

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

TESE

Diversidade genética baseada em caracteres morfoagronômicos e moleculares visando a identificação de genótipos de vinca (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) com potencial para a produção de biomassa foliar e de alcaloides

Gustavo Torres dos Santos Amorim

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE AGRONOMIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

**DIVERSIDADE GENÉTICA BASEADA EM CARACTERES
MORFOAGRONÔMICOS E MOLECULARES VISANDO A
IDENTIFICAÇÃO DE GENÓTIPOS DE VINCA (*Catharanthus roseus* [L.]
G. Don) COM POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE BIOMASSA
FOLIAR E DE ALCALOIDES**

GUSTAVO TORRES DOS SANTOS AMORIM

Sob a Orientação do Professor

Dr. Pedro Corrêa Damasceno Junior

E coorientação do Pesquisador

Dr. José Luiz Mazzei da Costa

Tese submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
Doutor em Fitotecnia, no
Programa de Pós-Graduação em
Fitotecnia da UFRRJ, Área de
Concentração em Produção Vegetal.

Seropédica, RJ
Julho de 2024

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A524d Amorim, Gustavo Torres dos Santos, 1990-
Diversidade genética baseada em caracteres
morfoagronômicos e moleculares visando a identificação
de genótipos de vinca (*Catharanthus roseus* [L.] G.
Don) com potencial para a produção de biomassa foliar
e de alcaloides / Gustavo Torres dos Santos Amorim. -
Seropédica, 2024.
127 f.: il.

Orientador: Pedro Corrêa Damasceno Junior.
Coorientador: José Luiz Mazzei da Costa.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
, 2024.

1. Melhoramento de plantas. 2. Plantas medicinais.
3. Marcador molecular ISSR. 4. HPLC-DAD. 5.
Vimblastina. I. Damasceno Junior, Pedro Corrêa , 1973
, orient. II. da Costa, José Luiz Mazzei , 1967-,
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia . IV.
Título.

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”.

**O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 0001.**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA**



HOMOLOGAÇÃO DE TESE DE DOUTORADO Nº 19 / 2025 - DeptFITO (12.28.01.00.00.00.32)

Nº do Protocolo: 23083.054377/2025-78

Seropédica-RJ, 18 de setembro de 2025.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

GUSTAVO TORRES DOS SANTOS AMORIM

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Fitotecnia, no Programa de Pós-graduação em Fitotecnia da UFRRJ, Área de concentração em Produção Vegetal.

Tese aprovada em: 30/07/2024.

Dr. Pedro Corrêa Damasceno Júnior. Dr. Genética e Melhoramento de Plantas. UFRRJ.

(Orientador)

Dr. José Luiz Mazzei da Costa. Dr. Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Farmanguinhos/Fiocruz.
(Coorientador)

Dra. Bruna Rafaela da Silva Menezes. Dra. Genética e Melhoramento de Plantas. UFRRJ.

(Membro Titular)

Dra. Marilene Hilma dos Santos. Dra. Genética e Melhoramento de Plantas. UFRRJ.

(Membro Titular)

Dra. Tatiana de Oliveira Pinto. Dra. Fitotecnia. UniFOA.

(Membro Titular)

Dra. Tatiane da Costa Barbé. Dra. Produção Vegetal. Farmanguinhos/Fiocruz.

(Membro Titular)

(Assinado digitalmente em 18/09/2025 14:52)

BRUNA RAFAELA DA SILVA MENEZES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptG (12.28.01.00.00.00.50)
Matricula: 2271445

(Assinado digitalmente em 19/09/2025 08:16)

MARILENE HILMA DOS SANTOS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptG (12.28.01.00.00.00.50)
Matricula: 2147409

(Assinado digitalmente em 24/09/2025 13:44)

PEDRO CORREA DAMASCENO JUNIOR
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DATS (11.39.00.35)
Matricula: 1712769

(Assinado digitalmente em 18/09/2025 14:50)

JOSÉ LUIZ MAZZEI DA COSTA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 905.847.677-49

(Assinado digitalmente em 16/10/2025 17:49)

TATIANA DE OLIVEIRA PINTO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 095.393.907-37

(Assinado digitalmente em 30/09/2025 10:06)

TATIANE DA COSTA BARBÉ
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 083.788.307-56

Visualize o documento original em
<https://sipac.ufrjr.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **19**,
ano: **2025**, tipo: **HOMOLOGAÇÃO DE TESE DE DOUTORADO**, data de emissão:
18/09/2025 e o código de verificação: **aab53c8980**

AGRADECIMENTOS

À Deus, a quem busquei nos momentos difíceis. A ele pedi forças, coragem e resiliência para seguir na jornada de estudos.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia (PPGF) pela oportunidade ímpar de realização do Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador Pedro Corrêa Damasceno Junior. Agradeço imensamente pela orientação, incentivo, apoio e contribuição na pesquisa. O cuidado com a orientação foi fundamental para concluir o Doutorado. Obrigado por todo suporte para alcançar os objetivos traçados.

Ao meu coorientador José Luiz Mazzei da Costa. Obrigado pela orientação e por compartilhar suas experiências e conhecimentos. Agradeço a parceria nas análises químicas das plantas de vinca. Sem dúvida, a sua coorientação foi essencial para analisar os alcaloides da vinca.

Ao Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular de Plantas (LCBMP), do Departamento de Agrotecnologias e Sustentabilidade (DATS), do Instituto de Agronomia (IA), da UFRRJ, onde pude realizar meu Mestrado e Doutorado. Agradeço a oportunidade de fazer parte deste grupo de pesquisa. A estrutura e os recursos humanos do referido laboratório contribuíram de forma única para a minha formação.

À Assistente do Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular de Plantas (LCBMP), Fernanda da Silva Ferreira Oliveira, pela ajuda, parceria, apoio e amizade. Sua contribuição foi fundamental para a execução do Doutorado.

À Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) pelo apoio nas análises químicas da presente Tese de Doutorado.

Ao Laboratório de Tecnologia para Biodiversidade em Saúde (LabTecBio), no Instituto de Tecnologia em Fármacos/Farmanguinhos, da Fiocruz, pelo suporte nas análises de extração dos alcaloides da vinca.

Ao analista Marcos Jun Nakamura e a técnica Elizete dos Santos Lima da Silva do LabTecBio, no Instituto de Tecnologia em Fármacos/Farmanguinhos, da Fiocruz. Agradeço o suporte na bancada durante as análises químicas.

Ao Departamento de Métodos Analíticos, no Instituto de Tecnologia em Fármacos/Farmanguinhos, da Fiocruz, pela parceria na quantificação dos alcaloides da vinca. Um agradecimento aos técnicos e funcionários do referido Departamento, em nome de Licínio de Almeida Fontoura e Marcio Soares.

Ao Professor Marco André Alves de Souza, do Departamento de Química, da UFRRJ, pelo auxílio durante as primeiras análises químicas da Tese.

Ao Laboratório de Recursos Genéticos Vegetais Prof. Élson Viégas do Departamento de Fitotecnia (DFITO), do Instituto de Agronomia (IA), da UFRRJ, por ceder a estrutura, reagentes e equipamentos para o desenvolvimento da Tese.

Aos funcionários do Campo experimental do Departamento de Fitotecnia da UFRRJ, na figura dos Srs. Reginaldo, Pedro, Henrique e Cristina, pela ajuda no campo.

À Assistente em Administração, da Secretaria do Programa de Pós-graduação em Fitotecnia (PPGF), Tatiane Dantas Garcez, por todo auxílio, orientações e amizade. Tudo isso contribuiu para o correto desenvolvimento da pesquisa, cumprimento das normas e prazos.

À minha mãe Márcia, a minha maior motivadora. Agradeço o seu valioso apoio e suporte. Obrigado por estar ao meu lado na vida acadêmica e pessoal. Sem você tudo seria mais difícil. Agradeço a ajuda e o cuidado incondicional desde o meu nascimento.

Ao meu pai Leonardo. Agradeço o apoio e suporte especialmente nos cursos de graduação (Zootecnia e Agronomia).

À minha irmã Bruna. Obrigado por me apoiar nos momentos bons e ruins. Você foi fundamental nessa jornada.

À minha namorada Viviane, que sempre acreditou em mim. Agradeço a paciência e por estar disponível para me ajudar sempre. Obrigado também pelos momentos de descontração e pela confiança de que tudo daria certo. Você é uma das maiores incentivadoras.

Em memória de meu avô Rubens, o responsável pelos primeiros contatos com as Ciências Agrárias. Este contato, certamente, contribuiu na escolha de minha profissão. De igual forma, à minha avó Esther por ser um alicerce. Sua ajuda e apoio foram fundamentais na minha caminhada pessoal e acadêmica.

Aos meus amigos Nilo e Wallace, que me acompanham desde a infância e adolescência. A amizade de longa data e os momentos de descontração foram essenciais. Vocês foram muito importantes.

Ao amigo Júnior pela amizade de muitos anos na UFRRJ, nos cursos de Zootecnia e Agronomia.

Aos amigos da UFRRJ, em especial: Ricardo, Carlos, Igor, Daniel, Laércio, João, Lucas e Wellerson. Os nossos momentos de lazer tornaram a rotina de estudos mais leve e agradável. Todos vocês foram fundamentais até mesmo nas atividades de pesquisa e coleta de dados da Tese. Todos foram extremamente importantes na minha caminhada. Por vocês tenho eterna gratidão e obrigado pela amizade.

As grandes amigas Fernanda, Tatiana, Mayara, Thaísa, Lívia, Mariana e Isabella pelo companheirismo, contribuição na pesquisa e excelente convivência no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular de Plantas (LCBMP).

Agradeço aos membros da banca Bruna Rafaela da Silva Menezes, Marilene Hilma dos Santos, Tatiana de Oliveira Pinto e Tatiane da Costa Barbé pelas contribuições valiosas à Tese de Doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) [Código Financeiro E-26/201.077/2016] pelo apoio e financiamento da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), visto que o presente trabalho foi realizado com o apoio financeiro da CAPES – Código de Financiamento 0001 ((PORTARIA Nº 206 DE 4 DE SETEMBRO DE 2018 DA CAPES)).

Agradeço a todos (as) que de alguma forma colaboraram com a minha formação pessoal e profissional.

Muito obrigado!

BIOGRAFIA

Gustavo Torres dos Santos Amorim, filho de Márcia Torres dos Santos e Leonardo Machado Amorim, nasceu no dia 6 de junho de 1990, na cidade de Petrópolis, Rio de Janeiro. Ingressou, em 2008, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), graduando-se em Zootecnia no ano de 2013. Em 2014, reingressou na UFRRJ e obteve o título de Engenheiro Agrônomo em 2017. Durante ambas as graduações (Zootecnia e Agronomia), foi estagiário e bolsista de Iniciação Científica. Em 2017, ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia (PPGF) da UFRRJ, na área de concentração em Produção Vegetal. Durante esse período, estudou o modo de reprodução preferencial em genótipos de vinca (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don). Obteve o título de Mestre em Fitotecnia no ano de 2019, sob a orientação do prof. Dr. Pedro Corrêa Damasceno Junior. Em março de 2020, ingressou no curso de doutorado do PPGF da UFRRJ.

RESUMO GERAL

AMORIM, Gustavo Torres dos Santos. **Diversidade genética baseada em caracteres morfoagronômicos e moleculares visando a identificação de genótipos de vinca (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) com potencial para a produção de biomassa foliar e de alcaloides**. 2024. 127 p. Tese de Doutorado. Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

A vinca (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) distingue-se por ser fonte dos alcaloides vincristina e vimblastina utilizados em quimioterápicos para o tratamento convencional de tumores, leucemias e linfomas. No entanto, estas substâncias ocorrem em baixas concentrações nas folhas da espécie. Nesse sentido, é fundamental desenvolver um programa de melhoramento genético. Diante do exposto, objetivou-se conhecer e estimar a diversidade genética entre 79 genótipos de *C. roseus* com base em variáveis morfoagronômicas. Além disso, avaliou-se a produção de biomassa de folhas secas (BFO_s) em 79 genótipos de vinca e, em seguida, foram selecionadas as melhores plantas para esta variável. Em tais plantas, a presente pesquisa buscou conhecer o potencial da produção dos alcaloides catarantina (CAT), vindolina (VDL), vincristina (VCR) e vimblastina (VBL), bem como estimar a diversidade molecular verificada via marcadores de DNA do tipo ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). Por fim, pretendeu-se propor uma lista de descritores mínimos para a cultura da vinca. No primeiro capítulo, a diversidade genética foi acessada através de descritores morfoagronômicos. Para isso, utilizou-se diferentes estratégias de análise multivariada, como a análise de agrupamento UPGMA, Anosim, índices de diversidade de Shannon (H') e de Pielou (J') e importância relativa das variáveis. No segundo capítulo, apenas os melhores genótipos para a produção de BFO_s e positivos para a presença de alcaloides prosseguiram para as análises químicas. Os teores dos alcaloides CAT, VDL, VCR e VBL foram determinados em HPLC-DAD (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detecção de Arranjo de Fotodiodos). Posteriormente, estimou-se a produção dos alcaloides por planta (BFO_s x teor dos alcaloides). Os genótipos também tiveram seu DNA extraído e analisado via 15 *primers* ISSR. Estimou-se a diversidade molecular utilizando a análise de agrupamento UPGMA e via índices de H' e de J'. No terceiro capítulo, foram elencados 15 descritores mínimos, nove foram de natureza qualitativa e seis de natureza quantitativa. Os descritores de natureza quantitativa foram transformados para descritores multicategóricos. Após a união da matriz de descritores de origem qualitativa e os de origem quantitativa, os dados foram submetidos a análise de agrupamento. Os resultados demonstraram que a diversidade genética da coleção acessada através de 18 descritores morfoagronômicos foi baixa a moderada. Dos 79 genótipos avaliados, 15 deles apresentaram a BFO_s estatisticamente superior à média da população. Dentre os 15 genótipos superiores para BFO_s, o UFRRJ VIN007/14(PAB) foi descartado, pois foi negativo para a presença de alcaloides. Na HPLC-DAD foi possível identificar a VBL em 13 das 14 plantas analisadas. Já CAT e VDL estiveram presentes em todas e a VCR não foi detectada em nenhuma delas. Três genótipos se destacaram para a produção de VBL. O genótipo UFRRJ VIN013/22(PAB) alcançou o maior teor de VBL (0,77 mg/g de BFO_s) e a maior produção de VBL/planta (13,61 mg). Por outro lado, não foram observados genótipos promissores para os teores de CAT e VDL. A diversidade molecular foi alta entre os genótipos elencados como superiores para produção de BFO_s, haja vista as distâncias genéticas obtidas no dendrograma, corroboradas pelos elevados índices de H' (5,66) e de J' (0,96). Os 15 descritores mínimos propostos possibilitaram a distinção no dendrograma de todos os 77 genótipos analisados. Isto ocorreu até mesmo em genótipos próximos geneticamente.

Palavras-chave: melhoramento de plantas, plantas medicinais, estatística multivariada, descritores totais, marcador molecular ISSR, HPLC-DAD, vimblastina, descritores mínimos.

GERAL ABSTRACT

AMORIM, Gustavo Torres dos Santos. **Genetic diversity based on morphoagronomic and molecular characters aiming to identify periwinkle (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) genotypes with potential for the production of leaf biomass and alkaloids.** 2024. 127 p. Thesis, Agronomy Institute, Departament of Crop Science, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

Periwinkle (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) is distinguished for being the source of the alkaloids vincristine and vinblastine used in chemotherapy for the conventional treatment of tumors, leukemias, and lymphomas. However, these substances occur in low concentrations in the leaves of this species. In this sense, it is essential to develop a genetic improvement program. In view of the above, the objective was to identify and estimate the genetic diversity among 79 genotypes of *C. roseus* based on morphoagronomic variables. In addition, the production of dry leaf biomass (BFO_s) in 79 periwinkle genotypes was evaluated, and then the best plants for this variable were selected. In such plants, the present research sought to understand the potential for the production of the alkaloids catharanthine (CAT), vindoline (VDL), vincristine (VCR) and vinblastine (VBL), as well as to estimate the molecular diversity verified via DNA markers of the ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) type. Finally, we intended to propose a list of minimum descriptors for the periwinkle crop. In the first chapter, genetic diversity was accessed through morphoagronomic descriptors. For this, different multivariate analysis strategies were used, such as UPGMA cluster analysis, Anosim, Shannon (H') and Pielou (J') diversity indices and relative importance of variables. In the second chapter, only the best genotypes for BFO_s production and positive for the presence of alkaloids proceeded to chemical analyses. The levels of the alkaloids CAT, VDL, VCR and VBL were determined by HPLC-DAD (High-Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection). Subsequently, the alkaloid production per plant was estimated (BFO_s x alkaloid content). The genotypes also had their DNA extracted and analyzed using 15 ISSR primers. Molecular diversity was estimated using UPGMA cluster analysis and H' and J' indices. In the third chapter, 15 minimum descriptors were listed, nine of which were qualitative and six of which were quantitative. The quantitative descriptors were transformed into multicategorical descriptors. After combining the matrix of qualitative and quantitative descriptors, the data were subjected to cluster analysis. The results showed that the genetic diversity of the collection accessed through 18 morphoagronomic descriptors was low to moderate. Of the 79 genotypes evaluated, 15 of them presented BFO_s statistically higher than the population average. Among the 15 superior genotypes for BFO_s, UFRRJ VIN007/14(PAB) was discarded, as it was negative for the presence of alkaloids. In HPLC-DAD, it was possible to identify VBL in 13 of the 14 plants analyzed. CAT and VDL were present in all of them, and VCR was not detected in any of them. Three genotypes stood out for VBL production. The genotype UFRRJ VIN013/22(PAB) achieved the highest VBL content (0.77 mg/g of BFO_s) and the highest VBL production/plant (13.61 mg). On the other hand, no promising genotypes were observed for CAT and VDL levels. Molecular diversity was high among the genotypes listed as superior for BFO_s production, given the genetic distances obtained in the dendrogram, corroborated by the high H' (5.66) and J' (0.96) indices. The 15 minimum descriptors proposed allowed the distinction in the dendrogram of all 77 genotypes analyzed. This occurred even in genetically close genotypes.

Keywords: plant breeding, medicinal plants, multivariate statistics, total descriptors, ISSR molecular marker, HPLC-DAD, vinblastine, minimum descriptors.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Lista preliminar de descritores desenvolvidos para a vinca. A lista inclui o nome do descritor e o método de mensuração.	45
Tabela 2. Descritores morfoagronômicos retirados da literatura e propostos em caráter de ineditismo utilizados na caracterização de 79 genótipos de vinca.	48
Tabela 3. Análise estatística descritiva referente aos 41 descritores quantitativos utilizados na caracterização de 79 genótipos de vinca.....	50
Tabela 4. Distribuição de 79 genótipos de vinca em oito grupos estatisticamente distintos obtidos em análise de agrupamento utilizando a distância Euclidiana e o método UPGMA. .	56
Tabela 5. Médias e desvios-padrões das 18 variáveis morfoagronômicas mensuradas em 79 genótipos de <i>C. roseus</i> distribuídas em oito grupos definidos a partir da técnica de Kelley <i>et al.</i> (1996).	58
Tabela 6. Relação de <i>primers</i> do tipo ISSR utilizados com respectivas temperaturas de anelamento (TA).....	74
Tabela 7. Produção de biomassa de folhas secas (BFO _s) em gramas nos genótipos de <i>C. roseus</i>	76
Tabela 8. Faixa de concentrações testadas, limite de quantificação (LQ), equações de regressão linear e suas significâncias (<i>p</i>), coeficientes de determinação (R^2) e coeficientes de variação (CV) do método para os padrões dos alcaloides catarantina (CAT), vindolina (VDL) e vimblastina (VBL).....	77
Tabela 9. Quantificação do teor e produção dos alcaloides catarantina (CAT), vindolina (VDL) e vimblastina (VBL) em extratos alcaloídicos de 14 genótipos de vinca (<i>C. roseus</i>) analisados em HPLC-DAD.	81
Tabela 10. Lista de descritores mínimos desenvolvidos para a vinca. A lista inclui o tipo de variável, nome do descritor, metodologia, estado e a referência de cada descritor.....	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Plantio das sementes (progênes) de autofecundação e de polinização aberta. A) Sementes de vinca. B) Plantio das sementes de vinca à 1 cm de profundidade em bandejas de semeadura. C) Início da germinação, 20 dias após a semeadura. D) Progênes de vinca com 60 dias de idade ainda nas bandejas de semeadura. E) Início do processo de transplantio mostrando um genótipo de vinca com 60 dias de idade. F) Genótipo de vinca após o transplantio para saco de 1 litro, identificado com um número de acesso através da fixação de placa. G) Genótipo com 120 dias de idade. H) Vaso de oito litros, previamente identificado, com substrato na proporção de 1:1:1 (areia, terra e esterco bovino curtido). I e J) Plantio de genótipos de vinca em vaso de oito litros.....	43
Figura 2. Genótipos de <i>C. roseus</i> pertencentes à Coleção de Trabalho de vinca do DATS/IA/UFRRJ.	44
Figura 3. Contribuição relativa individual de 41 descritores morfoagronômicos, calculada pelo método do cosseno quadrado, mensurados em plantas de <i>C. roseus</i> cultivadas em vasos de oito litros, dispostos em telado, no município de Seropédica-RJ. Legenda: APET - área média da pétala, CPET - comprimento médio da pétala, LPET - largura média da pétala, DFLO - diâmetro médio da flor, AFLO - área média da flor, CPE - comprimento médio do pecíolo, CEL - comprimento médio do estilo, ALT - altura da planta, NRT - número de ramos totais por genótipo, CENP - comprimento médio de entrenó em ramos primários, CTCOLCA - comprimento médio do tubo da corola mais o cálice, BFO _s - produção de biomassa foliar seca, NSEVA - número médio de sementes por vagem, PCO - área de projeção da copa, CO - comprimento médio do ovário, CENS - comprimento médio de entrenó em ramos secundários, AFO - área média foliar, NRB - número de ramos na base da planta, LFO - largura média foliar, CFO - comprimento médio foliar, CA - comprimento médio das anteras, NRA ₂₀ - número de ramos acima da altura de 20 cm, NDG - número de dias para germinação, DCA - diâmetro do caule principal, LSE - largura média das sementes, AIFC - ângulo médio de inserção da folha no caule, P100SE - peso de 100 sementes, NR _{Be20} - número de ramos entre a base da planta e altura de 20 cm, CEG - comprimento médio do estigma, NDF - número de dias para frutificação, NDA - número de dias para a antese, PVA - peso médio de vagens, NFLO - número de flores por planta, PTSE - peso total de sementes por genótipo, DRS - diâmetro de ramos secundários, LVA - largura média das vagens, CVA - comprimento médio das vagens, ASE - área média das sementes, DHLO - diâmetro médio do halo, CSE - comprimento médio das sementes e DRP - diâmetro de ramos primários.	53
Figura 4. Dendrograma e <i>heatmap</i> de 79 genótipos de vinca com base na caracterização fenotípica das variáveis NRT (número de ramos totais), BFO _s (produção de biomassa de folhas secas), NRB (número de ramos na base da planta), CO (comprimento médio do ovário), LPET (largura média da pétala), APET (área média da pétala), CPET (comprimento médio da pétala), AFLO (área média da flor), DFLO (diâmetro médio da flor), NSEVA (número médio de sementes por vagem), AFO (área média foliar), CENS (comprimento médio de entrenó em ramos secundários), ALT (altura da planta), PCO (área de projeção da copa), CPE (comprimento médio do pecíolo), CENP (comprimento médio de entrenó em ramos primários), CTCOLCA (comprimento médio do tubo da corola mais cálice) e CEL (comprimento médio do estilo).	55
Figura 5. Médias das 18 variáveis morfoagronômicas mensuradas em 79 genótipos de <i>C. roseus</i> , distribuídas em oito grupos através da técnica de Kelley <i>et al.</i> (1996). Legenda: ALT - altura da planta, NRB - número de ramos na base da planta, NRT - número de ramos totais, CENP - comprimento médio de entrenó em ramos primários, CENS - comprimento médio de entrenó em ramos secundários, PCO - área de projeção da copa, CPE - comprimento médio do pecíolo, AFO - área média foliar, BFO _s - produção de biomassa de folhas secas, CPET -	

comprimento médio da pétala, LPET - largura média da pétala, APET - área média da pétala, CTCOLCA - comprimento médio do tubo da corola mais cálice, AFLO - área média da flor, DFLO - diâmetro médio da flor, CEL - comprimento médio do estilo, CO - comprimento médio do ovário e NSEVA - número médio de sementes por vagem. 57

Figura 6. *Boxplots* representando a diversidade genética via algoritmo Anosim (análise da similaridade) entre e dentro de oito grupos de genótipos de *C. roseus* pertencentes à Coleção de Trabalho da UFRRJ. 61

Figura 7. Contribuição relativa das variáveis quantitativas na estimação da diversidade genética da Coleção de Trabalho de *C. roseus* do DATS/IA/UFRRJ, conforme o método de Singh (1981). Legenda: NSEVA - número médio de sementes por vagem, NRT - número de ramos totais, AFO - área média foliar, BFO_s - produção de biomassa de folhas secas, AFLO - área média da flor, NRB - número de ramos na base da planta, ALT - altura da planta, APET - área média da pétala, CENP - comprimento médio de entrenó em ramos primários, DFLO - diâmetro médio da flor, CENS - comprimento médio de entrenó em ramos secundários, CTCOLCA - comprimento médio do tubo da corola mais cálice, CPE - comprimento médio do pecíolo, LPET - largura média da pétala, CEL - comprimento médio do estilo, CPET - comprimento médio da pétala, CO - comprimento médio do ovário e PCO - área de projeção da copa. 62

Figura 8. Preparação dos extratos alcaloídicos de *C. roseus*. A) Material vegetal em pó (1,5 g) extraído em 10 mL de etanol a 95%. B) Filtragem do extrato etanólico em papel filtro após 12 horas. C) Extrato etanólico armazenado em frasco previamente identificado. D) Extrato etanólico concentrado até um volume de 3 mL após ser submetido ao rotavapor (Buchi, R-215, Suíça) à 40 °C, 40 rpm e 200 mbar. E) Adição de 3 mL de hexano por 3 vezes. Após cada adição de hexano, agitou-se o tubo Falcon e descartou-se a fração hexânica. F) Funil de separação contendo a porção basificada mais 10 mL de clorofórmio. A cada adição de clorofórmio agitou-se o funil de separação e esgotou-se a fase alvo (fração clorofórmica). G) Tubo Falcon contendo a fração clorofórmica. H) Fração clorofórmica concentrada em rotavapor (Buchi, R-215, Suíça) à 40 °C, 40 rpm e 200 mbar. I) Extrato alcaloídico. J) Programação do liofilizador à 0,20 mbar e -94,5 °C por 24h. 72

Figura 9. Detecção qualitativa dos alcaloides em extratos de folhas de *C. roseus* através do reagente de Dragendorff. A) Formação de precipitado alaranjado, indicando a presença de alcaloides no genótipo UFRRJ VIN004/02(AUT). Não formação de precipitado alaranjado nos genótipos UFRRJ VIN007/14(PAB) (B), UFRRJ VIN013/21(PAB) (C) e UFRRJ VIN050/41(PAB) (D) e, portanto, foram negativos para a presença de alcaloides. 77

Figura 10. Cromatogramas normalizados em HPLC-DAD. Picos com mesma retenção e espectro dos alcaloides vindolina (VDL), catarantina (CAT) e vimblastina (VBL) em 14 genótipos de *C. roseus*. 79

Figura 11. Padrão de amplificação pelo *primer* (GACA)₄ de ISSR em gel de agarose de 14 genótipos de *C. roseus*. Ordem dos genótipos no gel (da esquerda para a direita): UFRRJ VIN004/01(AUT), UFRRJ VIN004/02(AUT), UFRRJ VIN004/03(AUT), UFRRJ VIN004/05(PAB), UFRRJ VIN005/07(PAB), UFRRJ VIN005/09(PAB), UFRRJ VIN007/13(PAB), UFRRJ VIN013/22(PAB), UFRRJ VIN013/25(PAB), UFRRJ VIN029/32(PAB), UFRRJ VIN029/34(PAB), UFRRJ VIN044/37(PAB), UFRRJ VIN044/39(PAB) e UFRRJ VIN056/48(AUT). 83

Figura 12. Dendrograma obtido a partir da dissimilaridade de Jaccard e método de agrupamento UPGMA entre 14 genótipos de *Catharanthus roseus* com desempenho superior para produção de biomassa de folhas secas (BFO_s). 84

Figura 13. Imagem indicando a estrutura da flor a ser observada nos descritores mínimos CH_{ql} (cor de halo), CZOL_{ql} (cor da zona do olho ao redor do halo), ZOLI_{ql} (zona do olho quanto a

profusão ou irradiação) e CZOI _{ql} (cor da zona do olho irradiada) após aplicação de filtro no <i>software</i> CorelDRAW Standard.	98
Figura 14. Dendrograma mostrando o agrupamento de 77 genótipos de vinca (<i>C. roseus</i>) com base em 15 descritores mínimos, utilizando a dissimilaridade multicategórica e o método do vizinho mais distante. O <i>heatmap</i> mostra as classes de descritores mínimos as quais cada genótipo pertence.	101
Figura 15. Percentuais de importância relativa de descritores na distinguibilidade de genótipos de vinca. Legenda: CFLO _{ql} (cor de flor), CZOI _{ql} (cor da zona do olho irradiada), CZOL _{ql} (cor da zona do olho ao redor do halo), AIFC _{qn} (ângulo médio de inserção da folha no caule), DFLO _{qn} (diâmetro médio da flor), NRB _{qn} (número de ramos na base da planta), CFO _{qn} (comprimento médio foliar), CRA _{ql} (cor dos ramos do caule), PPET _{ql} (posição entre as pétalas), FFO _{ql} (formato das folhas), LFO _{qn} (largura média foliar), CPE _{qn} (comprimento médio do pecíolo), ZOLI _{ql} (zona do olho quanto a profusão ou irradiação), FAFO _{ql} (formato do ápice das folhas) e CH _{ql} (cor de halo).	102
Figura 16. Distribuição dos descritores mínimos qualitativos propostos em 77 genótipos pertencentes à Coleção de Trabalho de vinca da UFRRJ. Legenda: CRA _{ql} (cor dos ramos do caule), FFO _{ql} (formato das folhas), PPET _{ql} (posição entre as pétalas), ZOLI _{ql} (zona do olho quanto a profusão ou irradiação), FAFO _{ql} (formato do ápice das folhas), CH _{ql} (cor de halo), CZOI _{ql} (cor da zona do olho irradiada), CZOL _{ql} (cor da zona do olho ao redor do halo) e CFLO _{ql} (cor de flor).	103
Figura 17. Distribuição dos descritores mínimos de origem quantitativa propostos em 77 genótipos pertencentes à Coleção de Trabalho de vinca da UFRRJ. Legenda: NRB _{qn} (número de ramos na base da planta), CPE _{qn} (comprimento médio do pecíolo), CFO _{qn} (comprimento médio foliar), LFO _{qn} (largura média foliar), AIFC _{qn} (ângulo médio de inserção da folha no caule) e DFLO _{qn} (diâmetro médio da flor).	105

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVOS GERAIS	3
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3.1. Capítulo I	4
3.2. Capítulo II	4
3.3. Capítulo III.....	4
4. JUSTIFICATIVAS	5
5. HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	5
6. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
6.1. Aspectos gerais de <i>Catharanthus roseus</i> [L.] G. Don	5
6.1.1. Descrição taxonômica, botânica e morfológica	5
6.1.2. Aspectos agronômicos de cultivo.....	6
6.2. Diversidade genética.....	10
6.2.1. Marcadores moleculares.....	14
6.2.2. Diversidade genética em <i>Catharanthus roseus</i> [L.] G. Don.....	16
6.3. Aspectos gerais da vinca (<i>Catharanthus roseus</i> [L.] G. Don) associados ao melhoramento genético	18
6.3.1. Cultivares utilizadas para fins medicinais na espécie <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don.....	23
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
Capítulo I. Diversidade genética baseada em caracteres morfoagronômicos entre genótipos de vinca (<i>Catharanthus roseus</i> [L.] G. Don).	40
RESUMO.....	40
1. INTRODUÇÃO	42
2. MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1. Implantação da Coleção de Trabalho de vinca da UFRRJ	43
2.2. Localização do experimento e material vegetal.....	44
2.3. Idealização e desenvolvimento dos descritores morfoagronômicos	44
2.4. Caracterização morfoagronômica da Coleção de Trabalho de vinca.....	45
2.5. Análises estatísticas	47
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
3.1. Idealização e desenvolvimento dos descritores morfoagronômicos	48
3.2. Caracterização morfoagronômica da Coleção de Trabalho de vinca.....	49
3.3. Definição dos descritores a serem utilizados nas análises da diversidade.....	53
3.4. Análise de agrupamento.....	54

3.5. Padrões de agrupamento dos genótipos em relação aos descritores morfoagronômicos	56
3.6. Estimação da diversidade genética baseada em caracteres morfoagronômicos	60
3.7. Importância relativa das variáveis na diversidade genética	61
4. CONCLUSÃO	63
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
Capítulo II. Identificação de genótipos de vinca (<i>Catharanthus roseus</i> [L.] G. Don) visando a produção de alcaloides.	68
RESUMO	68
1. INTRODUÇÃO	70
2. MATERIAL E MÉTODOS	71
2.1. Material vegetal, condições experimentais e local da pesquisa	71
2.2. Produção de biomassa de folhas secas (BFO _s) dos genótipos da Coleção de Trabalho..	71
2.3. Detecção qualitativa dos alcaloides por meio do reagente de Dragendorff	71
2.4. Extração de Alcaloides	72
2.4.1. Preparação das amostras	73
2.4.2. Instrumento cromatográfico e condições de análise	73
2.5. Identificação dos alcaloides através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detecção de Arranjo de Fotodiodos (HPLC-DAD)	73
2.6. Análise quantitativa dos alcaloides através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detecção de Arranjo de Fotodiodos (HPLC-DAD)	73
2.6.1. Preparo dos padrões e da curva de calibração	73
2.6.2. Quantificação do teor e cálculo da produção dos alcaloides por genótipo	74
2.7. Análise da diversidade genética via marcador de DNA do tipo ISSR	74
2.7.1. Coleta e extração de DNA genômico	74
2.7.2. Seleção de <i>primers</i> ISSR	74
2.7.3. Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)	75
2.7.4. Fotodocumentação e obtenção da matriz binária	75
2.8. Análises estatísticas	75
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
3.1. Avaliação da produção de biomassa de folhas secas (BFO _s) da Coleção de Trabalho	76
3.2. Detecção qualitativa dos alcaloides por meio do reagente de Dragendorff	76
3.3. Análise quantitativa dos alcaloides através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detecção de Arranjo de Fotodiodos (HPLC-DAD)	77
3.3.1. Curvas de calibração dos padrões dos alcaloides catarantina (CAT), vindolina (VDL) e vimblastina (VBL)	77
3.3.2. Quantificação do teor e cálculo da produção dos alcaloides catarantina (CAT), vindolina (VDL) e vimblastina (VBL) por genótipo	78

3.4. Análise da diversidade genética via marcador de DNA do tipo ISSR.....	82
4. CONCLUSÃO.....	85
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
Capítulo III. Proposição de descritores mínimos para a vinca (<i>Catharanthus roseus</i> [L.] G. Don).....	92
RESUMO.....	92
1. INTRODUÇÃO	94
2. MATERIAL E MÉTODOS	95
2.1. Localização da pesquisa.....	95
2.2. Material vegetal e condições experimentais	95
2.3. Desenvolvimento dos descritores e caracterização das plantas	95
2.3.1. Verificação da normalidade dos dados e padronização dos descritores quantitativos	98
2.3.2. Análise de multicolinearidade na matriz de dados quantitativos	98
2.3.3. Categorização de descritores quantitativos em descritores qualitativos	98
2.4. Análise de agrupamento.....	99
2.5. Percentual de ocorrência das classes dos descritores mínimos.....	99
2.6. Importância relativa dos descritores mínimos	99
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
4. CONCLUSÃO.....	106
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
6. ANEXO.....	110

1. INTRODUÇÃO GERAL

A espécie *Catharanthus roseus* [L.] G. Don, conhecida popularmente no Brasil como vinca ou maria-sem-vergonha, tem seu centro de origem na ilha de Madagascar (ALLORGE *et al.*, 2015; KULKARNI *et al.*, 2016). A vinca, pertencente à família Apocynaceae, é diploide, com $2n = 2x = 16$ cromossomos (GUIMARÃES *et al.*, 2012), e caracteriza-se por ser semi-herbácea, de porte subarbustivo, rápido crescimento e ciclo de vida perene (MORGAN, 1994). As plantas da espécie alcançam até um metro de altura, com raízes que chegam a se estender até 70 cm de profundidade (NEJAT *et al.*, 2015).

A vinca chama a atenção pela sua imensa diversidade nos aspectos foliares e florais. As pétalas das flores variam entre branco, rosa-escuro, malva e o rosa tradicional (NEJAT *et al.*, 2015). Por isso, no Brasil e no mundo, *C. roseus* é amplamente utilizada como planta ornamental, sendo cultivada em jardins ou diretamente em vasos. As diferentes cultivares ornamentais são geralmente organizadas em séries, e o agrupamento subsequente é baseado na cor da corola (SCHMELZER & GURIB-FAKIM, 2008).

Além de sua importância ornamental, a vinca é responsável pela produção de mais de 130 tipos diferentes de alcaloides denominados TIAs (*Terpenoid Indole Alkaloids*) (ZHU *et al.*, 2015). Entre os principais TIAs, destacam-se os alcaloides diméricos vincristina e a vimblastina. Segundo Zhu *et al.* (2014), a vimblastina é sintetizada pela planta a partir do acoplamento dos alcaloides monoméricos catarantina e vindolina, levando à α -3',4'-anidrovimblastina, a qual é convertida em vimblastina e esta em vincristina. Estes dois últimos alcaloides estão presentes nas folhas das plantas de vinca (MISHRA *et al.*, 2001).

