a resposta plástica das plantas dos genótipos de *Bidens pilosa*. As espessuras do parênquima lacunoso (PL) e da folha total (EF) foram diferentes estatisticamente nos genótipos 450, 950 e 1150.

4.2.2. Magnitudes da plasticidade fenotípica

Na análise individual da interação do genótipo x altitude detectaram-se poucos resultados significativos, entretanto, a plasticidade fenotípica quantificada em magnitude foi estimada pelo coeficiente de variação ambiental (CVa) e pelo índice de determinação ambiental (Ia^2). No Quadro 3, encontram-se os valores do coeficiente de variação ambiental (CVa) e no Quadro 4 o índice de determinação ambiental (Ia^2), indicando as magnitudes da plasticidade fenotípica.

Adotando a classificação das magnitudes de plasticidade citada por SCHLICHTING e LEVIN (1984) (CVa > 20% alta, 10-20% média e < 10% baixa), as características, em média, tiveram magnitudes de plasticidade médias, CVa = 10,57 (Quadro 3). O maior valor de CVa foi estimado na espessura do parênquima lacunoso, CVa = 18,12 e a menor espessura foi detectada no parênquima paliçádico (PPM) em relação à espessura do mesofilo, com CVa = 4,17.

Os valores dos índices de determinação ambiental (Ia^2) nos genótipos demonstraram que a variação total atribuída aos efeitos ambientais (altitude) foi intermediária, cuja média foi de 0,5992 (Quadro 4), com os menores valores nas

Quadro 2 - Resumo da análise de variância conjunta com desdobramento das somas de quadrado da altitude e da interação altitude x genótipo nos genótipos 210, 450, 475, 675, 950 e 1150 de *Bidens pilosa* L., em estágio senescente, nas quatro altitudes, dos caracteres de espessura do parênquima paliçádico (PP), do parênquima lacunoso (PL), do mesofilo (MESO), das epidermes (EP), da espessura foliar total (EF) e porcentagem do parênquima paliçádico em relação ao mesofilo (PPM) e do parênquima paliçádico (PPF), parênquima lacunoso (PLF) e epiderme em relação à folha total (EPF)

FV	GL	Quadrados médios								
		PP	PL	MESO	EP	EF	PPM	PPF	PLF	EPF
Bloco/Altitude	12	139,90 ^{ns}	149,72 ^{ns}	535,93 ^{ns}	9,54 ^{ns}	501,88 ^{ns}	3,97 ^{ns}	5,43 ^{ns}	4,44 ^{ns}	8,34*
Altitude (A)	(3)	2047,29**	3600,75**	10917,17**	125,50**	13315,47**	45,08*	18,88 ^{ns}	59,55**	32,11**
Genótipo (G)	5	2132,81**	21,70**	6684,19**	56,07**	7833,07**	26,96 ^{ns}	39,64**	8,41 ^{ns}	21,17**
A x G	(15)	188,49 ^{ns}	28,88 ^{ns}	515,04 ^{ns}	8,98 ^{ns}	560,48 ^{ns}	13,68 ^{ns}	15,39 ^{ns}	6,80 ^{ns}	6,39 ^{ns}
A / G210	3	153,01 ^{ns}	552,24 ^{ns}	1162,96 ^{ns}	22,52 ^{ns}	1253,78 ^{ns}	20,13 ^{ns}	14,30 ^{ns}	17,44 ^{ns}	7,00 ^{ns}
A / G450	3	215,90 ^{ns}	611,06*	1506,24 ^{ns}	44,79 ^{ns}	2047,59*	18,90 ^{ns}	10,03 ^{ns}	17,08 ^{ns}	1,49 ^{ns}
A / G475	3	219,41 ^{ns}	383,69 ^{ns}	1058,83 ^{ns}	13,56 ^{ns}	1290,89 ^{ns}	18,64 ^{ns}	12,91 ^{ns}	14,58 ^{ns}	4,15 ^{ns}
A / G675	3	407,95 ^{ns}	501,43 ^{ns}	1777,82 ^{ns}	21,07 ^{ns}	2072,02 ^{ns}	3,44 ^{ns}	6,90 ^{ns}	5,71 ^{ns}	15,20 ^{ns}
A / G950	3	1104,80**	852,97**	3816,65**	32,97*	4554,32**	13,46 ^{ns}	15,22 ^{ns}	8,00 ^{ns}	8,27 ^{ns}
A / G1150	3	888,70*	1343,79**	4169,87**	35,51**	4899,23**	38,93 ^{ns}	36,45 ^{ns}	30,73*	27,97**
Resíduo	60	118,79	134,87	405,73	11,17	480,00	11,55	10,10	7,67	3,76
Média		72,24	73,19	145,43	28,89	174,32	49,70	41,29	41,76	16,96
CV (%)		15,09	15,87	13,85	11,57	12,57	6,84	7,70	6,63	11,44

* e ** = Significativos a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F; ns = não significativo, pelo teste F.

Quadro 3 - Estimativas dos coeficientes de variação ambiental (CVa) dos caracteres de espessura do parênquima paliçádico (PP), do parênquima lacunoso (PL), do mesofilo (MESO), das epidermes (EP), da espessura foliar total (EF) e porcentagem do parênquima paliçádico em relação ao mesofilo (PPM) e do parênquima paliçádico (PPF), parênquima lacunoso (PLF) e epiderme em relação à folha total (EPF), em plantas senescentes de seis genótipos de *Bidens pilosa* L. cultivados em quatro altitudes

Genótipo	Características									Média
	PP	PL	MESO	EP	EF	PPM	PPF	PLF	EPF	
210	6,50	12,88	9,15	7,35	8,10	4,36	4,32	5,04	8,89	7,40
450	10,42	17,34	13,69	11,55	13,25	4,35	3,82	4,98	3,57	9,22
475	11,69	13,96	12,19	6,44	11,08	4,53	4,60	4,45	5,67	8,29
675	15,16	16,04	15,46	7,88	13,75	1,90	3,27	2,85	10,90	9,69
950	23,57	20,52	21,80	10,45	19,95	3,69	4,70	3,37	8,70	12,97
1150	22,15	27,98	24,31	11,06	21,91	6,17	7,22	6,80	15,20	15,87
Média	14,92	18,12	16,10	9,12	14,67	4,17	4,66	4,58	8,82	10,57

Quadro 4 - Estimativas dos índices de determinação ambiental (Ia^2) dos caracteres de espessura do parênquima paliçádico (PP), do parênquima lacunoso (PL), do mesofilo (MESO), das epidermes (EP), da espessura foliar total (EF) e porcentagem do parênquima paliçádico em relação ao mesofilo (PPM) e do parênquima paliçádico (PPF), parênquima lacunoso (PLF) e epiderme em relação à folha total (EPF), em plantas senescentes de seis genótipos de *Bidens pilosa* L. cultivados em quatro altitudes

Genótipo	Características									Média
	PP	PL	MESO	EP	EF	PPM	PPF	PLF	EPF	
210	0,5615	0,6296	0,6612	0,3881	0,6594	0,4649	0,4969	0,4194	0,5564	0,5375
450	0,3841	0,7924	0,7058	0,6792	0,7239	0,5355	0,2175	0,7008	-	0,5924
475	0,5114	0,5192	0,5124	0,5237	0,6193	0,5819	0,5195	0,3613	-	0,5186
675	0,6703	0,7031	0,7034	0,1998	0,6876	-	0,0711	0,2109	0,6682	0,4893
950	0,9252	0,8962	0,9368	0,7246	0,9380	-	0,1043	0,0277	0,6378	0,6488
1150	0,7643	0,9473	0,8939	0,8640	0,9003	0,6503	0,5991	0,8055	0,8522	0,8085
Média	0,6361	0,7480	0,7356	0,5632	0,7548	0,5582	0,3347	0,4209	0,6787	0,5992

características percentuais, demonstrando que existe manutenção da relação entre os tecidos foliares. Estimativas negativas dos índices de determinação ambiental foram desconsideradas e representadas por traços no Quadro 4.

4.3. Características avaliadas e respectivas respostas em magnitude e padrão de plasticidade

A magnitude de plasticidade nos genótipos foi, em média, crescente entre os genótipos, tendo o genótipo 210 o menor valor ($CVa = 7,40$) e o genótipo 1150 o maior ($CVa = 15,87$) (Quadro 3). Pelo Ia^2 , estimou-se que cerca de 60% da variabilidade deveu-se a altitudes (Quadro 4).

4.3.1. Espessura do parênquima paliádico (PP)

Nas análises individuais, os quadrados médios foram significativos apenas nos genótipos 950 e 1150 (Quadro 2). No Quadro 3, os coeficientes de variação ambiental (CVa) foram de 6,50 a 23,57, com média de 14,92, indicando variabilidade plástica. Foram crescentes os valores de CVa com as altitudes de origem dos genótipos. Adotando a classificação das magnitudes de plasticidade citada por SCHLICHTING e LEVIN (1984) ($CVa > 20\%$ alta, 10-20% média e $< 10\%$ baixa), a magnitude de plasticidade foi média ($CVa = 14,92$) (Quadro 3). Os índices de determinação ambiental (Ia^2) foram, em média, altos (0,6361) (Quadro 4). Os mesmos genótipos tiveram os maiores valores de CVa e de Ia^2 . No padrão de plasticidade a resposta foi divergente, principalmente no genótipo 210 (Quadro 5), indicando que as altitudes influenciam a diferenciação desse caráter de maneira particular em cada genótipo.

4.3.2. Espessura do parênquima lacunoso (PL)

Nas análises individuais, os quadrados médios foram significativos apenas nos genótipos 450, 950 e 1150 (Quadro 2). Os coeficientes de variação ambiental (CVa), de 12,88 a 27,98, indicaram média a alta plasticidade fenotípica e, em média, detectou-se alta magnitude de plasticidade ($CVa = 18,12$). Os valores de

CVa foram crescentes com as altitudes de origem dos genótipos (Quadro 3). Os valores dos índices de determinação ambiental (Ia^2) foram altos ($Ia^2 = 0,7480$) (Quadro 4). Os mesmos genótipos tiveram os menores e os maiores valores de CVa e de Ia^2 , respectivamente, os genótipos 475 e 1150. O padrão de plasticidade teve mesmo sentido de resposta, pela correlação ser positiva (Quadro 5), indicando que as altitudes influenciam a diferenciação desse parênquima de maneira semelhante mas com intensidade distinta em cada genótipo.