Os alcaloides diméricos vincristina e a vimblastina são substâncias antineoplásicas e, portanto, utilizadas no tratamento convencional de diversos tipos de câncer. A ação desses anticancerígenos suprime a dinâmica dos microtúbulos, o que resulta em lentidão ou bloqueio da mitose na transição da metáfase para anáfase e indução da apoptose (JORDAN & WILSON, 2004; BRANDÃO *et al.*, 2010). O sulfato de vimblastina (comercializado como Velban) é usado no tratamento convencional da doença de Hodgkin's, linfossarcoma, coriocarcinoma, neuroblastoma, carcinoma de mama e pulmões. Já o sulfato de vincristina (vendido como Oncovin) é utilizado no tratamento da leucemia em crianças, leucemia linfocítica, doença de Hodgkin's, tumor de Wilkins, neuroblastoma e sarcoma de células reticulares (ASLAM *et al.*, 2010).

É preciso mencionar que a vincristina e vimblastina ocorrem em baixas concentrações nas folhas de *C. roseus*. De acordo com Prota (2015), em 1 tonelada de material seco são extraídos apenas 3 g de vincristina. Já, conforme Tyler (1988), em 1 tonelada de material vegetal seco extrai-se cerca de 1 g de vimblastina e 20 mg de vincristina. Uma hipótese para os reduzidos níveis desses alcaloides é a separação espacial dos locais biossintéticos. Os precursores biossintéticos, catarantina e vindolina, são produzidos em regiões distintas nas folhas. A catarantina se acumula inteiramente nos exsudatos de cera na superfície da folha, enquanto a vindolina é produzida dentro de células especializadas da folha chamadas de idioblastos e canais laticíferos (YU & DE LUCA, 2013).

O valor de mercado anual da vincristina e vimblastina variou entre US\$ 1.000.000 e 3.500.000 por quilograma no ano de 2016 (ALAM & SHARAF-ELDIN, 2016). O mercado de alcaloides da vinca foi de US\$ 85 milhões em 2022 e deve atingir US\$ 156,32 milhões até 2031, exibindo uma taxa de crescimento de 7,0% durante o período de previsão (BUSINESS RESEARCH INSIGHTS, 2024). A catarantina pode crescer a um CAGR (*Compound Annual Growth Rate*) de 3,6% durante 2021-2026 (INDUSTRYARC ANALYTICS RESEARCH CONSULTING, 2024).

Os preços desses alcaloides são muito elevados como resultado do baixo nível de produção da planta e dificuldade de síntese em laboratório devido a suas estruturas complexas

(BARRALES-CUREÑO *et al.*, 2020). Segundo Verma *et al.* (2007), a síntese total revelou-se difícil devido à complexidade estrutural das moléculas e às complicadas etapas de reação envolvendo restrições estereoquímicas. A cadeia de fornecimento mundial, por exemplo, de vimblastina e vincristina depende da extração e purificação de baixo rendimento dos precursores vindolina e catarantina provenientes das plantas de *C. roseus* (ISHIKAWA *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2022). Porém, isso tem tornado o custo de produção extremamente alto (ALAM & SHARAF-ELDIN, 2016).

Os países desenvolvidos têm concentrado grandes esforços na tentativa de se produzir vincristina e vimblastina em explantes via cultivo *in vitro* (KULKARNI *et al.*, 2016). Segundo Verpoorte *et al.* (1991), os teores de vincristina e vimblastina em cultivos *in vitro* são, geralmente, inferiores do que a da própria planta. Para Hemmati *et al.* (2021), o cultivo *in vitro* não tem sido eficaz ou adequado para se produzir vimblastina em larga escala. Os motivos da baixa produção de metabólitos secundários em cultivos *in vitro*, segundo Dias *et al.* (2016), podem ser devidos ao encurtamento das fases de diferenciação tecidual que ocorrem nestes métodos, o que força a inibição da atividade de algumas enzimas responsáveis por tal diferenciação.

A despeito desses entraves, Schlaepfer e Mendoza (2010) mencionaram que a produção comercial em larga escala da vincristina e vimblastina pode ser perfeitamente implementada através do cultivo das plantas no campo. Portanto, a implementação de programas de melhoramento para este propósito corresponde a uma excelente estratégia. A seleção de genótipos com alto rendimento e alta produção de metabólitos de interesse deve ser o principal alvo do melhoramento genético quando se pretende a produção de medicamentos.

Nesse sentido, existe uma demanda sobre pesquisas que visam o melhoramento genético da vinca. Para isso, é necessário, primeiramente, conhecer e estimar a diversidade genética entre genótipos de *C. roseus*. No melhoramento de plantas, a existência de alta diversidade genética é fator primordial para o sucesso no processo de seleção e, portanto, para a continuidade de programas de melhoramento (ALLARD, 1960; REIS *et al.*, 2015; CARENA, 2021; SALGOTRA & CHAUHAN, 2023; SANCHEZ *et al.*, 2023). Deste modo, é necessário avaliar a diversidade dos recursos genéticos disponíveis para o melhoramento, visto que é imprescindível que o germoplasma inicial apresente diversidade genética.

No intuito de se estimar a diversidade genética entre genótipos, estes devem ser caracterizados e avaliados. Tal caracterização pode ser morfoagronômica, pois segundo Cruz *et al.* (2020), a análise da diversidade pode ser acessada através de diferenças agronômicas e morfológicas entre os genótipos analisados. Tais diferenças são quantificadas em alguma medida de distância (de dissimilaridade ou similaridade) capaz de expressar o grau de divergência genética.

Alguns autores estimaram a diversidade genética em *C. roseus* através de análises ao nível fenotípico (MISHRA *et al.*, 2001; SAMIYARSIH *et al.*, 2019; SOARES *et al.*, 2024). Mishra *et al.* (2001), ao estudarem a diversidade genética por meio de variáveis morfoagronômicas entre 32 acessos de *C. roseus*, relataram uma base genética estreita nas populações do subcontinente indiano e na região asiática vizinha. Sabe-se que uma população de plantas com baixa diversidade genética implica na redução da eficiência da seleção e, assim, compromete o programa de melhoramento genético.

Além das informações relacionadas aos aspectos morfológicos e agronômicos das plantas de vinca, a utilização de informações ao nível molecular torna a estimativa da diversidade genética ainda mais precisa. A precisão na obtenção dessas estimativas é ainda mais necessária quando o melhorista pretende utilizá-las para se explorar a heterose em uma dada cultura. Neste caso, cruzamentos (ou hibridações) entre genótipos superiores são programados. De acordo com Shull (1952), a heterose ocorre quando o F_1 é superior aos seus pais. Isso,

logicamente, resulta em ganhos genéticos na progênie. A heterose tem a diversidade genética como preditor.

Trabalhos relacionados a estimação da diversidade molecular podem lançar mão do uso dos marcadores de DNA, que estão entre as principais ferramentas moleculares para se realizar genotipagens. A utilização de marcadores de DNA baseados em PCR (*Polymerase Chain Reaction*), como é o caso dos marcadores do tipo ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), são bastante adequados para a análise da diversidade molecular em plantas. Tais marcadores agregam as seguintes vantagens: não há necessidade de conhecimento prévio dos genomas analisados, evitando a necessidade do sequenciamento de DNA (ZOLET *et al.*, 2017); é potencial gerador de alto polimorfismo entre os genótipos analisados; por apresentar hibridização em regiões inter-microsatélites no genoma, são de ampla cobertura genômica (MEYER *et al.*, 1993).

Em vinca, estudos apontam para o uso de marcadores ISSR na estimação da diversidade molecular (SHAW *et al.*, 2009; LAL *et al.*, 2011; QING *et al.*, 2011; AMORIM *et al.*, 2023). Em todos os casos, os resultados indicaram um alto nível de polimorfismo na espécie em questão. É possível que a predominância da alogamia como modo de reprodução preferencial em vinca (AMORIM *et al.*, 2023) contribua para a ampliação desta diversidade. A constatação de alta diversidade genética na vinca sugere a possibilidade da seleção de genótipos superiores.

Atualmente, no Brasil, existem 127 cultivares de vinca registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (BRASIL, 2024), todas elas destinadas para fins ornamentais. Vale destacar que não há uma lista de descritores mínimos para a vinca disponível no Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC), vinculado ao MAPA. O SNPC é o órgão competente para proteção de cultivares no Brasil, responsável, entre outras atribuições, pela divulgação das espécies vegetais e seus respectivos descritores mínimos, necessários para abertura do processo de proteção, conforme o Decreto nº 2.366/1997 (RAMOS *et al.*, 2018).

As listas de descritores mínimos devem conter um conjunto mínimo de descritores altamente discriminatórios (BIOVERSITY INTERNATIONAL, 2007). Para Irastorza (1983), a descrição de uma variedade deve contribuir para solucionar conflitos de identificação que possam surgir no registro e proteção de cultivares, nos campos de produção de sementes e na sua comercialização. Com base nesses antecedentes, o presente estudo pode contribuir com informações para a proposição de uma lista de descritores mínimos padronizados para a espécie *C. roseus*, com o objetivo de distinguir claramente os genótipos de vinca.

2. OBJETIVOS GERAIS

A presente pesquisa teve por objetivo conhecer e estimar a diversidade genética entre 79 genótipos, pertencentes à Coleção de Trabalho de vinca da UFRRJ, com base em variáveis morfoagronômicas. Além disso, avaliou-se a produção de biomassa de folhas secas (BFO_s) em 79 genótipos de vinca e, em seguida, foram selecionadas as melhores plantas para esta variável. Em tais plantas, buscou-se conhecer o potencial da produção dos alcaloides catarantina (CAT), vindolina (VDL), vincristina (VCR) e vimblastina (VBL), além de estimar a diversidade molecular verificada através de marcadores de DNA do tipo ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). Por fim, pretendeu-se propor uma lista de descritores mínimos para a cultura da vinca, cujo propósito é distinguir genótipos de *C. roseus*.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcançar os objetivos gerais, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos, delimitados por capítulo.

3.1. Capítulo I

- i) Conhecer o comportamento dos genótipos em relação a cada um dos descritores propostos;
- ii) Elencar os descritores mais discriminativos pelo método do cosseno quadrado;
- iii) Conhecer e discutir os padrões de agrupamento dos genótipos em relação aos descritores elencados para estudo;
- iv) Estimar a diversidade genética total através dos índices de Shannon (H') e de Pielou (J');
- v) Mensurar a divergência genética entre e dentro de grupos via análise de similaridade (Anosim);
- vi) Conhecer e estimar a importância relativa das variáveis na análise da diversidade genética pelo método de Singh.

3.2. Capítulo II

- i) Avaliar a produção de biomassa de folhas secas em 79 genótipos de vinca e, em seguida, selecionar as melhores plantas para esta variável;
- ii) Verificar a presença de alcaloides em 79 genótipos, com base na detecção qualitativa observada através do reagente de Dragendorff;
- iii) Quantificar em HPLC-DAD (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detecção de Arranjo de Fotodiodos) o teor dos alcaloides vincristina, vimblastina, vindolina e catarantina nos genótipos positivos para alcaloides e com boa performance na produção de biomassa de folhas secas;
- iv) Estimar a produção dos alcaloides vincristina, vimblastina, vindolina e catarantina por genótipo, a partir das estimativas de produção de biomassa foliar seca e do teor de vincristina, vimblastina, vindolina e catarantina;
- v) Estimar a diversidade genética utilizando marcadores de DNA do tipo ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) entre os genótipos positivos para a presença de alcaloides e com bom desempenho na produção de biomassa de folhas secas.

3.3. Capítulo III

- i) Idealizar uma lista de descritores mínimos, utilizando-se como base as listas de descritores disponíveis na literatura, e através de descritores idealizados de forma inédita para a cultura da vinca;
- ii) Elencar e elaborar descritores para compor a lista de descritores mínimos utilizando os seguintes critérios: entendimento, por parte do usuário, da metodologia que norteia a aplicação do descritor e a sua eficiência em descrever a estrutura alvo, retornando valores mais homogêneos possíveis dentro da planta;
- iii) Adaptar, desenvolver e padronizar os descritores mínimos, conforme o *Bioversity International*;
- iv) Submeter os descritores mínimos quantitativos ao teste de multicolinearidade;
- v) Categorizar os descritores quantitativos em descritores qualitativos;
- vi) Verificar a multicolinearidade da matriz contendo todos os descritores mínimos, isto é, os de origem quantitativa e os qualitativos;
- vii) Submeter todos os descritores mínimos à análise de agrupamento e, assim, observar a separação dos genótipos de *C. roseus* no dendrograma;
- viii) Conhecer o percentual de ocorrência das classes dos descritores mínimos no germoplasma analisado;
- xi) Submeter os descritores mínimos à análise da importância relativa das variáveis.

4. JUSTIFICATIVAS

A Tese de Doutorado justifica-se principalmente pelos baixos teores dos alcaloides vincristina e vimblastina na espécie *C. roseus*. Portanto, este estudo pode ser um importante ponto de partida para se conhecer a produção de biomassa de folhas secas e dos alcaloides vincristina e vimblastina, bem como de seus precursores catarantina e vindolina. Neste sentido, é uma oportunidade de se identificar o potencial de produção destes metabólitos secundários, e assim, conhecer o real valor dos genótipos analisados no presente trabalho.

5. HIPÓTESE CIENTÍFICA

A diversidade genética entre genótipos de *C. roseus*, evidenciada por características morfoagronômicas e moleculares, permite conhecer o potencial da produção de biomassa foliar seca e dos alcaloides catarantina, vindolina, vincristina e vimblastina nos genótipos analisados. Além disso, os descritores mínimos propostos possibilitam distinguir claramente as plantas de vinca.

6. REVISÃO DE LITERATURA

6.1. Aspectos gerais de *Catharanthus roseus* [L.] G. Don

6.1.1. Descrição taxonômica, botânica e morfológica

A espécie *C. roseus* no Brasil é conhecida popularmente como vinca, maria-sem-vergonha, boa-noite, boa-tarde, lavadeira ou vinca-de-gato. Já na língua inglesa, é costumeiramente chamada de *Madagascar Periwinkle* ou simplesmente de *Periwinkle*. É uma espécie pertencente à família Apocynaceae e ao gênero *Catharanthus*, composto por 8 espécies (ALLORGE *et al.*, 2015); sete das quais são: *C. roseus*; *C. ovalis* Markgraf; *C. trichophyllus* (Baker) Pichon; *C. longifolius* (Pichon) Pichon; *C. coriaceus* Markgraf; *C. lanceus* (Bojer ex A. DC.) Pichon; *C. scitulus* (Pichon) Pichon originárias de Madagascar, e *C. pusillus* (Murray) G. Don, nativo da Índia (STEARN, 1975; NEJAT *et al.*, 2015).

A vinca é uma planta perene, semi-herbácea ou herbácea, com crescimento rápido, cuja altura varia de 75 cm - 1,00 m, sub-lenhosa na base e muito ramificada (NEJAT *et al.*, 2015; KULKARNI *et al.*, 2016). Seu caule é arredondado, verde ou amarelo, às vezes vermelho ou roxo, levemente penugento (pubescente) ou glabro. É uma planta ereta ou decumbente, geralmente com látex no caule e suas raízes podem atingir até 70 cm de comprimento (PLAIZIER, 1981). Nas raízes desta espécie estão presentes alcaloides anti-hipertensivos denominados de serpentina, ajmalicina e reserpina (KUMAR *et al.*, 2014a). Tais alcaloides são utilizados no tratamento da pressão arterial e outros tipos de doenças cardiovasculares (PANDEY, 2017).

As folhas são opostas, usualmente elípticas a oblongas, com comprimento e largura de 2,50 - 9,00 e 1,00 - 3,50 cm, respectivamente. Estas folhas estão conectadas a pecíolos verdes ou vermelhos, curtos, de 1,00 - 1,80 cm de comprimento. A superfície adaxial apresenta coloração verde intenso, enquanto na superfície abaxial predomina o verde pálido, com nervura central também pálida (NEJAT *et al.*, 2015). A extremidade da folha é arredondada ou aguda, com um pequeno ponto que se prolonga a partir da nervura central, geralmente são pubescentes, porém, às vezes, sem pelos (TOLAMBIYA & MATHUR, 2016).

Os alcaloides presentes nas folhas ocorrem em quantidades muito pequenas: vincristina em até 3 g.ton⁻¹ de material vegetal seco e vimblastina em uma quantidade ligeiramente maior (PROTA, 2015). Em contraponto, Tyler (1988) descreveu concentrações de vimblastina e

vincristina de 1 g.ton⁻¹ e 20 mg.ton⁻¹ de material vegetal, respectivamente. Segundo Liscombe e O'Connor (2011), a vimblastina e a vincristina estão presentes nas folhas das plantas em quantidades vestigiais de 0,0003 a 0,01%. O alto custo no processo de extração e purificação é devido as baixas concentrações destes metabólitos secundários na parte aérea da planta. De acordo com Loyola-Vargas *et al.* (2004), o processo de extração e purificação de 1,0 (um) grama de vincristina foi estimado em US\$ 3,5 milhões de dólares. De acordo com Barrales-Curreñó *et al.* (2019), estima-se que 1g de vincristina trata uma criança em quimioterapia por apenas 6 semanas.

Segundo Kulkarni *et al.* (2016), as flores são hermafroditas, actinomorfas, completas e pentâmeras. Apresentam cores variando de branco, rosa escuro e malva, à rosa tradicional (NEJAT *et al.*, 2015). As sépalas são livres e ligeiramente fundidas na base com 3 - 5 mm de comprimento, eretas e verdes. A corola é cilíndrica de 2 - 3 cm de comprimento, alargando-se perto do topo na inserção dos estames e pode apresentar inúmeras cores: rosa, roxo ou branco com um centro roxo, vermelho, rosa, amarelo pálido ou branco (FLORA OF CHINA EDITORIAL COMMITTEE, 2015; PROTA, 2015).

Os estames, inseridos na parte mais larga do tubo da corola, são pequenos, com 0,25 - 0,50 mm de comprimento. Todas as anteras (cinco) são livres, oblongas e obtusas na base, com uma dimensão de 2,30 - 3,00 a 1,00 - 1,30 mm (PLAIZIER, 1981). Amorim *et al.* (2023) constatarem uma média de 2.209,80 grãos de pólen por antera e 11.049,00 grãos de pólen por botão floral em *C. roseus*. Segundo estes mesmos autores, a porcentagem média de grãos de pólen viáveis nos botões florais foi igual a 96,50%.

O estigma é capitado, isto é, em forma de cabeça com pequenos pelos na parte superior e possui uma membrana em forma de xícara na parte basal do estigma (KULKARNI *et al.*, 2016). Entre o estigma e as anteras existe uma separação espacial, fenômeno conhecido como hercogamia (KULKARNI & BASKARAN, 2013). De acordo com Miyajima (2004), a vinca possui morfologia floral única, com anteras e estigmas não visíveis no exterior das flores.

Os pistilos variam de 17 a 26 mm de comprimento, compostos por dois carpelos estreitos, longos e triangulares, consistindo em estigma, estilo longo e ovário (NEJAT *et al.*, 2015). Os óvulos são numerosos, cerca de 10 a 30, em duas séries em cada carpelo (KULKARNI *et al.*, 2016). No trabalho de Amorim *et al.* (2023), o número de óvulos por botão floral variou de 28,00 a 41,80 em *C. roseus*, com média de 34,78 óvulos.

O fruto é composto por dois folículos cilíndricos longos, divergentes ou paralelos, de 2,00 - 4,70 cm de comprimento, contendo de 10 - 30 sementes, deiscentes na maturidade. As sementes são pequenas com 1,50 - 3,00 mm de comprimento, oblongas, cilíndricas, não ariladas, e com hilo em uma depressão longitudinal (TOLAMBIYA & MATHUR, 2016; KULKARNI *et al.*, 2016). O número médio de sementes por vagem produzidas por polinização aberta em botões florais emasculados e o número de sementes produzidas por autofecundação natural foi de 11,45 e 7,78 em genótipos de vinca, respectivamente (AMORIM *et al.*, 2023).

6.1.2. Aspectos agronômicos de cultivo

No que diz respeito aos aspectos agronômicos existem poucas referências na literatura para a espécie *C. roseus* (FERREIRA, 2003). Apenas 6,30% das publicações destinaram-se a estabelecer um manejo adequado à vinca (JHANG *et al.*, 2022). As pesquisas nas últimas décadas se concentraram nas propriedades fitoquímicas e terapêuticas da vinca, ao passo que poucos estudos foram realizados sobre aspectos agronômicos e genéticos (NEJAT *et al.*, 2015). O cultivo desta espécie pode ser realizado para duas diferentes finalidades, isto é, uma como planta ornamental e outra para fins medicinais (SENBAGALAKSHMI *et al.*, 2017).

A espécie *C. roseus* é cultivada comercialmente para fins medicinais na Espanha, Estados Unidos, China, África, Austrália, Índia e Sul da Europa (VAN DER HEIJDEN *et al.*,

2004; DAS *et al.*, 2017). O mercado de folhas desta espécie possui grande destaque nos Estados Unidos e países da Europa Oriental, como a Hungria (BARRALES-CUREÑO *et al.*, 2019). Na Índia, as áreas de produção já somaram mais de 3000 hectares (FAROOQI & SREERAMU, 2001). No Brasil, não há relatos na literatura de plantios comerciais da cultura para fins medicinais.

A vinca apresenta distribuição cosmopolita, se desenvolvendo em climas variados. Porém, seu crescimento é facilitado em regiões tropicais e subtropicais (NMPB, 2014). É considerada autóctone das Índias Ocidentais, mas foi originalmente descrita em Madagascar (ROSS, 1999). De acordo com Kulkarni *et al.* (2016), a vinca enfrenta dificuldades de adaptação em países de clima temperado, já em clima tropical a espécie se adapta muito bem.

Acredita-se que a melhor temperatura para o crescimento da vinca seja de 25°C (PRABHU & RAJESWARI, 2017). Porém, Jhang *et al.* (2022) afirmaram que algumas plantas de vinca podem suportar até 45°C. Guo *et al.* (2007) observaram que a síntese de vindolina, catarantina e vimblastina foi favorecida pelo aumento da temperatura de 30°C para 40°C, sendo os máximos teores de vindolina e vimblastina observados apenas duas horas após o início da exposição das mudas à temperatura de 40°C, enquanto o máximo teor de catarantina foi atingido após quatro horas de exposição. Segundo estes mesmos autores, a temperatura pode ser uma ferramenta útil para a promoção do aumento do conteúdo de alcaloides nas plantas de vinca.

A cultura se desenvolve em uma grande variedade de solos, exceto aqueles excessivamente alcalinos ou encharcados (FAROOQI & SREERAMU, 2001; PANDEY, 2017). São preferidos os solos com pH de 5,5 - 6,5, ricos em húmus e de fertilidade média. Neste tipo de solo não há apenas um melhor desenvolvimento das raízes, mas também se torna fácil tirá-las no momento da colheita (NMPB, 2014; PROTA, 2015). Pandey (2017) mencionou que os solos profundos arenosos e argilosos, de fertilidade moderada, são os preferidos para o cultivo em larga escala de *C. roseus*.

No que se refere ao plantio e propagação da espécie é igualmente possível por sementes e estacas (NARKIEWICZ & SADOWSKA, 1991; PANDEY, 2017). Em regiões de clima tropical e subtropical, consideradas mais adequadas para o cultivo de vinca, as sementes são depositadas diretamente no solo (MAITI *et al.*, 2000). Já em regiões temperadas devem ser propagadas por estacas, previamente preparadas em casa de vegetação (SADOWSKA, 1989). Esses diferentes métodos de propagação não tiveram influência sobre o rendimento dos alcaloides (PAREEK *et al.*, 1985). A taxa de semeadura para as sementes depositadas diretamente no solo e para as mudas transplantadas é de 2 - 3 kg/ha e 0,5 kg/ha, respectivamente (GUPTA, 1977).

As sementes geralmente exibem um período de dormência de 3 a 4 semanas e se mantém viável cerca de 12 a 18 meses à temperatura ambiente em condições tropicais e subtropicais (KULKARNI *et al.*, 2016). De acordo com Pandey (2017), as sementes permanecem viáveis por 3 a 5 anos, se armazenadas adequadamente. O espaçamento preconizado no plantio das sementes é de 45 x 30 cm ou 45 x 45 cm. Já para mudas, de 45 a 60 dias de idade, adota-se um espaçamento de 45 x 20 cm (NEJAT *et al.*, 2015). A densidade de plantio mais recomendada é de 75.000 plantas/ha (MAITI *et al.*, 2000).

Após o plantio, a vinca atinge o ápice da sua fase adulta na floração, sendo a fase vegetativa muito curta. A floração começa quando as plantas têm aproximadamente de 10 a 15 cm de altura ou cerca de 10 semanas de idade e continuam a florescer constantemente. As flores aparecem em pares nas axilas das folhas. Os pares de flores nunca estão no mesmo estágio de desenvolvimento, isto é, a antese de uma flor ocorre por volta de 2 a 3 dias antes da outra. A corola permanece conectada à planta por 2 a 3 dias, mas, geralmente, entra em senescência antes que o fruto se torne visível. O fruto (folículo) atinge a maturidade em 4 a 5 semanas (KULKARNI *et al.*, 2016).

No manejo do cultivo da vinca destaca-se a adubação, uma vez que a nutrição mineral pode exercer influência no teor de alcaloides (JANA, 1996). Por serem compostos nitrogenados, espera-se que a síntese e acúmulo de alcaloides pelas plantas sejam fortemente influenciadas pela adubação nitrogenada (SREEVALLI *et al.*, 2004).

Sreevalli *et al.* (2004) estudaram três genótipos de vinca, sendo eles a variedade Nirmal e dois mutantes superiores em produção de alcaloides identificados como NEU1-7 (superior em produção de alcaloides foliares) e NEU24-17 (superior em produção de alcaloides radiculares). Tais genótipos foram estudados sob três doses de adubação nitrogenada (0, 100 e 150 kg/ha) na forma de ureia. Os três genótipos apresentaram aumento no conteúdo de alcaloides totais nas folhas com o aumento dos níveis de nitrogênio. Dessa maneira, o genótipo NEU 24-17 foi o que exibiu maior concentração de alcaloides nas folhas, sendo 87% maior que a variedade Nirmal com nível de nitrogênio igual a zero. Neste estudo, a produção de biomassa também aumentou concomitantemente ao aumento dos níveis de nitrogênio.

Hassan *et al.* (2009) encontraram maior rendimento de vincristina e vimblastina na dose de 150 kg/ha, mesmo resultado observado nos trabalhos desenvolvidos por Gholamhosseinpour *et al.* (2011) e Rajeswara Rao e Singh (1990). No que se refere ao momento de aplicação, Gupta (1977) mencionou que o nitrogênio pode ser fornecido em duas parcelas (15 e 45 dias após o plantio), enquanto Hedge (1986) propôs três aplicações (1/3 no plantio, 1/3 aos 60 dias e 1/3 aos 120 dias após o plantio).

Com relação a outros macronutrientes, como fósforo e potássio, estes apresentaram um menor efeito sobre o rendimento dos alcaloides (LATA, 2007). O teor de alcaloides tende a reduzir à medida que as doses de potássio na adubação aumentam (WALLER & NOWACKI 1978). Hassan *et al.* (2009) estudaram o efeito da adubação potássica e confirmaram esta relação inversa. Embora os parâmetros agrônômicos tenham sido superiores nas maiores doses de nitrogênio e potássio, os maiores teores de vincristina e vimblastina foram obtidos com as menores doses de potássio.

Em relação às necessidades hídricas, Naeem *et al.* (2017) descreveram que a cultura se estabelece bem com precipitação média anual de 800 a 1400 mm. As plantas de vinca são tolerantes à seca, no entanto, secas severas podem comprometer o crescimento das plantas e a produção de alcaloides (BARKAT *et al.*, 2017). Sreevalli *et al.* (2000) estudaram dois mutantes com altos teores de alcaloides e a variedade Nirmal sob quatro tratamentos de regimes hídricos, que consistiram em irrigação uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas e uma vez a cada quatro semanas. Neste estudo, observaram-se que a biomassa foliar e radicular foi maior na variedade Nirmal, sob o regime de irrigação uma vez por semana.

Ahmed e El-Hassen (2001) observaram em duas cultivares de *C. roseus* que, com o aumento do intervalo de irrigação, a altura da planta foi significativamente reduzida; já o número de ramos, o peso seco de raízes, a produção de folhas e o conteúdo de alcaloides foram maiores. Frischknecht *et al.* (1987) monitoraram produção de alcaloides da vinca frente a condições de seca e os resultados mostraram diminuição do rendimento de alcaloides sob estresse hídrico.

A produtividade de folhas e raízes com irrigação é de 1,5 ton/ha e 0,5 ton/ha, respectivamente, enquanto o rendimento de folhas e raízes sob condições de chuva é de 0,75 ton/ha (NMPB, 2014). Segundo Pandey (2017), o rendimento de raízes secas, caules e folhas por hectare de terra irrigada para a colheita é de 1,5, 1,0 e 3,0 toneladas, respectivamente. A colheita da vinca, para folhas e raízes, realiza-se cerca de 12 meses a partir da semeadura. Esta atividade é efetuada arrancando-se toda a planta, porém as raízes são separadas do resto da planta e ambas as partes são processadas separadamente. Se houver apenas demanda por folhas, realizam-se duas colheitas, a primeira aos 6 meses e a segunda aos 9 meses, após a semeadura (PROTA, 2015).

Levy *et al.* (1983) relataram que o período ótimo de colheita se dá no alongamento da vagem ao observarem o comportamento dos componentes da parte aérea e da produção de ajmalicina nas raízes, em diferentes linhagens e híbridos de vinca. Nesta fase, o teor de ajmalicina das raízes e o peso das folhas atingiram seus máximos. Além disso, os referidos autores verificaram significativas correlações fenotípicas e ambientais entre os pesos da folha e da raiz. Dessa maneira, é possível o uso duplo da planta, ou seja, folhas para produção de outros alcaloides e raízes para a produção de ajmalicina.

Além dos aspectos de cultivo, é preciso mencionar as principais doenças encontradas na espécie *C. roseus*, já que são fatores limitantes para diversas plantas de interesse econômico. Vários patógenos de origem fúngica, viral e micoplasmática já foram relatados na espécie (PANDEY, 2017).

De acordo com Alves (2016), no Brasil, já foram relatados os seguintes fungos patogênicos relacionados à vinca: *Cercospora* sp. (mancha foliar), *Colletotrichum siamensi* (necrose nas hastes), *Colletotrichum truncatum* (mancha foliar), *Corynespora cassiicola* (mancha alvo) e *Lasiodiplodia theobromicola* (podridão de colo). Já Reis e Henrique (2007) relataram os seguintes fungos: *Phytophthora nicotianae* e *Rhizoctonia solani*. No banco de dados “Fungos Relatados em Plantas no Brasil”, *Botryosphaeria ribis* (Fuckel) Petr., *Botryosphaeria berengeriana* De Not., *Dothiorella ribis* (Fuckel) Sacc. e *Podosporium ribis* Fuckel foram listados como fitopatógenos na vinca (MENDES & URBEN, 2024).

A podridão do colo ou tombamento, causada por *Pythium aphanidermatum*, é uma das doenças mais devastadoras em vinca. Ela ocorre especialmente nas regiões tropicais e subtropicais, quando há estação chuvosa. Este patógeno causa podridão do colo e da raiz, o que resulta na morte das plantas (KULKARNI *et al.*, 2016). Uma variedade resistente à podridão do colo, chamada de Nirmal, foi desenvolvida com uma seleção de linhas puras de uma única planta resistente a *Pythium aphanidermatum* (KULKARNI, 1999).

Mridha e Rahman (2015) constatarem o primeiro relato de queima das folhas de vinca causado pelo fungo patogênico *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Neste estudo, foram utilizados extratos vegetais como biopesticidas. Das nove espécies examinadas, *Terminalia arjuna* apresentou a maior porcentagem de inibição (58,37%) seguida por *Azadirachta indica* (55,72%) e a menor porcentagem de inibição (27,4%) foi obtida com *Vitex negundo*.

De acordo com Nejat *et al.* (2015), a fertilização e irrigação são fatores importantes para o gerenciamento das doenças encontradas na vinca. Os mesmos autores recomendam evitar a fertilização e a rega excessiva das plantas. Além disso, a irrigação aérea e períodos prolongados de umidade das folhas devem ser evitados. Portanto, preconiza-se a rega apenas durante o dia e fertilidade do solo ajustada ao pH mantido em 5,50.

Além das doenças causadas por fungos, foram encontradas algumas viroses, como *Cucumber mosaic virus* (CMV) e *Catharanthus mosaic virus* (CatMV), provocando sintomas de má formação das folhas e mosaico na vinca (SEABRA *et al.*, 1999; MACIEL *et al.*, 2011). Kitajima (2020) realizou um inventário com mais de 200 patógenos capazes de infectar plantas no Brasil. A produção dessa lista foi baseada em um catálogo anual de publicações de vírus em plantas de 1926 a 2018. Neste inventário, os vírus *Catharanthus mosaic virus* e *Cucumber mosaic virus* foram descritos como patógenos para a espécie *C. roseus*.

A vinca é afetada por um grupo pequeno de insetos, portanto este é um dos pontos positivos no cultivo da espécie. Os insetos mais comuns são tripses, ácaros e cochonilhas. De modo geral, as recomendações padrões para controle de insetos funcionam muito bem para a vinca (THOMAS *et al.*, 2009).

6.2. Diversidade genética

A diversidade genética pode ser definida como qualquer medida quantitativa ou diferença genética, ao nível de sequência ou frequência alélica, que possa ser calculada entre indivíduos, populações ou espécies (BEAUMONT *et al.*, 1998; MOHAMMADI & PRASANNA, 2003). Segundo Swarup *et al.* (2021), a diversidade genética pode ser descrita como a gama de características genéticas em uma cultura ou espécie. Falconer (1987) afirmou que a diversidade genética se encontra na diferença entre as frequências alélicas. Para Salomão (2010), a diversidade genética é a amplitude da variação genética existente em uma determinada espécie, conferindo-lhe diferenças entre seus indivíduos.

De acordo com Salgotra e Chauhan (2023), a diversidade genética possibilita a conscientização da sociedade em geral sobre a importância da agrobiodiversidade. Segundo os mesmos autores, o uso da diversidade genética vegetal é necessário para o desenvolvimento e a liberação de novas variedades, bem adaptadas e melhoradas, visando à segurança alimentar global.

No melhoramento de plantas a existência de alta diversidade genética é fator primordial para o sucesso no processo de seleção e, portanto, para a continuidade de programas de melhoramento (REIS *et al.*, 2015; CARENA, 2021; SALGOTRA & CHAUHAN, 2023; SANCHEZ *et al.*, 2023). Para Allard (1960), o sucesso na seleção de genótipos é alcançado quando se dispõe de diversidade genética.

Segundo Cruz e Carneiro (2003), a análise da diversidade genética promove a identificação de genitores adequados à obtenção de híbridos de maior efeito heterótico, capazes de proporcionar maior segregação em recombinações e, desta maneira, maior possibilidade de recuperação de genótipos superiores. Nos programas de melhoramento baseados em hibridação, genótipos segregantes superiores são recuperados mais rápida e eficientemente quando a população-base para a seleção associa superioridade dos caracteres sob melhoramento à ampla variabilidade genética. Esta última oriunda da diversidade genética entre os genitores envolvidos na hibridação (FALCONER, 1987). Assim, o êxito de um programa de melhoramento depende da escolha criteriosa dos genitores a serem cruzados e, para tal, é necessário a análise da diversidade.

Também é preciso destacar que o conhecimento da divergência genética em uma coleção de germoplasmas é muito válido, pois proporciona a organização dos bancos evitando genótipos muito próximos ou duplicatas. De acordo com Beuselinck e Steiner (1992), a ocorrência de duplicatas dentro de coleções de germoplasmas aumentam os custos e dificulta a sua manutenção.

No intuito de se estimar a diversidade genética presente em uma coleção de germoplasmas, os acessos devem ser caracterizados e avaliados (COSTA *et al.*, 2009). Segundo Faleiro (2007), a caracterização pode ser definida como a atividade de descrição e registro de caracteres morfológicos, agronômicos, ecogeográficos e moleculares de um indivíduo ou acesso. Valois *et al.* (1996) adicionaram à definição de caracterização a descrição e o registro de características citogenéticas e bioquímicas do indivíduo. Já a avaliação consiste em descrever características agronômicas, de modo geral, quantitativas e de baixa herdabilidade, como a produtividade de grãos, no maior número possível de diferentes ambientes, com vistas à identificação de genes úteis para o melhoramento (JARAMILLO & BAENA, 2000).

Quando diversas características são avaliadas simultaneamente a predição da diversidade genética pode ser efetuada através da estatística multivariada. Esta permite integrar múltiplas informações e oferece maior oportunidade na escolha de genitores divergentes (SUDRÉ *et al.*, 2005). A contribuição de cada característica avaliada para a dissimilaridade entre os genótipos pode e deve ser mensurada, o que aumenta a probabilidade de êxito na composição de blocos de cruzamento (SCHMIT *et al.*, 2016).

A análise da diversidade tem contribuído na predição da heterose e na busca por grupos heteróticos promissores para constituição de híbridos. Para Falconer (1987), a expectativa de que genitores divergentes proporcionem boas combinações híbridas procede do fato de que a heterose manifestada em híbridos é dada em função dos efeitos da dominância dos genes para a característica em questão, e do quadrado da diferença das frequências gênicas de seus genitores, somados aos efeitos epistáticos, normalmente negligenciados. Portanto, a diversidade genética pode auxiliar no planejamento de estratégias mais eficazes com a finalidade de maximizar os ganhos genéticos no melhoramento através da identificação de combinações parentais adequadas à obtenção de híbridos.