4.3.3. Espessura do mesofilo (MESO)

Nas análises individuais (Quadro 2), os quadrados médios foram significativos apenas nos genótipos 950 e 1150. Os coeficientes de variação ambiental (CVa), de 9,15 a 24,31, indicam média a alta plasticidade fenotípica, com valores de média de 16,10 significando que essa característica teve média magnitude de plasticidade. Os valores de CVa foram crescentes com as altitudes de origem dos genótipos (Quadro 3). A média de Ia^2 (0,7356) demonstra que mais de 73% da variação é devido ao ambiente (Quadro 4). Os genótipos 950 e 1150 tiveram os maiores valores de CVa e de Ia^2 . No padrão de plasticidade houve mesmo sentido de resposta, com correlações positivas (Quadro 5) indicando que a altitude influencia diferentemente a formação do mesofilo de cada genótipo.

4.3.4. Espessura das epidermes (EP)

Nas análises individuais (Quadro 2), os quadrados médios foram significativos apenas nos genótipos 950 e 1150. Os coeficientes de variação ambiental (CVa) tiveram valores baixos (CVa <10) e médios (CVa 10 a 20), com média de 9,12 indicando baixa magnitude de plasticidade (Quadro 3). A média de Ia^2 (0,5632) demonstra que EP é menos influenciada pelo ambiente do que os tecidos foliares (Quadro 4). Os genótipos de maiores valores de CVa são os maiores de Ia^2 . No padrão de plasticidade o sentido foi divergente entre os pares de genótipos (Quadro 5).

4.3.5. Espessura foliar total (EF)

Nas análises individuais (Quadro 2), os quadrados médios foram significativos apenas nos genótipos 450, 950 e 1150. Os coeficientes de variação ambiental (CVa) tiveram valores médios (CVa 10 a 20) a altos (CVa >20), com média de 17,60 indicando média magnitude de plasticidade nessa característica (Quadro 3). A maior média das variáveis foi detectada na EF ($Ia^2 = 0,7548$), demonstrando que mais de 75% da variação foi devida à altitude (Quadro 4). Os maiores valores de CVa e de Ia^2 foram encontrados nos genótipos 950 e 1150. Correlações positivas indicam padrão de plasticidade com mesmo sentido (Quadro 5), significando que a altitude influencia a formação da folha de maneira diferencial em cada genótipo.

4.3.6. Porcentagem do parênquima paliçádico em relação ao mesofilo (PPM)

Nas análises individuais (Quadro 2), os quadrados médios não foram significativos. Os coeficientes de variação ambiental (CVa) tiveram valores baixos (CVa < 10), com média de 4,17 indicando baixa magnitude de plasticidade (Quadro 3). Os valores negativos foram desconsiderados e indicam que as variações são, sobretudo, devido ao genótipo (Quadro 4). Interessante notar que a PPM foi mantida nos genótipos, com padrão de resposta divergente na maioria dos pares de genótipos (Quadro 5).

4.3.7. Porcentagem do parênquima paliçádico em relação à folha total (PPF)

Nas análises individuais (Quadro 2), houve quadrados médios não significativos. Os coeficientes de variação ambiental (CVa) tiveram média de 4,66, indicando baixa magnitude de plasticidade (CVa<10) (Quadro 3). A média entre as características foi detectada ($Ia^2 = 0,3347$) e considerada baixa (Quadro 4). Os genótipos de maiores valores de CVa são os maiores de Ia^2 . A PPF foi mantida com controle gênico e o padrão de resposta diverge na maioria dos pares de genótipos (Quadro 5).

4.3.8. Porcentagem do parênquima lacunoso em relação à folha total (PLF)

Nas análises individuais o quadrado médio foi significativo apenas no genótipo 1150 (Quadro 2). Os coeficientes de variação ambiental (CVa) com valores baixos (CVa<10) e média de 4,58 indicam baixa magnitude de plasticidade (Quadro 3). A média detectada ($Ia^2 = 0,4209$) demonstra que cerca de 42% da variação dessa característica é devida à altitude (Quadro 4). O genótipo 1150 teve maiores valores de CVa e de Ia^2 . O PLF é controlado geneticamente nos genótipos, com padrão de resposta divergente nos pares de genótipos (Quadro 5).

4.3.9. Porcentagem da epiderme em relação à folha total (EPF).

Nas análises individuais o quadrado médio foi significativo apenas no genótipo 1150 (Quadro 2). Os coeficientes de variação ambiental (CVa) tiveram valores médios (CVa = 15,20) a baixos (CVa = 3,57), com média de 8,82, indicando baixa magnitude de plasticidade (Quadro 3). As estimativas negativas foram desconsideradas e correspondem aos genótipos obtidos nas altitudes de 450 e 475 m e demonstraram que a variação é devida ao genótipo e não à altitude (Quadro 4). Houve mesma direção no padrão de resposta da maioria dos pares de genótipos, demonstrando divergência de resposta (Quadro 5).

4.4. Coeficiente de coincidência (CCo)

Ao longo do crescimento e desenvolvimento da folha as regiões meristemáticas expressam atividade gênica diferenciada, com expressão do caráter influenciada pela altitude em cada tecido formado.

As características anatômicas são expressas ao longo do crescimento e desenvolvimento dos tecidos foliares vegetais. Devido a isso, a coincidência pode ser mais evidenciada em um tecido do que em outro. Essa coincidência foi quantificada com base nas médias contidas nos Quadros 6, onde os retângulos delimitam as maiores ou menores médias que coincidem com as altitudes de coleta dos genótipos, sendo os valores dos CCo mostrados no Quadro 7.

Quadro 5 - Matrizes contendo os coeficientes de correlação de Pearson dos caracteres de espessura do parênquima paliçádico (PP), do parênquima lacunoso (PL), do mesofilo (MESO), das epidermes (EP), da espessura foliar total (EF) e porcentagem do parênquima paliçádico em relação ao mesofilo (PPM) e do parênquima paliçádico (PPF), parênquima lacunoso (PLF) e epiderme em relação à folha total (EPF), em plantas senescentes de seis genótipos de *Bidens pilosa* L. cultivados em quatro altitudes

Genótipos	Caráter PP					Caráter PL					Caráter MESO				
	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150
210	-	0,6297*	0,2687 ^{ns}	-	0,1812 ^{ns}	0,3557 ^{ns}	0,5723*	0,3459 ^{ns}	0,5531*	0,3344 ^{ns}	0,0846 ^{ns}	0,6984*	0,4114 ^{ns}	0,3573 ^{ns}	0,3276 ^{ns}
	0,2927 ^{ns}			0,0333 ^{ns}											
450		0,1367 ^{ns}	0,4270*	0,3283 ^{ns}	0,2503 ^{ns}		0,2739 ^{ns}	0,7019*	0,4391*	0,5360*		0,2515 ^{ns}	0,6593*	0,4192 ^{ns}	0,4224 ^{ns}
475			0,5764*	0,3735 ^{ns}	0,5751*			0,4262*	0,5197*	0,4160 ^{ns}			0,5624*	0,4451*	0,5635*
675				0,4040 ^{ns}	0,5041*				0,6643*	0,5216*				0,6400*	0,5339*
950					0,4947*					0,3741 ^{ns}					0,5048*

Genótipos	Caráter EP					Caráter EF					Caráter PPM				
	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150
210	0,3219 ^{ns}	0,5906*	-	0,4983*	0,0118 ^{ns}	0,1532 ^{ns}	0,6908*	0,4099 ^{ns}	0,3927 ^{ns}	0,3259 ^{ns}	0,4790*	-	-	0,1734 ^{ns}	0,0611 ^{ns}
			0,0710 ^{ns}									0,1676 ^{ns}	0,2966 ^{ns}		
450		0,1265 ^{ns}	0,3386 ^{ns}	0,1330 ^{ns}	0,2545 ^{ns}		0,2511 ^{ns}	0,6530*	0,3923 ^{ns}	0,4141 ^{ns}		-	-	0,2473 ^{ns}	0,3146 ^{ns}
												0,1289 ^{ns}	0,2568 ^{ns}		
475			0,0444 ^{ns}	0,6225*	0,0295 ^{ns}			0,5314*	0,4697*	0,5548*			-	0,4738*	-
													0,2988 ^{ns}		0,4724*
675				0,3908 ^{ns}	0,4318*				0,6534*	0,5433*				-	0,2724 ^{ns}
														0,3214 ^{ns}	
950					0,1634 ^{ns}					0,5338*					-
															0,1620 ^{ns}

Genótipos	Caráter PPF					Caráter PLF					Caráter EPF				
	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150	450	475	675	950	1150
210	0,2858 ^{ns}	-	-	0,0986 ^{ns}	-	0,5889*	0,0405 ^{ns}	-	0,3049 ^{ns}	0,1860 ^{ns}	-	0,6645*	0,1061 ^{ns}	0,2409 ^{ns}	0,2023 ^{ns}
		0,0824 ^{ns}	0,4171 ^{ns}		0,0555 ^{ns}			0,0918 ^{ns}			0,1144 ^{ns}				
450		-	-	0,1790 ^{ns}	0,2675 ^{ns}		0,2779 ^{ns}	0,0807 ^{ns}	0,3063 ^{ns}	0,4181 ^{ns}		0,0328 ^{ns}	0,1306 ^{ns}	0,2123 ^{ns}	0,4945*
		0,4150 ^{ns}	0,4161 ^{ns}												
475			-	0,4572*	-			-	0,3985 ^{ns}	-			0,5241*	0,2924 ^{ns}	0,3412 ^{ns}
			0,0679 ^{ns}		0,3648 ^{ns}			0,2578 ^{ns}		0,1233 ^{ns}					
675				-	0,2090 ^{ns}				-	0,3681 ^{ns}				0,1787 ^{ns}	0,4249 ^{ns}
				0,2792 ^{ns}					0,2389 ^{ns}						
950					-					-					0,1105 ^{ns}
					0,1630 ^{ns}					0,0714 ^{ns}					

* = Significativo a 5% de probabilidade; ns = não significativo, pelo teste T.

A adaptação dos genótipos às altitudes onde foram coletados foi medida pelo CCo e varia de 0 a 100%. Como, na média dos seis genótipos, o CCo foi 50,00, evidenciou-se adaptação intermediária (CCo de 25 a 75%) dos genótipos às altitudes de origem (Quadro 7). Nota-se, no Quadro 7, dois genótipos com baixa adaptação (CCo de 0 a 25%), genótipos 450 e 675, dois com adaptação intermediária (CCo de 25 a 75%), genótipos 210 e 475, e dois com alta adaptação (CCo de 75 a 100%), genótipos 950 e 1150.

As médias dos genótipos 210 e 475 tiveram valores não significativos em todos os caracteres (Quadro 6). Apesar disso, a resposta foi coincidente nestes genótipos. A maior coincidência foi no genótipo 1150 (CCo = 88,89). Nos genótipos das maiores altitudes (genótipos 950 e 1150) a coincidência foi pela maior média na altitude 962 m, enquanto que o genótipo da menor altitude (genótipo 210), a coincidência foi pela menor média na altitude 198 m (Quadro 7). A variação nos tecidos foliares reflete a interação do genótipo com a altitude e demonstra que as folhas, bem como seus tecidos constituintes, são plásticas, o que a capacita a tirar proveito dos *habitats* (CUTTER, 1986; GUREVITCH, 1988).

4.5. Dados climáticos

Houve diminuição da pressão atmosférica com o aumento da altitude (Quadro 8), visto que ao nível do mar a pressão é 760 mm de mercúrio (Hg) (AYOADE, 1998).

Os valores de umidade relativa do ar diminuíram aproximadamente 20%, com o aumento da altitude (Quadro 8). A umidade relativa do ar pode variar entre as estações do ano e até mesmo durante o dia, nas mesmas altitudes.

Os valores de radiação solar incidente aumentaram com a altitude (Quadro 8). Segundo AYOADE (1998), em altitudes elevadas, com céu claro, há maior radiação solar que nos lugares próximos ao nível do mar, nas mesmas condições. Isso se deve à menor interferência da massa de ar sobre a radiação solar nas altitudes elevadas. Nos locais dos experimentos as plantas ficaram expostas à radiação solar direta e as plantas de *Bidens pilosa* do experimento e as nativas estavam exuberantes.

Quadro 6 - Médias dos caracteres de espessura do parênquima paliçádico (PP), do parênquima lacunoso (PL), do mesofilo (MESO), das epidermes (EP), da espessura foliar total (EF) e porcentagem do parênquima paliçádico em relação ao mesofilo (PPM) e do parênquima paliçádico (PPF), parênquima lacunoso (PLF) e epiderme em relação à folha total (EPF), em plantas senescentes de seis genótipos de *Bidens pilosa* L. cultivados em quatro altitudes

Genótipo	Altitude de cultivo	Características*								
		PP	PL	MESO	EP	EF	PPM	PPF	PLF	EPF
210	198	87,58A	78,71A	166,29A	32,78 ^A	199,07A	52,97A	44,21A	39,25A	16,54A
	479	102,65A	99,42A	202,07A	30,91 ^A	232,98A	51,19A	44,29A	42,33A	13,38A
	739	94,41A	83,90A	178,31A	30,05 ^A	208,36A	53,15A	45,41A	40,15A	14,44A
	962	96,01A	102,91A	198,92A	35,41A	234,33A	48,31A	41,02A	43,86A	15,13A
450	198	65,69A	57,83B	123,52A	26,31A	149,83A	53,10A	43,73A	38,57B	17,70A
	479	73,58A	77,53AB	151,11A	31,75A	182,86A	48,95A	40,45A	42,21AB	17,34A
	739	63,36A	64,62AB	127,98A	25,86A	153,84A	49,61A	41,18A	41,88AB	16,94A
	962	79,35A	85,21A	164,55A	31,99A	196,54A	48,17A	40,33A	43,39A	16,28A
475	198	56,91A	56,81A	113,73A	26,39A	140,12A	49,94A	40,38A	40,51A	19,11A
	479	63,94A	77,53A	141,47A	30,46A	171,93A	45,36A	37,18A	44,95A	18,22A
	739	59,06A	68,76A	127,82A	27,75A	155,57A	46,37A	37,95A	43,83A	17,86A
	962	73,57A	77,46A	151,03A	29,67A	180,69A	49,02A	40,85A	42,50A	16,65A
675	198	55,49A	57,63B	113,12A	28,24A	141,36A	49,19A	39,17A	40,47A	20,36A
	479	74,18A	73,81AB	147,99A	27,99A	175,99A	50,05A	42,10A	41,95A	15,95A
	739	60,66A	64,44AB	125,10A	27,67A	152,77A	48,54A	39,60A	41,95A	18,45A
	962	76,07A	83,34A	159,41A	32,53A	191,94A	47,88A	39,81A	43,39A	16,80A
950	198	60,71B	57,11B	117,83B	24,86B	142,69B	51,33A	42,39A	40,04A	17,57A
	479	70,10B	72,79AB	142,89B	27,88AB	170,77B	49,17A	41,16A	42,52A	16,32A
	739	57,17B	63,90B	121,07B	25,83AB	146,90B	47,31A	38,94A	43,38A	17,68A
	962	94,06A	90,83A	184,89A	31,35A	216,24A	50,90A	43,49A	41,92A	14,59A
1150	198	69,02AB	60,38BC	129,40AB	26,36B	155,76B	53,31A	44,18A	38,66B	17,16AB
	479	73,06AB	64,80B	137,86A	25,65B	163,51AB	52,89A	44,64A	39,69B	15,68B
	739	46,18B	46,49C	92,66B	24,46B	117,12B	49,23A	38,85A	39,93AB	21,22A
	962	80,87A	90,39A	171,26A	31,24A	202,50A	46,76A	39,58A	44,86A	15,56B

As médias seguidas de uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

*Os valores de PP, PL, MESO, EP e EF são médias, em μm , de quatro repetições. Os retângulos delimitam as maiores ou menores médias que coincidem com as altitudes de coleta dos genótipos.

Quadro 7 - Estimativas dos coeficientes de coincidência (CCo) dos caracteres de anatómicos foliares de seis genótipos de *Bidens pilosa* L. cultivados em quatro altitudes

	Genótipos						Média
	210	450	475	675	950	1150	
CCo	66,67	0,00	55,56	11,11	77,78	88,89	50,00

Quadro 8 - Resumo dos dados climáticos dos locais de crescimento dos seis genótipos de *Bidens pilosa* L. Itamarati de Minas-Astolfo Dutra, MG - Brasil. Ago-Out/2000

Altitude ⁽¹⁾ (m)	Pressão atmosférica ⁽²⁾ (mm Hg)	Umidade relativa do ar ⁽²⁾ (%)	Radiação solar ⁽³⁾ (Quilolux)
198	750,5	55	81,649
479	725,5	49	108,869
739	703,9	47	119,196
962	685,4	46	128,487

Média de dados de quatro medições realizadas com: ⁽¹⁾GPS 2000 XL (Magellan), ⁽²⁾Weather Monitor II (Davis Instruments Corp.) e ⁽³⁾Lutron LX-101 Digital Luximeter (Lutron).

Foi feita, ainda, a determinação da porcentagem de luz refletida sobre a lona plástica em relação à luz solar direta, sendo em média 4,15, 4,24, 4,45 e 4,56%, respectivamente nas altitudes 198, 479, 739 e 962 m.

4.6. Correlação entre dados climáticos e características anatômicas

No Quadro 8 encontram-se resumidos os dados climáticos dos quatro locais onde cresceram as plantas. Esses dados refletem o microclima das altitudes 198, 479, 739 e 962 m.

Os valores das correlações entre os dados climáticos e os caracteres dos seis genótipos encontram-se no Quadro 9. O aumento da pressão atmosférica e da umidade relativa do ar e a diminuição da luminosidade promovem a diminuição da espessura dos tecidos foliares, sendo o parênquima lacunoso o mais afetado.

Na porcentagem do parênquima paliçádico no mesofilo (PPM) e na folha (PPF) a correlação foi positiva e alta com a pressão atmosférica e a umidade relativa do ar, porém negativa com a luminosidade nos genótipos 210, 450 e 1150 (Quadro 9).

A porcentagem da epiderme na folha (EPF) aumenta com a diminuição da luminosidade e com o aumento da pressão atmosférica assim como da umidade relativa do ar, exceto no genótipo 1150. No genótipo 450 o aumento de luminosidade corresponde ao aumento da EPF (Quadro 9).

A espessura da folha total (EF) (Quadro 6) e a radiação solar (Quadro 8) aumentam com a altitude. Segundo WHATLEY e WHATLEY (1982), quanto maior a intensidade luminosa maior a espessura foliar, confirmando que a folha tem plasticidade fenotípica que pode ser detectada anatomicamente.

4.7. Influência da altitude na espessura dos tecidos foliares

Na maior altitude (962 m) há maior espessura dos tecidos foliares (PP, PL, MESO, EP) (Quadro 10). A espessura desses podem se modificar com a intensidade da radiação solar pois, com o aumento da altitude, aumenta a radiação solar e os tecidos foliares das plantas crescidas nessas condições são mais desenvolvidos (FAILS et al., 1982). A capacidade de alterar a estrutura das folhas em resposta à radiação solar é comum em espécies de amplo potencial de plasticidade fenotípica (GUREVITCH, 1988; VOLTAN et al., 1992).

A menor altitude favoreceu a produção percentual de parênquima paliçádico (PPM e PPF) e de epiderme (EPF). A maior porcentagem de parênquima paliçádico no mesofilo (PPM), confere, provavelmente, maior potencial fotossintético. Segundo FAHN (1990), o paliçádico é o parênquima fotossintético altamente especializado, geralmente, com mais cloroplastos que o parênquima lacunoso. A epiderme também pode ter alterações relacionadas a variações na intensidade luminosa. Segundo VOLTAN et al. (1992), de modo geral, nos cultivares de café avaliados, as epidermes abaxial e adaxial foram mais espessas nas plantas submetidas à menor intensidade luminosa.