O vigor híbrido ou heterose pode ser definido como o desempenho superior de híbridos da F₁ em relação aos seus genitores (MATHER & JINKS, 1971). De acordo com Miranda (1998), a diversidade genética entre genótipos pode ser estimada, geralmente, através da utilização de métodos biométricos, baseados na quantificação da heterose, ou por meio de processos preditivos.

Estudos de natureza preditiva são recomendados quando se dispõe de elevado número de genótipos. Entre os métodos preditivos da heterose citam-se aqueles que tomam por base as diferenças agronômicas, morfológicas, moleculares e fisiológicas entre os genótipos e não requerem a obtenção prévia das combinações híbridas (CRUZ *et al.*, 2020). Tais diferenças são quantificadas em alguma medida de distância (de dissimilaridade ou similaridade) capaz de expressar o grau de diversidade genética entre os genitores (CRUZ & CARNEIRO, 2003). Para tanto, pode-se utilizar variáveis quantitativas e qualitativas (multicategóricas e binárias) como medidas de distância genética.

As variáveis qualitativas são definidas por várias categorias ou classes, isto é, representam uma classificação dos indivíduos. Podem ser nominais, cujos valores não possuem ordenação, ou ordinais, quando apresentam uma ordenação (BUSSAB *et al.*, 1990). Uma variável qualitativa ao ser ordenada pode ser considerada multicategórica. Já as variáveis binárias são utilizadas para avaliar caracteres qualitativos de apenas duas categorias (presença ou ausência) (CRUZ & CARNEIRO, 2003). Características qualitativas são de herança monogênica (condicionadas por um ou poucos genes) e sofrem pouca ou nenhuma influência do ambiente (FALCONER & MACKAY, 1996). A cor das flores, cor da zona do olho, cor do halo e a cor dos ramos do caule são exemplos de caracteres qualitativos na vinca.

As variáveis classificadas como quantitativas podem ser contínuas ou discretas. Uma variável quantitativa é dita contínua, quando o conjunto de valores por ela assumidos for infinito, ou seja, não-enumerável. Por outro lado, as variáveis discretas podem assumir apenas um número finito (numerável) e são expressas por valores inteiros (BIOVERSITY INTERNATIONAL, 2007). Caracteres quantitativos exibem, de maneira geral, distribuição contínua, são determinados por poligenes de pequenos efeitos e influenciados pelo ambiente (CRUZ, 2005). Normalmente, estão associados à importância econômica e agrônômica das culturas, como, por exemplo, a produção de grãos, frutos e de caracteres relativos à produção em vinca.

Dentre as distâncias genéticas utilizadas para caracteres quantitativos ressaltam-se a distância Euclidiana, o quadrado da distância Euclidiana, a distância Euclidiana média, a distância ponderada e a distância generalizada de Mahalanobis (CRUZ *et al.* 2020). Para Cruz e Carneiro (2003), a estruturação da matriz de dissimilaridade é usualmente dada pela distância Euclidiana e pela distância generalizada de Mahalanobis. A distância Euclidiana é aquela que não leva em consideração as variâncias e covariâncias residuais existentes entre as características mensuradas. Nesta medida de dissimilaridade não há necessidade de repetições ou delineamentos experimentais. Por outro lado, a distância de Mahalanobis considera as variâncias e covariâncias residuais e quando os ensaios são realizados em genótipos avaliados em delineamentos experimentais recomenda-se o uso desta distância (CRUZ, 1990).

Quando o estudo da diversidade genética é realizado através de vários tipos de variáveis, podem ser recomendadas algumas estratégias de análise. Uma delas é adotar uma medida de dissimilaridade única para todos os tipos de variáveis. Sendo assim, cabe aqui ressaltar a distância de Gower (1971) utilizada em estudos da análise da diversidade. Esta técnica pode ser utilizada para obtenção da dissimilaridade entre indivíduos a partir da análise conjunta de variáveis quantitativas e qualitativas (CRUZ *et al.*, 2020). Nesse sentido, facilita o emprego de medidas de distância através da criação de um coeficiente geral único aplicável, simultaneamente, aos três tipos de características: binárias, multicategóricas e quantitativas.

Para Oliveira *et al.* (1999) somente as medidas de dissimilaridade não são capazes de reconhecer grupos homogêneos, uma vez que o número de estimativas obtidas é consideravelmente grande. Para isso, as análises de agrupamento são recomendadas. Estas permitem verificar a proximidade (ou distância) entre um genótipo e um grupo já formado ou entre dois grupos quaisquer. Em suma, espera-se com este tipo de análise que se obtenha homogeneidade dentro dos grupos e heterogeneidade entre estes (SNEATH & SOKAL, 1973; BUSSAB *et al.*, 1990).

Deste modo, métodos que, por algum critério de classificação, reúnam genótipos em grupos homogêneos são importantes na seleção dos melhores genitores (OLIVEIRA *et al.*, 1999). Os padrões de agrupamento podem definir quais cruzamentos exploram da melhor maneira a distância genética entre genótipos. Dos métodos de agrupamento, os mais relatados na literatura são os de otimização e os hierárquicos (CRUZ & CARNEIRO, 2003).

Nos métodos de otimização efetua-se a partição do conjunto de genótipos em subgrupos não-vazios e mutuamente exclusivos, através da maximização ou minimização de alguma medida preestabelecida. O método de otimização mais utilizado no melhoramento de plantas é o proposto por Tocher (RAO, 1952). Já nos métodos hierárquicos, o processo de agrupamento dos genitores se repete em vários níveis, até que seja formado o dendrograma. Neste caso, não há preocupação com o número ótimo de grupos, uma vez que o interesse maior está no dendrograma e nas ramificações obtidas. O exame visual do dendrograma permite avaliar pontos de alta mudança de nível, tomando-os em geral como delimitadores do número de genitores para determinado grupo (CRUZ *et al.*, 2020).

Entre os métodos hierárquicos destacam-se o do vizinho mais próximo (*Single Linkage Method*); vizinho mais distante (*Complete Linkage Method*); ligação média (*Average Linkage* ou *Unweighted Pair-Group Average* - UPGMA) e Ward. Entretanto, outros métodos hierárquicos também podem ser empregados, a saber: UPGMC, ou Centróides (LANCE & WILLIAMS, 1967), WPGMA ou Mcquitty (SOKAL & MICHENER, 1958) e WPGMC ou Mediana (GOWER, 1967). É importante observar que estas análises de agrupamento diferem pelo tipo de resultado e pelas diferentes formas de declarar graficamente a proximidade entre um indivíduo e um grupo já formado ou entre dois grupos quaisquer, para os quais não se conhece, *a priori*, o número de grupos a serem estabelecidos (CRUZ & CARNEIRO, 2003). O método UPGMA, por exemplo, já foi empregado em estudos da análise da diversidade em vinca por alguns autores (SHAW *et al.*, 2009; LAL *et al.*, 2011; EL-DOMYATI *et al.*, 2012; KUMAR *et al.*, 2014b; AMORIM *et al.*, 2023).

Mediante a existência de várias técnicas de agrupamento, cabe ao pesquisador adotar o método que melhor represente a estrutura de agrupamento esperada com base em seu conjunto de dados. Uma das estratégias para verificar a adequação dos resultados é a partir do grau de ajuste entre a representação gráfica da matriz de distância original (matriz fenética) e a matriz de agrupamento obtida (matriz cofenética), visto que no dendrograma pode ocorrer simplificação das informações originais e podem ser produzidas distorções sobre o padrão de dissimilaridade entre os genótipos analisados. Portanto, recomenda-se o uso do coeficiente de correlação cofenética, segundo Sokal e Rohlf (1962). De acordo com os mesmos autores, valores de correlação cofenética superiores a 0,80 indicam um bom ajuste entre as matrizes

originais de distância e a análise de agrupamento resultante. Enquanto Rohlf (1970) considera valores de correlação cofenética superiores a 0,70 como um bom ajuste.

Nos métodos de otimização a consistência do padrão de agrupamento também pode ser realizada. Para tal, aplica-se a análise discriminante baseada por Anderson (1958). Neste caso, a taxa de erro aparente mede a adequação do agrupamento formado na análise da técnica de otimização (CRUZ & CARNEIRO, 2003).

Uma maneira alternativa aos métodos de agrupamento, para avaliação da diversidade entre genótipos, é a análise da dispersão gráfica, normalmente, por meio do espaço bi ou tridimensional. A utilização conjugada de métodos de dispersão gráfica com os de agrupamento tem sido observada em estudos de diversidade genética em vinca (MISHRA *et al.*, 2001). Há várias técnicas que possibilitam a análise da diversidade genética por meio de dispersão gráfica. Dentre elas ressaltam-se os componentes principais e as variáveis canônicas (CRUZ *et al.*, 2020).

A análise de componentes principais (*Principal components analysis* - PCA) baseia-se somente nas informações individuais de cada genótipo e não há necessidade de dados com repetição. A grande utilidade da PCA em estudos da diversidade genética reside no fato de resumir informações contidas em um grupo de “n” variáveis em poucos componentes. A retenção do máximo da variação originalmente disponível e a independência entre si são propriedades importantes dos componentes obtidos (CRUZ & CARNEIRO, 2003).

Os componentes principais também são úteis na análise da diversidade na medida em que é possível conhecer variáveis que menos contribuem para a diferenciação dos genótipos e, assim, passível de descarte. Segundo Jolliffe (1973), quando se dispõem de um considerável número de descritores, muitos destes podem vir a ser redundantes, sendo assim passíveis de descarte, dado o baixo valor informativo adicionado à avaliação. Ainda segundo este autor, o número de variáveis a serem descartadas deve ser igual ao número de componentes principais cuja variância for inferior a 0,70. A variável que apresenta o maior valor absoluto no componente principal de menor autovalor (menor variância) será a de menor importância para explicar a variância total, e assim, é passível de descarte.

Na técnica PCA, as variáveis de maiores pesos nos primeiros autovetores são tidas como de maior importância para estudos da análise da diversidade. Isto ocorre quando o autovalor explica uma fração considerável da variabilidade disponível, geralmente limitado em valor mínimo de 80% (CRUZ & CARNEIRO, 2003). Os componentes principais têm sido utilizados em trabalhos com a espécie *C. roseus* (MISHRA *et al.*, 2001; LAL *et al.*, 2011).

A análise de variáveis canônicas apresenta, de modo geral, as mesmas propriedades de componentes principais, isto é, resume suas informações em poucas variáveis capazes de reter o máximo da variação disponível. Contudo, esta técnica baseia-se nas informações entre e dentro dos acessos (ou entre indivíduos de cada acesso), o que sugere a necessidade de dados com repetições. Sendo assim, a análise de variáveis canônicas é uma metodologia alternativa à análise de componentes principais (AMARAL JÚNIOR, 1999).

Diante do exposto, a análise da diversidade pode ser simplificada e dividida em seis fases: (1) seleção dos genótipos a serem avaliados; (2) obtenção e sistematização dos dados; (3) definição da medida de similaridade ou dissimilaridade; (4) escolha do método de agrupamento e/ou de dispersão gráfica; (5) verificação do grau de distorção provocado pelo método de agrupamento ou dispersão gráfica; e (6) interpretação dos resultados (BERTAN *et al.*, 2007).

No que tange à estimação da diversidade genética também podem ser utilizados os índices de Shannon e de Pielou. O índice de Shannon geralmente situa-se entre 1,50 e 3,50, e às vezes ultrapassa 4,00 (MARGALEF, 1972). Em suma, quanto maior o índice de Shannon, maior será a diversidade. O índice de Pielou mede a proporção da diversidade observada em relação à máxima diversidade esperada (KANIESKI *et al.*, 2010). Pode variar de zero a 1,0 e, neste caso, quanto mais próximo de 1,0 maior será a diversidade.

6.2.1. Marcadores moleculares

Ainda dentro dos modelos preditivos, outra maneira de estimar a diversidade genética entre genótipos ocorre através de estudos moleculares. Neste caso, a diversidade genética é estimada por meio de marcadores moleculares, que revelam polimorfismo ao nível de DNA e não sofrem influência ambiental (SANTANA *et al.*, 2016).

Ferreira e Grattapaglia (1998) definiram marcador molecular como sendo todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico do DNA, correspondente a regiões expressas ou não do genoma. Milach (1998) define marcadores moleculares como características de DNA, que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente. Segundo Bered *et al.* (1997), os marcadores moleculares têm por finalidade revelar polimorfismos e avaliar diferenças entre dois ou mais indivíduos.

Para Faleiro (2007) as principais vantagens dos marcadores moleculares concentram-se na obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos, na identificação direta do genótipo sem influência do ambiente e na possibilidade de detecção de tais polimorfismos em qualquer estágio do desenvolvimento da planta ou a partir de cultura de células ou tecidos.

Os marcadores moleculares podem quantificar o grau de dissimilaridade entre genótipos no melhoramento de plantas. Nesse sentido, os marcadores de DNA têm contribuído na predição da heterose e na busca por grupos heteróticos promissores para constituição de híbridos (CRUZ *et al.*, 2020). Para Borém e Miranda (2013), os marcadores moleculares podem ser utilizados para estimação da distância genética entre genótipos e para orientação do melhorista na escolha de genitores.

Em meados dos anos 80, com a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou Reação da Polimerase em Cadeia) surgiram novos marcadores moleculares. A PCR envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da DNA polimerase. A reação de PCR é baseada no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos utilizados como *primers*, que delimitam a sequência de DNA de fita dupla alvo da amplificação (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores podem ser classificados, segundo Milach (1998), em dois grupos, os de hibridização e os de amplificação do DNA. Os principais marcadores identificados por hibridização são RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e Minissatélites ou locus VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Outros como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), SSR (*Simple Sequence Repeat*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) e STS (*Sequence Tagged Sites*) são revelados por amplificação, via PCR (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

De acordo com Meyer *et al.* (1993), os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) caracterizam-se por utilizar *primers* (inicializadores) únicos, que hibridizam em sequências repetidas em regiões localizadas entre microssatélites no genoma. Os marcadores ISSR além de ser uma das técnicas mais simples e rápida (ZOLET *et al.*, 2017), em comparação com outras metodologias de análise molecular, agregam as seguintes vantagens: não há necessidade de conhecimento prévio dos genomas analisados, evitando a necessidade do sequenciamento de DNA (ZOLET *et al.*, 2017); é potencial gerador de alto polimorfismo entre os genótipos analisados; por apresentar hibridização em regiões inter-microssatélites no genoma, são de ampla cobertura genômica (MEYER *et al.*, 1993). Tais características fazem dos marcadores ISSR uma ferramenta molecular eficiente para a análise da diversidade genética em coleções de germoplasmas e progênies melhoradas.

Avanços em biologia molecular têm levado à classificação de marcadores baseados em sequenciamento. De acordo com Zolet *et al.* (2017), os marcadores de DNA podem ser divididos naqueles com base em hibridização e amplificação do DNA, via PCR. Estes autores acrescentaram na classificação os marcadores baseados em sequenciamento. Tal tecnologia, hoje denominada de plataformas de *Next Generation Sequencing* - NGS, aliadas às análises de bioinformática e estatística, tornaram possível identificar e genotipar diferentes indivíduos em um único passo para alguns tipos de marcadores moleculares.

Pode-se dizer que existem marcadores moleculares de natureza dominante e codominante. O primeiro caso, a exemplo dos marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), não existe a possibilidade de discriminar o genótipo homozigoto dominante (AA) do heterozigoto (Aa) (ZOLET *et al.*, 2017). Por isso, tais genótipos são alocados na mesma classe fenotípica, ou seja, exibem a banda no gel de agarose. Enquanto o genótipo homozigoto recessivo (aa) é identificado pela ausência da banda no gel. Assim, os géis obtidos são avaliados por uma matriz binária: presença (valor 1) para caracterizar as bandas (marcas) e zero para representar a ausência destas (CRUZ & CARNEIRO, 2003).

A partir de informações de marcadores dominantes, pode-se adotar medidas de dissimilaridade e, em seguida, a análise de agrupamento. Segundo Cruz *et al.* (2020), os principais coeficientes de similaridade descritos na literatura são os seguintes: de coincidência simples (SNEATH & SOKAL, 1973), o de Jaccard (JACCARD, 1908) e o de Nei e Li (NEI & LI, 1979). O coeficiente de similaridade de Jaccard já foi utilizado por alguns autores na vinca (SHAW *et al.*, 2009; LAL *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2014b; AMORIM, 2019; AMORIM *et al.*, 2023). Tais coeficientes são medidas de similaridade, nesse sentido, recomenda-se, na análise de agrupamento, fazer uso da dissimilaridade representada pelo inverso do coeficiente obtido ou pelo complemento aritmético (CRUZ & CARNEIRO, 2003).

Com os marcadores codominantes, como por exemplo os microssatélites, isoenzimas e RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), em cada loco estudado é possível identificar genótipos heterozigotos e homozigotos, o que indica mais informação em nível genético. Neste caso, a informação de frequência alélica se dá em nível populacional, de modo que as frequências dos alelos são quantificadas a partir dos genótipos analisados de cada população (ZOLET *et al.*, 2017). Nos marcadores codominantes, a similaridade entre pares de genótipos pode ser estimada pelos índices: não-ponderado, ponderado e índice d^2 de Smouse e Peakall. Uma vez obtida a matriz de distância entre os genótipos, ela poderá ser submetida à análise de agrupamento pelas técnicas já citadas anteriormente (CRUZ *et al.*, 2020).

Em vinca, muitos estudos apontam para o uso de marcadores moleculares na espécie, como, por exemplo, marcadores RAPD (KIM *et al.*, 2007; SHAW *et al.*, 2009; LAL *et al.*, 2011; EL-DOMYATI *et al.*, 2012; IBRAHIM *et al.*, 2013; KUMAR *et al.*, 2014b); AFLP (KIM *et al.*, 2007; EL-DOMYATI *et al.*, 2012), ISSR (SHAW *et al.*, 2009; LAL *et al.*, 2011; QING *et al.*, 2011; EL-DOMYATI *et al.*, 2012; IBRAHIM *et al.*, 2013; AMORIM *et al.*, 2023), SSR (LAL *et al.*, 2011; IBRAHIM *et al.*, 2013) e STMS (SHOKEEN *et al.*, 2007). Nota-se que alguns autores utilizaram mais de um tipo de marcador molecular para estimar a diversidade genética entre genótipos de vinca.

Através do uso de marcadores moleculares também é possível mapear regiões cromossômicas (QTLs - *Quantitative trait locus*) que afetam caracteres quantitativos. A identificação e mapeamento de QTLs é uma poderosa abordagem genética para identificar genes e/ou alelos favoráveis de características de interesse com marcadores de DNA e, assim, é possível introgradir os alelos desejáveis associados aos QTLs ao germoplasma medicinal por meio da seleção assistida por marcadores (MAS) (LÖRZ & WENZEL, 2005).

O primeiro estudo de QTLs em *C. roseus* foi desenvolvido por Sharma *et al.* (2012). Estes autores utilizaram uma população de 197 linhagens endogâmicas, as quais foram avaliadas quanto

a sete características de biomassa e 23 características de conteúdo de alcaloides e de rendimento. As referidas linhagens foram genotipadas por meio de 178 marcadores de DNA (RAPD, ISSR, SSR, microRNAs e SSR-EST) e formaram um mapa genético com oito grupos de ligação (GL). Os QTLs identificados foram associados a cinco dos oito GLs. A aplicação da análise de marcador único, mapeamento de intervalo simples e mapeamento de intervalo composto identificou um total de 20 QTLs, 11 em relação aos teores de alcaloides nos seguintes órgãos da planta: folhas (qTAL), caules (qTAS) e raízes (qTAR), sete para índices de colheita (qHIL, qHIS e qHIR) e dois para a característica de biomassa total da planta (qTDW).

Chaudhary *et al.* (2013) também identificaram 20 QTLs em vinca. Este estudo revelou uma linhagem chamada D54 com altas concentrações de vindolina (VL), vimblastina (VBL) e catarantina (CL) nas folhas e de catarantina nas raízes (CR). Além disso, a genotipagem mostrou que a linhagem D54 foi positivo para 13 dos 14 alelos de QTLs detectados como favoráveis para as características CL, VL, VBL e CR. A linhagem D54 possuía nove dos 14 marcadores de DNA identificados mais próximos a *qCL2-qCL4*, *qVL2-qVL4*, *qVBL1*, *qCR2*, *qCR4* e quatro marcadores identificados próximos a *qVL1*, *qCR1* e *qCR3*. A nomenclatura *qVL1* significa, por exemplo, QTL número 1 para a característica percentual de vindolina nas folhas. A linhagem citada anteriormente exemplificou as possibilidades de executar seleção assistida por marcadores (MAS) para genótipos com características melhoradas de VL, CL e CR. Portanto, os referidos autores demonstraram a viabilidade da seleção assistida por marcadores para características associadas ao rendimento de alcaloides na vinca.

Portanto, o mapeamento de regiões genômicas associadas a características complexas podem fornecer marcadores associados a QTLs que, quando usados em estudos de diversidade genética, podem aumentar as chances de encontrar genótipos distantes com genes complementares para importantes características agronômicas relacionadas ao QTL (BERTAN *et al.*, 2007).

6.2.2. Diversidade genética em *Catharanthus roseus* [L.] G. Don

Apesar da variação considerável observada na espécie *C. roseus* em todo o mundo, até alguns anos atrás, existiam poucos estudos sobre as relações genômicas da espécie (SHAW *et al.*, 2009). Segundo Kulkarni *et al.* (2016), existem cerca de 3.000 publicações científicas sobre *C. roseus* durante os 50 anos anteriores. Destas publicações apenas 15% referiram-se a estudos relativos à biologia molecular e engenharia genética na espécie. Porém, de acordo com estes mesmos autores, durante as últimas duas décadas, o maior número de publicações foi na área da biologia molecular e engenharia genética.

Na literatura existem publicações sobre o estudo da diversidade genética entre genótipos de *C. roseus* através de marcadores moleculares (KIM *et al.*, 2007; SHOKEEN *et al.*, 2007; SHAW *et al.*, 2009; LAL *et al.*, 2011; QING *et al.*, 2011; EL-DOMYATI *et al.*, 2012; IBRAHIM *et al.*, 2013; KUMAR *et al.*, 2014b; AMORIM *et al.*, 2023) e de caracteres morfoagronômicos (MISHRA *et al.*, 2001; SAMIYARSIH *et al.*, 2019; PAULA *et al.*, 2021; SOARES *et al.*, 2024).

Lal *et al.* (2011) acessaram a diversidade genética entre nove cultivares de *C. roseus*, a partir de marcadores moleculares RAPD, ISSR e SSR. Com o uso de 20 *primers* RAPD, seis amplificaram 592 bandas, das quais 466 eram polimórficas (78,71%). Com os marcadores ISSR e SSR, observou-se um polimorfismo de 78,94 e 76,62%, respectivamente. Tais resultados indicaram elevado polimorfismo entre os genótipos analisados.

Shaw *et al.* (2009) estimaram a diversidade genética entre 14 cultivares de vinca, por meio de marcadores RAPD e ISSR. Os *primers* RAPD resultaram na amplificação de 56 bandas, entre as quais 46 (82%) foram polimórficas. Já os *primers* ISSR amplificaram 31 *loci*, dos quais 17 (55%) foram polimórficos e 14 (45%) monomórficos. No dendrograma construído

baseado nos marcadores RAPD e ISSR foram obtidos dois grupos. O menor grupo incluiu as cultivares *Blue Pearl* e *Patricia White* e o maior grupo foi subdivido em dois subgrupos com *First Kiss Polka Dot* isolado do restante das cultivares.

Kumar *et al.* (2014b) estudaram a diversidade genética entre dez genótipos silvestres de vinca, oriundos de regiões diferentes de Rajastão, um estado indiano. Os marcadores RAPD utilizados nesta pesquisa indicaram um nível de 84,61% de polimorfismo.

Na pesquisa desenvolvida por Shokeen *et al.* (2007) foram analisados um conjunto de 37 acessos, dos quais 32 acessos de *C. roseus* e um de *Catharanthus trichophyllus*, *Catharanthus pusillus*, *Vinca minor*, *Thevetia peruviana* e *Nerium indicum*. Para identificar as sequências microssatélites, duas bibliotecas genômicas de *C. roseus* foram construídas e após sequenciamento, *primers* foram desenhados baseados nas sequências flanqueadoras dos microssatélites. Estas regiões são conservadas e podem ser usadas para projetar marcadores específicos de Locus STMS (*Sequence Tagged Microsatellite Site*). O alto valor médio esperado de heterozigosidade (H_E) de 0,56 e o valor observado de heterozigosidade (H_O) de 0,52 estabeleceram a eficiência dos marcadores STMS para discriminar os genótipos de vinca.

Neste mesmo trabalho, Shokeen *et al.* (2007) observaram também que os acessos de *C. roseus* originários da Índia agruparam-se em dois subgrupos (IIA e IIB), enquanto os acessos de outros países formaram um subgrupo diferente (IID), e as cultivares ornamentais foram agrupadas em outro subgrupo (IIC). Portanto, pode-se dizer que os acessos foram agrupados de acordo com a sua origem.

Ibrahim *et al.* (2013) realizaram a caracterização molecular de seis cultivares de vinca por meio de marcadores RAPD e ISSR. Estes autores observaram para os marcadores RAPD 18 bandas polimórficas (44%). Já com os marcadores ISSR, obtiveram 50 fragmentos amplificados, 30 deles foram polimórficos (60%). O dendrograma da combinação dos marcadores RAPD e ISSR resultou em dois grupos. O grupo menor incluiu a cultivar *Crimson red* e os grupos maiores as cultivares: *Milky white* com halo vermelho, *Dark pink*, *Milky white*, *Purple* e *Light pink*. Os índices de similaridade e analisando-se o dendrograma para as distâncias genéticas, revelaram que a maior similaridade foi de 92% entre cultivares *Crimson red* e *Light pink*; já para as cultivares *Milky white* com halo vermelho e *Dark pink*, a similaridade foi zero.

O modo de reprodução preferencial de *C. roseus* foi relacionado à diversidade genética entre dez genótipos de vinca (AMORIM *et al.*, 2023). Estes autores utilizaram 15 *primers* ISSR e observaram elevados índices de Shannon (5,22) e de Pielou (0,96). Tais índices sugerem alta diversidade genética entre os dez genótipos analisados. Neste estudo, não foi possível determinar se as sequências de DNA marcadas estão ou não relacionadas a regiões que expressam as diferentes características utilizadas para definir o modo de reprodução em *C. roseus*. Portanto, não houve relação entre a formação de grupos no dendrograma e o modo de reprodução preferencial.

Na revisão publicada por Nejat *et al.* (2015) há inferências acerca da magnitude da diversidade genética em *C. roseus* acessada por marcadores moleculares. Segundo os referidos autores, foi encontrada alta diversidade genética nos seguintes trabalhos: Shokeen *et al.* (2007), Shaw *et al.* (2009), Lal *et al.* (2011) e Qing *et al.* (2011). Já em Kim *et al.* (2007) foi observada diversidade genética de baixa a moderada.

A diversidade genética também foi acessada entre genótipos de vinca a partir de caracteres morfoagronômicos e não tão somente através de marcadores de DNA. Mishra *et al.* (2001) acessaram a diversidade genética através de caracteres morfoagronômicos entre 32 acessos de *C. roseus*. Foram formados cinco grupos e os acessos provenientes de climas tropicais tenderam a se separar daqueles originários de ambientes subtropicais a semitemperados. Além disso, os referidos autores relataram uma base genética estreita nas populações do subcontinente indiano e na região asiática vizinha.

A análise da diversidade no estudo de Mishra *et al.* (2001) permitiu identificar os grupos “A”, “B” e “D” como aqueles de maior potencial para a produção de alcaloides na vinca. Os acessos pertencentes ao grupo “A” apresentaram bom desempenho em termos de alcaloides radiculares e de vincristina e vimblastina, presentes nas folhas. O grupo “B” exibiu genótipos com boa produção de biomassa de raízes e folhas e alta concentração de vimblastina nas folhas. Características comuns como boa produção de biomassa foliar e de vincristina nas folhas foram observadas nos genótipos pertencentes ao grupo “D”.

Samiyarsih *et al.* (2019) estudaram a diversidade genética com base em caracteres morfológicos, anatômicos e no conteúdo de clorofila e antocianina entre oito genótipos de vinca. Neste estudo, a análise de variância mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) para o comprimento da folha, largura da folha, comprimento do pecíolo, diâmetro e comprimento da corola. As oito plantas de vinca mostraram-se com diferentes teores de clorofila a, clorofila b e clorofila total, mas os seus teores de antocianinas não apresentaram diferença significativa.

A importância relativa de 11 variáveis em cultivares de vinca foi verificada por Paula *et al.* (2021). Verificou-se, nesta pesquisa, que o número de folhas e diâmetro da flor contribuíram, respectivamente, com 38,90 e 39,40% de importância relativa na diversidade genética. Vale destacar que a importância relativa das variáveis depende da estrutura genética da população de plantas em estudo.

Ao todo 17 variáveis morfológicas foram utilizadas por Soares *et al.* (2024) na caracterização fenotípica de dez genótipos de vinca. Através da análise de dissimilaridade genética, as plantas foram agrupadas em três grupos e as variáveis relativas às folhas foram as que mais colaboraram para o agrupamento das plantas nos grupos formados.

Diante do exposto, pode-se concluir que o estudo da análise da diversidade é possível a partir de informações fenotípicas (caracteres quantitativos e qualitativos) ou de informações genotípicas, que são obtidas a partir de marcadores moleculares. Nesse sentido, processos preditivos da heterose obtidos a partir de caracteres morfoagronômicos e moleculares podem auxiliar na seleção de genótipos de vinca superiores e distantes geneticamente. Estes genótipos ao serem envolvidos em programas de hibridação possibilitam maior efeito heterótico na progênie, isto é, aumentam as chances de êxito na seleção de genótipos superiores em gerações segregantes.

6.3. Aspectos gerais da vinca (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) associados ao melhoramento genético

Apesar da necessidade de aumento da produção de princípios ativos na espécie *C. roseus*, os países em desenvolvimento apresentam escassez de pesquisas sobre melhoramento genético visando aumentar a produção de alcaloides em *C. roseus* (KULKARNI *et al.*, 2016). Como exemplo, entre 1963 e 2020, apenas 6,20% das publicações foram sobre genética e melhoramento genético da vinca (JHANG *et al.*, 2022). Nesse sentido, é imperativo desenvolver pesquisas sobre o melhoramento genético na busca por genótipos com potencial para a produção de alcaloides na vinca. Para isso, torna-se fundamental o conhecimento da natureza do controle genético associado à produção dos referidos alcaloides, bem como de outros caracteres morfoagronômicos na espécie.

O conhecimento do controle genético de caracteres quantitativos é fundamental para o desenvolvimento de um programa de melhoramento eficiente, com o objetivo de orientar a escolha de populações segregantes, e proporcionar o conhecimento do tipo de ação gênica envolvida em cada característica avaliada (SCHUELTER *et al.*, 2010). Resende (2001), Cruz *et al.* (2004) e Ramalho *et al.* (2008) destacaram que o controle genético dos caracteres é revelado através das estimativas de parâmetros genéticos. De acordo com Cruz e Carneiro

(2003), os parâmetros genéticos de maior destaque são as variâncias genéticas aditiva e não-aditiva, as correlações e as herdabilidades.

A obtenção de estimativas de parâmetros genéticos é fundamental, pois permite identificar a natureza da ação dos genes envolvidos no controle dos caracteres quantitativos e avalia a eficiência de diferentes estratégias de melhoramento para obtenção de ganhos genéticos e manutenção de uma base genética adequada (CRUZ & CARNEIRO, 2003). Além disso, auxiliam os melhoristas na tomada de decisões quanto à escolha do método de melhoramento, do modo de condução e de seleção das populações segregantes, além da possibilidade de prever o sucesso nos futuros ciclos de seleção (RAMALHO *et al.*, 1993).

Na pesquisa realizada por Singh *et al.* (2007), avaliou-se, os caracteres altura de planta, número de ramos primários, número de ramos secundários, área foliar, proporção folha-caule, produção total de biomassa de folhas, conteúdo de alcaloides da folha e rendimento total de alcaloides da folha com a finalidade de conhecer o controle genético sobre a produção de alcaloides foliares na espécie *C. roseus*. Para isso utilizou-se um dialelo 6 x 6, que teve como resultado 30 F_{1s}. As variâncias genéticas aditivas e não aditivas foram consideradas importantes na herança do rendimento de alcaloides e em outros caracteres que contribuem para o rendimento. No entanto, o componente não aditivo foi superior ao componente aditivo para a maioria dos caracteres, exceto para a relação folha-caule. Sendo assim, o controle genético não aditivo observado neste estudo pode direcionar o programa de melhoramento à obtenção de híbridos de vinca.

Singh e Dwivedi (2010) estudaram o controle genético de oito caracteres morfoagronômicos na vinca, em progênies (30 F_{1s}) resultantes do dialelo (6 x 6). Verificou-se que tanto a variância aditiva quanto a variância de dominância foram significativas para área foliar, relação folha-caule, teor de alcaloides foliares e porcentagem de vimblastina. No que diz respeito à proporção da variância de dominância e aditiva, os resultados obtidos revelaram que a magnitude do componente não aditivo foi maior do que o componente aditivo para todos os caracteres analisados.

Pode-se inferir a partir dos estudos desenvolvidos por Singh *et al.* (2007) e Singh e Dwivedi (2010) que a magnitude do componente não aditivo foi superior ao componente aditivo em importantes caracteres morfoagronômicos na vinca, como a produção total de biomassa de folhas, conteúdo de alcaloides da folha, rendimento total de alcaloides da folha, área foliar, porcentagem de vimblastina e porcentagem de vincristina. Portanto, o controle genético destas importantes características na espécie foi atribuído aos desvios de dominância e, desta forma, o programa de melhoramento deverá ser direcionado à obtenção de híbridos.

O controle genético de caracteres morfoagronômicos também foi analisado por Singh e Dhatt (2022) em *C. roseus*. A ação aditiva influenciou a altura da planta, largura da folha, comprimento do pecíolo, dias para o florescimento e comprimento do tubo da corola. No entanto, a propagação da planta, número de ramos por planta, comprimento da folha, comprimento de entrenó, duração da floração, número de flores por planta, diâmetro da flor e comprimento do folículo foram controlados por componentes genéticos não aditivos. Portanto, a seleção ou a obtenção de híbridos pode ser empregada para o melhoramento dessas características com base no controle genético observado.

Os resultados obtidos acima por Singh e Dhatt (2022) são extremamente relevantes para o uso da vinca como planta ornamental, visto que foram avaliadas características morfológicas associadas a finalidades ornamentais. Entre elas destacam-se o número de flores por planta, dias para o florescimento, duração da floração, propagação da planta, diâmetro da flor e comprimento do tubo da corola. Este parece ser o primeiro estudo do controle genético associado a importantes características na vinca para uso ornamental. Normalmente, os trabalhos disponíveis na literatura dão ênfase no seu uso como planta medicinal.

A estimativa do teor de alcaloides, em vinca, pode ser demorada e, assim, limitar o número de plantas que podem ser avaliadas no programa de melhoramento. Sendo assim, qualquer característica com alta herdabilidade e com alta correlação com o conteúdo de alcaloides é útil para a triagem preliminar dos princípios ativos de interesse, tal como para a seleção indireta dessa importante característica (KULKARNI *et al.*, 2016).

A seleção indireta é sem dúvida, uma importante ferramenta na seleção de plantas para variáveis com baixa herdabilidade (CARVALHO *et al.*, 2004), como parece ser o caso de caracteres associados à produção em vinca. Neste caso, sem dúvida, muitos genes agem sobre tais caracteres. Por consequência, a ação do ambiente também se mostra forte sobre estas variáveis.

A correlação de um determinado caráter com outros caracteres que contribuem para a produção de alcaloides é de grande importância na seleção indireta de genótipos na cultura da vinca. A área foliar exibiu correlação positiva entre alcaloides totais, vindolina, catarantina e peso total da planta. Foi verificado uma correlação negativa da altura da planta com vincristina, vimblastina, catarantina, vindolina e índice de colheita. Tal fato indica que plantas com altura reduzida possivelmente terão maior produção de biomassa contendo maior porcentagem de alcaloides (ROY *et al.*, 2013).

Singh e Dwivedi (2017) constataram associação positiva significativa da produção total de biomassa de folhas com o conteúdo de alcaloides foliares e rendimento total de alcaloides foliares. Isto sugere que o aumento na produção de biomassa pode resultar em um aumento no rendimento de alcaloides foliares. Já o conteúdo de alcaloides foliares apresentou associação positiva significativa com a vimblastina. Os alcaloides vincristina e vimblastina exibiram associação positiva significativa entre si.

Ainda no estudo desenvolvido por Singh e Dwivedi (2017) foi constatado que para a maioria das características morfoagronômicas analisadas a correlação fenotípica exibiu valor inferior do que as estimativas correspondentes em nível genotípico. Resultados similares foram encontrados por Dwivedi *et al.* (1999a). Enquanto Kulkarni *et al.* (1984) e Roy *et al.* (2013) verificaram que a correlação fenotípica era maior do que a correlação genotípica em vinca para os caracteres morfológicos analisados. Isso pode ter ocorrido devido ao efeito modificador do ambiente.

Levy *et al.* (1983) avaliaram os componentes de rendimento da parte aérea e o conteúdo de ajmalicina das raízes em três linhagens de vinca com diferentes cores de flores e nos seus híbridos. Estes autores observaram correlações genéticas e ambientais significativas e positivas entre os pesos secos da folha e da raiz, mas não entre os componentes vegetativos e o conteúdo de ajmalicina das raízes. O conteúdo de ajmalicina da raiz principal foi geneticamente e fenotipicamente correlacionado ao das raízes laterais.

No que se refere ao conteúdo de alcaloides, Chaudhary *et al.* (2013) observaram que as correlações fenotípicas foram positivas e significativas entre vindolina, catarantina e vimblastina mais vincristina, presentes nas folhas, em todas as combinações possíveis. As correlações pareadas entre serpentina, ajmalicina e catarantina nas raízes também foram positivas e significativas. No entanto, as correlações de vindolina e vincristina mais vimblastina, nas folhas, com serpentina, ajmalicina e catarantina nas raízes foram fracamente positivas e não significativas. Em contraste, as correlações de catarantina nas folhas com os alcaloides nas raízes (serpentina, ajmalicina e catarantina) foram negativas, fracas e não significativas. Portanto, conclui-se que a análise de correlação mostrou que o acúmulo dos alcaloides estudados nas folhas foi independente do acúmulo nas raízes e vice-versa.

Entretanto, Sharma *et al.* (2012) constataram através dos coeficientes de correlação de Pearson, que a produção de folhas e raízes, produção foliar e produção de alcaloides nas folhas, produção de raízes e produção de alcaloides radiculares correlacionaram-se de maneira positiva.

Isso indica que a melhoria concomitante desses pares de caracteres pode ser possível através da seleção, ao contrário do que foi observado por Chaudhary *et al.* (2013).

Mishra *et al.* (2001) encontraram correlações positivas e significativas entre a área foliar e número de folhas, tal qual com a produção de alcaloides foliares e rendimento de vimblastina em 32 genótipos de vinca. Neste estudo, foram observadas altas e significativas correlações entre a produção de biomassa de folhas e produção de alcaloides foliares e radiculares de 0,76 e 0,70, respectivamente. O rendimento de vimblastina foi correlacionado positivamente e significativamente com o número de folhas, produção de biomassa foliar, produção de alcaloides foliares e produção de vincristina. Foi possível observar apenas uma correlação negativa e significativa entre a altura de planta e concentração de alcaloides nas raízes. Estas correlações parecem favoráveis para a melhoria da produção de alcaloides em *C. roseus*.

Alguns trabalhos tiveram por objetivo estudar a existência de relações entre a cor das flores e a produção de alcaloides na vinca. Magnotta *et al.* (2006) não encontraram nenhuma relação entre a cor das flores e os teores de vindolina e catarantina nos 50 genótipos analisados. Sevestre-Rigouzzo *et al.* (1993) encontraram altos teores de vindolina nas folhas e serpentina nas raízes, independentemente da cor da flor. Entretanto, Idrees *et al.* (2010) e Bhutkar e Bhise (2011) afirmaram que as plantas de vinca com flor rosa apresentaram maior conteúdo de alcaloides em relação as flores brancas.

Vale ressaltar que apesar dos coeficientes de correlações serem úteis na quantificação da magnitude e direção das influências de fatores na determinação de associações entre caracteres complexos, eles não concedem a exata importância relativa aos efeitos diretos e indiretos desses fatores. Para contornar esta situação utiliza-se a análise de trilha (*path analysis*), a qual consiste no estudo dos efeitos diretos e indiretos de caracteres sobre uma variável básica, cujas estimativas são obtidas por meio de equações de regressão, nas quais as variáveis são previamente padronizadas (WRIGHT, 1921).

A importância de cada componente agrônomo na determinação do rendimento de alcaloides é alcançada dividindo-se em efeitos diretos e indiretos por meio da análise de trilha. A escolha de caracteres agrônômicos como o número de folhas/planta pode ser recompensadora para a melhoria da produção de alcaloides. De acordo com Roy *et al.* (2013), utilizando coeficientes de trilha, o aumento do número de folhas na planta resulta no aumento da produção de alcaloides na vinca. O mesmo ocorreu com a produção de matéria seca, ou seja, tem efeito direto positivo na produção de alcaloides. A vindolina, catarantina e vimblastina apresentaram efeito direto, porém a vincristina demonstrou efeito indireto na produção de alcaloides. A área foliar, neste estudo, também exibiu efeito indireto na produção de alcaloides.

De acordo com Xiaofen *et al.* (2009), o aumento do diâmetro das pétalas de flores em vinca mostra uma leve tendência para o aumento da produção do alcaloide vindolina ($r = 0,29$, coeficiente de trilha). Segundo estes mesmos autores, o comprimento do entrenó exerce uma forte influência sobre a produção do referido alcaloide ($r = 0,95$).

A partir dos coeficientes de trilha, onde se estimou os efeitos diretos e indiretos das variáveis sobre a biomassa de folhas secas (BFO_s), Costa (2021) propôs um ideótipo primário de vinca. Considerando a BFO_s, o ideótipo de planta de vinca seria: fenótipo mais ramificado na base, com ramos mais grossos e menor comprimento de entrenó, que apresentem também pecíolos foliares e flores menores em relação à média da população, produzirão maior peso de BFO_s.

Como já foi mencionado anteriormente espera-se que caracteres de maior importância agrônoma e econômica na vinca tenham natureza quantitativa. Por exemplo, a produção de biomassa de folhas e de alcaloides, por tratar-se de uma característica quantitativa, é esperado que o fenótipo seja bastante influenciado pelo ambiente. As maiores fontes de variação em caracteres de herança quantitativa são devidas aos fatores de ambiente e da interação genótipo

x ambiente. Por este motivo a produção de biomassa e de alcaloides parecem estar sujeitas às influências ambientais, o que pode resultar em baixas estimativas de herdabilidades.

Singh *et al.* (2007) encontraram valores de herdabilidade no sentido restrito de 29,50%; 27,04%; 36,93%; 41,88%; 59,99%; 63,51%; 58,24% e 56,04% para os caracteres altura de planta, número de ramos primários, número de ramos secundários, área foliar, proporção folha-caule, produção total de biomassa de folhas, conteúdo de alcaloides da folha e rendimento total de alcaloides da folha, respectivamente. A variável mais próxima da unidade (1,0) foi a produção total de biomassa de folhas, neste espera-se que 63,51% da variação fenotípica seja de origem genética. Com relação ao rendimento total de alcaloides foliares é esperado que 56,04% da variabilidade seja de origem genética.

As estimativas de herdabilidade no sentido restrito obtidas por Singh *et al.* (2007) são aquelas que possuem maior importância para o melhoramento genético da vinca. Pois, tais estimativas de herdabilidade refletem a proporção da variação total expressa que pode ser herdada. Neste trabalho, provavelmente, as influências ambientais foram inferiores à de origem genética (63,51 e 56,04%) tanto para a produção total de biomassa de folhas, como para o rendimento total de alcaloides foliares, respectivamente.

As herdabilidades no sentido amplo de sete características associadas à biomassa e 23 características de conteúdo de alcaloides em 197 linhagens endogâmicas foram estimadas por Sharma *et al.* (2012). No que se refere aos sete caracteres foram obtidas as seguintes herdabilidades: 56,97%; 17,07; 67,48%; 30,30%; 23,29%; 7,06% e 9,21% para massa seca da raiz, peso seco do caule, peso seco da folha, peso seco total da planta, índice de colheita de raízes, índice de colheita de caule e índice de colheita de folhas, respectivamente. Dessa maneira, é possível inferir que todos os índices de colheita (de raízes, caule e folhas) apresentaram baixas herdabilidades. Tal fato, também foi verificado para o conteúdo total de alcaloides nas folhas e raízes (5,35 e 12,99%, respectivamente).

Com base nos resultados obtidos acima por Sharma *et al.* (2012), pode-se verificar que as condições ambientais influenciaram fortemente o índice de colheita de folhas em *C. roseus*, bem como conteúdo total de alcaloides. Nestes importantes caracteres da espécie foram observadas baixas herdabilidades. Desta forma é necessário que genótipos de vinca sejam avaliados nas condições ambientais para as quais se pretende recomendá-los, permitindo assim, a seleção daqueles que apresentem maiores rendimentos em tais condições, quando se pretende explorar a característica desejada.

Contudo, Chaudhary *et al.* (2013) observaram maiores valores de herdabilidades no sentido amplo para vindolina (79,2%), catarantina (64,6%) e vincristina mais vimblastina (40,3%), presentes nas folhas. Nas raízes verificaram para a catarantina, serpentina e ajmalicina magnitudes de herdabilidade de 61,0%; 50,1% e 15,4%, respectivamente. A herdabilidade no sentido amplo de ajmalicina nas raízes foi significativamente menor do que todos os outros alcaloides analisados. Altas herdabilidades no sentido amplo também foram relatadas para a produção de biomassa foliar, conteúdo de vindolina, catarantina, vincristina mais vimblastina nas folhas (DWIVEDI *et al.*, 1999b) e catarantina e serpentina nas raízes (BARIK & SAO, 2015).

Pode-se concluir com base na literatura consultada que o controle genético da produção de vincristina e de biomassa de folhas na vinca foi devido aos desvios de dominância (componente não aditivo). As baixas herdabilidades observadas podem indicar que as condições ambientais influenciaram fortemente o controle genético do índice de colheita de folhas, bem como do conteúdo total de alcaloides. Contudo, maiores valores de herdabilidades também foram verificados, sendo assim o controle genético também pode sofrer maior influência de fatores genéticos.

6.3.1. Cultivares utilizadas para fins medicinais na espécie *Catharanthus roseus* (L.) G. Don

Em vinca, a busca por novas cultivares é impulsionada pela demanda por maior rendimento e maior teor de alcaloides. Um outro entrave refere-se à síntese total destes alcaloides em laboratório. Esta atividade não é simples devido à complexidade estrutural das moléculas e etapas de reação que envolvem restrições estereoquímicas (VERMA *et al.*, 2007).

Na semissíntese em escala comercial dos alcaloides vincristina e vimblastina a partir da reação de Polonovski modificada (POTIER, 1980), a catarantina é facilmente produzida. Entretanto, a vindolina deve ser proveniente principalmente das plantas (MALL *et al.*, 2019; MALL *et al.*, 2021). Dessa forma, a planta torna-se indispensável para explorar e selecionar cultivares de vinca superiores quanto à produção de alcaloides. Uma das formas para se alcançar tal objetivo é a heterose. De acordo com Shull (1952) a heterose ocorre quando o F_1 é superior aos seus pais. Isso, logicamente, resulta em ganhos genéticos na progênie.

Para a exploração da heterose em vinca pode-se fazer necessário o desenvolvimento de linhagens endogâmicas com alto teor de alcaloides. A existência de linhagens de vinca tem sido observada na literatura (LEVY *et al.*, 1983; BOWMEN, 1996; DWIVEDI *et al.*, 2001; KULKARNI *et al.*, 2003; XING *et al.*, 2011; CHAUDHARY *et al.*, 2013). De acordo com Amorim *et al.* (2023), todos os genótipos de vinca analisados foram autocompatíveis, uma vez que a polinização cruzada não foi reforçada por nenhum sistema autoincompatível. Isso sugere que tais genótipos podem aceitar a autofecundação. No entanto, deve-se saber se a autofecundação natural ou artificial conduz a depressão por endogamia, especialmente nos genótipos com certo predomínio da alogamia. Isto não deve ser verdadeiro para os genótipos com certa obrigatoriedade de ocorrência de autofecundação em virtude da cleistogamia.

Na pesquisa desenvolvida por Singh e Dhatt (2022), oito linhagens de vinca foram obtidas através de cinco gerações de autofecundação. Um alto nível de homozigose em gerações de autofecundações não se tornou uma desvantagem e, na espécie, a formação de linhagens endogâmicas parece ser possível. Além, é claro, de híbridos a partir de linhagens obtidas por sucessivas autofecundações. Todavia, é preciso ter maior atenção nas espécies alógamas, pois estas tendem a apresentar efeitos da depressão por endogamia sobre os seus indivíduos.

Levy *et al.* (1983) avaliaram os componentes de rendimento da parte aérea e o conteúdo de ajmalicina das raízes em três linhagens endogâmicas de *C. roseus*, com diferentes cores de flores, e nos seus híbridos. Os referidos autores observaram 29 e 24% de heterose significativa e positiva para peso seco de folhas e raízes por planta, respectivamente, no híbrido F_1 envolvendo as linhagens parentais (corola rosa x corola branca com halo vermelho). Porém, nenhuma heterose foi obtida para o conteúdo de ajmalicina nas raízes. Diante destes resultados, concluíram que a ausência de heterose para o teor de ajmalicina nas raízes não favoreceu o desenvolvimento de cultivares híbridas de vinca para explorar um importante alcaloide anti-hipertensivo, presente nas raízes, utilizado no tratamento da pressão arterial e outros tipos de doenças cardiovasculares.

Bowmen (1996) no processo de seleção de linhagens resistentes à *Phytophthora parasitica* identificou a linhagem endogâmica 15667, a qual possui alto conteúdo total de alcaloides foliares (6,26%). O conteúdo total de alcaloides refere-se ao teor total de alcaloides expresso em uma porcentagem do peso seco total no tecido vegetal. Este valor (6,26%) no genótipo 15667 era 3,6 vezes o nível de alcaloides totais relatados para qualquer outra cultivar de vinca. A linhagem 15667 também foi altamente resistente à pulgões (*Myzus persicae*) e ácaros (*Tetranychus urticae*). Outras linhagens, como 15614 e 15620, não apresentaram níveis elevados de alcaloides, porém ainda expressaram resistência à *Phytophthora parasitica*.

Os teores de vindolina, catarantina e vimblastina foram maiores em linhagens tetraploides em comparação com as diploides (XING *et al.*, 2011). Neste estudo, observou-se

níveis mais elevados de expressão dos genes de *tdc*, *g10h*, *sls*, *str*, *dat* e *prx1* nas linhagens tetraploides. A análise química via HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) mostrou que a tetraploidia pode aumentar os teores de alcaloides em vinca. Os resultados de QRT-PCR mostraram que a expressão de enzimas envolvidas na via de biossíntese de alcaloides aumentou nas plantas tetraploides.

Uma linhagem com maior teor e rendimento de alcaloides foliares na vinca foi desenvolvida por Kulkarni *et al.* (2003). Para este fim, sementes do genótipo Nirmal foram submetidas a um tratamento químico mutagênico. A mutagênese induzida produziu folhas que tinham as margens onduladas, ou seja, totalmente diferente das folhas habituais de vinca. O mutante selecionado foi autofecundado por três gerações e caracteriza-se por um material genético estável para o cultivo comercial. A linhagem obtida neste trabalho, denominada Dhawal, exibe alta produtividade de biomassa foliar (1352 a 2557 kg.ha⁻¹); 0,89 a 1,40% de alcaloides totais nas folhas; 1,60 a 2,22% de alcaloides totais nas raízes; 19,2 kg.ha⁻¹ de rendimento total de alcaloides foliares e 12,1 kg.ha⁻¹ de rendimento total de alcaloides radiculares. Uma outra linhagem de vinca com bastante potencial agrônomo, chamada de Prabal, apresentou teor total de alcaloides foliares de 1,65-1,95% e teor total de alcaloides radiculares de 1,50-1,85% (DWIVEDI *et al.*, 2001).

Chaudhary *et al.* (2013) também identificaram linhagens superiores em vinca. Este estudo revelou uma linhagem chamada D54 com altas concentrações de vindolina, vimblastina e catarantina nas folhas e de catarantina nas raízes. Mishra *et al.* (2001) observaram um acesso bastante promissor, denominado Crc-31. Neste estudo, dos 32 acessos de *C. roseus* analisados, o Crc-31 apresentou teor de vincristina 74 vezes maior e vimblastina 12 vezes maior do que os respectivos valores mais baixos entre todos os acessos estudados.

Apesar da grande importância das linhagens endogâmicas para a produção de híbridos na vinca, a presença da autofecundação natural na espécie (KULKARNI *et al.*, 2001; KULKARNI *et al.*, 2005; AMORIM *et al.*, 2023) pode tornar a produção de sementes híbridas comercialmente inviável. Para isso, é preciso lançar mão das emascações ou da macho-esterilidade para o desenvolvimento de híbridos. Contudo, é preciso salientar que a emascação em plantas pode ser logisticamente difícil, visto que uma única flor não pode ser negligenciada e perdida. Ademais, pode demandar mão de obra excessiva para execução desta atividade. Em algumas culturas, como a vinca, o processo de emascação parece ser ainda mais trabalhoso, devido a quantidade considerável de flores produzidas por planta.

Em milho, a emascação das linhagens receptoras de grãos de pólen é um processo relativamente fácil, pois as estruturas reprodutivas masculinas e femininas são separadas. Entretanto, é uma prática que consome muito tempo e mão de obra em plantios comerciais. Em outras espécies, como o sorgo, que exibe flores andróginas (hermafroditas), em uma grande inflorescência, a emascação é extremamente difícil (BUENO *et al.*, 2006).

Alguns autores utilizaram a macho-esterilidade na vinca (BOWMAN, 2000; FLASCHENREIM & BLOWERS, 2017). Plantas que expressam o fator de esterilidade masculina são incapazes de realizar a autopolinização e podem ser usadas como genitores femininos na produção de sementes híbridas. Ao contrário do parental feminino, a viabilidade e a quantidade de grãos de pólen são um importante componente do genitor masculino. Após a seleção das linhagens masculinas e femininas (macho estéril) apropriadas de vinca pode-se efetuar as polinizações. Os grãos de pólen são removidos do genitor masculino e transferidos para estigmas receptivos femininos.

A prevenção eficiente da autofecundação é um requisito fundamental na produção de híbridos F₁. Em vista disso, pode-se utilizar a esterilidade masculina. Esta pode resultar no não funcionamento dos gametas, o qual pode ser devido a aberrações cromossômicas, à ação de genes ou influências de origem citoplasmática (ALLARD, 1960). Conforme a maneira que são controlados geneticamente, os exemplos de esterilidade masculina podem ser divididos em três

tipos: genética, citoplasmática e genético-citoplasmática (BUENO *et al.*, 2006). Os três tipos de esterilidade masculina não ocorrem naturalmente em qualquer espécie do gênero *Catharanthus*, nem são conhecidas por ocorrerem na família Apocynaceae (BOWMAN, 2000).

Algumas induções químicas resultam na macho-esterilidade (BUENO *et al.*, 2006). Bowman (2000) submeteu sementes de vinca à estreptomicina e as plantas obtidas foram cultivadas. De aproximadamente 400 mudas induzidas foi identificada uma planta (13861-1) sem grãos de pólen viáveis. Este genótipo foi rigorosamente avaliado por um período de dois anos com o objetivo de verificar oscilações sob mudanças climáticas e estados de maturidade da planta. Concluiu-se ao final da pesquisa que a macho-esterilidade em 13861-1 foi governada pela herança do alelo recessivo nuclear *msGS* e não carrega nenhum efeito pleiotrópico indesejado. Estes resultados obtidos deram origem a uma patente (US006166306A).

Flaschenreim e Blowers (2017) desenvolveram uma linhagem macho estéril (H7487D) através de etil metano sulfonato (EMS). O gene da macho-esterilidade foi introgridido cruzando H7487D x *Pacifica Really Red* e, logo em seguida, o F₁ obtido foi autofecundado por cinco gerações. Como produto obtiveram a linhagem macho estéril P7998D.

Os híbridos interespecíficos também já foram produzidos com sucesso na vinca. Como o gênero *Catharanthus* apresenta oito espécies, entre elas *C. roseus*, a exploração de híbridos interespecíficos pode ser uma forma de melhoramento genético da cultura (SEVESTRE-RIGOUZZO *et al.*, 1993). Segundo Allard (1960), a hibridação interespecífica consiste no cruzamento de espécies taxonômicas diferentes com a preservação de tipos melhorados, que surgem como produtos da segregação.

A hibridação natural entre as espécies *Catharanthus longifolius* (Pichon) Pichon e *C. roseus* já foi observada na ilha de Madagascar. No entanto, *C. roseus* como genitor feminino não produziu vagens, sendo assim não foram observadas introgressões de *Catharanthus longifolius* (Pichon) Pichon para *C. roseus*. Já na utilização de *Catharanthus longifolius* (Pichon) Pichon como genitor feminino, os cruzamentos foram bem-sucedidos com alta produção de sementes e boa capacidade germinativa no F₁ (SEVESTRE-RIGOUZZO *et al.*, 1993). Na avaliação dos híbridos interespecíficos verificou-se heterose significativa para os teores de ajmalicina, catarantina e serpentina nas folhas e nas raízes, e para o conteúdo de vindolina nas folhas. Além disso, os híbridos também apresentaram maiores rendimentos de raízes e folhas em relação aos genitores.

Algumas cultivares de vinca de polinização aberta já foram citadas na literatura por Bowman (1996). Os cultivares de polinização aberta são obtidos através do acasalamento ao acaso de um grupo de indivíduos selecionados. Estes cultivares podem ser uma alternativa ao uso dos híbridos. As populações alógamas em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, em termos comerciais, são os cultivares de polinização aberta, ou, conforme conhecidas na cultura do milho, as variedades (BORÉM & MIRANDA, 2013).

Populações de polinização aberta são usadas como cultivares em espécies de cultivo que são tão sensíveis à depressão endogâmica que não permitem o desenvolvimento de linhagens endogâmicas, ou em espécies de cultivo em que os programas de melhoramento não são bem desenvolvidos (SOUZA JUNIOR, 2011).

Atualmente, no Brasil são mencionadas 127 cultivares de vinca registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (BRASIL, 2024), todas estas desenvolvidas para fins ornamentais. Portanto, faz-se necessária a busca por autossuficiência na produção e desenvolvimento de cultivares promissoras de vinca no Brasil para o tratamento convencional de tumores, leucemias e linfomas em humanos. Em outras partes do mundo já existem cultivares estabelecidas em um registro internacional de cultivares de *Catharanthus*, publicado em 1998 (NEJAT *et al.*, 2015).

No Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular de Plantas (LCBMP), da UFFRJ, já existem técnicas eficientes para a condução de cruzamentos artificiais, autofecundações e

emasculações nos genótipos pertencentes à coleção de germoplasma de vinca da UFRRJ. Devido ao reduzido tamanho das anteras e estigma das flores de vinca, extrema precisão e cuidado são necessários durante a realização das polinizações. No caso das autopolinizações artificiais, um protocolo próprio foi desenvolvido no LCBMP. Resultados promissores foram obtidos com a formação de sementes provenientes tanto de autopolinizações (naturais e artificiais), como em cruzamentos manuais (AMORIM, 2019; AMORIM *et al.*, 2023).

Nesse sentido, conclui-se que no LCBMP da UFRRJ já foram desenvolvidas as bases para dirigir a reprodução (polinização), conforme a necessidade dos métodos de melhoramento de plantas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, A. A. M.; EL-HASSEN, G. M. Effect of water regime and cultivar on herbage yield and alkaloid content of *Catharanthus roseus*. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, v. 23, n. 3, p. 350-356, 2001.

ALAM, P.; SHARAF-ELDIN, M. Limited production of plant derived anticancer drugs vinblastine and vincristine. **Planta Medica**, v. 82, n. 5, 2016.

ALLARD, R. W. **Principles of plant breeding**. London: J. Wiley, 1960. 485 p.

ALLORGE, L.; PHILLIPSON, P. B.; RAZAKAMALALA, R. *Catharanthus makayensis* L. Allorge, Phillipson & Razakamal. (Apocynaceae), a new species from Madagascar. **Candollea**, v. 70, n. 1, p. 61-66, 2015.

ALVES, M. P. **Ocorrência de fungos fitopatogênicos em *Catharanthus roseus* (vinca) em Viçosa - MG: novos relatos**. 21 p. Trabalho de conclusão de curso (Graduação) – Universidade Federal de Viçosa - MG, 2016.

AMARAL JÚNIOR, A. T. do. Divergência genética entre acessos de moranga do banco de germoplasma de hortaliças da Universidade Federal de Viçosa. Palestra. Suplemento. **Horticultura Brasileira**, v. 17, p. 03-06, 1999.

AMORIM, G. T. dos S. Modo de reprodução preferencial em genótipos de vinca (*Catharanthus roseus* [L.] G. DON). **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, UFRRJ: Seropédica, RJ. 2019. 81 p.

AMORIM, G. T. S.; PINTO, T. O.; SILVEIRA, T. O.; SOUZA, M. A. A.; MENEZES, B. R. da S.; DAMASCENO JUNIOR, P. C. *Catharanthus roseus* [L.] G. Don: allogamy as the main reproductive strategy and autogamy as a supposed reproductive guarantee mechanism. **South African Journal of Botany**, v. 154, p. 32-40, 2023.

ANDERSON, T. W. **An introduction to multivariate statistical analysis**. New York, John Wiley & Sons. 1958. 242 p.

ASLAM, J.S.; KHAN, H.; SIDDIQUI, Z. H.; FATIMA, Z.; MAQSOOD, M.; BHAT, M. A.; NASIM, S. A.; ILAH, A.; AHMAD, I. Z.; KHAN, A.; MUJIB, A.; SHARMA, M. P. Important drug: it's applications and production. **International Journal of Comprehensive Pharmacy**, v. 4, n. 12, p. 1-16, 2010.

BARIK, K.; SAO, S. Pharmaceutical alkaloids from *Catharanthus roseus*, detection and mapping of associated QTL. **International Journal of Green and Herbal Chemistry**, v. 4, n. 3, 2015.

BARKAT, M. A.; ABUL, H.; RAHMAN, M. A. Agricultural, pharmaceutical and therapeutic interior of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. In: NAEEM, M.; AFTAD, T.; KHAN, M. M. A. **Catharanthus roseus: Current Research and Future Prospects**. Springer, p. 71-100, 2017.

BARRALES-CUREÑO, H. J.; ANDRADE-HOYOS, P.; REYES, C.R.; ESPINOZA-PEREZ, J.; VALDEZ, L. G. L.; DE JESÚS, A. G.; RUÍZ, J. A. C.; HERRERA, L. M. S.; CABALLERO, M. C. C.; MAGALLÓN, J. A. S.; MONTOYA, J. M. Alkaloids of pharmacological importance in *Catharanthus roseus*. **IntechOpen**, v. 1, p. 1-18, 2019.

BARRALES-CUREÑO, H. J.; MONTOYA, J.; ESPINOZA-PEREZ, J.; CORTÉS RUIZ, J.; CONSTANTINO, G.; ZARAGOZA, F.; SALAZAR-MAGALLÓN, J.; CESAR, R.; LÓPEZ-VALDEZ, L. Metabolomics and fluxomics studies in the medicinal plant *Catharanthus roseus*. In: AFTAB, T.; HAKEEM, K. R. Eds. **Medicinal and Aromatic Plants**, Academic Press, p. 61-86, 2020.

BEAUMONT, M. A.; IBRAHIM, K. M.; BOURSOT, P.; BRUFORD, M. W. Measuring genetic distance. In: KARP, A. *et al.* (ed.). **Molecular Tools for Screening Biodiversity**, p. 315-325, 1998.

BERED, F.; BARBOSA-NETO, J. F.; CARVALHO, F. I. F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, v. 27, n. 2, p. 513-520, 1997.

BERTAN, I.; CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, A.C. Parental selection strategies in plant breeding programs. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 211-222, 2007.

BEUSELINCK, P. R.; STEINER, J. J. A proposed framework for identifying, quantifying and utilizing plant germoplasm resources. **Field Crop Research**, v. 29, n. 3, p. 261-272, 1992.

BHUTKAR, M. A.; BHISE, S. B. Comparative studies on antioxidant properties of *Catharanthus rosea* and *Catharanthus alba*. **International Journal of Pharm Tech Research**, v. 3, p. 1551-1556, 2011.

BIOVERSITY INTERNATIONAL. Guidelines for the development of crop descriptor lists. **Bioversity Technical Bulletin Series**. Bioversity International, Rome, Italy, 2007. 72 p.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de Plantas**. 6 ed. Viçosa: UFV, 2013. 523 p.

BOWMAN, R. N. *Phytophthora* resistance gene of *Catharanthus* and its use. PCT Int. Appl. WO 9519698 A1 19950727, US Patent 5,491,285. 1996.

BOWMAN, R. N. **Method of producing hybrid *Catharanthus* using male sterility**. US Patent 6,166,306. 2000.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**. Cultivar web – Gerenciamento de Informação. [WWW Document]. Disponível em: https://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php. Acessado em: 15/07/2024.

BUENO, L. C. de S.; MENDES, A. N. G.; CARVALHO, S. P. de C. **Melhoramento genético de plantas - princípios e procedimentos**. 2. Ed. Lavras: UFLA, 2006. 319 p.

BUSINESS RESEARCH INSIGHTS. Disponível em: <https://www.businessresearchinsights.com/market-reports/vinca-alkaloid-market-100461>. Acessado em: 12/02/2024.

BUSSAB, W. O.; MIAZAKI, E. S.; ANDRADE, D. F. Introdução à análise de agrupamentos. In: **SIMPÓSIO NACIONAL DE PROBABILIDADE E ESTATÍSTICA**, 9, 1990. São Paulo. Anais... Associação Brasileira de Estatística, ABE, 1990. 87 p.

CARENA, M. J. Germplasm enhancement and cultivar development: the need for sustainable breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 21, p. e385621S4, 2021.

CARVALHO, F. I. F.; LORENCETTI, C.; BENIN, G. **Estimativas e implicações da correlação no melhoramento genético**. Pelotas: UFPel, 2004. 142 p.

CHAUDHARY, S.; PANDEY, R.; SHARMA, V.; TRIPATHI, B. N.; KUMAR, S. Detection and mapping of QTLs affecting contents of pharmaceutical alkaloids in leaf and root of *Catharanthus roseus*. **Agricultural Research**, v. 2, p. 9–23, 2013.

COSTA, F. R.; PEREIRA, T. N. S.; SUDRÉ, C. P.; RODRIGUES, R. Marcadores RAPD e caracteres morfoagronômicos na determinação da diversidade genética entre acessos de pimentas e pimentões. **Ciência Rural**, v. 39, n.3, p. 696-704, 2009.

COSTA, I. N. B. **Análise de trilha visando o entendimento dos efeitos diretos e indiretos de variáveis morfoagronômicas sobre a produção de biomassa de folhas em vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don)**. Relatório de Bolsa de Iniciação Científica - PIBIC CNPq. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Seropédica, RJ. 2021. 17 p.

CRUZ, C. D. **Aplicações de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas**. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1990. 188 p.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. v. 2. Viçosa: UFV, 2003. 585 p.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 3 ed. Viçosa: UFV, 2004. v. 1, 480 p.

CRUZ, C. D. **Princípios de genética quantitativa**. Viçosa: UFV, 2005. 394 p.

CRUZ, C. D.; MEDEIROS, F. F.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Viçosa: UFV, 2020. 614 p.

DAS, S.; SHARANGI, A. B. Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus* L.): Diverse medicinal and therapeutic benefits to humankind. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 6, n. 5, p. 1695-1701, 2017.

DIAS, M. I.; SOUSA, M. J.; ALVES, R. C.; FERREIRA, I. C. F. R. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 82, p. 9-22, 2016.

DWIVEDI, S.; SINGH, M.; SINGH, A.P.; SHARMA, S.; KUMAR, S. Nature and degree of association among some important morphological traits in periwinkle *Catharanthus roseus*. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, v. 21, p. 338-342, 1999a.

DWIVEDI S.; SINGH, M.; SINGH, A. P.; SHARMA, S.; UNİYAL, G. C.; KUMAR, S. Genetic variability, heritability and genetic advance for alkaloid yield attributing traits in 26 genotypes of periwinkle *Catharanthus roseus*. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, v. 21, p. 320–324, 1999b.

DWIVEDI, S.; SINGH, M.; SINGH, A. P.; UNİYAL, G. C.; KHANUJA, S. P. S.; KUMAR S. Registration of a new variety Prabal of *Catharanthus roseus*. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, v. 23, p. 104-106, 2001.

EL-DOMYATI, F. M.; RAMADAN, A. M.; GADALLA, N. O.; EDRIS, S.; SHOKRY, A. M.; HASSAN, S. M.; HASSANIEN, S. E.; BAESHEN, M. N.; HAJRAH, N. H.; AL-KORDY, M. A.; ABUZINADAH, O. A.; AL- HAJAR, A. S. M.; AKOH, C. C.; BAHIELDIN, A. Identification of molecular markers for flower characteristics in *Catharanthus roseus* producing anticancer compounds. **Life Science Journal**, v. 9, n. 4, p. 5949-5960, 2012.

FALCONER, D. S. **Introdução à genética quantitativa**. 1 ed., Viçosa: UFV, 1987. 279 p.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. London: Longman Malaysia, 1996. 463 p.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF. Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

FAROOQUI, A. A.; SREERAMU, B. S. **Cultivation of medicinal and aromatic crops**. University Press, p. 308–312, 2001.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1998. 220 p.

FERREIRA, M. M. **Crescimento, alocação de biomassa e abordagem fitoquímica de plantas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don em função da adubação orgânica e época de colheita**. 2003. 63 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, MG, 2003.

FLASCHENRIEM, D. R.; BLOWERS, A. D. **Male sterility in *Catharanthus***. US Patent 10212908. 2017.

FLORA OF CHINA EDITORIAL COMMITTEE. Flora of China. **Missouri Botanical Garden and Harvard University Herbaria**, St. Louis, Missouri and Cambridge, Massachusetts, USA, 2015.

FRISCHKNECHT, P. M; BATTIG, M; BAUMANN, T. W. Effect of drought and wounding stress on indole alkaloid formation in *Catharanthus roseus*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 3, p. 707-710, 1987.

GHOLAMHOSSEINPOUR, Z.; HEMATI, K.; DORODIAN, H.; BASHIR-SADR, Z. Effect of nitrogen fertilizer on yield and amount of alkaloids in periwinkle and determination of vinblastine and vincristine by HPLC and TLC. **Plant Sciences Research**, v. 3, p. 4–9, 2011.

GOWER, J. C. A comparison of some methods of cluster analysis. **Biometrics**, Arlington, v. 23, n. 4, p. 623-637, 1967.

GOWER, J. C. A general coefficient of similarity and some of its properties. **Biometrics**, Arlington, v. 27, n. 4, p. 857-874, 1971.

GUIMARÃES, G.; CARDOSO, L.; OLIVEIRA, H.; SANTOS, C.; DUARTE, P.; SOTTOMAYOR, M. Cytogenetic characterization and genome size of the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **AoB Plants**, p. 1-10, 2012.

GUO, X. R.; YANG, L.; YU, J. H.; TANG, Z. H.; ZU, Y. G. Alkaloid variations in *Catharanthus roseus* seedlings treated by different temperatures in short term and long term. **Journal of Forest Research**, v. 18, n. 4, p. 313–315, 2007.

GUPTA, R. Periwinkle-produces anticancer drug. **Indian Farming**, v. 7, p. 11–13, 1977.

HASSAN, R. A.; HABIB, A. A.; EL-DIN, E. Effect of nitrogen and potassium fertilization on growth, yield and alkaloidal content of periwinkle (*Catharanthus roseus* G. Don). **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, v. 3, p. 24–26, 2009.

HEGDE, D. M. Effect of level and time of nitrogen application on growth and productivity of periwinkle, *Catharanthus roseus*. **Herba Hungarica**, v. 25, p. 107-114, 1986.

HEMMATI, N.; AZIZI, M.; ARUEI, H.; SAEEDI, M.; YAMCHI, A. Evaluation of some morphological traits and amount of vinblastine, vincristine and ajmalicine alkaloids in different organs of periwinkle cultivars (*Catharanthus roseus* (L.) G. DON). **Journal of Plant Production**, v. 28, n. 2, p. 53-66. 2021.

IBRAHIM, M.M.; ABOU EL-NASR, T.H.S.; ABDEL-SAMEA, N. S.; ABOUD, K.A. Efficiency of RAPD and ISSR markers in assessment of genetic diversity in some *Catharanthus roseus* L. cultivars grown in Egypt. **World Applied Sciences Journal**, v. 26, n. 11, p. 1407-1415, 2013.

IDREES, M.; NAEEM, M.; KHAN, M. M. A. The superiority of cv ‘rosea’ over cv ‘alba’ of periwinkle (*Catharanthus roseus* L.) in alkaloid production and other physiological attributes. **Turkish Journal of Biology**, v. 34, p. 81-88, 2010.

INDUSTRYARC ANALYTICS RESEARCH CONSULTING. Disponível em: <https://www.industryarc.com/Report/15679/catharanthine-market.html>. Acesso em: 12/02/2024.

IRASTORZA, M. H. **Aspectos teóricos e aplicados da descrição varietal do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1983. 146 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Sementes) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

ISHIKAWA, H.; COLBY, D. A.; SETO, S.; VA, P.; TAM, A.; KAKEI, H.; RAYL, T. J.; HWANG, I.; BOGER, D. L. Total synthesis of vinblastine, vincristine, related natural products, and key structural analogues. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 13, p. 4904-4916, 2009.

JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. **Bulletin de la Société vaudoise des sciences naturelles**. v. 44, p. 223-270, 1908.

JARAMILLO, S.; BAENA, M. **Material de apoyo a la capacitación em conservación ex situ de recursos fitogenéticos**. Instituto Internacional para os Recursos Fitogenéticos. Cali, Colômbia, 2000. 221 p.

JANA, B. K.; VARGHESE, B. Effect of mineral nutrition on growth and alkaloid content of *Catharanthus roseus*. **Indian Agriculture**, v. 40, p. 93-99, 1996.

JHANG, T.; DWIVEDI, S.; SHARMA, S. Classical breeding and trait genetics in *Catharanthus*. In: KOLE, C. **The Catharanthus Genome**. Cham: Springer International Publishing, p. 35-83, 2022.

JOLLIFFE, I. T. Discarding variables in a principal component analysis. II. Real data. **Applied Statistics**, v. 22, n. 1, p. 21-31, 1973.

JORDAN, M. A.; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. **Nature reviews cancer**, v. 4, n. 4, p. 253-265, 2004.

KANIESKI, M. R.; ARAUJO, A. C. B.; LONGHI, S. J. Quantificação da diversidade em Floresta Ombrófila Mista por meio de diferentes Índices Alfa. **Scientia Forestalis**, v. 38, n. 88, p. 567-577, 2010.