Quadro 9 - Correlação entre as médias dos dados climáticos e dos caracteres de espessura do parênquima paliçádico (PP), do parênquima lacunoso (PL), do mesofilo (MESO), das epidermes (EP), da espessura foliar total (EF) e porcentagem do parênquima paliçádico em relação ao mesofilo (PPM) e do parênquima paliçádico (PPF), parênquima lacunoso (PLF) e epiderme em relação à folha total (EPF), em plantas senescentes de seis genótipos de *Bidens pilosa* L. cultivados em quatro altitudes

Caracteres	Genótipo 210			Genótipo 450			Genótipo 475		
	Pressão	UR	Luz	Pressão	UR	Luz	Pressão	UR	Luz
PP	-0,3975 ^{ns}	-0,6215 ^{ns}	0,5722 ^{ns}	-0,5188 ^{ns}	-0,4627 ^{ns}	0,5169 ^{ns}	-0,7653 ^{ns}	-0,6779 ^{ns}	0,7363 ^{ns}
PL	-0,6299 ^{ns}	-0,6725 ^{ns}	0,6926 ^{ns}	-0,7209 ^{ns}	-0,7305 ^{ns}	0,7597 ^{ns}	-0,7238 ^{ns}	-0,8372 ^{ns}	0,8270 ^{ns}
MESO	-0,5782 ^{ns}	-0,6888 ^{ns}	0,6848 ^{ns}	-0,6556 ^{ns}	-0,6405 ^{ns}	0,6796 ^{ns}	-0,7841 ^{ns}	-0,8126 ^{ns}	0,8330 ^{ns}
EP	-0,3225 ^{ns}	-0,0668 ^{ns}	0,1709 ^{ns}	-0,4263 ^{ns}	-0,4646 ^{ns}	0,4893 ^{ns}	-0,5206 ^{ns}	-0,6598 ^{ns}	0,6456 ^{ns}
EF	-0,6001 ^{ns}	-0,6724 ^{ns}	0,6825 ^{ns}	-0,6254 ^{ns}	-0,6180 ^{ns}	0,6553 ^{ns}	-0,7635 ^{ns}	-0,8036 ^{ns}	0,8206 ^{ns}
PPM	0,6644 ^{ns}	0,5591 ^{ns}	-0,6252 ^{ns}	0,8605 ^{ns}	0,9466*	-0,9391*	0,1693 ^{ns}	0,4657 ^{ns}	-0,3713 ^{ns}
PPF	0,5312 ^{ns}	0,3349 ^{ns}	-0,4260 ^{ns}	0,7995 ^{ns}	0,9188*	-0,9009*	-0,0897 ^{ns}	0,2185 ^{ns}	-0,1137 ^{ns}
PLF	-0,7129 ^{ns}	-0,7033 ^{ns}	0,7392 ^{ns}	-0,9008*	-0,9613*	0,9614*	-0,3862 ^{ns}	-0,6519 ^{ns}	0,5751 ^{ns}
EPF	0,3663 ^{ns}	0,6315 ^{ns}	-0,5579 ^{ns}	0,9771*	0,8718 ^{ns}	0,9190*	0,8824 ^{ns}	0,8368 ^{ns}	-0,8775 ^{ns}

* = Significativo a 5% de probabilidade; ns = não significativo, pelo teste T.

Quadro 9 - Cont.

Caracteres	Genótipo 675			Genótipo 950			Genótipo 1150		
	Pressão	UR	Luz	Pressão	UR	Luz	Pressão	UR	Luz
PP	-0,6225 ^{ns}	-0,6813 ^{ns}	0,6958 ^{ns}	-0,6440 ^{ns}	-0,5113 ^{ns}	0,5852 ^{ns}	-0,0361 ^{ns}	0,0660 ^{ns}	0,0013 ^{ns}
PL	-0,7754 ^{ns}	-0,7599 ^{ns}	0,7958 ^{ns}	-0,7997 ^{ns}	-0,7292 ^{ns}	0,7814 ^{ns}	-0,4633 ^{ns}	-0,3041 ^{ns}	0,3874 ^{ns}
MESO	-0,7100 ^{ns}	-0,7300 ^{ns}	0,7559 ^{ns}	-0,7245 ^{ns}	-0,6198 ^{ns}	0,6843 ^{ns}	-0,2797 ^{ns}	-0,1421 ^{ns}	0,2205 ^{ns}
EP	-0,6624 ^{ns}	-0,4547 ^{ns}	0,5452 ^{ns}	-0,7657 ^{ns}	-0,6920 ^{ns}	0,7464 ^{ns}	-0,5331 ^{ns}	-0,3161 ^{ns}	0,4114 ^{ns}
EF	-0,7244 ^{ns}	-0,7220 ^{ns}	0,7552 ^{ns}	-0,7284 ^{ns}	-0,6263 ^{ns}	0,6899 ^{ns}	-0,3034 ^{ns}	-0,1580 ^{ns}	0,2384 ^{ns}
PPM	0,7267 ^{ns}	0,4945 ^{ns}	-0,5655 ^{ns}	0,2804 ^{ns}	0,4945 ^{ns}	-0,4071 ^{ns}	0,9494*	0,8100 ^{ns}	-0,8602 ^{ns}
PPF	0,0147 ^{ns}	-0,2391 ^{ns}	0,1799 ^{ns}	-0,0153 ^{ns}	0,1901 ^{ns}	-0,0975 ^{ns}	0,8367 ^{ns}	0,7347 ^{ns}	-0,7568 ^{ns}
PLF	-0,9469*	-0,9145*	0,9462*	-0,6447 ^{ns}	-0,8317 ^{ns}	0,7684 ^{ns}	-0,8486 ^{ns}	-0,6938 ^{ns}	0,7655 ^{ns}
EPF	0,5704 ^{ns}	0,7214 ^{ns}	-0,7009 ^{ns}	0,6548 ^{ns}	0,5599 ^{ns}	-0,6233 ^{ns}	-0,0656 ^{ns}	-0,1115 ^{ns}	0,0615 ^{ns}

* = Significativo a 5% de probabilidade; ns = não significativo, pelo teste T.

Quadro 10 - Médias dos caracteres de espessura do parênquima paliçádico (PP), do parênquima lacunoso (PL), do mesofilo (MESO), das epidermes (EP), da espessura foliar total (EF) e porcentagem do parênquima paliçádico em relação ao mesofilo (PPM) e do parênquima paliçádico (PPF), parênquima lacunoso (PLF) e epiderme em relação à folha total (EPF), em plantas senescentes de seis genótipos de *Bidens pilosa* L. cultivados em quatro altitudes

Altitude	Características*								
	PP	PL	MESO	EP	EF	PPM	PPF	PLF	EPF
198 m	65,90C	61,41C	127,31C	27,49BC	154,80C	51,64A	42,34A	39,58B	18,07A
479 m	76,25B	77,65B	153,90B	29,10B	183,00B	49,60B	41,64AB	42,27A	16,09B
739 m	63,48C	65,35C	128,82C	26,94C	155,76C	49,03B	40,32B	41,85A	17,83A
962 m	83,32A	88,36A	171,68A	32,03A	203,71A	48,51B	40,85AB	43,32A	15,83B

As médias seguidas de uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

*Os valores de PP, PL, MESO, EP e EF são médias, em μm , de quatro repetições.

A tendência de aumento percentual do parênquima lacunoso com o aumento da altitude (Quadro 10) pode estar relacionada à diminuição da concentração de CO_2 nas altitudes. Com a diminuição da concentração de CO_2 atmosférico, ocorrida pelo aumento da altitude, e a diminuição da pressão atmosférica, que favorece as trocas gasosas (PENNING DE VRIES, 1989; JONES, 1994), a folha responde plasticamente com o aumento do parênquima paliçádico, por nele estar contido as câmaras subestomáticas destinadas a recepção e disponibilização do CO_2 do parênquima paliçádico ao parênquima lacunoso (TAIZ e ZEIGER, 1991).

5. RESUMO E CONCLUSÕES

A espessura dos tecidos foliares de *Bidens pilosa* em microscopia de luz foi determinada em analisador de imagens e subsidiaram o estudo da plasticidade fenotípica.

Tendo em vista que a folha é o órgão mais plástico da planta, sendo responsável pela síntese de compostos úteis ao crescimento vegetal e ao homem, como medicinal, foi estudada a anatomia foliar de *Bidens pilosa*, enfatizando a espessura dos tecidos, em genótipos crescidos em quatro altitudes.

Os genótipos utilizados foram provenientes de seis altitudes (210, 450, 475, 675, 950 e 1.150 m), propagados por cultura de tecidos e os clones crescidos em vasos em quatro altitudes, em mesmo solo, irrigação e delineamento. A distância entre as altitudes de condução do experimento era inferior a 10 km.

As análises de cada genótipo em cada altitude foram feitas em folhas de oito plantas, sendo quatro repetições com duas plantas por parcela. Ao considerar os seis genótipos e as quatro altitudes, totalizam 48 plantas por altitude e 192 nas quatro altitudes, sendo essas conduzidas na mesma época.

A anatomia foliar foi semelhante com uma camada de células na epiderme superior, inferior e parênquima paliádico e três a cinco camadas de parênquima lacunoso.

Os resultados permitiram as seguintes conclusões:

- 1) Pelos estimadores da plasticidade as altitudes influenciam a resposta anatômica e cada genótipo respondeu de modo distinto às variações da altitude;

- 2) Pelo CCo os caracteres anatômicos coincidiram em 50%, com a resposta à altitude semelhante à de coleta, indicando adaptação intermediária entre os genótipos e suas respectivas altitudes de origem;
- 3) A magnitude e o padrão de plasticidade foram específicos em cada genótipo.
- 4) Estimou-se, pelo Ia^2 , que cerca de 60% da variação anatômica foi devido ao efeito da altitude;
- 5) O aumento da pressão atmosférica e da umidade relativa e a diminuição da luminosidade promovem a diminuição da espessura dos tecidos foliares, sendo o parênquima lacunoso o mais afetado;
- 6) Na maior altitude (962 m) houve maior espessura dos tecidos foliares;
- 7) A menor altitude favoreceu a produção percentual de parênquima paliçádico e de epiderme.

Conclui-se que a altitude influencia na plasticidade fenotípica cujo estudo em plantas medicinais é importante na seleção de genótipos, que possuem ampla variabilidade anatômica que possibilite inferir o valor adaptativo do caráter a ser selecionado.