KIM, S. W.; BAN, S. H.; JEONG, S. C.; CHUNG, H. J.; KO, S. M.; YOO, O. J.; LIU, J. R. Genetic discrimination between *Catharanthus roseus* cultivars by metabolic fingerprinting using ¹H NMR spectra of aromatic compounds. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 12, n. 6, p. 646-652, 2007.

KITAJIMA, E. W. An annotated list of plant viruses and viroids described in Brazil (1926-2018). **Biota Neotropica**, v. 20, n. 2, p. 1-101, 2020.

KULKARNI, R. N.; DIMARI, B. P.; RAJGOPAL, K. Variability for quantitative characters in periwinkle. **Indian Drugs**, v. 22, p. 61-64, 1984.

KULKARNI, R. N. Evidence for phenotypic assortative mating for flower colour in periwinkle. **Plant Breeding**, v. 118, n. 6, p. 561-564, 1999.

KULKARNI, R. N.; SREEVALLI, Y.; BASKARAN, K.; KUMAR S. The mechanism and inheritance of intraflower self-pollination in self-pollinating strains of periwinkle. **Plant Breeding**, v. 120, n. 3, p. 247–250, 2001.

KULKARNI, R. N.; BASKARAN, K.; CHANDRASHEKHRA, R. S.; KHANUKA, S. P. S.; DAROKAR, M. P.; SHASANY, A. K.; UNİYAL, G. C.; GUPTA, M. M.; KUMAR, S. **‘Dhawal’, A high alkaloid producing periwinkle plant**. US006548746B1, United States Patent Office. 2003.

KULKARNI, R. N, SREEVALLI, Y, BASKARAN, K. Allelic genes at two loci govern different mechanisms of intraflower selfpollination in self-pollinating strains of periwinkle. **Journal of Heredity**, v. 95, p. 71–77, 2005.

KULKARNI, R. N.; BASKARAN, K. From herkogamy to cleistogamy-development of cleistogamy in periwinkle. **Journal of heredity**, v. 104, n. 1, p. 140-148, 2013.

KULKARNI, R. N.; BASKARAN, K.; JHANG, T. Breeding medicinal plant, periwinkle [*Catharanthus roseus* (L) G. Don]: a review. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, v. 14, n. 4, p. 283-302, 2016.

KUMAR, S.; SHAH, N.; GARG, V.; BHATIA, S. Large scale in-silico identification and characterization of simple sequence repeats (SSRs) from de novo assembled transcriptome of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Plant Cell Reports**, v. 33, p. 905-918, 2014a.

KUMAR, A.; SINGHAL, K. C.; SHARMA, R. A.; VYAS, G. K.; KUMAR, V. Molecular characterisation of *Catharanthus roseus* cultivars from various regions of Rajasthan based on RAPD marker. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 5, n. 9, p. 3936-3941, 2014b.

LAL, S.; MISTRY, K. N.; SHAH, S. D.; THAKER, R.; VAIDYA, P. B. Genetic diversity assessment in nine cultivars of *Catharanthus roseus* from Central Gujarat (India) through RAPD, ISSR and SSR markers. **Journal of research in Biology**, v. 1, n. 8, p. 667-675, 2011.

LANCE, G. N.; WILLIAMS, W. T. A general theory of classificatory sorting strategies. I. Hierarchical systems. **Computer Journal**, v. 9, n. 4, p. 373-380, 1967.

LATA, B. Cultivation, mineral nutrition and seed production of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don in the temperate climate zone. **Phytochemistry Reviews**, v. 6, n. 2-3, p. 403-411, 2007.

LEVY, A.; MILO J.; ASHRI, A.; PALEVITCH, D. Heterosis and correlation analysis of the vegetative components and ajmalicine content in the roots of the medicinal plant –*Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Euphytica**, v. 32, p. 557–564, 1983.

LISCOMBE, D. K.; O'CONNOR, S. E. A virus-induced gene silencing approach to understanding alkaloid metabolism in *Catharanthus roseus*. **Phytochemistry**, v. 72, n.16, p. 1969-1977, 2011.

LÖRZ, H.; WENZEL, G. **Molecular marker systems in plant breeding and crop improvement**. Springer, New York, NY, USA, 2005. 476 p.

LOYOLA-VARGAS, V. M.; SÁNCHEZ-ITURBE, P.; CANTO-CANCHÉ, B.; GUTIÉRREZ-PACHECO, L.; GÁLÁZ-ÁVALOS, R.; MORENO-VALENZUELA, O. Biosíntesis de los alcaloides indólicos. Uma revisão crítica. **Revista de la Sociedad Química de México**, v. 48, p. 67-94, 2004.

MACIEL, S. C.; SILVA, F. S.; REIS, M.S.; JADÃO, A.S.; ROSA, D. D.; GIAMPAN, J. S.; KITAJIMA, E. W.; REZENDE, J. A. M.; CAMARGO, L. E. A. Characterization of a new potyvirus causing mosaic and flower variegation in *Catharanthus roseus* in Brazil. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 6, p. 687-690, 2011.

MAGNOTTA, M.; MURATA, J.; CHEN, J.; DE LUCA, V. Identification of a low vindoline accumulating cultivar of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don by alkaloid and enzymatic profiling. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1758–1764, 2006.

MAITI, S.; CHANDRA, R.; GEETHA, K. A.; MANDAL. Production technology of some important medicinal and aromatic crops developed under the all India coordinated research project. **Indian Journal Arecanut Spices Medicinal Plants**, v. 2, n. 3, p. 88–98, 2000.

MALL, M.; VERMA, R. K.; GUPTA, M. M.; SHASANY, A.K.; KHANUJA, S. P. S.; SHUKLA, A. K. Influence of seasonal and ontogenic parameters on the pattern of key terpenoid indole alkaloids biosynthesized in the leaves of *Catharanthus roseus*. **South African Journal of Botany**, v. 123, p. 98–104, 2019.

MALL, M.; SINGH, P.; KUMAR, R.; SHANKER, K.; GUPTA, A. K.; KHARE, P.; SHASANY, A. K.; KHATOON, S.; SUNDARESAN, V.; BASKARAN, K.; YADAV, S.; SHUKLA, A. K. Phenotypic, genetic and expression profiling of a vindoline-rich genotype of *Catharanthus roseus*. **South African Journal of Botany**, v. 139, p. 50-57, 2021.

MARGALEF, R. Homage to Evelyn Hutchinson, or why is there an upper limit to diversity. **Transactions of the Connecticut Academy of Arts and Sciences**, v. 44, p. 211-235, 1972.

MATHER, K.; JINKS, J. L. **Biometrical genetics**. Second revised edition. Ithaca, New York, Cornell University Press, 1971. 382 p.

MENDES, M. A. S.; URBEN, A. F. **Fungos relatados em plantas no Brasil, Laboratório de Quarentena Vegetal**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Disponível em: <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/fgbanco01.asp>. Acessado em: 29/06/2024.

MEYER, W.; MITCHELL, T. G.; FREEDMAN, E. Z.; VILGALYS, R. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 9, p. 2274-2280, 1993.

MILACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 17-28, 1998.

MIRANDA, G. V. **Diversidade genética e desempenho de cultivares de soja como progenitores**. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998. 117 p.

- MISHRA, P.; UNİYAL, G. C.; SHARMA, S.; KUMAR S. Pattern of diversity for morphological and alkaloid yield related traits among the periwinkle *Catharanthus roseus* accessions collected from in and around Indian subcontinent **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 48, n. 3, p. 273-286, 2001.
- MIYAJIMA, D. Pollination and seed set in vinca [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don]. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 79, n. 5, p. 771-775, 2004.
- MOHAMMADI, S. A.; PRASANNA, B. M. Analysis of genetic diversity in crop plants: salient statistical tools and considerations. **Crop Science**, v. 43, p. 1235-1248, 2003.
- MORGAN, R. **Enciclopédia das ervas e plantas medicinais**. 8a ed., São Paulo, p.141, 1994.
- MRIDHA, A. U.; RAHMAN, M. M. Leaf blight of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid and its in vitro control through bio-pesticides. **Pakistan Journal of Botany**, v. 47, n. 2, p. 741-745, 2015.
- NAEEM, M.; AFTAD, T.; KHAN, M. M. A. ***Catharanthus roseus*: Current Research and Future Prospects**. 1st ed, Label, Springer, 2017. 412 p.
- NARKIEWICZ, M.; SADOWSKA, A. Possibility of cultivation of rosy periwinkle (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) for seed production under conditions of Poland. **Biuletyn IHAR**, v. 177, p. 179–184, 1991.
- NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 10, p. 5269-5273, 1979.
- NEJAT, N.; VALDIANI, A.; CAHILL, D.; TAN Yee-How; MAZIAH, M.; ABIRI R. Ornamental exterior versus therapeutic interior of Madagascar Periwinkle (*Catharanthus roseus*): the two faces of a versatile herb. **The Scientific World Journal**, v. 2015, p. 1-19, 2015.
- NMPB. **Agro-techniques of selected medicinal plants (vol 1)**. National Medicinal Plants. Board, Department of AYUSH, Ministry of Health and Family Welfare, Government of India, p. 111, 2014.
- OLIVEIRA, V. R.; CASALI, V. W. D.; CRUZ, C. D. PEREIRA, P. R.; BRACCINI, A. L. Avaliação da diversidade genética em pimentão através de análise multivariada. **Horticultura Brasileira**, v. 17, p. 19-24, 1999.
- PANDEY, S. *Catharanthus roseus*: cultivation under stress conditions. In: NAEEM, M.; AFTAD, T.; KHAN, M. M. A. ***Catharanthus roseus*: Current Research and Future Prospects**. Springer, p. 383-397, 2017.
- PAREEK, S. K.; MAHESHWARI, M. L.; GUPTA, R. Cultivation of periwinkle in North India. **Indian Journal of Horticulture**, v. 30, n. 3, p. 9-12, 1985.
- PAULA, F. C.; SOARES, I. F. G.; NETO, J. D. de S.; MOULIN, M. M.; BERILLI, A. P. C. G.; NASCIMENTO, L. C.; PRETTI, I. R. Correlações fenotípicas e genotípicas a expressão de

vincristina e vimblastina relativas ao efeito do solo em características concernentes a *Catharanthus roseus*. **Revista IFES Ciência**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2021.

PIMENTEL, A. J. B.; RIBEIRO, G.; SOUZA, M. D.; MOURA, L. M.; ASSIS, J. D.; MACHADO, J. C. Comparação de métodos de seleção de genitores e populações segregantes aplicados ao melhoramento de trigo. **Bragantia**, v. 72, n. 2, p. 113-121, 2013.

PLAIZIER, A. C. A revision of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Apocynaceae). **Mededelingen Landbouwhogeschool**, v. 81, n. 9, p. 1-12, 1981.

POTIER, P. Is the modified Polonovski reaction biomimetic? In: PHILLIPSON, J. D.; ZENK, M. H. (Eds.), **Indole and Biogenetically Related Alkaloids**. Academic Press Inc. (London) Ltd, London, p. 159-169, 1980.

PRABHU, D. S.; RAJESWARI, V. D. *Catharanthus roseus*: the cancer-fighting medicine. In: NAEEM, M.; AFTAD, T.; KHAN, M. M. A. **Catharanthus roseus: Current Research and Future Prospects**. Springer, p. 121-151, 2017.

PROTA. **Plant resources of tropical africa. african ornamentals. Proposals and examples**. Wageningen, The Netherlands: PROTA Foundation; 2015.

QING, Y. D.; BINYE, P.; KUN, R. D. L. ISSR analysis of genetic relationships between forty varieties of *Catharanthus roseus*. **Journal of Shanghai Jiaotong University-Agricultural Science**, v. 27, p. 138-142, 2011.

RAJESWARA RAO, B. R.; SINGH, M. Effect of NPK fertilizers and spacing on periwinkle (*Catharanthus roseus*) under irrigated and rained conditions. **Herba Hungarica**, v. 29, p. 1-2, 1990.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; ZIMMERMANN, M. J. de O. **Genética quantitativa em plantas autógamas: aplicações ao melhoramento do feijoeiro**. Goiânia: UFG. 1993. 271 p.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; PINTO, C. A. B. P. **Genética na agropecuária**. 4. ed. Lavras: UFLA, 2008. 463 p.

RAMOS, S.; SOBRAL, K.; FERREIRA, J.; de ARAGAO, W. M.; COSTA, E.; RIBEIRO, F. E. **Proposta de descritores mínimos para caracterizar variedades e cultivares de *Cocos nucifera* L. e indicação de cultivares exemplos**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2018. 45 p.

RAO, C. R. **Advanced statistical methods in biometric research**. New York, John Wiley, 1952.

REIS, A.; HENRIQUE, I. M. *Phytophthora nicotianae* e *Rhizoctonia solani*: dois novos patógenos da vinca no Brasil. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças. **Embrapa Hortaliças. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 30, p. 19, 2007.

- REIS, M. V. M.; DAMASCENO, P. C.; CAMPOS, T. D. O.; DIEGUES, I. P.; FREITAS, S. C. D. Variabilidade genética e associação entre caracteres em germoplasma de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 2, p. 412-420, 2015.
- RESENDE, M. D. V. de. Melhoramento de espécies perenes. In: NASS, L. L. *et al.* (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento – plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001, p. 357-421.
- ROHLF, F. J. Adaptive hierarchical clustering schemes. **Systematic Zoology**, v. 18, p. 58-82, 1970.
- ROSS, I. A. **Medicinal plants of the world: chemical constituents, traditional and modern medicinal uses**. Totowa, New Jersey, p. 623, 1999.
- ROY, A. M.; BANERJEE, N.; MANDAL, S. Studies on alkaloid yield in mutants of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. through character correlation and path analysis. **Applied Botany**, v. 64, p. 19193-19198, 2013.
- SADOWSKA, A.; OBIDOWSKA, G.; SZACHO-GUCHOWICZ, M. Effect of NPK fertilization upon production of crude material and alkaloid content of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don). **Biuletyn IHAR**, v. 170, p. 55–63, 1989.
- SALGOTRA, R. K.; CHAUHAN, B. S. Genetic diversity, conservation, and utilization of plant genetic resources. **Genes**, v. 14, n. 1, p. 1-20, 2023.
- SALOMÃO, A. N. **Manual de curadores de germoplasma-vegetal: glossário**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. 14 p.
- SAMIYARSIH, S.; NAIPOSPOS, N.; PALUPI, D. Variability of *Catharanthus roseus* based on morphological and anatomical characters, and chlorophyll contents. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 20, n. 10, p. 2986-2993, 2019.
- SANCHEZ, D.; SADOUN, S. B.; MARY-HUARD, T.; ALLIER, A.; MOREAU, L.; CHARCOSSET, A. Improving the use of plant genetic resources to sustain breeding programs' efficiency. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 120, n. 14, p. 1-9, 2023.
- SANTANA, J. G. S.; NASCIMENTO, A. L. S.; COSTA, T. S.; ALMEIDA, T. M. B.; RABBANI, A. R. C.; SILVA, A. V. C. Estimation of genetic diversity in a natural population of Cambuí tree (*Myrciaria tenella* O. Berg) using ISSR markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 4, p. 1-11, 2016.
- SCHLAEPFER, L.; MENDOZA, J. A. Medicinal plants as potential agents against cancer, relevance for Mexico. **Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas**, v. 41, n. 4, p. 18-27, 2010.
- SCHMIT, R.; MELO, R. C.; PEREIRA, T. C. V.; BECK, M.; GUIDOLIN, A. F.; COIMBRA, J. L. M. Application of multivariate techniques in the evaluation of pure lines of beans. **Ciência Rural**, v. 46, n. 9, p. 1535-1541, 2016.

SCHMELZER, G. H.; GURIB-FAKIM, A. Plant resources of Tropical Africa 11 (1). Medicinal plants 1. PROTA Foundation, Wageningen, Netherlands. **Backhuys Publishers, Leiden, Netherlands/CTA, Wageningen, Netherlands**, v. 791, p. 427-430, 2008.

SCHUELTER, A. R.; PEREIRA, M. G.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; CASALI, V. W. D., SCAPIM, C. A.; BARROS, W. S.; FINGER, F. L. Genetic control of agronomically important traits of pepper fruits analyzed by Hayman's partial diallel cross scheme. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, p. 113 - 127, 2010.

SEABRA, P. V.; ALEXANDRE, M. A. V.; RIVAS, E. B.; DUARTE, L. M. L. (1999). Occurrence of a Potyvirus in *Catharanthus roseus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 66, p. 116, 1999.

SENBAGALAKSHMI, P.; RAO, M.V.; SENTHIL KUMAR, T. In vitro studies, biosynthesis of secondary metabolites and pharmacological utility of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.: a review. In: NAEEM, M.; AFTAD, T.; KHAN, M. M. A. **Catharanthus roseus: Current Research and Future Prospects**. Springer, p. 153-199, 2017.

SEVESTRE-RIGOUZZO, M.; NEF-CAMPA, C.; GHESQUIERE, A.; CHRESTIN, H. Genetic diversity and alkaloid production in *Catharanthus roseus*, *C. trichophyllus* and their hybrids. **Euphytica**, v. 66, n. 1-2, p. 151-159, 1993.

SHARMA, V.; CHAUDHARY, S.; SRIVASTAVA, S.; PANDEY, R.; KUMAR, S. Characterization of variation and quantitative trait loci related to terpenoid indole alkaloid yield in a recombinant inbred line mapping population of *Catharanthus roseus*. **Journal of Genetics**, v. 91, p. 49-69, 2012.

SHAW, R. K.; ACHARYA, L.; MUKHERJEE, A. K. Assessment of genetic diversity in a highly valuable medicinal plant *Catharanthus roseus* using molecular markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 52-59, 2009.

SHOKEEN, B.; SETHY, N. K.; KUMAR, S.; BHATIA, S. Isolation and characterization of microsatellite markers for analysis of molecular variation in the medicinal plant Madagascar Periwinkle (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). **Plant Science**, v. 172, n. 3, p. 441-451, 2007.

SHULL, G. H. Beginnings of the heterosis concept. In J.W. Gowen (ed.) **Heterosis: A record of researches directed toward explaining and utilizing the vigor of hybrids**. Iowa State College Press, Ames. p. 14 - 48, 1952.

SINGH, M.; DWIVEDI, S. Genetic analysis of important morpho-economic traits in periwinkle, *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Indian Forester**, v. 136, n. 8, p. 1034-1047, 2010.

SINGH, M.; SRIVASTAVA, A.; SINGH, A. P.; SINGH, V.; SRIVASTAVA, A.; SHARMA, S.; UNIYAL, G. C.; DWIVEDI, S. Genetic analysis of important morpho-economic traits in periwinkle [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don]. **Indian J. Genet.**, v. 67, n. 1, p. 62-65, 2007.

SINGH, M.; DWIVEDI, S. Correlation and path coefficient analysis in the F₁ generation of 6x6 diallel analysis in periwinkle-*Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Progressive Research - An International Journal**, v. 12, p. 2502-2505, 2017.

SINGH, M.; DHATT, K. K. Assessment of combining ability for morphological traits in periwinkle (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) genotypes using diallel analysis. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 97, n. 2, p. 265-271, 2022.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W. H. Freeman, 1973. 573 p.

SOARES, I. F. G.; PAULA, F. C.; DE SOUZA NETO, J. D.; FERREIRA, B. C.; BERILLI, A. P. C. G.; MOULIN, M. M. Morphological diversity in varieties of *Catharanthus Roseus* [L.] G. Don. **Observatório de La economía Latinoamericana**, v. 22, n. 1, p. 2095-2111, 2024.

SOKAL, R. R.; MICHENER, C. D. A statistical method for evaluating systematic relationships. **Science Bulletin**. v. 38, p. 1409–1438, 1958.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. James. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, v. 11, n. 2, p. 33-40, 1962.

SOUZA JUNIOR, C. L. Cultivar development of allogamous crops. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 11(spe), p. 8-15, 2011.

SREEVALLI, Y.; BASKARAN, K.; CHANDRASHEKARA, R. S.; KULKARNI, R. N. Preliminary observation on the effect of irrigation frequency and genotypes on yield and alkaloid concentration in periwinkle. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, v. 22, n. 4a, p. 356-358, 2000.

SREEVALLI, Y.; KULKARNI, R. N.; BASKARAN, K.; R. CHANDRASHEKARA, S. Increasing the content of leaf and root alkaloids of high alkaloid content mutants of periwinkle through nitrogen fertilization. **Industrial Crops and Products**, v. 19, n. 2, p. 191-195, 2004.

SUDRÉ, C. P.; RODRIGUES, R.; RIVA, E. M.; KARASAWA, M.; AMARAL JÚNIOR, A. T. Divergência genética entre acessos de pimenta e pimentão utilizando técnicas multivariadas. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 1, p.22-27, 2005.

SWARUP, S.; CARGILL, E. J.; CROSBY, K.; FLAGEL, L.; KNISKERN, J.; GLENN, K. C. Genetic diversity is indispensable for plant breeding to improve crops. **Crop Science**, v. 61, n. 2, p. 839-852, 2021.

THOMAS, P. A.; WOODWARD, J.; STEGELIN, F. E.; PENNISI, S. V. **A guide for commercial production of vinca**. Bulletin 1219, 2009.

TOLAMBIYA, P.; MATHUR, S. A Study on Potential Phytopharmaceuticals Assets in *Catharanthus roseus* L. (Alba). **International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2016.

TYLER, V.E. Medicinal plant research: 1953-1987. **Planta Medica**, v. 54, n. 2, p. 95-100, 1988.

VALOIS, A. C. C.; SALOMÃO, A. N.; ALLEM, A. C. **Glossário de recursos genéticos vegetais**. Documentos, 22. Brasília, DF: Embrapa Cenargen, 1996. 62 p.

VAN DER HEIJDEN, JACOBS D. I.; SNOEIJER W.; Hallard D.; VERPOORTE R. The Catharanthus alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 5, p. 607-628, 2004.

VERMA, A.; LAAKSO, I.; SEPPANEN-LAAKSO, T.; HUHTIKANGAS, A.; RIEKKOLA, M. A simplified procedure for indole alkaloid extraction from *Catharanthus roseus* combined with a semi-synthetic production process for vinblastine. **Molecules**, v. 12, p. 1307-1315, 2007.

VERPOORTE, R.; VAN DER HEIJDEN, R.; VAN GULIK, W. M.; TEN HOOPEN, H. J. Plant biotechnology for the production of alkaloids: present status and prospects. **The alkaloids: chemistry and pharmacology**, v. 40, p. 1-187, 1991.

WALLER, G.R.; NOWACKI, E.K. **Alkaloid biology and metabolism in plants**. Boston: Springer Science and Business Media, 1978. 294 p.

WRIGHT, S. Correlation and causation. **Journal of Agricultural Research**, v. 20, p. 557-585, 1921.

XIAOFEN, S.; YU, C.; JUNSONG, P.; YULIANG, W.; KEXING, S.; KEXUAN, T.; RUN, C. 长春花主要农艺性状与文多灵含量的相关及通径分析. **Chinese Bulletin of Botany**, v. 44, n. 1, p. 96-102, 2009.

XING, S. H.; GUO, X. B.; WANG, Q.; PAN, Q. F.; TIAN, Y. S.; LIU, P.; ZHAO, J. Y.; WANG, G. F.; SUN, X. F.; TANG, K. X. Induction and flow cytometry identification of tetraploids from seed-derived explants through colchicine treatments in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1-10, 2011.

YU, F.; DE LUCA V. ATP-binding cassette transporter controls leaf surface secretion of anticancer drug components in *Catharanthus roseus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, p. 5830–15835, 2013.

ZHANG, J.; HANSEN, L. G.; GUDICH, O.; VIEHRIG, K.; LASSEN, L. M.; SCHRÜBBERS, L.; & KEASLING, J. D. A microbial supply chain for production of the anti-cancer drug vinblastine. **Nature**, v. 609, n. 7926, p. 341-347, 2022.

ZHU, X.; ZENG, X.; SUN, C.; CHEN, S. Biosynthetic pathway of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus*. **Frontiers of medicine**, v. 8, n. 3, p. 285-293, 2014.

ZHU, J.; WANG, M.; WEN, W.; YU, R. Biosynthesis and regulation of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus*. **Pharmacognosy reviews**, v. 9, n. 17, p. 24-28, 2015.

ZOLET, A. C. T.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. **Marcadores moleculares na era genômica: metodologias e aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. 181 p.

Capítulo I. Diversidade genética baseada em caracteres morfoagronômicos entre genótipos de vinca (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don).

RESUMO

A vinca (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) é uma espécie medicinal que produz importantes alcaloides antineoplásicos encontrados em baixas concentrações nas folhas desta espécie. Portanto, é essencial implementar um programa de melhoramento genético. Para isso, é necessário, inicialmente, estimar a diversidade genética, pois o sucesso na seleção de genótipos é alcançado quando se dispõe de diversidade genética. Esta pode ser acessada através de descritores morfoagronômicos. Diante do exposto, objetivou-se conhecer e estimar a diversidade genética entre 79 genótipos da Coleção de Trabalho de vinca da UFRRJ. Para tal, uma lista com 41 descritores, inéditos e outros transcritos da literatura, foi idealizada e desenvolvida, contemplando todas as partes da planta: caule, ramos, folhas, flores, frutos (vagens) e sementes. Em seguida, procedeu-se a caracterização dos 79 genótipos da referida coleção. Todos os descritores foram submetidos a uma análise estatística descritiva. Posteriormente, procedeu-se o descarte de descritores redundantes via método do cosseno quadrado. De posse de uma nova matriz, contendo os descritores mais discriminativos, procedeu-se à análise de agrupamento. Para isso, estimou-se a matriz de distância genética através da distância Euclidiana (matriz fenética). A análise de agrupamento foi realizada através do algoritmo UPGMA (matriz cofenética). Para estimar o número ótimo de grupos no dendrograma foi utilizado o algoritmo *kgs*. O ajuste entre as matrizes fenética e cofenética foi estimado a partir da correlação cofenética. Com base no padrão de agrupamento dos genótipos via *kgs* foram estimados as médias e os desvios-padrões de cada uma das variáveis dentro dos grupos formados. Os valores médios para cada grupo também foram apresentados em gráficos do tipo radar. Utilizando-se os descritores mais discriminativos, foram estimados também os índices de diversidade de Shannon (H') e de Pielou (J'). Em seguida, via algoritmo Anosim (análise da similaridade) foram estimados os índices de diversidade entre e dentro dos grupos. Por fim, os descritores mais discriminativos foram submetidos à análise de importância relativa das variáveis. A partir do método do cosseno quadrado foram elencados 18 descritores mais discriminativos para proceder as análises da diversidade. Foram definidos oito grupos estatisticamente distintos. Verificou-se que os grupos foram muito heterogêneos, o que pode sugerir que a diversidade genética não seja alta. O grupo G3 agrupou os genótipos mais produtivos em termos de produção de biomassa foliar seca (BFO_s). De modo geral, as plantas deste grupo possuíam altura reduzida, muitos ramos, entrenós de ramos primários e secundários mais curtos, pecíolos menores e área de projeção da copa mais estreita. No grupo G6, encontrou-se a maior diversidade e o pior desempenho para a produção de BFO_s, mesmo sendo um *cluster* formado por plantas de folhas grandes, ou seja, de maior área foliar. Além disso, foi um grupo composto por genótipos com pétalas pequenas, entrenós de ramos primários compridos, pecíolos longos e com muitas sementes por vagem. As estimativas dos índices de $H' = 2,22$ e $J' = 0,77$ corroboraram os resultados da análise de agrupamento. Logo, a diversidade genética da Coleção de Trabalho de vinca da UFRRJ foi baixa a moderada. A análise da similaridade (Anosim) demonstrou que a maior diversidade é encontrada entre os grupos. Ademais, indicou que as diferenças entre os grupos foram significativas. Descritores ligados às sementes (NSEVA), ramos (NRT), folhas (AFO) e produção (BFO_s) exerceram maior importância relativa na análise da diversidade. Pode-se concluir, portanto, que a Coleção de Trabalho de vinca aqui analisada possui diversidade genética baixa a moderada.

Palavras-chave: coleção de germoplasmas, descritores totais, estatística multivariada, fenótipo, melhoramento genético, plantas medicinais.

Chapter I. Genetic diversity based on morphoagronomic traits among periwinkle genotypes.

ABSTRACT

Periwinkle (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) is a medicinal species that produces important antineoplastic alkaloids found in low concentrations in the leaves of this species. Therefore, it is essential to implement a genetic improvement program. To this end, it is necessary to initially estimate genetic diversity, since success in genotype selection is achieved when genetic diversity is available. This can be accessed through morphoagronomic descriptors. In view of the above, the objective was to understand and estimate genetic diversity among 79 genotypes of the Periwinkle Working Collection of UFRRJ. To this end, a list with 41 descriptors, both unpublished and others transcribed from the literature, was designed and developed, covering all parts of the plant: stem, branches, leaves, flowers, fruits (pods) and seeds. Then, the 79 genotypes of the aforementioned collection were characterized. All descriptors were subjected to descriptive statistical analysis. Subsequently, redundant descriptors were discarded using the squared cosine method. With a new matrix containing the most discriminative descriptors, cluster analysis was performed. For this purpose, the genetic distance matrix was estimated using the Euclidean distance (phenetic matrix). Cluster analysis was performed using the UPGMA algorithm (cophenetic matrix). The *k*gs algorithm was used to estimate the optimal number of groups in the dendrogram. The adjustment between the phenetic and cophenetic matrices was estimated based on the cophenetic correlation. Based on the genotype grouping pattern via *k*gs, the means and standard deviations of each of the variables within the groups formed were estimated. The mean values for each group were also presented in radar graphs. Using the most discriminative descriptors, the Shannon (H') and Pielou (J') diversity indices were also estimated. Then, using the Anosim algorithm (similarity analysis), the diversity indices between and within the groups were estimated. Finally, the most discriminative descriptors were subjected to analysis of the relative importance of the variables. Using the squared cosine method, 18 most discriminative descriptors were listed to perform the diversity analyses. Eight statistically distinct groups were defined. It was found that the groups were very heterogeneous, which may suggest that genetic diversity is not high. Group G3 grouped the most productive genotypes in terms of dry leaf biomass (BFO_s) production. In general, the plants in this group had reduced height, many branches, shorter internodes of primary and secondary branches, smaller petioles and a narrower crown projection area. The highest diversity and worst performance for BFO_s production were found in group G6, even though it was a cluster formed by plants with large leaves, i.e., with a larger leaf area. In addition, it was a group composed of genotypes with small petals, long internodes of primary branches, long petioles and with many seeds per pod. The estimates of the indexes $H' = 2.22$ and $J' = 0.77$ corroborated the results of the cluster analysis. Therefore, the genetic diversity of the UFRRJ Periwinkle Working Collection was low to moderate. The similarity analysis (Anosim) demonstrated that the highest diversity was found among the groups. Furthermore, it indicated that the differences between the groups were significant. Descriptors linked to seeds (NSEVA), branches (NRT), leaves (AFO) and production (BFO_s) exerted greater relative importance in the diversity analysis. It can be concluded, therefore, that the Periwinkle Working Collection analyzed here has low to moderate genetic diversity.

Keywords: germplasm collection, total descriptors, multivariate statistics, phenotype, plant breeding, medicinal plants.

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Catharanthus roseus* [L.] G. Don, chamada popularmente no Brasil de vinca ou maria-sem-vergonha, tem o seu centro de origem na ilha de Madagascar (ALLORGE *et al.*, 2015; NEJAT *et al.*, 2015). É uma espécie medicinal pertencente à família Apocynaceae, com $2n = 2x = 16$ cromossomos (GUIMARÃES *et al.*, 2012). As plantas da espécie apresentam porte arbustivo, baixa estatura, rápido crescimento e são perenes, podendo alcançar até um metro de altura, com raízes que se estendem até 70 cm de profundidade (NEJAT *et al.*, 2015).

A vinca é responsável pela produção de diversos alcaloides antineoplásicos, denominados TIAs (*terpenoid indole alkaloids*), com destaque para a vimblastina e vincristina. O primeiro alcaloide, na forma de sulfato de vimblastina, é usado no tratamento convencional da doença de Hodgkin's, linfossarcoma, coriocarcinoma, neuroblastoma, carcinoma de mama e pulmões. Já o sulfato de vincristina é utilizado no tratamento da leucemia em crianças, leucemia linfocítica, doença de Hodgkin's, tumor de Wilkins, neuroblastoma e sarcoma de células reticulares (ASLAM *et al.*, 2010). A vincristina, é utilizada, principalmente, no tratamento da leucemia aguda em crianças (KAUSHIK *et al.*, 2017). No entanto, é preciso mencionar que estes metabólitos secundários ocorrem em baixíssimas concentrações nas folhas de *C. roseus* (TYLER, 1988; MU *et al.*, 2012; PROTA, 2015).

Por isso, existe uma demanda crescente sobre pesquisas que visam o melhoramento genético da vinca. Para isso, é necessário, inicialmente, conhecer e estimar a diversidade genética entre genótipos de *C. roseus*. Tendo em vista que o sucesso de um programa de melhoramento reside, diretamente, na variabilidade do germoplasma disponível, a estimação de sua diversidade faz-se essencial (REIS *et al.*, 2015; CARENA, 2021). A elevada magnitude da diversidade genética representa um recurso valioso no melhoramento de plantas, visto que o sucesso na seleção de genótipos é alcançado quando se dispõe de diversidade genética (ALLARD, 1960).

Deste modo, é necessário avaliar a diversidade dos recursos genéticos disponíveis para o melhoramento, uma vez que, é imprescindível que o germoplasma inicial apresente diversidade genética. No intuito de se estimar a diversidade genética entre genótipos, estes devem ser caracterizados e avaliados. Tal caracterização pode ser morfoagronômica, pois segundo Cruz *et al.* (2020), a análise da diversidade pode ser acessada através de diferenças agronômicas e morfológicas entre os genótipos analisados. Tais diferenças são quantificadas em alguma medida de distância (de dissimilaridade ou similaridade) capaz de expressar o grau de diversidade genética.

A literatura reporta alta diversidade genética para vinca, tanto ao nível molecular (SHOKEEN *et al.*, 2007; SHAW *et al.*, 2009; QING *et al.*, 2011; LAL *et al.*, 2011; AMORIM *et al.*, 2023) quanto ao nível químico (CHUNG *et al.*, 2011; ARSIH *et al.*, 2020). É provável que a prevalência da alogamia como modo de reprodução preferencial em vinca (AMORIM *et al.*, 2023) seja um fator decisivo na ampliação desta diversidade. Entretanto, Mishra *et al.* (2001) ao estudarem a diversidade genética por meio de variáveis morfoagronômicas entre 32 acessos de *C. roseus* relataram uma base genética estreita nas populações do subcontinente indiano e na região asiática vizinha. Sabe-se que uma população de plantas com baixa diversidade genética implica na redução da eficiência da seleção e, assim, compromete o programa de melhoramento genético.

Portanto, verifica-se a necessidade de implementação de estudos relacionados à estimação da diversidade genética através da aplicação de variáveis morfoagronômicas. Tais estudos contribuem de maneira significativa para o planejamento e desenvolvimento do programa de melhoramento genético da vinca na UFRRJ.

Diante do exposto, objetivou-se conhecer e estimar a diversidade genética entre 79 genótipos da Coleção de Trabalho de vinca da UFRRJ.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Implantação da Coleção de Trabalho de vinca da UFRRJ

Para a implantação da Coleção de Trabalho de vinca da UFRRJ foram utilizadas progênies (sementes) pertencentes ao Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular de Plantas (LCBMP), do Departamento de Agrotecnologias e Sustentabilidade (DATS), do Instituto de Agronomia (IA), da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). O referido Laboratório dispõe de sementes de autofecundação (AUT) e de polinização aberta (PAB) (Anexo 1).

No dia 13/07/2020, realizou-se a semeadura (Figuras 1A e 1B) de 20 sementes, escolhidas aleatoriamente, por genitor materno, em bandejas de 200 células, com substrato contendo húmus de minhoca (composto por esterco bovino e carvão vegetal). Em média, as sementes germinaram cerca de 20 dias após a semeadura (Figura 1C). Quando as progênies completaram 60 dias de idade (Figuras 1D e 1E), foi realizado o transplântio para sacos de 1 litro, previamente identificados e preenchidos com substrato na proporção de 2:1 (solo e esterco bovino curtido) (Figura 1F).

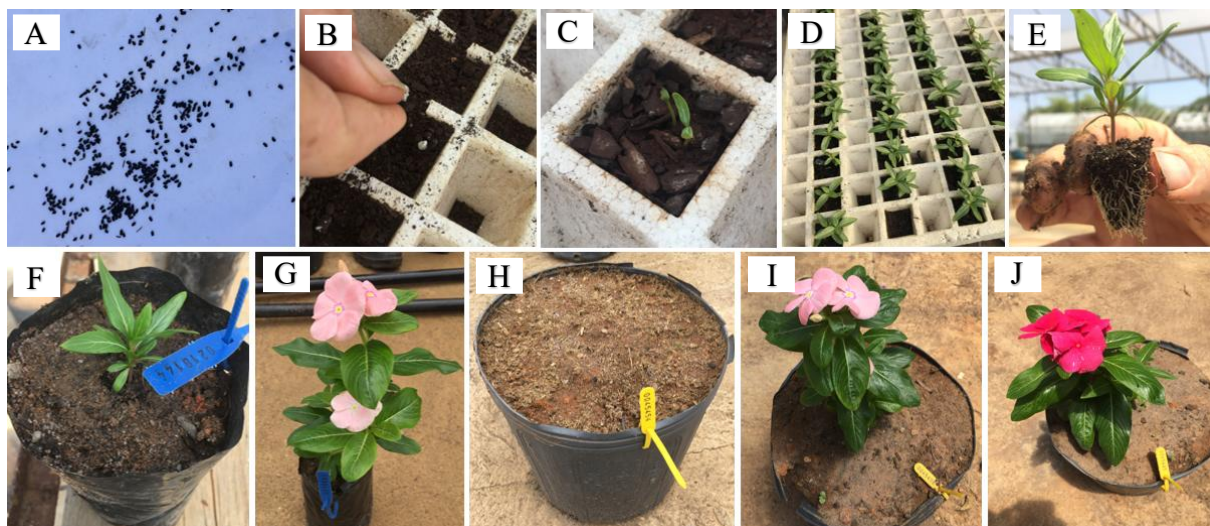


Figura 1. Plantio das sementes (progênies) de autofecundação e de polinização aberta. A) Sementes de vinca. B) Plantio das sementes de vinca à 1 cm de profundidade em bandejas de semeadura. C) Início da germinação, 20 dias após a semeadura. D) Progênies de vinca com 60 dias de idade ainda nas bandejas de semeadura. E) Início do processo de transplântio mostrando um genótipo de vinca com 60 dias de idade. F) Genótipo de vinca após o transplântio para saco de 1 litro, identificado com um número de acesso através da fixação de placa. G) Genótipo com 120 dias de idade. H) Vaso de oito litros, previamente identificado, com substrato na proporção de 1:1:1 (areia, terra e esterco bovino curtido). I e J) Plantio de genótipos de vinca em vaso de oito litros.

Quando as progênies completaram 120 dias de idade (Figura 1G), foi realizado o preenchimento dos vasos de oito litros, previamente identificados, com substrato na proporção de 1:1:1 (areia, terra e esterco bovino curtido) (Figura 1H). Posteriormente, efetuou-se o plantio dos genótipos de vinca (Figuras 1I e 1J). Ao todo, foi realizado o plantio de 80 genótipos, porém UFRRJ VIN050/45(PAB) apresentou problemas de ordem fitossanitária e, assim, não faz mais parte da Coleção de Trabalho. Sendo assim, a coleção possui 79 genótipos (Figura 2 e Anexo 2).

Todas as 79 plantas foram dispostas com espaçamento de 0,80 x 0,80 m, sem repetições, não havendo delineamento estatístico. Desse modo, cada planta foi tratada como um acesso. Os genótipos da Coleção (Figura 2 e Anexo 2), além do número de acesso, por meio de placas fixadas nos vasos, também possuem um nome de acesso. Este nome é composto da seguinte forma: o nome de acesso UFRRJ VIN004/01(AUT) possui UFRRJ VIN004 como código do genitor materno, 01 é o número dentro da progênie e AUT significa que o genótipo UFRRJ VIN004/01(AUT) é oriundo de uma semente de autofecundação. Já os genótipos advindos de sementes de polinização aberta foram identificados com o código PAB.



Figura 2. Genótipos de *C. roseus* pertencentes à Coleção de Trabalho de vinca do DATS/IA/UFRRJ.

2.2. Localização do experimento e material vegetal

Os dados foram obtidos de 79 plantas de vinca pertencentes à Coleção de Trabalho do DATS/IA/UFRRJ, em Seropédica (22°45' S; 43° 41' W), Rio de Janeiro, Brasil. As plantas foram cultivadas sob telado em vasos de oito litros. As temperaturas mínimas e máximas médias no período de avaliação foram, respectivamente, 23,85 e 25,09°C e a umidade relativa média foi de 71,27% (BRASIL, 2023).

2.3. Idealização e desenvolvimento dos descritores morfoagronômicos

Após a implementação da Coleção de Trabalho, foram idealizados descritores morfoagronômicos para a caracterização da espécie. Para isso, foi seguido as recomendações sugeridas pelo *Guidelines for the development of crop descriptor lists* (BIOVERSITY INTERNATIONAL, 2007). Dessa maneira, cada descritor foi composto por três elementos essenciais: um *nome*, capaz de descrever o atributo de forma simples e compacta; um *estado*, capaz de expressar a característica do atributo observado; e um *método* de mensuração claro e de fácil entendimento. Na presente pesquisa, o elemento *estado* não foi considerado, visto que apenas descritores quantitativos foram considerados.

Foram definidos ao todo 41 descritores morfoagronômicos passíveis de aplicação (Tabela 1). Tais descritores abarcaram caracteres relativos aos frutos (vagens), sementes, flores, folhas, caule e ramos. Para composição da lista de descritores utilizou-se como referências: Mishra *et al.* (2001), UPOV (2004), Kumar *et al.* (2007) e Flaschenriem (2016). Estes autores utilizaram descritores morfoagronômicos na espécie *C. roseus*. Vale ressaltar que o presente trabalho também propôs descritores inéditos para a cultura da vinca.

2.4. Caracterização morfoagronômica da Coleção de Trabalho de vinca

Na caracterização morfoagronômica, ao todo, foram feitos 3.239 registros, ou seja, 41 descritores quantitativos foram aplicados a 79 plantas de vinca de mesma idade. Os descritores relativos à altura, comprimento, largura, área, diâmetro e ângulo foram mensurados via análise digital de imagem através do *software* ImageJ. As variáveis relacionadas à pesagem foram obtidas mediante uso de balança digital (Shimadzu, AUY 220, Japão). Já para a obtenção do peso seco de biomassa de folhas (BFO_s) utilizou-se a balança digital Bel, Mark 1300, Itália.

Tabela 1. Lista preliminar de descritores desenvolvidos para a vinca. A lista inclui o nome do descritor e o método de mensuração.

Descritores Quantitativos:
1. ALT - Altura da planta: mensurado (cm) entre a base do caule (solo) e o ramo mais alto presente na planta.
2. PCO - Área de projeção da copa (m ²): obtida através da seguinte fórmula: [(PCOn + PCOs) x (PCOl + PCOo)] / 2, onde os descritores PCOn, PCOs, PCOl e PCOo corresponderam aos valores de projeção nos sentidos Norte, Sul, Leste e Oeste, respectivamente. Para tal, cada valor de projeção (em m) deve ser mensurado a partir da região central da base do caule até a projeção máxima do ramo em cada sentido.
3. DCA - Diâmetro do caule principal: mensurado (cm) na região do colo da planta, partindo de uma altura de 5 cm da base do caule (solo).
4. DRP - Diâmetro de ramos primários: mensurado (cm) na região da base dos ramos primários.
5. DRS - Diâmetro de ramos secundários: mensurado (cm) na região da base dos ramos secundários.
6. CENP - Comprimento médio de entrenó em ramos primários: obtido pela média das medidas efetuadas nos 3 ramos primários de maior comprimento, avaliando-se 6 entrenós na porção mediana de cada ramo primário. A média do comprimento do entrenó de ramos primários por planta (em cm) foi dada pela divisão da soma de todos os entrenós mensurados pelo número total de entrenós avaliados.
7. CENS - Comprimento médio de entrenó em ramos secundários: obtido pela média das medidas efetuadas nos 3 ramos secundários de maior comprimento, avaliando-se 6 entrenós na porção mediana de cada ramo secundário. A média do comprimento do entrenó de ramos primários por planta (em cm) foi dada pela divisão da soma de todos os entrenós mensurados pelo número total de entrenós avaliados.
8. NRB - Número de ramos na base da planta: avaliado a partir da contagem dos ramos que saem da base do caule.
9. NR _{Be20} - Número de ramos entre a base da planta e altura de 20 cm: avaliado a partir da contagem dos ramos que saem do caule principal entre a base da planta até a altura de 20 cm.
10. NR _{A20} . Número de ramos acima da altura de 20 cm: avaliado a partir da contagem dos ramos que saem do caule principal acima da altura de 20 cm.

-
11. NRT - Número de ramos totais por genótipo: obtido pela contagem do número total de ramos da planta.
-
12. CPE - Comprimento médio do pecíolo: obtido mediante a média do comprimento do pecíolo (cm), avaliado em 10 folhas completamente desenvolvidas por genótipo.
-
13. CFO - Comprimento médio foliar: obtido pela média do comprimento (cm) em 10 folhas completamente desenvolvidas por genótipo.
-
14. LFO - Largura média foliar: obtida pela média da largura (cm) em 10 folhas completamente desenvolvidas por genótipo.
-
15. AFO - Área média foliar: obtida através da média da área (cm²) da superfície adaxial em 10 folhas completamente desenvolvidas.
-
16. BFO_s - Produção de biomassa foliar seca: avaliado mediante a colheita de todas as folhas por genótipo. Após a colheita, as folhas foram secas em estufa com circulação forçada de ar (Eletrolab EL 402, Brasil) à 47°C até peso constante. Logo após a secagem, as folhas foram pesadas, mediante uso de balança digital, para obtenção do peso seco de biomassa de folhas (g/genótipo).
-
17. AIFC - Ângulo médio de inserção da folha no caule: obtido pela média das medidas entre a inserção da folha (pecíolo) e o caule em 10 folhas completamente desenvolvidas por genótipo. A média do ângulo de inserção da folha no caule (em graus) foi dada pela divisão do valor da soma de todos os ângulos aferidos pelo número total de folhas avaliadas.
-
18. NFLO - Número de flores por genótipo: obtido pela contagem do número total de flores produzidas pelo genótipo.
-
19. CPET - Comprimento médio das pétalas: obtido pelo comprimento médio (cm) de 25 pétalas em 5 flores por genótipo.
-
20. LPET - Largura média da pétala: obtido pela largura média (cm) das 25 pétalas em 5 flores por genótipo.
-
21. APET - Área média da pétala: deve ser obtido pela área média (cm²) das 25 pétalas em 5 flores por genótipo.
-
22. DFLO - Diâmetro médio da flor: obtido a partir da média da distância (cm) entre duas pétalas opostas em 5 flores por genótipo.
-
23. AFLO - Área média da flor: obtida a partir da média da área da superfície ocupada de todas as cinco pétalas mais a região do halo em 5 flores por genótipo.
-
24. DHLO - Diâmetro médio do halo: deve ser obtido através do diâmetro médio do halo (cm) em 5 flores por genótipo.
-
25. CTCOLCA - Comprimento médio do tubo da corola mais cálice: avaliado como comprimento médio (cm) a partir da base do cálice até a extremidade final da corola em 5 flores por genótipo.
-
26. NDA - Número de dias para a antese: obtido pela contagem do número de dias entre o plantio e a primeira antese por genótipo.
-
27. CO - Comprimento médio do ovário: obtido através do comprimento médio (cm) do ovário em 5 flores por genótipo.
-
28. CEL - Comprimento médio do estilo: deve ser obtido através do comprimento médio (cm) do estilo em 5 flores por genótipo.
-
29. CEG - Comprimento médio do estigma: obtido através do comprimento médio (cm) do estigma em 5 flores por genótipo
-
30. CA - Comprimento médio das anteras: obtido através do comprimento médio (cm) das cinco anteras em 5 flores por genótipo.
-
31. CVA - Comprimento médio das vagens: obtido pelo comprimento médio (cm) de 5 vagens por genótipo.
-

-
32. LVA - Largura média das vagens: obtida pela largura média da vagem (cm) na região central de 5 vagens por genótipo.
-
33. PVA - Peso médio de vagens: obtido através da pesagem média de 5 vagens por genótipo através do uso de balança digital.
-
34. NDF - Número de dias para a frutificação: obtido pela contagem do número de dias entre o plantio e o primeiro fruto formado por genótipo.
-
35. CSE - Comprimento médio das sementes: obtido pelo comprimento médio (cm) de 20 sementes por genótipo.
-
36. LSE - Largura média das sementes: deve ser obtida através da largura média das sementes (cm), mensurada na região central de 20 sementes por genótipo.
-
37. ASE - Área média das sementes: obtida a partir da área média (cm²) de 20 sementes por genótipo.
-
38. NSEVA - Número médio de sementes por vagem: obtido pela média do número total de sementes produzidas em 5 vagens por genótipo.
-
39. P100SE - Peso de 100 sementes: mensurado através da pesagem de 100 sementes (g) em balança digital.
-
40. PTSE - Peso total de sementes por genótipo: mensurado através da pesagem de todas as sementes produzidas por genótipo (g), mediante uso de balança digital.
-
41. NDG - Número de dias para a germinação: obtido pela contagem do número de dias entre o plantio e a germinação das sementes por genótipo.
-

2.5. Análises estatísticas

Inicialmente, por meio dos registros, anotou-se o valor médio, mínimo e máximo, estimou-se a amplitude, desvio padrão e coeficiente de variação. Em seguida, foi verificada a normalidade multivariada dos dados tanto para assimetria quanto para curtose através do teste de Mardia (MARDIA, 1970). Posteriormente, todos os descritores foram padronizados dividindo-se o valor observado pelo desvio-padrão da variável correspondente. De posse da nova matriz, os dados foram submetidos ao método do cosseno quadrado. Neste método, descritores posicionados acima da contribuição média esperada foram considerados os mais discriminantes. Isso indica que a variável tem uma contribuição acima da média para a variabilidade explicada pelos componentes principais (MACHADO *et al.*, 2018; ADU *et al.*, 2020). Por outro lado, descritores abaixo da contribuição média esperada foram descartados por exibirem uma contribuição abaixo da média para a variabilidade explicada. Em suma, este método mostra a importância de um componente para uma dada observação (ABDI & WILLIAMS, 2010).

Após o descarte de descritores foi construída uma nova matriz de dados, a qual foi submetida à análise de agrupamento. Para isso, estimou-se a matriz de distância genética através da distância Euclidiana. A análise de agrupamento foi realizada através do algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Groups Method with Arithmetic Mean*) (SOKAL & MICHENER, 1958). Para estimar o número ótimo de grupos no dendrograma foi utilizado o algoritmo de *Kelley-Gardner-Sutcliffe (kgs)* (KELLEY *et al.*, 1996). O ajuste entre as matrizes fenética e cofenética foi estimado a partir da correlação cofenética (SOKAL & ROHLF, 1962), utilizando o teste de Mantel com 1000 permutações (MANTEL, 1967).

Com base no número de grupos obtidos via Kelley *et al.* (1996) foram estimados as médias e os desvios-padrões de cada uma das variáveis dentro dos grupos formados. Os valores médios para cada grupo também foram apresentados em gráficos do tipo radar. Utilizando-se os mesmos descritores mais discriminantes, foram estimados também os índices de diversidade de Shannon (H') (SHANNON, 1948) e de Pielou (J') (PIELOU, 1966). Em seguida, via

algoritmo Anosim (análise da similaridade) (CLARKE & GREEN, 1988), foram estimados os índices de diversidade entre e dentro dos grupos.

Por fim, os descritores mais discriminantes foram submetidos à análise de importância relativa das variáveis, conforme Singh (1981). Nesta análise, os resultados foram apresentados em gráficos do tipo barra com o percentual de cada descritor na contribuição para a diversidade genética entre os genótipos analisados.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no Programa R, versão 4.2.3 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2023).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Idealização e desenvolvimento dos descritores morfoagronômicos

Inicialmente, na presente pesquisa, foram propostos 41 descritores morfoagronômicos para composição da lista de descritores utilizada na caracterização dos genótipos de vinca. Ao todo foram retirados da literatura 24 descritores morfoagronômicos (Tabela 2). Além destes 24 descritores, buscou-se ineditismo com a proposição de outros 17 descritores (Tabela 2). Vale salientar que alguns descritores aqui utilizados se repetiam nos trabalhos de Mishra *et al.* (2001), UPOV (2004), Kumar *et al.* (2007) e Flaschenriem (2016). Após consulta a esses autores, observou-se que certos descritores eram passíveis de divergência de interpretação e, em outros, não havia variabilidade genética para o caráter nos 79 genótipos de vinca analisados. Portanto, não foram considerados para compor a lista de descritores (Tabela 2).

Todos os 41 descritores morfoagronômicos foram registrados pelo seu valor exato, conforme o Bioversity International (2007).

Tabela 2. Descritores morfoagronômicos retirados da literatura e propostos em caráter de ineditismo utilizados na caracterização de 79 genótipos de vinca.

Descritores quantitativos	Referências
Altura da planta (ALT), diâmetro do caule principal (DCA), número de ramos totais por genótipo (NRT), comprimento médio do pecíolo (CPE), área média foliar (AFO), diâmetro médio da flor (DFLO), comprimento médio do tubo da corola mais o cálice (CTCOLCA), comprimento médio do estilo (CEL), comprimento médio das anteras (CA), comprimento médio das vagens (CVA), comprimento médio das sementes (CSE) e peso de 100 sementes (P100SE).	Mishra <i>et al.</i> (2001).
Altura da planta (ALT), comprimento médio do pecíolo (CPE), comprimento médio foliar (CFO), largura média foliar (LFO), diâmetro médio da flor (DFLO) e largura média da pétala (LPET).	UPOV (2004).
Altura da planta (ALT), diâmetro do caule principal (DCA), número de ramos totais por genótipo (NRT), comprimento médio do pecíolo (CPE), comprimento médio foliar (CFO), largura média foliar (LFO), área média foliar (AFO), diâmetro médio da flor (DFLO), comprimento médio da pétala (CPET), largura média da pétala (LPET), área média da pétala (APET), NFLO - número de flores por planta (NFLO), comprimento médio do tubo da corola mais o cálice (CTCOLCA), comprimento médio do estilo (CEL), comprimento médio das anteras (CA), comprimento médio do ovário (CO), comprimento médio das vagens (CVA), largura	Kumar <i>et al.</i> (2007).

média das vagens (LVA), comprimento médio das sementes (CSE), número médio de sementes por vagem (NSEVA), peso de 100 sementes (P100SE) e produção de biomassa foliar seca (BFO_s).

Altura da planta (ALT), comprimento médio foliar (CFO), largura média foliar (LFO), diâmetro médio da flor (DFLO), comprimento médio da pétala (CPET), largura média da pétala (LPET), número de flores por planta (NFLO), diâmetro médio do halo (DHLO) e peso total de sementes por genótipo (PTSE).

Flaschenriem (2016).

Comprimento médio de entrenó em ramos primários (CENP), comprimento médio de entrenó em ramos secundários (CENS), número de ramos na base da planta (NRB), número de ramos entre a base da planta e altura de 20 cm (NR_{Be20}), número de ramos acima da altura de 20 cm (NRA₂₀), diâmetro de ramos primários (DRP), diâmetro de ramos secundários (DRS), área de projeção da copa (PCO), ângulo médio de inserção da folha no caule (AIFC), área média da flor (AFLO), comprimento médio do estigma (CEG), largura média das sementes (LSE), área média das sementes (ASE), peso médio de vagens (PVA), número de dias para germinação (NDG), número de dias para a antese (NDA) e número de dias para frutificação (NDF).

Inéditos.

3.2. Caracterização morfoagronômica da Coleção de Trabalho de vinca

Com base no teste de Mardia (MARDIA, 1970), os dados seguiram uma distribuição normal multivariada. A suposição de normalidade dos dados amostrais ou experimentais é uma condição exigida para a realização de muitas inferências válidas a respeito de parâmetros populacionais (CANTELMO & FERREIRA, 2007). Dessa maneira, procedeu-se com a análise descritiva observada na Tabela 3.

A Tabela 3 mostra os resultados da caracterização dos genótipos de *C. roseus*. A média de produção de biomassa de folhas secas (BFO_s) na população analisada foi estimada em 14,04 g $\pm$ 3,57 g. O valor mínimo de BFO_s (7,16 g) foi observado no genótipo UFRRJ VIN062/67(PAB). Por outro lado, UFRRJ VIN004/05(PAB) produziu 22,40 g de BFO_s (valor máximo). Este último genótipo acumulou cerca de 3,12 vezes mais BFO_s do que UFRRJ VIN062/67(PAB). Entre estes dois genótipos foi verificado uma elevada amplitude de 15,24 g de BFO_s.

A média de BFO_s da população de plantas estudada (Tabela 3) foi inferior aos resultados obtidos por Sharma *et al.* (2012). Tais autores observaram em 197 linhagens endogâmicas de vinca um peso seco médio foliar de 38,20 g $\pm$ 1,27 g. Contudo, vale ressaltar que estes genótipos já estão em processo de melhoramento e foram cultivados no campo. Já na presente pesquisa, os genótipos foram cultivados em vasos de oito litros. Naeem *et al.* (2015) também estimaram o peso seco foliar em plantas de *C. roseus*. A média de BFO_s do presente estudo (Tabela 3) foi mais próxima dos obtidos por Naeem *et al.* (2015), isto é, quando as plantas também foram cultivadas em vasos.

Entre as plantas da Coleção de Trabalho analisadas, atenção especial deve ser dada ao comprimento médio das folhas, ou seja, CFO. Convém destacar que a média geral de CFO (6,69 cm - Tabela 3) foi superior aos resultados obtidos por Kumar *et al.* (2007), Chen *et al.* (2017), Gupta *et al.* (2020), Paula *et al.* (2021), Ravikumar e Dhath (2023) e Soares *et al.* (2024). Nestes trabalhos o comprimento médio foliar foi estimado em 3,50, 5,08, 3,28, 6,28, 4,63 e 6,19 cm,

respectivamente. O comprimento médio foliar do híbrido de vinca PAS1053044 foi estimado em 7,00 cm (FLASCHENRIEM, 2016). Nota-se, portanto, que o germoplasma aqui analisado possui folhas maiores em relação aos trabalhos consultados, com exceção feita apenas ao híbrido PAS1053044.

Tabela 3. Análise estatística descritiva referente aos 41 descritores quantitativos utilizados na caracterização de 79 genótipos de vinca.

Variáveis	Média	Mínimo	Máximo	Amplitude	Desvio padrão	CV (%)
ALT	41,71	20,21	59,65	39,44	9,25	22,18
PCO	0,17	0,05	0,37	0,32	0,07	42,22
DCA	0,74	0,51	1,02	0,51	0,12	15,79
DRP	0,41	0,25	0,81	0,57	0,10	24,67
DRS	0,25	0,12	0,42	0,29	0,05	21,50
CENP	2,45	1,29	3,74	2,45	0,53	21,81
CENS	1,64	1,08	2,85	1,77	0,35	21,04
NRB	4,80	2,00	12,00	10,00	1,85	38,55
NR_{Be20}	3,41	0,00	9,00	9,00	2,16	63,36
NRA₂₀	7,91	1,00	17,00	16,00	3,25	41,14
NRT	16,09	6,00	27,00	21,00	4,58	28,47
CPE	0,75	0,32	1,32	1,01	0,25	32,93
CFO	6,69	4,55	9,77	5,22	0,99	14,78
LFO	3,08	2,28	4,55	2,27	0,49	16,05
AFO	17,27	10,95	24,04	13,09	3,91	22,65
BFO_s	14,04	7,16	22,40	15,24	3,57	25,39
AIFC	53,14	31,37	79,62	48,25	9,80	18,44
NFLO	22,71	8,00	65,00	57,00	10,12	44,55
CPET	1,84	1,11	2,56	1,46	0,29	15,90
LPET	1,63	0,95	2,26	1,31	0,31	18,97
APET	2,05	0,83	3,99	3,15	0,68	33,16
DFLO	3,48	2,11	4,83	2,72	0,54	15,55
AFLO	8,38	3,18	16,57	13,39	2,99	35,69
DHLO	0,31	0,17	0,45	0,28	0,06	18,25
CTCOLCA	3,76	2,84	4,55	1,71	0,35	9,43
NDA	100,97	70,00	116,00	46,00	10,50	10,40
CO	0,30	0,21	0,51	0,30	0,06	20,17
CEL	2,49	1,63	2,98	1,35	0,29	11,71
CEG	0,17	0,11	0,19	0,08	0,02	9,71
CA	0,27	0,19	0,37	0,19	0,03	12,92
CVA	2,16	0,95	3,77	2,83	0,63	29,01
LVA	0,32	0,13	0,52	0,39	0,07	23,13
PVA	0,14	0,06	0,28	0,22	0,04	26,96
NDF	115,43	84,00	130,00	46,00	9,05	7,84
CSE	0,23	0,19	0,28	0,08	0,02	8,10
LSE	0,13	0,11	0,17	0,06	0,01	7,65

Continua.						
Variáveis	Média	Mínimo	Máximo	Amplitude	Desvio padrão	CV (%)
NSEVA	26,88	9,80	48,20	38,40	7,57	28,16
P100SE	0,12	0,04	0,22	0,18	0,03	21,22
PTSE	0,26	0,11	0,66	0,55	0,10	40,40
NDG	19,80	7,00	38,00	31,00	7,58	38,28

Legenda: ALT - altura da planta, PCO - área de projeção da copa, DCA - diâmetro do caule principal, DRP - diâmetro de ramos primários, DRS - diâmetro de ramos secundários, CENP - comprimento médio de entrenó em ramos primários, CENS - comprimento médio de entrenó em ramos secundários, NRB - número de ramos na base da planta, NR_{Be20} - número de ramos entre a base da planta e altura de 20 cm, NRA₂₀ - número de ramos acima da altura de 20 cm, NRT - número de ramos totais por genótipo, CPE - comprimento médio do pecíolo, CFO - comprimento médio foliar, LFO - largura média foliar, AFO - área média foliar, BFO_s - produção de biomassa foliar seca, AIFC - ângulo médio de inserção da folha no caule, NFLO - número de flores por planta, APET - área média da pétala, CPET - comprimento médio da pétala, LPET - largura média da pétala, DFLO - diâmetro médio da flor, AFLO - área média da flor, DHLO - diâmetro médio do halo, CTCOLCA - comprimento médio do tubo da corola mais o cálice, NDA - número de dias para a antese, CO - comprimento médio do ovário, CEL - comprimento médio do estilo, CEG - comprimento médio do estigma, CA - comprimento médio das anteras, CVA - comprimento médio das vagens, LVA - largura média das vagens, PVA - peso médio de vagens, NDF - número de dias para frutificação, CSE - comprimento médio das sementes, LSE - largura média das sementes, ASE - área média das sementes, NSEVA - número médio de sementes por vagem, P100SE - peso de 100 sementes, PTSE - peso total de sementes por genótipo, NDG - número de dias para germinação e CV - Coeficiente de variação (%).

A média geral da largura foliar (LFO) foi estimada em 3,08 cm (Tabela 3). Este valor foi superior aos observados por Kumar *et al.* (2007), Flaschenriem (2016), Chen *et al.* (2017), Gupta *et al.* (2020), Ravikumar e Dhatt (2023) e Soares *et al.* (2024). Quatro cultivares ornamentais de *C. roseus* exibiram média geral de largura foliar igual a 3,08 cm (PAULA *et al.*, 2021). Dessa maneira, é possível inferir que a média geral de LFO da Coleção de Trabalho da UFRRJ foi superior aos trabalhos mencionados e igual a de cultivares ornamentais melhoradas e disponíveis para o plantio.

Ainda no que se refere às folhas, destaca-se a área média foliar (AFO). A média geral deste caractere foi estimada em 17,27 cm² (Tabela 3). Na literatura, verificaram-se valores médios de área foliar em vinca bem abaixo da média geral de AFO aqui obtida. Os trabalhos de Mishra *et al.* (2001), Rai *et al.* (2001), Kumar *et al.* (2007), Singh e Dwivedi (2010), Naeem *et al.* (2015), Chen *et al.* (2017), Naeem *et al.* (2019) e Soares *et al.* (2024) corroboram esse relato. Em apenas dois trabalhos os valores médios de área foliar foram superiores aos nossos resultados. Sendhilmathan *et al.* (2016) e Paula *et al.* (2021) encontraram valores médios de área foliar em plantas de *C. roseus* iguais a 18,96 e 18,00 cm², respectivamente. Portanto, possivelmente, a ocorrência de folhas grandes em *C. roseus* tem ocorrência um tanto quanto restrita entre as plantas.

Na Coleção de Trabalho da UFRRJ uma planta de vinca alcançou, no máximo, 59,65 cm de altura (ALT) (Tabela 3). Mishra *et al.* (2001), Rai *et al.* (2001), Kumar *et al.* (2007), Singh e Dwivedi (2010) e Ravikumar e Dhatt (2023) observaram as seguintes médias para a altura de planta em *C. roseus*: 74,00, 63,40, 63,40, 73,00 e 57,46 cm, respectivamente. Portanto, foram genótipos mais altos quando comparados com a média geral de ALT (41,71 cm - Tabela 3). Porém, na literatura foram observadas plantas de vinca ainda mais baixas, a saber: 29,00 cm

(FLASCHENRIEM, 2016), 26,57 cm (SOARES *et al.*, 2024) e 25,04 cm (PAULA *et al.*, 2021). Isto exemplifica a existência de genótipos de vinca com alturas de plantas bem distintas.

A área de projeção da copa das plantas (PCO) variou de 0,05 a 0,37 m² (Tabela 3). A média geral de PCO foi estimada em 0,17 m². O genótipo UFRRJ VIN005/06(PAB), com a menor PCO (0,05 m²), alcançou 28,46 cm de ALT, ou seja, possui altura abaixo da média geral da população (Tabela 3). Já o genótipo UFRRJ VIN061/63(PAB), com o valor máximo de PCO (0,37 m²), apresentou ALT (46,92 cm) acima da média geral (41,71 cm - Tabela 3). Portanto, parece haver uma tendência de que plantas mais baixas exibem menor área de projeção da copa.

Na Tabela 3, é possível observar que a média geral e o valor máximo do número de ramos totais (NRT) foram de 16,09 e 27,00 ramos, respectivamente. Kumar *et al.* (2007) verificaram 45 ramos totais no mutante de vinca *lli*, cultivado em condições de campo. A média do número de ramos por planta em um genótipo silvestre de *C. roseus*, cultivado em vasos, foi de 26,70 ramos (RAI *et al.*, 2001). O genótipo elite de *C. roseus*, chamado Dhawal, mantido em vasos, produziu, em média, 23,60 ramos totais (KULKARNI & BASKARAN, 2014). As médias do NRT no mutante *lli*, no genótipo silvestre e no Dhawal foram acima da média geral da coleção de plantas aqui estudadas (16,09 ramos - Tabela 3). Neste caso, em média, os genótipos da presente pesquisa tendem a ser menos ramificados.

A média geral do comprimento médio de entrenó de ramos primários (CENP) foi igual a 2,45 cm (Tabela 3). Kumar *et al.* (2007) observaram em um genótipo silvestre de vinca comprimento de entrenó igual a 2,10 cm. Ravikumar e Dhatt (2023), Rai *et al.* (2001) e Gupta *et al.* (2020) encontraram comprimentos médios de entrenó de 2,10, 0,76 e 1,88 cm em *C. roseus*, respectivamente. Com base nos resultados dos autores supracitados, pode-se concluir, de maneira geral, que as plantas aqui analisadas possuem entrenós compridos.

O diâmetro do caule principal (DCA) variou entre 0,51 e 1,02 cm. Sua média geral foi estimada em 0,74 cm (Tabela 3). Na literatura, foram observados genótipos de *C. roseus* com diâmetros de caule mais espessos, a saber: 1,20 cm (RAI *et al.*, 2001), 1,32 cm (KUMAR *et al.*, 2007) e 2,03 cm (GUPTA *et al.*, 2020). Assim, é possível concluir que, de modo geral, as plantas da Coleção de Trabalho da UFRRJ possuem caule principal menos espesso.

A literatura reporta diâmetros médios de flores de vinca estimados em 5,40 cm (FLASCHENRIEM, 2016), 4,55 cm (RAVIKUMAR & DHATT, 2023), 3,70 cm (MISHRA *et al.*, 2001) e 4,03 cm (KUMAR *et al.*, 2007). Neste caso, tais flores foram maiores quando comparadas com a média geral do DFLO (3,48 cm - Tabela 3). O diâmetro da flor no genótipo CIMAP866 (CIM-Sushil), com alta concentração de vindolina nas folhas, foi estimado em 2,50 cm (GUPTA *et al.*, 2020) e, assim, abaixo da média geral do DFLO (Tabela 3). Portanto, existe uma tendência de que, em média, as flores da Coleção de Trabalho da UFRRJ sejam pequenas. Porém, ainda assim, foram maiores que as flores de CIMAP866 (CIM-Sushil).

Na Coleção de Trabalho da UFRRJ uma planta de vinca pode, no máximo, produzir 48,20 sementes por vagem (NSEVA), 0,22 g de peso de 100 sementes (P100SE) e 0,66 g de peso total de sementes (PTSE) (Tabela 3). O valor máximo do peso médio de vagem (PVA) foi verificado no genótipo UFRRJ VIN075/77(PAB), o qual também exibiu a máxima produção de NSEVA (48,20 sementes). Por outro lado, em UFRRJ VIN029/32(PAB) observou-se valores mínimos para PVA (0,06 g) e NSEVA (9,80 sementes). Portanto, é provável que o PVA seja muito influenciado pelo número de sementes contidas no interior das vagens (NSEVA).

A média geral obtida para o NSEVA (26,88 sementes - Tabela 3) foi superior aos resultados observados na literatura. Rai *et al.* (2001), Kumar *et al.* (2007), Gupta *et al.* (2020) e Ravikumar e Dhatt (2023) encontraram as seguintes médias: 16,00, 12,00, 15,00 e 24,10 sementes por vagem. Assim, é possível inferir que as vagens da coleção aqui estudada produziram um número elevado de sementes.

Os coeficientes de variação (CV) foram estimados em cada um dos 41 descritores quantitativos (Tabela 3). O CV auxilia na detecção dos descritores que mais e menos variaram

e permite realizar inferências acerca da variabilidade fenotípica (REIS *et al.*, 2015). Dez descritores (NRB, NR_{Be20}, NRA₂₀, PCO, CPE, NFLO, APET, AFLO, PTSE e NDG) apresentaram o CV superior a 30% (Tabela 3). O CV da variável BFO_s foi estimado em 25,39%. É possível inferir, portanto, que onze descritores (NRB, NR_{Be20}, NRA₂₀, PCO, CPE, NFLO, APET, AFLO, PTSE, NDG e BFO_s) exibiram maior variação. Sabe-se que o sucesso de um programa de melhoramento genético reside, diretamente, na diversidade do germoplasma disponível. Por outro lado, o baixo CV obtido nos descritores CTCOLCA, CEG, NDF, CSE e LSE (Tabela 3) sugere reduzida fonte de variação e certa dificuldade na seleção das referidas variáveis.

3.3. Definição dos descritores a serem utilizados nas análises da diversidade

Com base nos resultados obtidos no método do cosseno quadrado (Figura 3), dos 41 descritores quantitativos analisados, 18 descritores foram elencados para proceder as análises da diversidade genética, visto que apresentaram uma contribuição acima da média para a variabilidade explicada pelos componentes principais. São eles: APET - área média da pétala, CPET - comprimento médio da pétala, LPET - largura média da pétala, DFLO - diâmetro médio da flor, AFLO - área média da flor, CPE - comprimento médio do pecíolo, CEL - comprimento médio do estilo, ALT - altura da planta, NRT - número de ramos totais por genótipo, CENP - comprimento médio de entrenó em ramos primários, CTCOLCA - comprimento médio do tubo da corola mais o cálice, BFO_s - produção de biomassa foliar seca, NSEVA - número médio de sementes por vagem, PCO - área de projeção da copa, CO - comprimento médio do ovário, CENS - comprimento médio de entrenó em ramos secundários, AFO - área média foliar e NRB - número de ramos na base da planta (Figura 3).

Os 18 descritores mais discriminativos contemplaram as seguintes partes da planta: caule (ALT), ramos (NRT, NRB, CENP, CENS, PCO), folhas (CPE, AFO, BFO_s), flores (APET, CPET, LPET, DFLO, AFLO, CTCOLCA, CEL, CO) e sementes (NSEVA).

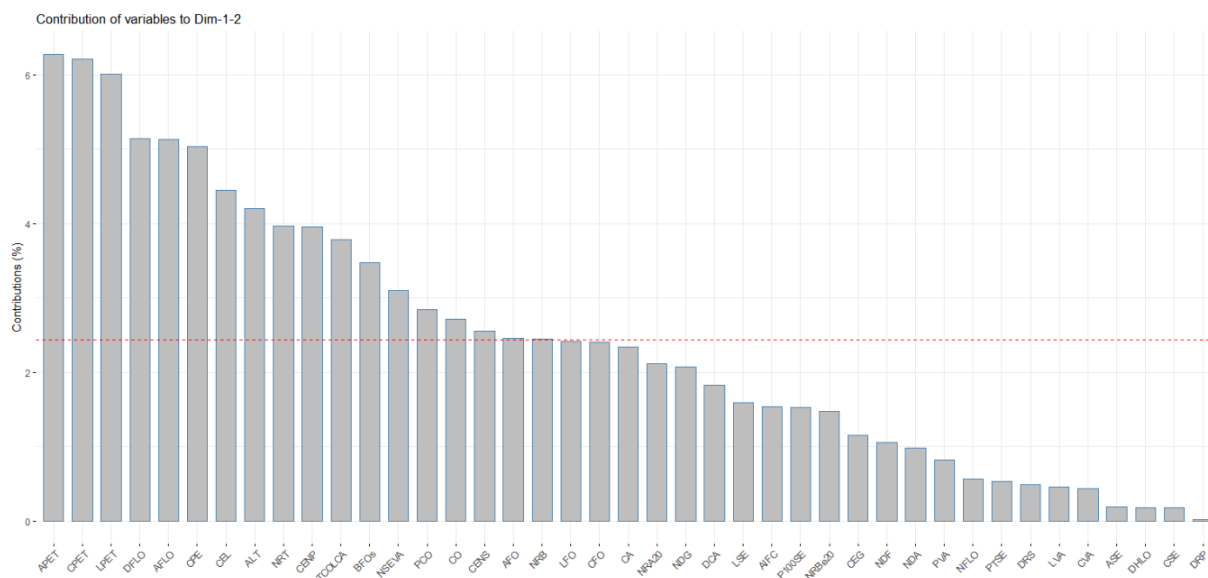


Figura 3. Contribuição relativa individual de 41 descritores morfoagronômicos, calculada pelo método do cosseno quadrado, mensurados em plantas de *C. roseus* cultivadas em vasos de oito litros, dispostos em telado, no município de Seropédica-RJ. Legenda: APET - área média da pétala, CPET - comprimento médio da pétala, LPET - largura média da pétala, DFLO - diâmetro médio da flor, AFLO - área média da flor, CPE - comprimento médio do pecíolo, CEL - comprimento médio do estilo, ALT - altura da planta, NRT - número de ramos totais por

genótipo, CENP - comprimento médio de entrenó em ramos primários, CTCOLCA - comprimento médio do tubo da corola mais o cálice, BFO_s - produção de biomassa foliar seca, NSEVA - número médio de sementes por vagem, PCO - área de projeção da copa, CO - comprimento médio do ovário, CENS - comprimento médio de entrenó em ramos secundários, AFO - área média foliar, NRB - número de ramos na base da planta, LFO - largura média foliar, CFO - comprimento médio foliar, CA - comprimento médio das anteras, NRA₂₀ - número de ramos acima da altura de 20 cm, NDG - número de dias para germinação, DCA - diâmetro do caule principal, LSE - largura média das sementes, AIFC - ângulo médio de inserção da folha no caule, P100SE - peso de 100 sementes, NR_{Be20} - número de ramos entre a base da planta e altura de 20 cm, CEG - comprimento médio do estigma, NDF - número de dias para frutificação, NDA - número de dias para a antese, PVA - peso médio de vagens, NFLO - número de flores por planta, PTSE - peso total de sementes por genótipo, DRS - diâmetro de ramos secundários, LVA - largura média das vagens, CVA - comprimento médio das vagens, ASE - área média das sementes, DHLO - diâmetro médio do halo, CSE - comprimento médio das sementes e DRP - diâmetro de ramos primários.