CONCLUSÕES GERAIS

Pelos resultados das análises dos sistemas isozimáticos ACP, α -EST, β -EST, GOT, PO, SKDH e SOD utilizados na caracterização e nas estimativas de distância genética entre 46 indivíduos de *Bidens pilosa*, coletados em nove altitudes (210, 450, 475, 675, 795, 800, 875, 950 e 1.150 m), conclui-se:

- 1) Os sete sistemas testados foram polimórficos;
- 2) As variações ocorreram entre acessos e entre indivíduos do mesmo acesso;
- 3) A variabilidade detectada permitiu separar indivíduos de todos os acessos em padrões individuais;
- 4) O sistema α -EST foi o que melhor separou os acessos;
- 5) O sistema PO revelou maior variação entre os indivíduos de mesmo acesso;
- 6) O Método de Otimização de Tocher permitiu a formação de dez grupos: os grupos I e VI, respectivamente com indivíduos dos acessos 210 e 795; os grupos IV e VII, com indivíduos de mesmo acesso; os grupos II, III e V, com indivíduos de dois ou mais acessos e os grupos VIII, IX e X, com um indivíduo cada.

Pelos resultados da micropropagação, da influência de cinco níveis de BAP (0,0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mg L⁻¹) na multibrotação e da aclimação de clones de seis genótipos (coletados nas altitudes 210, 450, 475, 675, 950 e 1.150 m) selecionados por meio de análises isozimáticas, conclui-se:

- 7) A micropropagação de *Bidens pilosa* é viável, pois seu desenvolvimento é eficiente mesmo em meio básico MS sem adição de reguladores de crescimento;

- 8) Com ou sem BAP há multibrotamento dos explantes;
- 9) BAP causou efeito inibitório na formação das raízes e provocou formação de calo na extremidade do explante em contato com o meio, indicando efeito tóxico de BAP nas concentrações utilizadas;
- 10) Em meio MS sem BAP, os genótipos analisados tiveram comportamentos diferenciados quanto ao número de brotos e à altura média do caule, fatores diretamente relacionados ao número de explantes de cada subcultivo;
- 11) O método de aclimação feito em três fases: fase 1 com substrato líquido (água), fase 2 e fase 3 com substratos sólidos, respectivamente areia e terra:areia:húmus:esterco (proporção 6:2:1:1) foi eficiente, obtendo-se plântulas suficientes.

Pelos resultados da plasticidade fenotípica, estimada em magnitude, pelo coeficiente de variação ambiental (CVa) e pelo índice de determinação ambiental (Ia^2), e em padrão de resposta, e do coeficiente de coincidência (CCo), que estima o grau de adaptação entre as altitudes de origem dos genótipos (210, 450, 475, 675, 950 e 1.150 m) e as altitudes de cultivo (198, 479, 739 e 962 m), caracteres morfométricos de plantas crescidas em quatro altitudes e colhidas em quatro estádios reprodutivos (florescimento, início de frutificação, frutificação plena e senescência), conclui-se:

- 12) A altitude influencia os caracteres morfométricos de *Bidens pilosa*;
- 13) A mesma característica nos genótipos pode variar em função da altitude e do estágio reprodutivo, demonstrando plasticidade fenotípica espacial (altitude) e temporal (estádio). Os mesmos pares de genótipos são afetados em suas características pela altitude de maneira particular nos estádios reprodutivos em cada genótipo;
- 14) A magnitude e o padrão de plasticidade foram específicos em cada genótipo, podendo diferir entre os estádios reprodutivos e estimou-se que cerca de 83% da variação foi devido ao efeito da altitude;
- 15) Na verificação do grau de adaptação dos genótipos às suas altitudes de coleta, utilizando-se o CCo, determinou-se que os caracteres coincidiram em cerca de 53% com a resposta à altitude semelhante à de coleta, significando adaptação intermediária à respectiva altitude de origem;

- 16) A folha foi o órgão adaptativo mais plástico, tendo o número de folhas o maior CCo e a massa seca foliar, o menor;
- 17) Os valores de SPAD (SP), que mede a quantidade relativa de clorofila, foram crescentes, de acordo com o aumento da altitude, e decrescentes, de acordo com o estágio reprodutivo;
- 18) Os efeitos da plasticidade foram relevantes com relação ao número de folhas em 1 grama e à área foliar, bem como ao número de folhas por planta, significando que importa a altitude de cultivo e o estágio reprodutivo da planta a ser utilizado nos preparados medicinais e considerar esses parâmetros quando da seleção dos melhores genótipos.

Pelos resultados da plasticidade fenotípica, estimada em magnitude e em padrão de resposta e em coeficiente de coincidência (CCo), dos caracteres de fitofármacos (ácido clorogênico e ácido caféico) de plantas crescidas em quatro altitudes e colhidas em quatro estádios reprodutivos e a correlação entre os caracteres e os dados climáticos de cada altitude, conclui-se:

- 19) *Bidens pilosa* possui plasticidade fenotípica passível de ser detectada quimicamente;
- 20) A folha é o órgão que possui maior quantidade de ácido clorogênico e caféico por grama de matéria seca;
- 21) Pelos estimadores da plasticidade as altitudes influenciam a produção dos fitofármacos e cada genótipo apresentou resposta de acordo com a altitude;
- 22) A magnitude e o padrão de plasticidade foram específicos em cada genótipo, podendo diferir dentro do mesmo genótipo em função do estágio reprodutivo;
- 23) Pelo CCo, os caracteres coincidiram em cerca de 45% com a resposta à altitude semelhante à de coleta, revelando adaptação intermediária dos genótipos às altitudes de origem;
- 24) O ácido clorogênico e o ácido caféico têm correlação negativa com a temperatura e a evaporação e positiva com a pluviosidade;
- 25) Há diferença de produção desses compostos nos estádios de desenvolvimento da planta, sendo o estágio de início de frutificação o melhor;
- 26) Na maior altitude a produção conjunta desses compostos é maior.

Pelos resultados da plasticidade fenotípica, estimada em magnitude (Ia^2) e em padrão de resposta e em coeficiente de coincidência (CCo), dos caracteres anatômicos foliares de plantas crescidas em quatro altitudes e colhidas em quatro estádios reprodutivos e a correlação entre esses caracteres e os dados climáticos de cada altitude, conclui-se:

- 27) Pelos estimadores da plasticidade as altitudes influenciam a resposta anatômica e cada genótipo respondeu de modo distinto às variações da altitude;
- 28) Pelo CCo os caracteres anatômicos coincidiram em 50%, com a resposta à altitude semelhante à de coleta, indicando adaptação intermediária entre os genótipos e suas respectivas altitudes de origem;
- 29) A magnitude e o padrão de plasticidade foram específicos em cada genótipo. Estimou-se, pelo Ia^2 , que cerca de 60% da variação anatômica foi devido ao efeito da altitude;
- 30) O aumento da pressão atmosférica e da umidade relativa e a diminuição da luminosidade promovem a diminuição da espessura dos tecidos foliares, sendo o parênquima lacunoso o mais afetado;
- 31) Na maior altitude (962 m) houve maior espessura dos tecidos foliares;
- 32) A menor altitude favoreceu a produção percentual de parênquima paliádico e de epiderme;

Conclui-se, ainda, que a altitude influencia na plasticidade fenotípica cujo estudo em plantas medicinais é importante na seleção de genótipos, que possuem ampla variabilidade genética, morfológica, de fitofármacos e anatômica que possibilite inferir o valor adaptativo do caráter a ser selecionado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAH, P.A., EKEKWE, R.K. Ethnopharmacology of some Asteraceae family used in Nigerian traditional medicine. **Fitoterapia**, v.66, n.4, p.351-355, 1995.
- ALFENAS, A.C., PETERS, I., BRUNE, W., PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa, MG: UFV, 1991. 242p.
- ALFENAS, A.C. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa, MG: UFV, 1998. 574p.
- AMARAL, C.L.F., CASALI, V.W.D. Identificação e caracterização de populações de alfavaca (*Ocimum selloi* Benth.) por meio de marcadores isoenzimáticos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.2, n.2, p.9-15, 2000.
- ANDRADE, M.W., LUZ, J.M.Q., LACERDA, A.S., MELO, P.R.A. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência e Agrotecnologia**, v.24, n.1, p.174-180, 2000.
- ARIMURA, C.T. **Propagação *in vitro* de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) por meio de segmentos nodais estiolados**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 59p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- ATISSO, M.A. As plantas medicinais voltam a florescer. **O Correio da UNESCO**, v.7, n.9, p.7-8, 1979.
- AYOADE, J.O. 1998. **Introdução à climatologia para os trópicos**. 5ed. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 332p.
- BALBAA, S.I. Satisfying the requirements of medicinal plant cultivation. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SPICE AND MEDICINAL PLANTS, 3, 1982, Hamburg (Alemanha). **Acta Horticulturae**, v.132, p.75-84, 1983.
- BALLARD, R. *Bidens pilosa* complex (Asteraceae) in North and Central America. **American Journal of Botany**, v.73, n.10, p.1452-1465, 1986.