3.4. Análise de agrupamento

Na análise de agrupamento, verificou-se que as matrizes fenética e cofenética apresentaram uma boa correspondência. O coeficiente de correlação cofenética entre as referidas matrizes foi estimado em 0,72, significativo a 1% de probabilidade pelo teste de Mantel (MANTEL, 1967). De acordo com Rohlf (1970), valores de correlação cofenética superiores a 0,70 indicam um bom ajuste entre as matrizes originais de distância e a análise de agrupamento resultante.

Com base no dendrograma (Figura 4) é possível observar que as medidas de dissimilaridades variaram de 1,70 a 7,06. A menor dissimilaridade ocorreu entre os genótipos UFRRJ VIN062/69(PAB) e UFRRJ VIN069/72(PAB), ambos do grupo G7, com distância de 1,70. Enquanto a máxima dissimilaridade (7,06) foi observada entre os grupos G1 e G2 com todos os demais genótipos (Figura 4). Uma vez estimada a distância genética entre os genótipos estudados, foram utilizadas as análises de agrupamento com o intuito de se reunir genótipos semelhantes e separar os dissimilares. Dessa forma, espera-se homogeneidade dentro e heterogeneidade entre os grupos formados (SNEATH & SOKAL, 1973).

A diversidade genética pode ser analisada pela verificação do número de grupos de plantas formados no dendrograma. Estes grupos são analisados quanto ao seu tamanho em relação ao número de plantas alocadas. Por meio do algoritmo de *Kelley-Gardner-Sutcliffe (kgs)* (KELLEY *et al.*, 1996) determinou-se, no dendrograma, o número de grupos ótimos. Foi observado a formação de oito grupos estatisticamente distintos (Tabela 4 e Figura 4). Vale ressaltar que o grupo G7, agrupou 38 plantas, representando 48,10% dos 79 genótipos aqui analisados. Também foi possível observar que os grupos não foram homogêneos (Tabela 4 e Figura 4). A formação de grupos muito heterogêneos pode sugerir que a diversidade não seja alta.

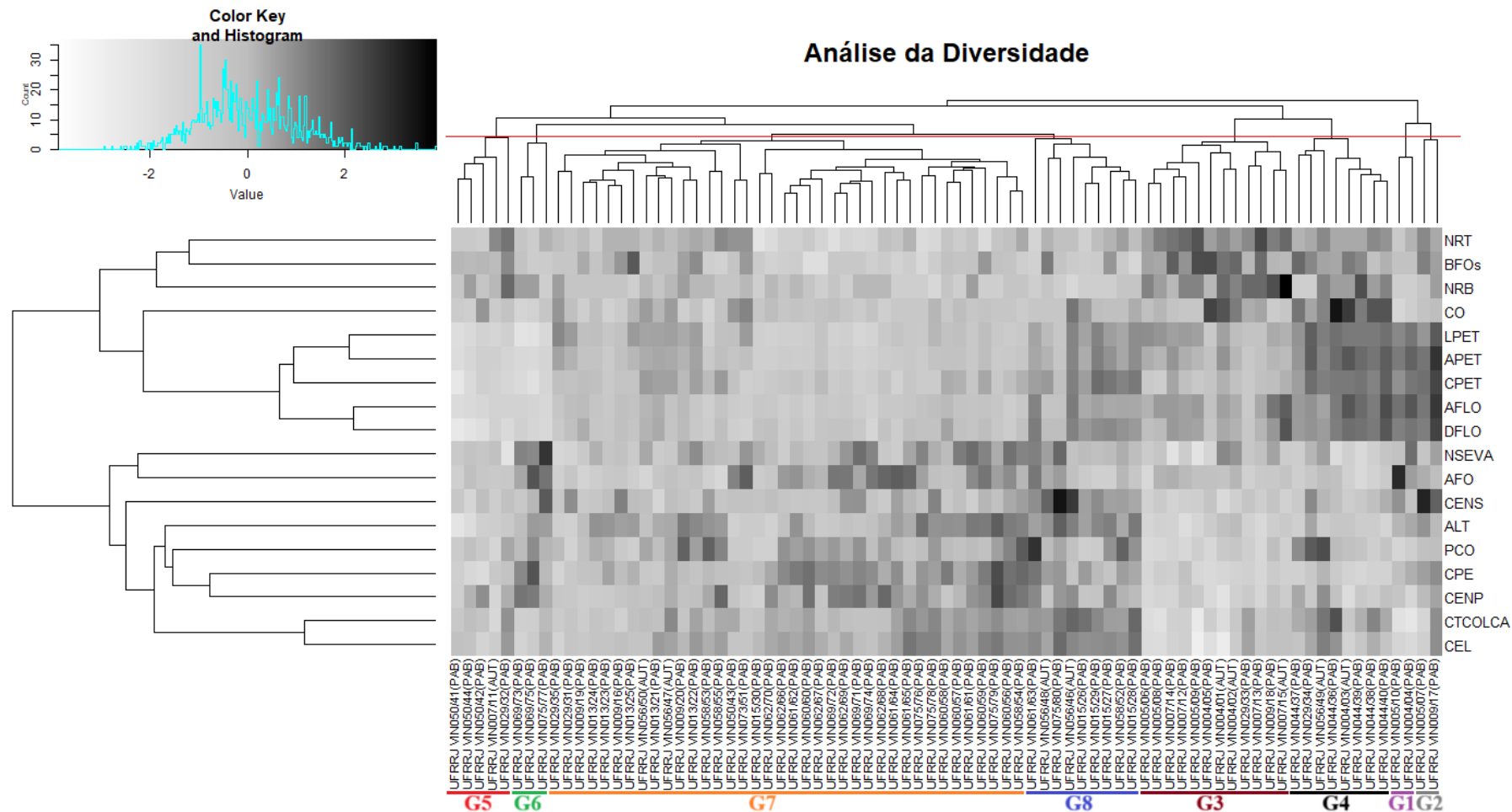


Figura 4. Dendrograma e *heatmap* de 79 genótipos de vinca com base na caracterização fenotípica das variáveis NRT (número de ramos totais), BFOs (produção de biomassa de folhas secas), NRB (número de ramos na base da planta), CO (comprimento médio do ovário), LPET (largura média da pétala), APET (área média da pétala), CPET (comprimento médio da pétala), AFLO (área média da flor), DFLO (diâmetro médio da flor), NSEVA (número médio de sementes por vagem), AFO (área média foliar), CENS (comprimento médio de entrenó em ramos secundários), ALT (altura da planta), PCO (área de projeção da copa), CPE (comprimento médio do pecíolo), CENP (comprimento médio de entrenó em ramos primários), CTCOLCA (comprimento médio do tubo da corola mais cálice) e CEL (comprimento médio do estilo).

A partir do dendrograma (Figura 4) é possível inferir que houve uma tendência das progênes oriundas de um mesmo genitor materno agrupar-se no mesmo grupo. Isto foi verificado especialmente para os genitores UFRRJ VIN007, UFRRJ VIN044, UFRRJ VIN013, UFRRJ VIN060, UFRRJ VIN061, UFRRJ VIN062 e UFRRJ VIN015. Os genitores maternos UFRRJ VIN060, UFRRJ VIN062, UFRRJ VIN013 exibiram todas as suas cinco progênes no grupo G7 e UFRRJ VIN044 no G4.

Shokeen *et al.* (2007) observaram que os acessos de *C. roseus* originários da Índia agruparam-se em dois subgrupos (IIA e IIB), enquanto os acessos de outros países formaram um subgrupo diferente (IID), e as cultivares ornamentais foram agrupadas em outro subgrupo (IIC). Mishra *et al.* (2001) utilizaram caracteres morfoagronômicos para acessar a diversidade genética entre 32 genótipos de vinca de áreas climaticamente diferentes do subcontinente indiano. Foram formados cinco grupos e os acessos provenientes de climas tropicais tenderam a se separar daqueles originários de ambientes subtropicais a semitemperados. Portanto, a hipótese para a formação dos grupos nos trabalhos de Shokeen *et al.* (2007) e Mishra *et al.* (2001) foi a origem dos acessos. De acordo com Cruz *et al.* (2020), a análise de agrupamento permite formular e testar hipóteses sobre as causas da aglomeração ou dispersão de indivíduos.

Tabela 4. Distribuição de 79 genótipos de vinca em oito grupos estatisticamente distintos obtidos em análise de agrupamento utilizando a distância Euclidiana e o método UPGMA.

Grupos	Número de genótipos nos grupos	Percentual de genótipos nos grupos (%)
G1	2	2,53
G2	2	2,53
G3	12	15,19
G4	8	10,13
G5	5	6,33
G6	3	3,80
G7	38	48,10
G8	9	11,39
Total	79	100,00

3.5. Padrões de agrupamento dos genótipos em relação aos descritores morfoagronômicos

Os padrões de agrupamento são mostrados pela interpretação do *heatmap* (Figura 4) e dos gráficos radar (Figura 5). Na Tabela 5 são apresentadas as médias e desvios-padrões das 18 variáveis morfoagronômicas dentro dos oito grupos formados.

As características marcantes dos genótipos pertencentes ao grupo G1 revelam plantas de folhas grandes, pouco ramificadas na base, menor área de projeção da copa e com flores grandes, porém o tamanho do tubo da corola mais cálice, estilo e ovários foram pequenos (Figuras 4 e 5). Estes padrões também podem ser verificados com base nas menores médias constatadas para o NRB (3,00 ramos), PCO (0,09 m²), CTCOLCA (2,96 cm), CEL (2,04 cm) e CO (0,23 cm), e na maior média para a AFO (Tabela 5), o que reforça o padrão de folhas grandes no grupo G1.

Mishra *et al.* (2001) também observaram padrões dentro dos grupos formados, os quais foram denominados 'A', 'B', 'C', 'D' e 'E'. O grupo 'B' exibiu a maior média de área foliar e, portanto, foi um grupo composto por plantas de vinca com folhas maiores em relação aos grupos 'A', 'C', 'D' e 'E'. Vale ressaltar que a média da referida variável no grupo 'B' (11,00 ± 0,90 cm²) foi inferior à média de AFO (24,42 cm² - Tabela 5) observada no grupo G1 do presente trabalho.

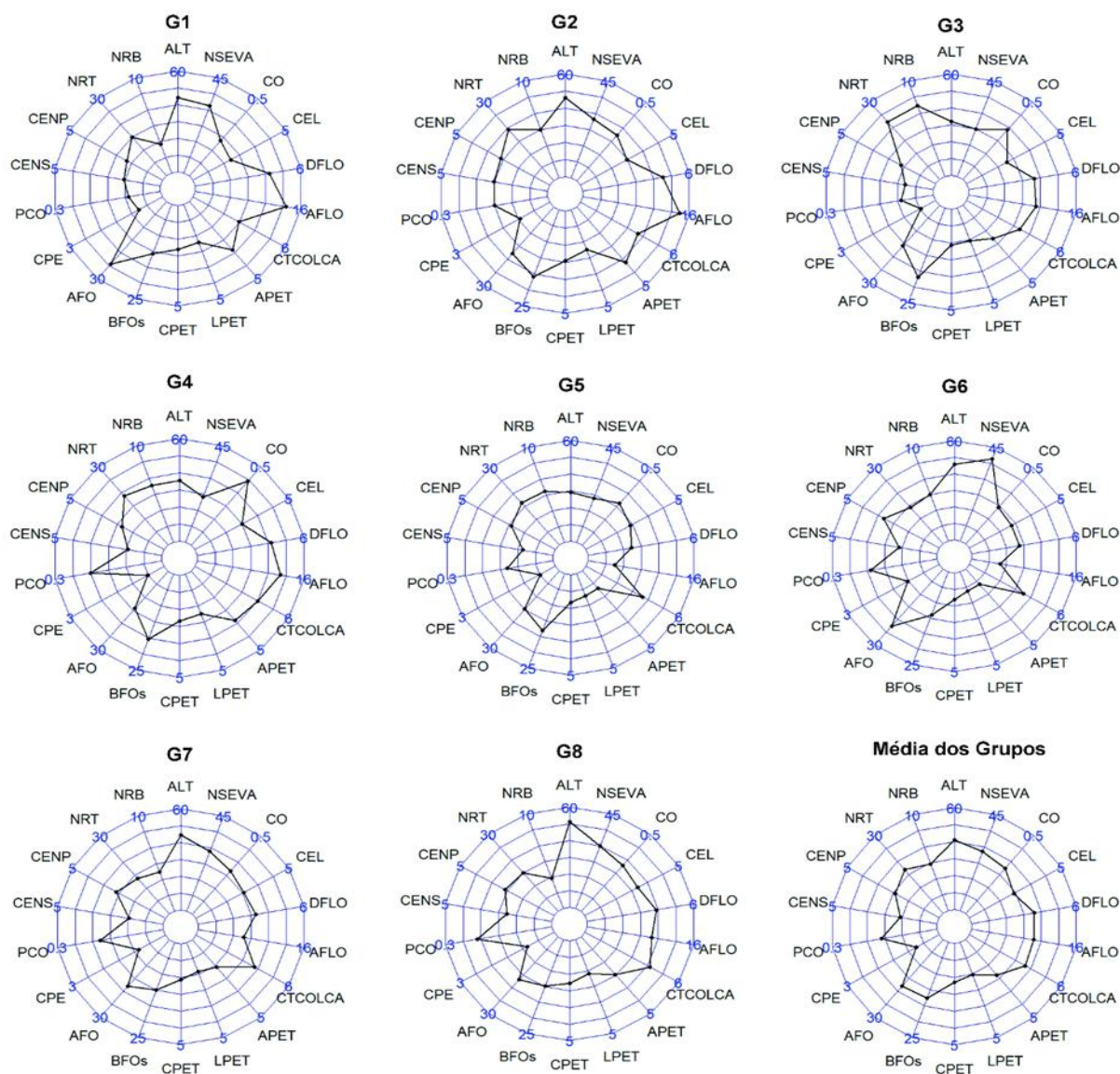


Figura 5. Médias das 18 variáveis morfoagronômicas mensuradas em 79 genótipos de *C. roseus*, distribuídas em oito grupos através da técnica de Kelley *et al.* (1996). Legenda: ALT - altura da planta, NRB - número de ramos na base da planta, NRT - número de ramos totais, CENP - comprimento médio de entrenó em ramos primários, CENS - comprimento médio de entrenó em ramos secundários, PCO - área de projeção da copa, CPE - comprimento médio do pecíolo, AFO - área média foliar, BFOs - produção de biomassa de folhas secas, CPET - comprimento médio da pétala, LPET - largura média da pétala, APET - área média da pétala, CTCOLCA - comprimento médio do tubo da corola mais cálice, AFLO - área média da flor, DFLO - diâmetro médio da flor, CEL - comprimento médio do estilo, CO - comprimento médio do ovário e NSEVA - número médio de sementes por vagem.

As plantas pertencentes ao grupo G2 exibiram entrenós de ramos secundários compridos, muitos ramos totais, boa produção de BFOs e flores grandes (Figuras 4 e 5). Entre os oito grupos formados, foi o grupo G2, que exibiu as maiores médias para as variáveis CPET, LPET, APET, DFLO, AFLO e CENS, a saber: 2,43 cm, 2,07 cm, 3,52 cm², 4,51 cm, 14,60 cm² e 2,52 cm, respectivamente (Tabela 5). No grupo G2, a média destes seis descritores foi acima da média geral da população (Tabela 3). Flores grandes de vinca foram um padrão verificado em dois ('B' e 'C') dos cinco grupos no trabalho de Mishra *et al.* (2001).

Tabela 5. Médias e desvios-padrões das 18 variáveis morfoagronômicas mensuradas em 79 genótipos de *C. roseus* distribuídas em oito grupos definidos a partir da técnica de Kelley *et al.* (1996).

Variáveis	Médias ± Desvio Padrão							
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
ALT	44,35 ± 1,77	46,05 ± 5,02	32,09 ± 5,09	35,50 ± 5,09	29,06 ± 6,32	45,86 ± 3,83	44,75 ± 7,92	51,34 ± 4,46
NRB	3,00 ± 0,00	5,00 ± 1,41	7,42 ± 1,88	5,88 ± 2,03	5,40 ± 1,67	5,00 ± 1,73	4,11 ± 0,98	3,22 ± 0,67
NRT	15,00 ± 2,83	19,50 ± 2,12	22,25 ± 2,67	18,88 ± 1,55	16,40 ± 5,18	14,33 ± 2,52	13,76 ± 3,94	15,11 ± 2,89
CENP	1,92 ± 0,39	2,60 ± 0,17	1,83 ± 0,30	2,23 ± 0,46	2,36 ± 0,52	3,01 ± 0,33	2,63 ± 0,50	2,62 ± 0,36
CENS	1,74 ± 0,30	2,52 ± 0,32	1,32 ± 0,13	1,60 ± 0,22	1,42 ± 0,18	1,82 ± 0,47	1,61 ± 0,21	2,12 ± 0,37
PCO	0,09 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,09 ± 0,04	0,20 ± 0,09	0,13 ± 0,05	0,19 ± 0,04	0,18 ± 0,06	0,21 ± 0,09
CPE	0,76 ± 0,08	0,95 ± 0,06	0,46 ± 0,10	0,52 ± 0,13	0,49 ± 0,15	1,02 ± 0,25	0,86 ± 0,20	0,85 ± 0,15
AFO	24,42 ± 6,53	17,90 ± 0,89	15,80 ± 2,20	14,17 ± 2,10	14,92 ± 1,25	22,67 ± 3,34	17,95 ± 4,07	16,84 ± 3,26
BFO _s	13,08 ± 0,02	17,35 ± 1,67	18,14 ± 3,10	16,86 ± 2,26	15,06 ± 1,58	11,66 ± 1,09	12,47 ± 2,93	12,40 ± 3,33
CPET	2,19 ± 0,11	2,43 ± 0,18	1,77 ± 0,13	2,25 ± 0,11	1,38 ± 0,17	1,34 ± 0,10	1,77 ± 0,16	2,14 ± 0,16
LPET	2,02 ± 0,08	2,07 ± 0,27	1,72 ± 0,16	2,07 ± 0,09	1,19 ± 0,11	1,02 ± 0,11	1,53 ± 0,21	1,81 ± 0,17
APET	3,15 ± 0,24	3,52 ± 0,66	2,16 ± 0,29	3,14 ± 0,30	1,14 ± 0,21	1,01 ± 0,11	1,76 ± 0,35	2,46 ± 0,36
DFLO	4,22 ± 0,09	4,51 ± 0,46	3,68 ± 0,38	4,17 ± 0,27	2,46 ± 0,28	2,75 ± 0,12	3,27 ± 0,23	3,90 ± 0,26
AFLO	13,84 ± 1,21	14,60 ± 2,77	10,09 ± 2,07	12,46 ± 1,92	4,03 ± 0,70	4,32 ± 0,46	6,94 ± 1,10	9,74 ± 1,74
CTCOLCA	2,96 ± 0,07	3,67 ± 0,60	3,39 ± 0,33	4,03 ± 0,30	3,64 ± 0,31	3,53 ± 0,22	3,80 ± 0,21	4,17 ± 0,17
CEL	2,04 ± 0,04	2,48 ± 0,41	2,13 ± 0,31	2,50 ± 0,24	2,37 ± 0,22	2,30 ± 0,22	2,58 ± 0,19	2,81 ± 0,11
CO	0,23 ± 0,03	0,29 ± 0,01	0,32 ± 0,07	0,41 ± 0,06	0,27 ± 0,05	0,24 ± 0,03	0,28 ± 0,03	0,30 ± 0,04
NSEVA	32,00 ± 10,18	27,40 ± 5,37	22,45 ± 8,08	21,13 ± 6,24	20,88 ± 6,35	39,73 ± 7,35	28,27 ± 6,32	29,87 ± 5,18

Legenda: ALT (altura da planta), NRB (número de ramos na base da planta), NRT (número de ramos totais), CENP (comprimento médio de entrenó em ramos primários), CENS (comprimento médio de entrenó em ramos secundários), PCO (área de projeção da copa), CPE (comprimento médio do pecíolo), AFO (área média foliar), BFO_s (produção de biomassa de folhas secas), CPET (comprimento médio da pétala), LPET (largura média da pétala), APET (área média da pétala), DFLO (diâmetro médio da flor), AFLO (área média da flor), CTCOLCA (comprimento médio do tubo da corola mais cálice), CEL (comprimento médio do estilo), CO (comprimento médio do ovário) e NSEVA (número médio de sementes por vagem).

O grupo G3 corresponde ao grupo de plantas com maior produção de BFO_s dentre os oito grupos formados. Sua média foi estimada em 18,14 g (Tabela 5). Cabe mencionar que UFRRJ VIN004/05(PAB), pertencente ao grupo G3, foi identificado como de maior valor para a produção de BFO_s (22,40 g - Tabela 2). Além disso, neste grupo, verificou-se as maiores médias para NRB (7,42 ramos) e NRT (22,25 ramos), e as menores médias para o CENP (1,83 cm), CENS (1,32 cm), PCO (0,09 m²) e CPE (0,46 cm) (Tabela 5). Portanto, pode-se dizer que o grupo G3 é composto por plantas mais baixas, com bom desempenho agrônômico para a produção de BFO_s, muito ramificadas na base e em toda a planta, com entrenós mais curtos, pecíolos menores e copa com menor projeção de área (Figuras 4 e 5).

No trabalho de Mishra *et al.* (2001), agruparam-se plantas de vinca com boa produção de biomassa foliar nos grupos 'B' e 'D'. No caso do grupo 'B', verificou-se também que as plantas eram bastante ramificadas. Portanto, assim como no grupo G3 (Figura 4), plantas de *C. roseus* bastante ramificadas resultaram em boa produção de biomassa foliar.

O grupo G4 caracterizou-se por exibir plantas com folhas pequenas e ovários compridos (Figuras 4 e 5). Neste grupo, observou-se a menor média para AFO (14,17 cm²) e maior para CO (0,41 cm) (Tabela 5). No *heatmap*, de modo geral, foram observadas cores mais intensas para as variáveis APET, CPET, LPET, DFLO, AFLO, NRB, NRT e BFO_s (Figura 4). Logo, o grupo G4 também exibiu genótipos com muitos ramos, boa produção de BFO_s e flores grandes.

A característica marcante do grupo G5 foi a reduzida altura de planta, flores de tamanho pequeno e poucas sementes produzidas por vagem (Figuras 4 e 5). Na Tabela 5, tais padrões foram refletidos pelas menores médias para a ALT (29,06 cm), DFLO (2,46 cm), AFLO (4,03 cm²) e NSEVA (20,88 sementes). Na Figura 4, também foi possível observar outros padrões no grupo G5, a saber: plantas com folhas e pétalas pequenas e pecíolos curtos.

Pode-se dizer que G6 é um grupo de flores com pétalas pequenas (Figuras 4 e 5). Na Tabela 5, este grupo apresentou as menores médias para os descritores CPET (1,34 cm), LPET (1,02 cm) e APET (1,01 cm²). Outras características que chamaram bastante atenção no grupo G6 foi a sua menor média para a produção de BFO_s (11,66 g) e maiores médias para CENP (3,01 cm), CPE (1,02 cm) e NSEVA (39,73 sementes). Também é possível afirmar que o grupo G6 exibiu folhas grandes (Figura 4 e Tabela 5). Em suma, foi um grupo composto por plantas com baixa produção de BFO_s, de pétalas pequenas, entrenós de ramos primários compridos, pecíolos longos, folhas grandes e com muitas sementes por vagem.

É importante destacar que os grupos mencionados até aqui (G1 até G6) são compostos por poucas plantas (Tabela 4 e Figura 4). O grupo G6 mencionado como menos produtivo em BFO_s agrupou apenas três plantas, o que representa um percentual de 3,80% (Tabela 4). O grupo G3, o mais produtivo, exibiu 12 plantas (15,19%). Por outro lado, o grupo G7 concentrou quase metade das plantas analisadas (48,10% - Tabela 4).

O grupo G7, o maior grupo formado (Figura 4), de modo geral, apresentou o número de ramificações totais como característica marcante (Figura 5), isto é, com o menor número de ramos totais (NRT), com média estimada em 13,76 ramos (Tabela 5). Neste grupo, foram observadas plantas tanto com folhas pequenas como grandes (Figura 4). A média de produção de BFO_s em G7 foi baixa (12,47 g) e se assemelha a do grupo G8 (12,40 g - Tabela 5). Vale ressaltar que o grupo G7 abrigou o genótipo UFRRJ VIN062/67(PAB), cuja produção de BFO_s foi a menor (7,16 g - Tabela 3) entre as 79 plantas de vinca estudadas.

O grupo G8 destacou-se na maior altura de planta, área de projeção da copa mais larga, entrenós de ramos secundários compridos, tubo da corola mais cálice e estilo compridos (Figuras 4 e 5). Alguns destes padrões foram verificados através das maiores médias para as variáveis ALT (51,34 cm), PCO (0,21 m²), CTCOLCA (4,17 cm) e CEL (2,81 cm). Este grupo foi composto por nove plantas (11,39% - Tabela 4).

3.6. Estimação da diversidade genética baseada em caracteres morfoagronômicos

No que tange à estimação da diversidade genética foram utilizados os índices de Shannon (H') e de Pielou (J'). De modo geral, observou-se que a coleção de plantas em questão detém uma diversidade baixa a moderada, haja vista as estimativas de 2,22 e 0,77 obtidas via H' e de J' , respectivamente. O índice de Shannon geralmente situa-se entre 1,50 e 3,50, e às vezes ultrapassa 4,00 (MARGALEF, 1972). Já o índice de Pielou mede a proporção da diversidade observada em relação à máxima diversidade esperada (KANIESKI *et al.*, 2010). Pode variar de zero a 1,00 e, neste caso, quanto mais próximo de 1,00 maior será a diversidade.

Amorim *et al.* (2023) estimaram a diversidade a nível molecular entre dez genótipos de vinca através dos índices de Shannon (H') e Pielou (J'), os quais foram estimados em 5,22 e 0,96, respectivamente. Silveira *et al.* (2022) utilizaram os referidos índices para verificar a magnitude da diversidade genética entre 88 genótipos de melão-de-são-caetano (*Momordica charantia* L.) acessada por variáveis morfoagronômicas. Tais autores observaram os valores de 2,25 e 0,74 para os índices de Shannon e de Pielou, respectivamente. Estes resultados foram bem próximos dos observados na presente pesquisa.

Em trabalhos de melhoramento genético a existência de alta diversidade genética é fator primordial para o sucesso no processo de seleção e, portanto, para a continuidade de programas de melhoramento. A elevada magnitude da diversidade genética representa um recurso valioso no melhoramento de plantas, visto que o sucesso na seleção de genótipos é alcançado quando se dispõe de diversidade genética (ALLARD, 1960). De acordo com Carena (2021), a diversidade genética é essencial para a obtenção de ganhos genéticos significativos em características economicamente importantes.

Alguns autores verificaram elevada diversidade genética em *C. roseus* através de análises ao nível molecular (SHOKEEN *et al.*, 2007; SHAW *et al.*, 2009; QING *et al.*, 2011; LAL *et al.*, 2011; AMORIM *et al.*, 2023). A alta diversidade genética pode estar relacionada com o modo de reprodução da espécie *C. roseus*. Populações com estrutura genética formada a partir da alogamia tendem a exibir, naturalmente, um alto polimorfismo. De acordo com Amorim *et al.* (2023), a espécie apresenta modo de reprodução misto, ou seja, pode se autofecundar e realizar a polinização cruzada. Contudo, segundo estes mesmos autores, a vinca tem a alogamia como modo de reprodução principal, e realiza a autogamia somente como um mecanismo de garantia reprodutiva. Portanto, muito provavelmente, tende a apresentar altas taxas de polinização cruzada, o que pode ampliar a diversidade genética na espécie.

Na literatura também existem trabalhos que acessaram a diversidade genética entre genótipos de *C. roseus* através de análises ao nível fenotípico (MISHRA *et al.*, 2001; SAMIYARSIH *et al.*, 2019; SOARES *et al.*, 2024). Mishra *et al.* (2001), ao estudarem a diversidade genética por meio de variáveis morfoagronômicas entre 32 acessos de *C. roseus*, relataram uma base genética estreita nas populações do subcontinente indiano e na região asiática vizinha. Neste trabalho, metade dos acessos provenientes de grandes distâncias geográficas foram colocados juntos em agrupamentos formados por componentes principais e pelo método UPGMA.

A análise de similaridade (Anosim) (CLARKE & GREEN, 1988) também foi realizada para avaliar a significância das diferenças entre grupos formados na presente pesquisa. A Anosim é um método estatístico não paramétrico que possibilita a comparação de diferentes populações. A análise promove uma estatística R definida para o intervalo entre -1 e +1. Nesta estatística, valores próximos a zero indicam a aceitação da hipótese nula (H_0), ou seja, as diferenças entre grupos são aproximadamente iguais às diferenças dentro dos grupos. Enquanto valores próximos a +1 e -1 sugerem, respectivamente, maior diferença entre e dentro dos grupos (CLARKE, 1993; DAMASCENO JUNIOR *et al.*, 2015).

A Figura 6 evidenciou que a maior diversidade foi encontrada entre os grupos formados ($R=0,783$). O p-valor ($P=0,001$) indicou que as diferenças entre os grupos foram significativas. Damasceno Junior *et al.* (2015) observaram valor de R igual a 1,00 entre *Vasconcellea monoica*, *Jacaratia spinosa* e *Carica papaya* L. Já Silveira *et al.* (2022) verificaram um R igual a 0,80 em melão-de-são-caetano (*Momordica charantia* L.). Em ambos os casos, portanto, também foi evidenciado maior diversidade entre os grupos.

É possível perceber que a diversidade disponível nos grupos G5 (445,00) e G8 (426,50) refere-se a menor dentre os oito grupos formados (Figura 6). Enquanto os grupos G4 (682,00) e G6 (801,00) compreendem as maiores diversidades. Em tais grupos, foram observados os seguintes números de genótipos: oito e três (Tabela 4), respectivamente. Portanto, o grupo G6 mesmo com o menor número de plantas exibiu maior diversidade. Neste caso, foi observado diversidade em um grupo com baixa performance para a produção de BFOs, com flores pequenas, entrenós de ramos primários compridos, pecíolos longos, muitas sementes por vagem e folhas grandes (Figuras 4 e 5).

Os grupos G3 (573,50) e G7 (546,00) tiveram magnitudes de diversidade bem próximas (Figura 6). Salienta-se que G3 corresponde ao grupo identificado como o mais produtivo no que se refere à produção de biomassa de folhas secas (BFOs), com maiores médias para o NRB e NRT, e menores médias para CENP, CENS, PCO e CPE (Tabela 5).

Vale ressaltar que não foi possível gerar os *boxplots* dos grupos G1 e G2 (Figura 6), pois foram grupos formados por apenas duas plantas cada (Tabela 4 e Figura 4).

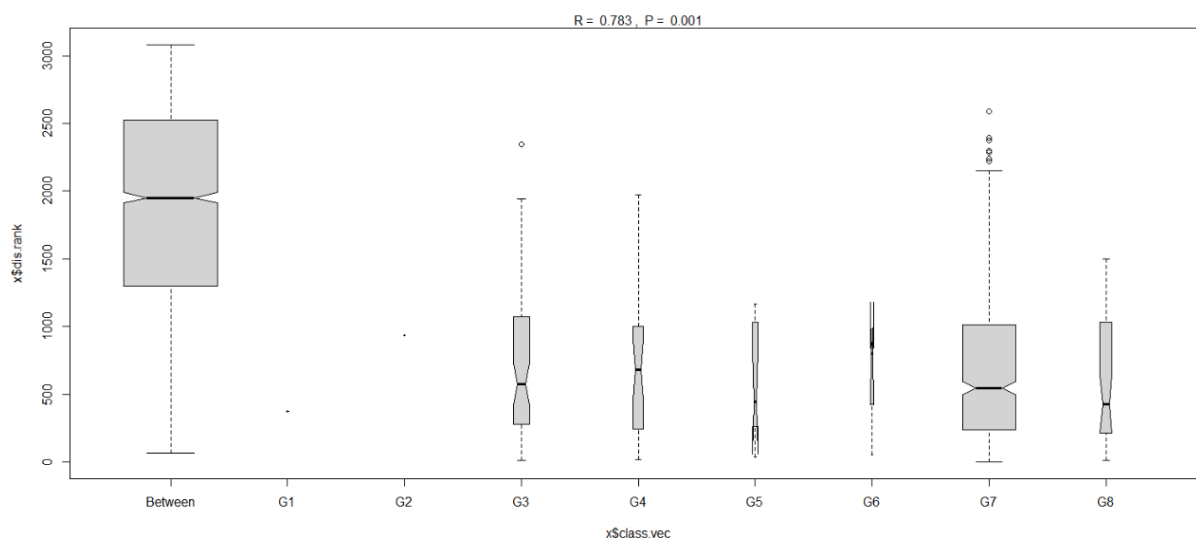


Figura 6. *Boxplots* representando a diversidade genética via algoritmo Anosim (análise da similaridade) entre e dentro de oito grupos de genótipos de *C. roseus* pertencentes à Coleção de Trabalho da UFRRJ.

3.7. Importância relativa das variáveis na diversidade genética

Os detentores da maior importância relativa na diversidade genética foram os seguintes descritores: número médio de sementes por vagem (NSEVA) (21,89%), número de ramos totais (NRT) (20,29%), área média foliar (AFO) (13,90%) e produção de biomassa de folhas secas (BFOs) (11,37%), conforme o método de Singh (1981) (Figura 7). Tais variáveis totalizaram 67,45% de importância relativa. Portanto, foram os descritores mais eficientes em explicar a dissimilaridade entre os 79 genótipos de *C. roseus*.

A Figura 7 demonstra que existe variabilidade para as variáveis NSEVA, NRT, AFO e BFOs. Esta última variável é de grande importância comercial para a vinca, uma vez que a

produção de alcaloides é obtida pelo produto entre o teor do alcaloide e a BFO_s. Portanto, possivelmente, existem, na população analisada, genótipos com produção de biomassa foliar seca (BFO_s) favorável à seleção.

Ainda de acordo com a Figura 7 é possível observar que dos 18 descritores avaliados, 11 apresentaram importância relativa abaixo de 5,0%. São eles: APET, CENP, DFLO, CENS, CTCOLCA, CPE, LPET, CEL, CPET, CO e PCO. Pelo método de Singh (1981), consideram-se de menor importância as características que apresentam menor variabilidade. Portanto, os descritores abaixo de 5,00% (Figura 7) exibiram menor variabilidade.

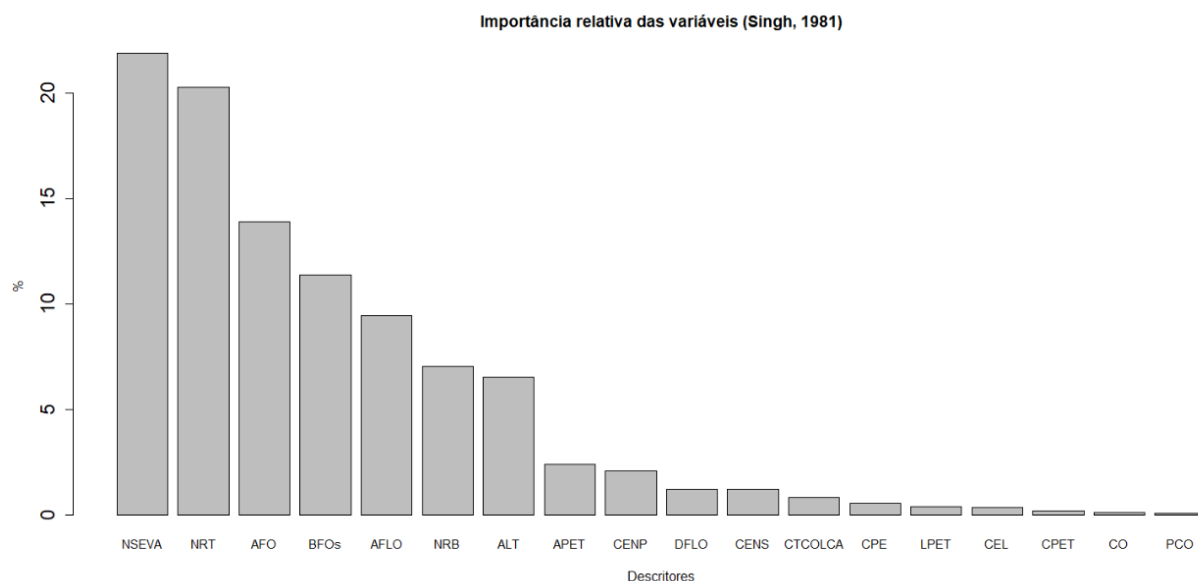


Figura 7. Contribuição relativa das variáveis quantitativas na estimação da diversidade genética da Coleção de Trabalho de *C. roseus* do DATS/IA/UFRRJ, conforme o método de Singh (1981). Legenda: NSEVA - número médio de sementes por vagem, NRT - número de ramos totais, AFO - área média foliar, BFO_s - produção de biomassa de folhas secas, AFLO - área média da flor, NRB - número de ramos na base da planta, ALT - altura da planta, APET - área média da pétala, CENP - comprimento médio de entrenó em ramos primários, DFLO - diâmetro médio da flor, CENS - comprimento médio de entrenó em ramos secundários, CTCOLCA - comprimento médio do tubo da corola mais cálice, CPE - comprimento médio do pecíolo, LPET - largura média da pétala, CEL - comprimento médio do estilo, CPET - comprimento médio da pétala, CO - comprimento médio do ovário e PCO - área de projeção da copa.