- BALLVÉ, R.M.L. **Marcadores isoenzímicos e biologia da reprodução de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni.** Campinas, SP: UNICAMP, 1992. 106p. Tese (Doutorado em Biologia) - Universidade Estadual de Campinas, 1992.
- BASTIDAS P., P.I., VILLEGAS P., J.C., MUÑOZ F., J.E. Contribucion al conocimiento de la papunga, *Bidens pilosa* L. **Acta Agronomica**, Palmira, v.39, n.3/4, p.182-196. 1989.
- BENHURA, M.A.N., CHITSIKU, I.C. The extractable β -carotene content of Guku (*Bidens pilosa*) leaves after cooking, drying and storage. **International Journal of Food Science and Technology**, v.32, p.495-500, 1997.
- BERLY, G.P., MITKSCHKE, J.P. **Botanical microtechnique and citochemistry.** Ames Iowa: The Iowa State University Press, 1976. 326p.
- BORÉM, A. **Melhoramento de plantas.** Viçosa (MG): UFV, 1997. 547p.
- BRADSHAW, A.D. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. **Advances in Genetics**, v.13, p.115-155, 1965.
- BRAGA, F.C. **Avaliação quantitativa de cardenólídeos de *Digitalis lanata* do cultivar experimental do maciço do Itatiaia, Minas Gerais e isolamento de cardenólídeos digitálicos por cromatografia em contracorrente de rotação locular (RLCC).** Belo Horizonte, MG: UFMG, 1997. 216p. Tese (Doutorado em Ciências - Química) - Universidade Federal de Minas Gerais, 1997.
- BRANDÃO, M.G.L., KRETTLI, A.U., SOARES, L.R.S., NERY, C.G.C., MARINUZZI, H.C. Antimalarial activity of extracts and fractions from *Bidens pilosa* and other *Bidens* species (Asteraceae) correlated with the presence of acetylene and flavonoid compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v.57, p.131-138, 1997.
- BREWER, G.L., SING, C.F. **An introduction to isozyme techniques.** New York: Academic Press, 1970. 186p.
- CAPOTE, S., ORTA, R., PÉREZ, E. Estrategia de reproducción de una mala hierba: *Bidens pilosa* L. **Revista del Jardín Botánico Nacional**, v.7, n.1, p.73-79, 1986.
- CARVALHO, J.C.T., GOSMANN, G., SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. (Orgs.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS / Ed. UFSC, 1999. p.433-449.
- CHATTERJEE, S.K., NANDI, R.P., SARMA, P., PANDA, P.K. Studies on developmental physiology of medicinally important steroid yielding plants growing in India. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SPICE AND MEDICINAL PLANTS, 3, 1982, Hamburg (Alemanha). **Acta Horticulturae**, v.132, p.85-100, 1983.
- CHUDA, Y., SUZUKI, M., NAGATA, T., TSUSHIDA, T. Contents and cooking loss of three quinic acid derivates from garland (*Chrysanthemum coronarium* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.1437-1439, 1998.

- CORRÊA JÚNIOR, C., MING, L.C., SCHEFFER, M.C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994, 151p.
- CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura-Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984. 6v.
- COUNTS, R.L. Phenotypic plasticity and genetic variability in annual *Zizania* spp. along a latitudinal gradient. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.71, n.1, p.145-154, 1993.
- CROCOMO, O.J. Biotechnological approaches for the control of plant morphogenesis and their applications in agriculture. **Genome**, v.31, n.2, p.1034-1041, 1989.
- CRUZ, C.D. **Aplicações de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas**. Piracicaba: ESALQ, USP, 1990. 188p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1990.
- CRUZ, C.D. **Programa GENES; aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 1997. 442p.
- CUTTER, E.G. **Anatomia vegetal**. Parte II. Órgãos - experimentos e interpretação. São Paulo: Roca, 1986. 336p.
- DAO, L., FRIEDMAN, M. Chlorogenic acid content of fresh and processed potatoes determined by ultraviolet spectrophotometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, p.2152-2156, 1992.
- DEL MORAL, R. On the variability of chlorogenic acid concentration. **Oecologia**, v.9, p.289-300, 1972.
- DIAS, L.A.S. Análises multidimensionais. In: ALFENAS, A.C. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa, MG: UFV, 1998. p.405-475.
- DIGGLE, P.K., LOWER, S., RANKER, T.A. Clonal diversity in alpine populations of *Polygonum viviparum* (Polygonaceae). **International Journal of Plant Science**, v.159, n.4, p.606-615, 1998.
- DIXON, R.A., PAIVA, N.L. Stress induced phenylpropanoid metabolism. **The Plant Cell**, v.7, p.1085-1097, 1995.
- ESCARPA, A., GONZÁLES, M.C. High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. **Journal of Chromatography A**, v.823, p.331-337, 1998.
- FAHN, A. **Plant anatomy**. 4ed. New York: Pergamon Press, 1990. 588p.
- FAILS, B.S., LEWIS, A.J., BARDEN, J.A. Anatomy and morphology of sun and shade grown *Ficus benjamina*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.107, p.754-757, 1982.

- FELIPPE, G.M. Estudos de germinação, crescimento e floração de *Bidens pilosa* L. **Revista do Museu Paulista**, v.25, p.183-215, 1978.
- FEO, V. Uso di piante ad azione antiinfiammatoria nell'Alto Ucayali, Perú Orientale. **Fitoterapia**, v.62, n.6, p.481-494, 1991.
- FERREIRA, L.R., OLIVEIRA, M.D.X. de, PINTO, M.M. **Biologia de *Bidens pilosa* L.** Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, USP, 1995. 48p. (Monogr.).
- FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 2ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1996. p.15-53.
- FUENTES-GRANADOS, R.G., WIDRLECHNER, M.P., WILSON, L.A. Allozyme inheritance in Anise hyssop [*Agastache foeniculum* (Pursh) Kuntze (Lamiaceae)]. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.123, n.5, p.868-874, 1998.
- GAVILANES, M.L., BRANDÃO, M., CARDOSO, C. Levantamento das plantas daninhas utilizadas como medicinais, de uso popular. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 7, 1982, Belo Horizonte. **Oréades**, v.8, n.14/15, p.34-47, 1981-1982.
- GEORGE, E.F., SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture.** Eversley: Exegetics, 1984. 709p.
- GERMOSÉN-ROBINEAU, L.(Ed.) **Farmacopea vegetal Caribeña** 1.ed. Fort-de-France, Martinica: Ediciones Emile Désormeaux, 1996. 360p.
- GERSHENZON, J. Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. **Recent Advances in Phytochemistry**, v.18, p.273-321, 1984.
- GOMES, F.P. **A estatística moderna na pesquisa agropecuária.** 3ed. Piracicaba, SP: POTAFOS, 1987. 162p.
- GOMES, J.M. **SAEG.** Viçosa: CPD/UFV, 1992. 100p.
- GOTTLIEB, L.D. Gel electrophoresis: new approach to the study of evolution. **Bioscience**, v.21, n.18, p.939-944, 1971.
- GOTTLIEB, L.D. Conservation and duplication of isozyme in plants. **Science**, v.216, n.4544, p.373-379, 1982.
- GOTTLIEB, O.R., KAPLAN, M.A.C., BORIN, M.R.M.B. **Biodiversidade; um enfoque químico-biológico.** Rio de Janeiro: UFRJ, 1996. 268p.
- GRANDI, T.S.M., SIQUEIRA, D.M. Flora medicinal de Belo Horizonte. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 7, 1982, Belo Horizonte. **Oréades**, v.8, n.14/15, p.126-139, 1981-1982.
- GRATTAPAGLIA, D., MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S. (eds.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas.** Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. Parte II, p.99-169.

- GRIFFITHS, D.W., BAIN, H., DALE, M.F.B. Development of a rapid colorimetric method for the determination of chlorogenic acid in freeze-dried potato tubers. **Journal of the Science of Food Agriculture**, v.58, p.41-48, 1992.
- GUREVITCH, J. Variation in leaf dissection and leaf energy budgets among populations of *Achillea* from an altitudinal gradient. **American Journal Botany**, v.75, n.9, p.1298-1306, 1988.
- HADAC, E., HADACOVA, V. Contribución a la ecología de *Bidens pilosa* L. en Cuba. **Academia Científica de Cuba**; ser. biol. v.2, p.1-14, 1969.
- HARBORNE, J.B. Plant phenolics. In: BELL, E.A., CHARLWOOD, B.V. (Ed.) p.23-63 **Secondary plant products**. Berlin: Springer-Verlag. 1980. p.329-402. (Encyclopedia of plant physiology; new series, v.8).
- HARRIS, R.K., MAGGERTY, W.J. Assays for potentially anticarcinogenic phytochemicals in flaxseed. **Cereal Foods World**, v.38, n.3, p.147-151, 1993.
- HARTMANN, H.T., KESTER, D.E., DAVIES Jr., F.T. **Plant propagation principles and practices**. 5ed. New Jersey: Prentice-Hall International, 1990. 647p.
- HILDEBRANT, D.F., ORF, J.H., HYMOWITZ, T. Inheritance of an acid phosphatase and its linkage with the kunitz trypsin inhibitor in seed proteins of soybean. **Crop Science**, Madison, v.20, n.1, p.83-85, 1980.
- HOFFMANN, B., HÖLZL, J. A methylated chalcone glucoside from *Bidens pilosa*. **Phytochemistry**, v.27, n.11, p.3700-3701, 1988.
- IKUTA, A.R.Y. Estudos sobre propagação de marcela (*Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C., Compositae. In: MING, L.C., SCHEFFER, M.C., CORRÊA JÚNIOR, C., BARROS, I.B.I., MATTOS, J.K.A. **Plantas medicinais aromáticas e condimentares: avanços na pesquisa agrônômica**. Botucatu: UNESP, 1998. p.23-42, v.1.
- INGROUILLE, M. **Diversity and evolution of land plants**. London: Chapman & Hall, 1992. 340p.
- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: Mac Graw-Hill Book, 1940. 560p.
- JONES, H.G. **Plants and microclimate: a quantitative approach to environmental plant physiology**. 2ed. New York: Cambridge University Press, 1994. 428p.
- KAMADA, T. **Plasticidade fenotípica da morfologia e do óleo essencial em acessos de manjeriço (*Ocimum* spp.)**. Viçosa, MG: UFV, 1998. 59p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- KAMADA, T., CASALI, V.W.D., BARBOSA, L.C.A., FORTES, I.C.P., FINGER, F.L. Plasticidade fenotípica do óleo essencial em acessos de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.1, n.2, p.13-22, 1999.

- KIRSZENZAFT, S.L. **Desenvolvimento vegetativo de *Bidens pilosa* L.:** fotoperíodo, temperatura e substâncias reguladoras de crescimento. São Paulo: Escola Paulista de Medicina, 1975. 134p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) - Universidade de São Paulo, 1975.
- KLINAR, S.B., CASTILLO P.R., CHANG A.C., SCHMEDA-HIRSCHMANN, G., REYES, S., THEODULOZ, C., RAZMILIC, I.B. Biological activity of medicinal plants of Ica (Perú). **Fitoterapia**, v.66, n.4, p.341-345, 1995.
- KOPTUR, S. Alternative defences against herbivores in *Inga* (Fabaceae: Mimosoideae) over an elevational gradient. **Ecology**, v.66, p.1639-1650, 1985.
- LI, Y., CRAKER, L.E., POTTER, T. Effect of light on essential oil production of sage (*Salvia officinalis*) and thyme (*Thymus vulgaris*). **Acta Horticulturae**, v.426, p.419-426, 1996.
- LOPES, R.C. **Caracterização isozimática, diversidade genética e produção de óleo essencial em acessos de *Polygonum punctatum* Ell.** Viçosa, MG: UFV, 1997. 88p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas no Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais.** São Paulo, Nova Odessa, 1982. 868 p.
- LOWE, K.C. DAVEY, M.R., POWER, J.B. Plant tissue culture: past, present and future. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v.2, n.4, p.175-186, 1996.
- LUCCHETTI, L., SILVA, A.J.R. Caracterização de novos poliacetilenos presentes na fração ativa de *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) contra hepatite B. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, 1996, Florianópolis. **Resumos ...** Florianópolis: UFSC, 1996. p.187.
- LUCKNER, M. Expression and control of secondary metabolism. In: BELL, E.A., CHARLWOOD, B.V. (Ed.) **Secondary plant products**. Berlin: Springer-Verlag. 1980. p.23-63. (Encyclopedia of plant physiology; new series, v.8).
- MACHADO, J.O., SANTOS, E., LEFÈVRE, A.F.V. Atividade antibacteriana de extratos de *Bidens pilosa* L. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v.10, p.55-62, 1988.
- MACIEL, H.E.T. Ecologia de plantas agrófilas, IV: balanço hídrico de *Ageratum conyzoides* L. e *Bidens pilosa* L. (Compositae). **Revista Brasileira de Biologia**, v.40, n.4, p.777-782, 1980.
- MANANDHAR, N.P. Herbal remedies of Surket district, Nepal. **Fitoterapia**, v.64, n.3, p.266-272, 1993.
- MANTELL, S.H., MATTHEWS, J.A., McKEE, R.A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 333p.
- MARKERT, C.L., MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species specific patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n.45, p. 753-763, 1959.

- MARQUESINI, N.R., MOREIRA, E.A. Plantas usadas como medicinais pelos índios do Paraná e Santa Catarina, Sul do Brasil. Família Asteraceae. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, 1996, Florianópolis. **Resumos ...** Florianópolis: UFSC, 1996. p.64.
- MATSUMOTO, S.T., MARIN-MORALES, M.A. Análise citogenética de cinco populações de *Bidens pilosa* (Asteraceae). In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 47, 1996, Nova Friburgo. **Resumos ...** Nova Friburgo: Colégio Anchieta, 1996. p.503.
- MATTOS, J.K.A. Aspectos gerais da cultura do funcho. **Informe Agropecuário**, v.10, n.120, p.84-88, 1984.
- MILACH, S.C.K. Uso de marcadores moleculares na caracterização de cultivares. In: BORÉM, A., GIÚDICE, M.P., SAKIYAMA, N.S., SEDIYAMA, T., MOREIRA, M.A., PORTUGAL, R.S. (Eds.) **Biossegurança, proteção de cultivares, acesso aos recursos genéticos e propriedade industrial na agropecuária**. Viçosa, MG: UFV, 1998. p.43-58.
- MINOLTA CO. LTD. **Chlorophyll meter SPAD-502**: instruction manual. Japão: IFIAP, 1989. 22p.
- MITICH, L.W. Beggarticks. **Weed Technology**, v.8, p.172-175, 1994.
- MORAIS, O.P. **Análise multivariada da divergência genética dos progenitores, índices de seleção e seleção combinada numa população de arroz oriunda de intercrossamentos, usando macho-esterilidade**. Viçosa, MG: UFV, 1992. 251p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1992.
- MUÑOZ-COLLAZOS, S., SORIANO-FERRUFINO, J., COLLIN, G.J., JEAN, F.I., DESLAURIERS, H. Variability in the composition of the essential oils of *Mintostachys andina* in Central Bolivia. **Phytochemistry**, v.33, n.1, p.123-127, 1993.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-497, 1962.
- MURPHY, R.W., SITES, J.W., BUTH, D.G., HAUFLE, C.H. Proteins I: isozyme electroforese. In: HILLIS, D.M., MORITZ, C. (Eds.). **Molecular systematics**. Massachusetts: Sinauer, 1990. p.45-126.
- NEVES, L.J., HERMETO, N.M.S. Contribuição ao estudo de *Bidens pilosa* L. (Compositae). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 7, 1982, Belo Horizonte. **Oréades**, v.8, n.14/15, p.196-205, 1981-1982.
- OBARA, S.Y., BEZUTTE, A.J., ALVES, P.L.C.A. Desenvolvimento e composição mineral do picão-preto sob diferentes níveis de pH. **Planta Daninha**. v.12, n.1, p.52-56, 1994.
- OGAWA, K., SASHIDA, Y. Caffeoyl derivatives of sugar lactone and its hydroxy acid from the leaves of *Bidens pilosa*. **Phytochemistry**, v.31, n.10, p.3657-3658, 1992.

- OHNISH, M., MORISHITA, H., IWAHASHIH., TODA, S., SHIRATAKI, Y., KIMURA, M., KIDO, R. Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis. **Phytochemistry**, v.36, p.579-583, 1994.
- OLIVEIRA, J.E.Z., AMARAL, C.L.F., CASALI, V.W.D. **Plantas medicinais e aromáticas: avanços no melhoramento genético**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitotecnia, 2001. 155p.
- OLIVEIRA, J.E.Z., CASALI, V.W.D. Caracterização isozimática de acessos de *Bidens pilosa* L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.2, n.1, p.19-26, 1999.
- PANIZZA, S. **Plantas que curam: cheiro de mato**. 12.ed. São Paulo: IBRASA, 1997. 279p.
- PARKER, P.G., SNOW, A.A., SCHUG, M.D., BOOTON, G.C., FUERST, P.A. What molecules can tell us about populations. Choosing and using a molecular marker. **Ecology**, v.79, n.2, p.361-382, 1998.
- PEIRCE, L.C., BREWBAKER, L.C. Applications of isozymes analysis in horticultural science. **HortScience**, v.8, n.1, p.17-22, 1973.
- PENNINIG DE VRIES, F.W.T., JANSEN, D.M., TEN BERGE, H.F.M., BAKEMA, A. **Simulation of ecophysiological processes of growth in several annual crops**. Wageningen: PUDOC/IRRI, 1989. 271p.
- PIERIK, R.L.M. Closure of test tubes and flasks. In: PIERIK, R.L.M.(Ed). **In vitro culture of higher plants**. Netherlands: Martinus Nijhoff, 1987. p.83-125.
- POLIGNANO, G.B., QUINTANO, G., BISIGNATO, V., UGGENTI, P., DELLA GATTA, C., ALBA, E. Enzyme polymorphism in faba bean (*Vicia faba* L. *minor*) accessions. Genetic interpretation and value for classification. **Euphytica**, v.102, p.169-176, 1998.
- PRAMANIK, S., RAYCHAUDHURI, S.S. DNA content, chromosome composition, and isozyme patterns in *Plantago* L. **The Botanical Review**, v.63, n.2, p.124-139, 1997.
- PUYVELDE, L. van, NTAWUKILIYAYO, J.D., PORTAELS, F., HAKIZAMUNGU, E. *In vitro* inhibition of mycobacteria by ruandese medicinal plants. **Phytotherapy Research**, v.8, p.65-69, 1994.
- RAO, R.C. **Advanced statistical methods in biometric research**. New York: John Wiley and Sons, 1952. 390p.
- RAVEN, P.H., EVERT, R.F., CURTIS, H. **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1978. 724 p.
- RIBAS, L.A. **Variabilidade isoenzimática e sistema de cruzamento de *Parapiptadenia rigida* em um pomar de sementes**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 90p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- RIVERA, D., OBÓN, C. The ethnopharmacology of Madeira and Porto Santo Islands, a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.46, n.2, p.73-93, 1995.

- ROBINSON, I.P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A.C. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa, MG: UFV, 1998. p.329-380.
- RODRIGUEZ DE SOTILLO, D., HADLEY, M., HOLM, E.T. Phenolics in aqueous potato peel extract: extraction, identification and degradation. **Journal of Food Science**, v.59, n.2, p.649-651, 1994.
- SACCO, T., PERACINO, V., MAFFEI, M. Phenotypic plasticity in *Mentha viridis lavanduliodora*. **Journal of Essential Oil Research**, v.4, n.5, p.491-496, 1992.
- SAKAMURA, F., SUGA, T. **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1989. v.7, p.524-538.
- SALAMON, I. Ecobiology of the chamomile (*Chamomilla recutita* L. Rauschert). **Horticultura Brasileira**, v.12, n.2, p.226-229, 1994.
- SALINAS, J., BENITO, C. Esterase isozymes in rye: characterization, genetic control and chromosomal location. **Theoretical and Applied Genetics**, v.71, n.1, p.136-140, 1985.
- SANTOS, P.C. **Plasticidade fenotípica em três ecótipos de capim-gordura (*Melinis minutiflora* Beauv.)**. Viçosa, MG: UFV, 1990. 97p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1990.
- SCANDALIOS, J.G. Genes, isozymes and evolution. In: MARKET, C.L. (Ed.). **Isozymes: genetic and evolution**. New York: Academic Press, 1975. v.4, p.1-7.
- SCHEINER, S.M. Genetics and evolution of phenotypic plasticity. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.24, p.35-68, 1993.
- SCHLICHTING, C.D. The evolution of phenotypic plasticity in plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.17, p.667-693, 1986.
- SCHLICHTING, C.D., LEVIN, D.A. Phenotypic plasticity of annual *Phlox*: tests of some hypotheses. **American Journal Botany**, v.71, p.252-260, 1984.
- SCHUMACHER, H.M. Biotechnology in the production and conservation of medicinal plant. In: AKERELE, O., HEYWOOD, V., SYNGE, H. **Conservation of medicinal plants**. New York: Cambridge University Press, 1991. p.179-198.
- SEVESTRE-RIGOUZZO, M., NEF-CAMPA, C., GHESQUIÈRE, A., CHRESTIN, H. Genetic diversity and alkaloid production in *Catharanthus roseus*, *C. trichophyllus* and their hybrids. **Euphytica**, v.66, p.151-159, 1993.
- SHAW, C.R., PRASAD, R. Starch gel electrophoresis of enzymes: a compilation of recipes. **Biochemical Genetics**, v.4, n.2, p.297-320, 1970.
- SNEATH, P.H., SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy the principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W.H. Freeman, 1973. 513p.

- SOLTIS, D.E., HAUFLER, C.H., DARROW, D.C., GASTONY, G.J. Starch gel electrophoresis of fern: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. **American Fern Journal**, v.73, n.1, p.9-27, 1983.
- SOUZA, J.C. **Diversidade genética entre acessos de acerola (*Malpighia* sp.) com base em dados isozimáticos e agronômicos**. Viçosa, MG: UFV, 1996. 67p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- SOUZA, M.P., MATOS, M.E.O., MATOS, F.J.A., MACHADO, M.I.L., CRAVEIRO, A.A. **Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras**. Fortaleza: Edições UFCE/Laboratório de Produtos Naturais, 1991. 416p.
- STRANG, H.E., CARAUTA, J.P.P., VIANNA, M.C., AIDA, V. Manual ilustrado de algumas plantas espontâneas no Rio de Janeiro. **Rodriguésia**, v.32, n.53, p.121-149, 1980.
- SULTAN, S.E. Phenotypic plasticity and plant adaptation. **Acta Botanica Neerlandica**, v.44, n.4, p.363-383, 1995.
- SUN, M., GANDERS, F.R. Outcrossing rates and allozyme variation in rayed and rayless morphs of *Bidens pilosa*. **Heredity**, v.64, p.139-143, 1990.
- SUZUKI, D.T., GRIFFITHS, A.J.F., MILLER, J.H., LEWONTIN, R.C. **Introdução à genética**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 633p.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. **Plant physiology**. Redwood City, California: The Benjamin Cummings, 1991. 559p.
- TAMASHIRO, J.Y., LEITÃO FILHO, H.F. Observações sobre o ciclo de vida de *Bidens pilosa* L. (Compositae - Heliantheae). **Hoehnea**, v.7, p.27-40, 1978.
- TÉTÉNYI, P. Biological preconditions of aromatic and medicinal plant cultivation. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SPICE AND MEDICINAL PLANTS, 3, 1982, Hamburg (Alemanha). **Acta Horticulturae**, v.132, p.15-22, 1983.
- TORGGLER, M.G.F., CONTEL, E.P.B., TORGGLER, S.P. **Isoenzimas - variabilidade genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. 186p.
- TORRES, A.C., CALDAS, L.S. (Eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, DF: ABCTP/EMBRAPA-CNPQ, 1990. 433p.
- TRENTINI, A.M.M. Registro, controle de qualidade e comércio de fitoterápicos. In: SEMINÁRIO MINEIRO DE PLANTAS MEDICINAIS, 3, 1997, Ouro Preto. **Anais ...** Ouro Preto: UFOP, 1997. p.23-25.
- TUBELIS, A., NASCIMENTO, F.J.L. **Meteorologia descritiva: fundamentos e aplicações brasileiras**. São Paulo: Nobel, 1980. 374p.
- ULRICHOVÁ, J., ONDRA, P., SIMÁNEK, V., SÜTLÜPLINAR, N. Cytoprotective effect of phenolics from *Colchicum* on rat hepatocytes. **Fitoterapia**, v.66, n.5, p.399-402, 1995.

- VASQUES, C.A.V., VASQUES, N.V., GELLER, M. Contribuição ao estudo do picão (*Bidens pilosa* L.). **Arquivos Brasileiros de Medicina**, v.60, n.4, p.283-287, 1986a.
- VASQUES, C.A.V.; VASQUES, N.V. & GELLER, M. Revisão farmacognóstica do picão (*Bidens pilosa* L.). **Arquivos Brasileiros de Medicina**, v.60, n.2, p.107-108, 1986b.
- VOLTAN, R.B.Q., FAHL, J.L., CARELLI, M.L.C. Variação na anatomia foliar de cafeeiros submetidos a diferentes intensidades luminosas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.4, p.99-105, 1992.
- WAGNER, H., BLADT, S. **Plant drug analysis**. 2ed. Berlin: Springer-Verlag, 1996. 384p.
- WHATLEY, J.M., WHATLEY, F.R. **A luz e a vida das plantas**. São Paulo: EPU-EDUSP, 1982. 101p. (Temas de Biologia; v.30).
- WONG-LEUNG, Y.L. Antibacterial activities of some Hong Kong plants used in Chinese medicine. **Fitoterapia**, v.59, n.1, p.11-16, 1988.
- YOMURA, M.H., CURY, P.R., JESUS, M.A.L., COELHO, C.A.R. Efeitos da suspensão aquosa de folhas secas do picão (*Bidens pilosa* L.) sobre o fluxo biliar em ratos. **Arquivos Brasileiros de Medicina**, v.62, n.4, p.281-282, 1988.
- ZOLLO, P.H.A., KUIATÉ, J.R., MENUT, C., LAMATY, G., BESSIÈRE, J.M., CHALCHAT, J.C., GARRY, R.P. Aromatic plants of Tropical Central Africa. Part XX. The occurrence of 1-phenylhepta-1,3,5-triene in the essential oil of *Bidens pilosa* L. from Cameroon. **Flavour and Fragrance Journal**, v.10, n.2, p.97-100, 1995.
- ZULUETA, M.C.A., TADÁ, M., RAGASA, C.Y. A diterpene from *Bidens pilosa*. **Phytochemistry**, v.38, n.6, p.1449-1450, 1995.

APÊNDICE

APÊNDICE A

1. Composição da solução-tampão empregada na extração de enzimas de *Bidens pilosa* L.

1.1. Solução-tampão número 1 (ALFENAS et al., 1991)

Fosfato de sódio bibásico (0,034 M)	0,60 g
Sacarose (0,2 M)	7,00 g
PVP-40 (polivinilpirrolidona) (2,56%)	2,56 g
DTT (ditiotreitól) (3,0 mM)	0,05 g
L-ácido ascórbico (5,7 mM)	0,10 g
DIECA (dietilditiocarbamato de sódio) (5,8 mM)	0,10 g
Bissulfito de sódio (2,6 mM)	0,05 g
Borato de sódio (bórax) (2,5 mM)	0,05 g
2-mercaptoetanol (0,2%)	0,20 mL
Polietilenoglicol-6000 (1,0%)	1,00 g
Água deionizada (ou destilada) (q.s.p.)	100,00 mL

Durante a trituração adiciona-se aproximadamente 30 mg de PVPP (polivinilpolipirrolidona) com a finalidade de remover compostos fenólicos e aumentar a estabilidade das enzimas.

1.1. Solução-tampão número 3 (ALFENAS et al., 1991)

Tris-HCl (0,2 M, pH 8,0)	100,000 mL
Tetraborato de sódio (0,014 M)	0,280 g
Bissulfito de sódio (4,2 mM)	0,080 g
L-ácido ascórbico (0,057 M)	1,000 g
Bissulfito de sódio (2,5 mM)	0,047 g
DIECA (dietilditiocarbamato de sódio) (6,0 mM)	0,102 g

Antes de usar, adicione 8 g de PVP-40 (polivinilpirrolidona) e 6-8 gotas de 2-mercaptoetanol; o pH deve ser 7,5.

2. Protocolo de detecção da atividade enzimática

2.1. Incubar no escuro, à temperatura de 37 °C, até a revelação das bandas

a) Fosfatase ácida (ACP - EC 3.1.3.2) (Brewbaker et al., 1968 - modificado por HILDEBRANT et al., 1980)

α - naftil fosfato	100,0 mg
“Fast garnet GBC salt”	50,0 mg
Cloreto de magnésio	25,0 mg
Cloreto de sódio	500,0 mg
PVP-40 (polivinilpirrolidona)	125,0 mg
Tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0	500,0 mL

b) α -Esterase (EST - EC 3.1.1.-) (SOLTIS et al., 1983), modificado

α - naftil acetato	20,0 mg
dissolver em:	
Acetona	1,0 mL
Tampão fosfato 1,0 M, pH 6,0	5,0 mL
Água destilada	45,0 mL
“Fast blue RR salt”	50,0 mL

c) β -Esterase (EST - EC 3.1.1.-) (SOLTIS et al., 1983), modificado

β - naftil acetato	20,0 mg
dissolver em:	
Acetona	1,0 mL
Tampão fosfato 1,0 M, pH 6,0	5,0 mL
Água destilada	45,0 mL
“Fast blue RR salt”	50,0 mL

d) Glutamato oxaloacetato transaminase (GOT - EC 2.6.1.1) (SOLTIS et al., 1983), modificado

Ácido L-aspártico	100,0 mg
Ácido α -cetoglutárico	100,0 mg
Ajuste o pH a 8,0, adicionando NaOH (1 M) e, em seguida:	
Pyridoxal 5'-fosfato	2,5 mg
“Fast blue BB salt”	50,0mg

e) Chiquimato desidrogenase (SKDH - EC 1.1.1.25) (SOLTIS et al., 1983)

Ácido chiquímico	100,0 mg
NADP ⁺ , Na ₂	2,0 mL (20,0 mg)
MTT ou NBT	2,0 mL (20,0 mg)
PMS (Fenazina metossulfato)	2,0 mL (2,0 mg)
Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5 (q.s.p.)	100,0 mL

f) Superóxido dismutase (SOD - EC 1.15.1.1) (SOLTIS et al., 1983)

Riboflavina	4,0 mg
EDTA (Etilenodiaminatetraacetato), Na ₂	300,0 mg
MTT ou NBT	2,0 mL (20,0 mg)
Tris-HCl 0,05 M, pH 8,5 (q.s.p.)	100,0 mL

2.2. Incubar no escuro, à temperatura de ± 4 °C, até a revelação das bandas

a) Peroxidase (PO - EC 1.11.1.7) (SOLTIS et al., 1983), modificado

3-amino-9-etil-carbazole	50,0 mL
Dimetilformamida (DMF)	2,5 mL
Tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0	95,0 mL
CaCl ₂ 0,1 M	2,0 mL
H ₂ O ₂ em 3%	2,0 mL

APÊNDICE B

Sais constituintes do Meio básico de MURASHIGE e SKOOG (1962)

Sais	Concentração (mg L ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	1.650,0
KNO ₃	1.900,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	440,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,0
KH ₂ PO ₄	170,0
Na ₂ EDTA	37,3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Suplementação	
Glicina	3,0
Ácido nicotínico	0,5
Tiamina	1,0
Piridoxina	0,5
Inositol	100,0
Sacarose	30.000,0