A importância relativa de caracteres morfológicos na diversidade genética entre quatro cultivares de vinca foi verificada por Paula *et al.* (2021). Observou-se, neste trabalho, que o número de folhas e o diâmetro da flor contribuíram, respectivamente, com 38,90 e 39,40%, ou seja, foram os de maior importância. Já na presente pesquisa, o descritor diâmetro médio da flor (DFLO) contribuiu com apenas 1,23%. O que demonstra que a relevância dos descritores depende da estrutura genética da população de plantas em análise.

A análise da diversidade genética aqui conduzida é essencial para o planejamento e desenvolvimento do programa de melhoramento genético da vinca na UFRRJ. Com base nos resultados obtidos na análise de agrupamento (Figura 4), verificou-se uma distribuição bastante irregular das plantas dentro dos grupos (Tabela 4). Isto, de certa forma, aponta para uma limitada diversidade genética. Os índices de Shannon (SHANNON, 1948) e Pielou (PIELOU, 1966) corroboraram tal fato e apontaram para uma diversidade genética baixa a moderada. A

análise da similaridade via algoritmo Anosim (Figura 6), demonstrou a existência de diferenças estatísticas significativas entre os grupos formados. Os descritores de maior importância relativa foram os relacionados às sementes (NSEVA), ramos (NRT), folhas (AFO) e produção (BFO_s) (Figura 7). Logo, são descritores que precisam ser levados em consideração em estudos da diversidade genética.

4. CONCLUSÃO

A diversidade genética da Coleção de Trabalho de vinca da UFRRJ foi baixa a moderada. Haja vista a distribuição irregular das plantas dentro dos grupos formados. Isto foi corroborado pelas estimativas dos índices de Shannon (2,22) e Pielou (0,77). A análise da similaridade (Anosim) indicou que a maior diversidade é encontrada entre os grupos formados. Além disso, indicou que as diferenças entre os grupos foram significativas. A maior diversidade foi encontrada no grupo G6, composto por genótipos com baixo desempenho para a produção de BFO_s, com flores pequenas, entrenós de ramos primários compridos, pecíolos longos, muitas sementes por vagem e folhas grandes. Descritores ligados às sementes (NSEVA), ramos (NRT), folhas (AFO) e produção (BFO_s) exerceram maior importância relativa na análise da diversidade genética.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDI, H.; WILLIAMS, L. J. Principal component analysis. **Wiley interdisciplinary reviews: computational statistics**, v. 2, n. 4, p. 433-459, 2010.

ADU, M. O.; ASARE, P. A.; YAWSON, D. O.; NYARKO, M. A.; ABDUL RAZAK, A.; KUSI, A. K.; TACHIE-MENSON, J. W.; AFUTU, E.; ANDOH, D. A.; ACKAH, F. K.; VANDERPUIJE, G. C.; TAAH, K. J.; ASARE-BEDIAKO, E.; AMENORPE, G. The search for yield predictors for mature field-grown plants from juvenile pot-grown cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Plos one**, v. 15, n. 5, e0232595, 2020.

ALLARD, R. W. **Principles of plant breeding**. London: J. Wiley, 1960. 485 p.

ALLORGE, L.; PHILLIPSON, P. B.; RAZAKAMALALA, R. *Catharanthus makayensis* L. Allorge, Phillipson & Razakamal. (Apocynaceae), a new species from Madagascar. **Candollea**, v. 70, n. 1, p. 61-66, 2015.

AMORIM, G. T. S.; PINTO, T. O.; SILVEIRA, T. O.; SOUZA, M. A. A.; MENEZES, B. R. da S.; DAMASCENO JUNIOR, P. C. *Catharanthus roseus* [L.] G. Don: allogamy as the main reproductive strategy and autogamy as a supposed reproductive guarantee mechanism. **South African Journal of Botany**, v. 154, p. 32-40, 2023.

ARSIH, S. S.; FITRIANTO, N.; PROKLAMASININGSIH, E.; JUWARNO; MULJOWATI, S. S. J. S. Phytochemical diversity and antimicrobial properties of methanol extract of several cultivars of *Catharanthus roseus* using GC-MS. **Biodiversitas**, v. 21, n. 4, p. 1332-1344. 2020.

ASLAM, J, KHAN, S. H.; SIDDIQUI, Z. H.; FATIMA, Z.; MAQSOOD, M.; BHAT, M. A.; NASIM, S. A.; ILAH, A.; AHMAD, I. Z.; KHAN, A. S. *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. An importante drug: it's applications and production. **Pharmacie Globale, International Journal of Comprehensive Pharmacy (IJCP)**, v. 1, n. 4, p. 1-16, 2010.

BIOVERSITY INTERNATIONAL. Guidelines for the development of crop descriptor lists. **Bioversity Technical Bulletin Series**. Bioversity International, Rome, Italy, 2007. 72 p.

BRASIL. **Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**. Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/>. Acessado em: 19/09/2023.

CANTELMO, N. F.; FERREIRA, D. F. Desempenho de Testes de Normalidade Multivariados Avaliado por Simulação Monte Carlo. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 6, p. 1630-1636, 2007.

CARENA, M. J. Germplasm enhancement and cultivar development: the need for sustainable breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 21, p. e385621S4, 2021.

CHEN, Q.; LU, X.; GUO, X.; GUO, Q.; LI, D. Metabolomics characterization of two Apocynaceae plants, *Catharanthus roseus* and *Vinca minor*, using GC-MS and LC-MS methods in combination. **Molecules**, v. 22, n. 6, p. 1-16, 2017.

CHUNG, I. M.; KIM, E. H.; LI, M.; PEEBLES, C. A.; JUNG, W.-S.; SONG, H.-K.; AHN, J.-H.; SAN, K.Y. Screening 64 cultivars *Catharanthus roseus* for the production of vindoline, catharanthine, and serpentine. **Biotechnology progress**, v. 27, n. 4, p. 937-943, 2011.

CLARKE, K. R.; GREEN, R. H. Statistical design and analysis for a "biological effects" study. **Marine Ecology Progress Series**, v. 46, n. 1, p. 213-226, 1988.

CLARKE, K. R. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. **Australian journal of ecology**, v. 18, n. 1, p. 117-143, 1993.

CRUZ, C. D.; MEDEIROS, F. F.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Viçosa: UFV, 2020. 614 p.

DAMASCENO JUNIOR, P. C.; PEREIRA, T. N. S.; SILVA, F. F. D.; REIS, M. V. M.; PEREIRA, M. G. Diversidade genética em duas espécies de Caricáceas e suas relações genéticas com *Carica papaya* L. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 4, p. 733-739, 2015.

FLASCHENRIEM, D. R. **Catharanthus variety PAS1053044**. US PP18,315 P3. 2016.

GUIMARÃES, G.; CARDOSO, L.; OLIVEIRA, H.; SANTOS, C.; DUARTE, P.; SOTTOMAYOR, M. Cytogenetic characterization and genome size of the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **AoB Plants**, p. 1-10, 2012.

GUPTA, A. K.; SHUKLA, A. K.; SINGH, P.; MALL, M.; YADAV, S.; SHASANY, A. K.; SHANKER, K.; BASKARAN, K.; SUNDARESAN, V.; TALHA, M.; SRIVASTAVA, A.; GUPTA, S.; KHARE, P.; MANI, D. N.; SAMAD, A. CIM-Sushil: A high vindoline yielding variety of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, v. 42, n. 1-2, p. 51-63, 2020.

KANIESKI, M. R.; ARAUJO, A. C. B.; LONGHI, S. J. Quantificação da diversidade em Floresta Ombrófila Mista por meio de diferentes Índices Alfa. **Scientia Forestalis**, v. 38, n. 88, p. 567-577, 2010.

KAUSHIK, S.; TOMAR, R. S.; GUPTA, M.; MISHRA, R. K. An overview of *Catharanthus roseus* and medicinal properties of their metabolites against important diseases. **European Academic Research**, v. 5, n. 2, 1237-1247, 2017.

KELLEY, L. A.; GARDNER, S. P.; SUTCLIFFE, M. J. An automated approach for clustering an ensemble of NMR derived protein structures into conformationally-related subfamilies. **Protein Engineering**, v. 9, p. 1063-1065, 1996.

KULKARNI, R. N.; BASKARAN, K. Increasing total leaf alkaloid concentrations in periwinkle (*Catharanthus roseus*) by combining the macro-mutant traits of two induced leaf mutants ('necrotic leaf' and 'nerium leaf'). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 89, n. 5, p. 513-518, 2014.

KUMAR, S.; RAI, S. P.; KUMAR, S. R.; SINGH, D.; SRIVASTAVA, S.; MISHRA, R. K. **Plant variety of *Catharanthus roseus* named 'Ili'**. US PP18,315 P3. 2007.

LAL, S.; MISTRY, K. N.; SHAH, S. D.; THAKER, R.; VAIDYA, P. B. Genetic diversity assessment in nine cultivars of *Catharanthus roseus* from Central Gujarat (India) through RAPD, ISSR and SSR markers. **Journal of research in Biology**, v. 1, n. 8, p. 667-675, 2011.

MACHADO, D. F. T.; SILVA, S. H. G.; CURI, N.; MENEZES, M. D. D. Soil type spatial prediction from Random Forest: different training datasets, transferability, accuracy and uncertainty assessment. **Scientia Agricola**, v. 76, n. 3, p. 243-254, 2019.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, v. 27, n. 2, p. 209-202, 1967.

MARDIA, K. V. Measures of multivariate skewness and kurtosis with applications. **Biometrika**, v. 57, n. 3, p. 519-530, 1970.

MARGALEF, R. Homage to Evelyn Hutchinson, or why is there an upper limit to diversity. **Transactions of the Connecticut Academy of Arts and Sciences**, v. 44, p. 211-235, 1972.

MISHRA, P.; UNİYAL, G. C.; SHARMA, S.; KUMAR, S. Pattern of diversity for morphological and alkaloid yield related traits among the periwinkle *Catharanthus roseus* accessions collected from in and around Indian subcontinent. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 48, n. 3, p. 273-286, 2001.

MU, F.; YANG, L.; WANG, W. et al., Negative-pressure cavitation extraction of four main vinca alkaloids from *Catharanthus roseus* leaves. **Molecules**, v. 17, n. 8, p. 8742-8752, 2012.

NAEEM, M.; AFTAB, T.; ANSARI, A. A.; IDREES, M.; ALI, A.; KHAN, M. M. A.; UDDIN, M.; VARSHNEY, L. Radiolytically degraded sodium alginate enhances plant growth, physiological activities and alkaloids production in *Catharanthus roseus* L. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 8, n. 4, p. 606-616, 2015.

NAEEM, M.; ANSARI, A. A.; AFTAB, T.; SHABBIR, A.; ALAM, M. M.; KHAN, M. M. A.; UDDIN, M. Application of triacontanol modulates plant growth and physiological activities of *Catharanthus roseus* (L.). **International Journal of Botany Studies**, v. 4, n. 2, p. 131-135, 2019.

NEJAT, N.; VALDIANI, A.; CAHILL, D.; TAN Yee-How; MAZIAH, M.; ABIRI R. Ornamental exterior versus therapeutic interior of Madagascar Periwinkle (*Catharanthus roseus*): the two faces of a versatile herb. **The Scientific World Journal**, v. 2015, p. 1-19, 2015.

PAULA, F. C.; SOARES, I. F. G.; NETO, J. D. de S.; MOULIN, M. M.; BERILLI, A. P. C. G.; NASCIMENTO, L. C.; PRETTI, I. R. Correlações fenotípicas e genotípicas a expressão de vincristina e vimblastina relativas ao efeito do solo em características concernentes a *Catharanthus roseus*. **Revista IFES Ciência**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2021.

PIELOU, E. C. The measurement of diversity in different types of biological collections. **Journal of Theoretical Biology**, v. 13, p. 131–144, 1966.

PROTA. **Plant resources of Tropical Africa. African ornamentals. Proposals and examples**. Wageningen, The Netherlands: PROTA Foundation; 2015.

QING, Y. D.; BINYE, P.; KUN, R. D. L. ISSR analysis of genetic relationships between forty varieties of *Catharanthus roseus*. **Journal of Shanghai Jiaotong University-Agricultural Science**, v. 27, p. 138-142, 2011.

RAI, S. P.; LUTHRA, R.; GUPTA, M. M.; KUMAR, S. Pleiotropic morphological and abiotic stress resistance phenotypes of the hyper-abscisic acid producing Abo– mutant in the periwinkle *Catharanthus roseus*. **Journal of Biosciences**, v. 26, n. 1, p. 57-70, 2001.

RAVIKUMAR, B.; DHATT, K. K. Exploitation of heterosis in a diallel crosses of periwinkle (*Catharanthus roseus*) for morphological traits. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 93, n. 5, p. 495-500, 2023.

R DEVELOPMENT CORE TEAM (2023). **R: a language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL. <https://www.R-project.org/>.

REIS, M. V. M.; DAMASCENO, P. C.; CAMPOS, T. D. O.; DIEGUES, I. P.; FREITAS, S. C. D. Variabilidade genética e associação entre caracteres em germoplasma de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.). **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 2, p. 412-420, 2015.

ROHLF, F. J. Adaptive Hierarchical clustering schemes. **Systematic Zoology**. v. 18, p. 58-82, 1970.

SAMIYARSIH, S.; NAIPOSPOS, N.; PALUPI, D. Variability of *Catharanthus roseus* based on morphological and anatomical characters, and chlorophyll contents. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 20, n. 10, p. 2986-2993, 2019.

SENDHILNATHAN, R.; KARUPPAIAH, P.; RAJKUMAR, M; SURESHKUMAR, R. Effect of plant growth regulators on growth and yield of periwinkle [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don] cv. rose purple flowered. **International Journal of Current Research**, v. 8, n. 7, p. 35505-35506, 2016.

SHANNON, C. E. **A Mathematical Theory of Communication**. Reprinted with corrections from The Bell System Technical Journal, v. 27, pp. 379–423, 623–656, 1948.

SHARMA, V.; CHAUDHARY, S.; SRIVASTAVA, S.; PANDEY, R.; KUMAR, S. Characterization of variation and quantitative trait loci related to terpenoid indole alkaloid yield in a recombinant inbred line mapping population of *Catharanthus roseus*. **Journal of genetics**, v. 91, p. 49-69, 2012.

SHAW, R. K.; ACHARYA, L.; MUKHERJEE, A. K. Assessment of genetic diversity in a highly valuable medicinal plant *Catharanthus roseus* using molecular markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 52-59, 2009.

SHOKEEN, B.; SETHY, N. K.; KUMAR, S.; BHATIA, S. Isolation and characterization of microsatellite markers for analysis of molecular variation in the medicinal plant Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). **Plant Science**, 172(3), 441-451, 2007.

SILVEIRA, T. D. O.; MARQUES, M. D. M.; AMORIM, G. T. S.; CARVALHO, M. G. D., DAMASCENO, P. C. Genetic diversity among bitter melon genotypes assessed through morpho-agronomic variables. **Revista Caatinga**, v. 35, n. 4, p. 755-763, 2022.

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, v.41. p.237-245, 1981.

SINGH, M.; DWIVEDI, S. Genetic analysis of important morpho-economic traits in periwinkle, *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Indian Forester**, v. 136, n. 8, p. 1034-1047, 2010.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W. H. Freeman, 1973. 573 p.

SOARES, I. F. G.; PAULA, F. C.; DE SOUZA NETO, J. D.; FERREIRA, B. C.; BERILLI, A. P. C. G.; MOULIN, M. M. Morphological diversity in varieties of *Catharanthus Roseus* [L.] G. Don. **Observatório de La economía Latinoamericana**, v. 22, n. 1, p. 2095-2111, 2024.

SOKAL, R. R.; MICHENER, C. D. **A statistical method for evaluating systematic relationships**. **Science Bulletin**. v. 38, p. 1409–1438, 1958.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. James. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, v. 11, n. 2, p. 33-40, 1962.

TYLER, V.E. Medicinal plant research: 1953-1987. **Planta Medica**, v. 54, n. 2, p. 95-100, 1988.

UPOV. **Union for the Protection of New Varieties of Plants. *Catharanthus roseus* (L). G. Don. Guidelines for the conduct of test for distinctness, uniformity and stability.** TG/214/1Internationa, Geneva, 2004. 21 p.

Capítulo II. Identificação de genótipos de vinca (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) visando a produção de alcaloides.

RESUMO

A vinca (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) produz os alcaloides vincristina e vimblastina muito utilizados no tratamento convencional da leucemia e de alguns tipos de câncer em humanos. Como tais substâncias ocorrem em baixas concentrações nas folhas desta espécie, é fundamental a implementação de um programa de melhoramento visando o aumento dessas substâncias nas plantas de vinca. Nesse sentido, é importante conhecer o potencial do germoplasma quanto à produção de alcaloides. A presente pesquisa teve por objetivo conhecer o potencial da produção de catarantina (CAT), vindolina (VDL), vimblastina (VBL) e vincristina (VCR) em diferentes genótipos de vinca de seis meses de idade, bem como estimar a diversidade molecular entre os genótipos mais produtivos. Para tal, inicialmente avaliou-se a produção de biomassa de folhas secas (BFO_s) em 79 genótipos. Verificou-se a presença de alcaloides nestes genótipos através do reagente de Dragendorff. Apenas os genótipos com a BFO_s acima da média geral da população e positivos para a presença de alcaloides prosseguiram para a extração de alcaloides. Os teores dos alcaloides CAT, VDL, VCR e VBL foram determinados em HPLC-DAD (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detecção de Arranjo de Fotodiodos). Posteriormente, estimou-se a produção dos alcaloides por planta (BFO_s x teor dos alcaloides). Na análise genotípica foram utilizados 15 *primers* ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*). A matriz fenética foi estimada pelo índice de dissimilaridade de Jaccard e o agrupamento foi realizado via UPGMA (*Unweighted Pair Groups Method with Arithmetic Mean*). Verificou-se a consistência do padrão de agrupamento através da correlação cofenética. Para estimar o número ótimo de grupos no dendrograma utilizou-se o algoritmo *kgs*. A diversidade molecular foi estimada via índices de Shannon e Pielou. A média de BFO_s na população analisada foi estimada em 14,04 g ± 3,57 g. Dos 79 genótipos avaliados, 15 deles apresentaram a BFO_s estatisticamente superior à média da população. Dentre os 15 genótipos superiores para BFO_s, o UFRRJ VIN007/14(PAB) foi descartado, pois foi negativo para a presença de alcaloides. Na HPLC-DAD foi possível identificar a VBL em 13 das 14 plantas analisadas. Já CAT e VDL estiveram presentes em todas e a VCR não foi detectada em nenhuma delas. Três dos 14 genótipos analisados se destacaram para a produção de VBL. O genótipo UFRRJ VIN013/22(PAB) alcançou o maior teor de VBL (0,77 mg/g de BFO_s) e a maior produção de VBL/planta (13,61 mg). Em plantas no campo, esta produção de VBL é considerada alta. Elevadas produções de VBL/planta também foram verificadas nos genótipos UFRRJ VIN005/07(PAB) (12,79 mg) e UFRRJ VIN056/48(AUT) (10,96 mg). Por outro lado, não foram observados genótipos promissores para os teores de CAT e VDL. Na análise de agrupamento, o coeficiente de correlação cofenética foi estimado em 0,71. Por meio do algoritmo *kgs* determinou-se, no dendrograma, quatro grupos. As medidas de dissimilaridades variaram de 0,65 a 0,83 e a distância genética média foi estimada em 0,80. Os resultados para os índices de Shannon (5,66) e Pielou (0,96) indicaram alta diversidade molecular e corroboraram as elevadas distâncias genéticas obtidas no dendrograma. Conclui-se que (i) foi possível a identificação de genótipos promissores para produção de VBL, e (ii) constatou-se que a diversidade molecular foi alta entre os genótipos analisados.

Palavras-chave: diversidade genética, extração de alcaloides, HPLC-DAD, melhoramento genético, plantas medicinais, vimblastina.

Chapter II. Identification of periwinkle (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) genotypes aiming at alkaloid production.

ABSTRACT

Periwinkle (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) produces the alkaloids vincristine and vinblastine, which are widely used in the conventional treatment of leukemia and some types of cancer in humans. Since these substances occur in low concentrations in the leaves of this species, it is essential to implement a breeding program aimed at increasing these substances in vinca plants. In this sense, it is important to know the potential of the germplasm for alkaloid production. The present study aimed to determine the potential for the production of catharanthine (CAT), vindoline (VDL), vinblastine (VBL) and vincristine (VCR) in different genotypes of six-month-old periwinkle, as well as to estimate the molecular diversity among the most productive genotypes. To this end, the production of dry leaf biomass (BFO_s) was initially evaluated in 79 genotypes. The presence of alkaloids in these genotypes was verified using the Dragendorff reagent. Only genotypes with BFO_s above the general population average and positive for the presence of alkaloids proceeded to alkaloid extraction. The levels of the alkaloids CAT, VDL, VCR and VBL were determined using HPLC-DAD (High-Performance Liquid Chromatography–Diode Array Detection). Subsequently, the alkaloid production per plant was estimated (BFO_s x alkaloid content). In the genotypic analysis, 15 ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) primers were used. The phenetic matrix was estimated by the Jaccard dissimilarity index and the clustering was performed via UPGMA (Unweighted Pair Groups Method with Arithmetic Mean). The consistency of the clustering pattern was verified through the cophenetic correlation. To estimate the optimal number of groups in the dendrogram, the *k*gs algorithm was used. Molecular diversity was estimated via Shannon and Pielou indices. The mean BFO_s in the analyzed population was estimated at 14.04 g ± 3.57 g. Of the 79 genotypes evaluated, 15 of them presented BFO_s statistically higher than the population mean. Among the 15 superior genotypes for BFO_s, UFRRJ VIN007/14(PAB) was discarded, as it was negative for the presence of alkaloids. In HPLC-DAD, it was possible to identify VBL in 13 of the 14 plants analyzed. CAT and VDL were present in all of them, and VCR was not detected in any of them. Three of the 14 genotypes analyzed stood out for VBL production. The genotype UFRRJ VIN013/22(PAB) achieved the highest VBL content (0.77 mg/g of BFO_s) and the highest VBL production/plant (13.61 mg). In field plants, this VBL production is considered high. High VBL/plant productions were also observed in the UFRRJ VIN005/07(PAB) (12.79 mg) and UFRRJ VIN056/48(AUT) (10.96 mg) genotypes. On the other hand, no promising genotypes were observed for CAT and VDL contents. In the cluster analysis, the cophenetic correlation coefficient was estimated at 0.71. Using the *k*gs algorithm, four groups were determined in the dendrogram. The dissimilarity measures ranged from 0.65 to 0.83 and the average genetic distance was estimated at 0.80. The results for the Shannon (5.66) and Pielou (0.96) indices indicated high molecular diversity and corroborated the high genetic distances obtained in the dendrogram. It was concluded that (i) it was possible to identify promising genotypes for VBL production, and (ii) it was found that molecular diversity was high among the genotypes analyzed.

Keywords: genetic diversity, alkaloid extraction, HPLC-DAD, plant breeding, medicinal plants, vinblastine.

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Catharanthus roseus* [L.] G. Don, pertencente à família Apocynaceae, é diploide com $2n = 2x = 16$ cromossomos (GUIMARÃES *et al.*, 2012). No Brasil, é conhecida pelo nome de vinca ou maria-sem-vergonha e tem o seu centro de origem na ilha de Madagascar (NEJAT *et al.*, 2015; PHAM *et al.*, 2020). A espécie tem flores hermafroditas, com predominância da alogamia, mas com certa taxa de autogamia, a depender do genótipo (AMORIM *et al.*, 2023). Possui crescimento rápido, é sub-lenhosa, muito ramificada e a sua altura pode atingir 1,0 (um) metro (KULKARNI *et al.*, 2016).

A vinca é responsável pela produção de mais de 130 tipos diferentes de alcaloides denominados TIAs (*Terpenoid Indole Alkaloids*) (ZHU *et al.*, 2015). Entre os principais TIAs, destacam-se os alcaloides diméricos vincristina e a vimblastina. Segundo Zhu *et al.* (2014), a vimblastina é sintetizada pela planta a partir do acoplamento dos alcaloides monoméricos catarantina e vindolina, levando à α -3',4'-anidrovimblastina, a qual é convertida em vimblastina e esta em vincristina.

Os alcaloides vincristina e vimblastina podem ser extraídos diretamente das folhas das plantas de vinca. Ambas são substâncias antineoplásicas e, portanto, utilizadas no tratamento convencional de diversos tipos de câncer. A vimblastina é utilizada no tratamento do linfoma de Hodgkin, neuroblastoma, câncer de mama e de pulmão, e leucemia aguda e crônica (ASLAM *et al.*, 2010). A vincristina é utilizada no tratamento do câncer de pulmão, leucemia linfocítica, glioblastomas e leucemia mieloide aguda (SHUKLA *et al.*, 2024). De acordo com Kaushik *et al.* (2017) e Škubník *et al.* (2021), a vincristina é utilizada, principalmente, no tratamento da leucemia aguda em crianças.

Contudo, os alcaloides vincristina e vimblastina ocorrem em baixíssimas concentrações nas folhas de *C. roseus* (TYLER, 1988; VAN DER HEIJDEN *et al.*, 2004; LISCOMBE & O'CONNOR, 2011; NEJAT *et al.*, 2015). Em face da complexidade em sintetizar artificialmente esses alcaloides (VERMA *et al.*, 2007), a sua produção industrial também se dá via processo de semissíntese. Esse processo é realizado a partir de seus precursores vindolina e catarantina extraídos diretamente das plantas (ZHANG *et al.*, 2022). Porém, isso tem tornado o custo de produção elevado (ALAM & SHARAF-ELDIN, 2016).

Uma alternativa tem sido a produção de vincristina e vimblastina via cultivo *in vitro*. Segundo Kulkarni *et al.* (2016), os países desenvolvidos têm concentrado grandes esforços na tentativa de se produzir vincristina e vimblastina em explantes via cultivo *in vitro*. Os mesmos autores ressaltaram que esta estratégia está relacionada às dificuldades de adaptação que a vinca enfrenta em países de clima temperado. Para Hemmati *et al.* (2020), o cultivo *in vitro* não tem sido eficaz ou adequado para se produzir vimblastina em larga escala. De acordo com Dias *et al.* (2016), a curta fase estacionária de crescimento pela qual passam as células no cultivo *in vitro* pode reduzir severamente os metabólitos secundários produzidos por enzimas, que estão presentes ou ativas apenas em células expandidas.

Dada a dificuldade de produção da vimblastina e vincristina *in vitro*, uma alternativa é a produção a partir do cultivo das plantas no campo. De acordo com Kulkarni *et al.* (2016), a vinca adapta-se muito bem às condições de clima tropical. Schlaepfer e Mendoza (2010) mencionaram que a produção comercial em larga escala da vincristina e vimblastina pode ser perfeitamente implementada através do cultivo das plantas no campo. Atualmente, no Brasil são mencionadas 127 cultivares de vinca registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (BRASIL, 2024), todas elas desenvolvidas para fins ornamentais. Neste caso, no Brasil, a implementação de programas de melhoramento visando a seleção de genótipos superiores para a produção de alcaloides de interesse corresponde a uma excelente estratégia.

No melhoramento de plantas a existência de alta diversidade genética é fator primordial para o sucesso no processo de seleção e, portanto, para a continuidade de programas de melhoramento (ALLARD, 1960; CARENA, 2021; SALGOTRA & CHAUHAN, 2023; SANCHEZ *et al.*, 2023). A literatura reporta alta diversidade genética para vinca ao nível molecular (SHOKEEN *et al.*, 2007; SHAW *et al.*, 2009; QING *et al.*, 2011; LAL *et al.*, 2011; AMORIM *et al.*, 2023). É provável que a prevalência da alogamia como modo de reprodução preferencial em vinca (AMORIM *et al.*, 2023) seja um fator decisivo na ampliação desta diversidade. A constatação de alta diversidade genética na espécie pode apontar para a possibilidade de seleção de genótipos superiores.

Diante do exposto, a presente pesquisa tem por finalidade conhecer o potencial da produção de biomassa de folhas secas (BFO_s) e dos alcaloides catarantina (CAT), vindolina (VDL), vincristina (VCR) e vimblastina (VBL) em diferentes genótipos de vinca, bem como estimar a diversidade molecular entre os melhores genótipos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal, condições experimentais e local da pesquisa

Os genótipos de *C. roseus* aqui analisados pertencem à Coleção de Trabalho do Departamento de Agrotecnologias e Sustentabilidade (DATS), do Instituto de Agronomia (IA), da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), em Seropédica (22°45' S; 43° 41' W), Rio de Janeiro, Brasil. Tal coleção abrange 79 genótipos de *C. roseus* cultivados, sob telado, em vasos de 8 litros contendo substrato na proporção de 1:1:1 (areia, terra e esterco bovino curtido). As temperaturas mínimas e máximas médias no período avaliado foram, respectivamente, 23,85 e 25,09°C e a umidade relativa média foi de 71,27% (BRASIL, 2023).

As atividades laboratoriais ao nível molecular foram conduzidas no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular de Plantas (LCBMP), do Departamento de Fitotecnia (DFITO)/IA/UFRRJ. As análises químicas foram desenvolvidas no Laboratório de Recursos Genéticos Vegetais Prof. Élson Viégas do DFITO/IA/UFRRJ e no Laboratório de Tecnologia para Biodiversidade em Saúde (LabTecBio), no Instituto de Tecnologia em Fármacos/Farmanguinhos, da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

2.2. Produção de biomassa de folhas secas (BFO_s) dos genótipos da Coleção de Trabalho

Para se conhecer o potencial produtivo dos genótipos realizou-se a colheita, ao mesmo tempo, de todas as folhas de cada uma das 79 plantas de *C. roseus* de mesma idade (seis meses). Em seguida, as folhas foram secas em estufa com circulação forçada de ar (Eletrolab EL 402, Brasil) à 47°C até peso constante. Após a secagem, as folhas foram pesadas a 0,01 g de precisão, mediante uso de balança digital (Bel, Mark 1300, Itália), para determinação da produção de biomassa de folhas secas (BFO_s) em gramas por genótipo.

Após a obtenção dos pesos secos foram selecionados os genótipos que apresentaram a produção de biomassa de folhas secas (BFO_s) estatisticamente superior à média da população.

2.3. Detecção qualitativa dos alcaloides por meio do reagente de Dragendorff

Os 79 genótipos de vinca foram submetidos ao *screening* para detecção de presença/ausência de alcaloides. Para isso, os extratos de folhas foram obtidos conforme Wagner e Bladt (1996).

A detecção qualitativa dos alcaloides foi efetuada conforme Aziz *et al.* (2014). A formação de um precipitado de cor vermelha/alaranjada indica a presença de alcaloides, após a adição de três gotas do reagente de Dragendorff nos extratos brutos obtidos.

Apenas os genótipos positivos para a presença de alcaloides e com produção de BFO_s superior à média populacional foram encaminhados para a extração de alcaloides.

2.4. Extração de Alcaloides

Para a análise de HPLC-DAD (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detecção de Arranjo de Fotodiodos), os extratos alcaloídicos de folhas de *C. roseus* foram obtidos conforme Singh *et al.* (2000).

Para tal, o material vegetal em pó (1,5 g - Figura 8A) de cada genótipo foi extraído em etanol a 95% (3 x 10 mL, 12 horas de cada vez) à temperatura ambiente. O extrato etanólico foi filtrado, reunido e concentrado em rotavapor (Buchi, R-215, Suíça) à 40 °C, 40 rpm e 200 mbar até um volume de 3 mL (Figuras 8B, 8C e 8D). Em seguida, foi diluído em 3 mL de água ultrapurificada e acidificado com 3 mL de HCl a 3%. A esta solução foram adicionados 3 mL de hexano por 3 vezes (Figura 8E). A fração alvo foi basificada com NH₄OH até pH = 8,5 e extraída com 10 mL de clorofórmio (por 3 vezes) em funil de separação (Figura 8F). A fração clorofórmica (Figura 8G) foi lavada com água destilada, seca *overnight* em sulfato de sódio anidro e evaporada em rotavapor (Buchi, R-215, Suíça), nas mesmas condições citadas acima (Figura 8H). O extrato alcaloídico (Figura 8I) foi liofilizado à 0,20 mbar e -94,5 °C por 24 h (Figura 8J).

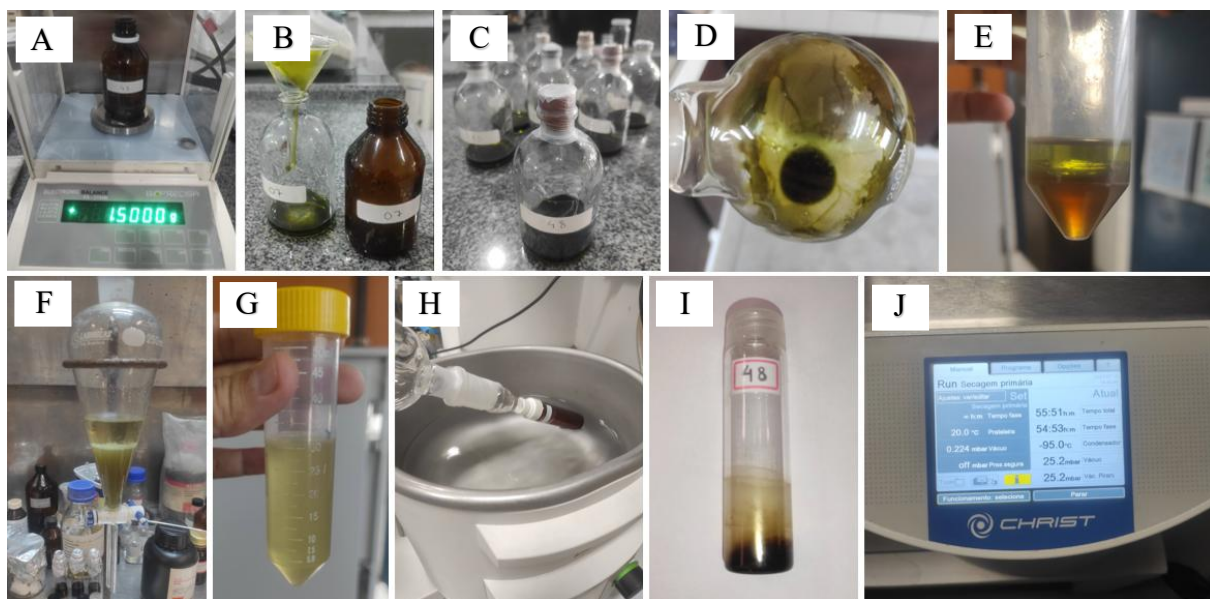


Figura 8. Preparação dos extratos alcaloídicos de *C. roseus*. A) Material vegetal em pó (1,5 g) extraído em 10 mL de etanol a 95%. B) Filtragem do extrato etanólico em papel filtro após 12 horas. C) Extrato etanólico armazenado em frasco previamente identificado. D) Extrato etanólico concentrado até um volume de 3 mL após ser submetido ao rotavapor (Buchi, R-215, Suíça) à 40 °C, 40 rpm e 200 mbar. E) Adição de 3 mL de hexano por 3 vezes. Após cada adição de hexano, agitou-se o tubo Falcon e descartou-se a fração hexânica. F) Funil de separação contendo a porção basificada mais 10 mL de clorofórmio. A cada adição de clorofórmio agitou-se o funil de separação e esgotou-se a fase alvo (fração clorofórmica). G) Tubo Falcon contendo a fração clorofórmica. H) Fração clorofórmica concentrada em rotavapor (Buchi, R-215, Suíça)

à 40 °C, 40 rpm e 200 mbar. I) Extrato alcaloídico. J) Programação do liofilizador à 0,20 mbar e -94,5 °C por 24h.

2.4.1. Preparação das amostras

Adicionaram-se aos extratos alcaloídicos de cada um dos genótipos 3.000 µL de metanol, agitando em vórtex por 30 segundos e levando a sonicação por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram filtradas em membranas PVDF de 0,22µm (Millex-GV, PVDF, Merck Millipore).

2.4.2. Instrumento cromatográfico e condições de análise

As análises por HPLC-DAD (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detecção de Arranjo de Fotodiodos) foram realizadas em um sistema Nexera (Shimadzu, Kyoto, Japão), constituído de degasador DGU-20A5R, duas bombas LC-20ADXR, forno para colunas CTO-20AC, injetor automático SIL-30AC programado para injeção em triplicata, detector SPD-M20A e módulo CBM-20A e software LabSolutions para aquisição de dados e controle do sistema.

As condições cromatográficas adotadas foram conforme Naaranlahti *et al.* (1987), com algumas modificações (CARVALHAES *et al.*, 2002) e aplicadas no Departamento de Métodos Analíticos, no Instituto de Tecnologia em Fármacos/Farmanguinhos, da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

A eluição ocorreu a vazão de 1,5 mL/min usando como fase móvel uma solução de acetato de amônio 25 mM (fase A) e metanol/acetonitrila 2:3 (fase B), ambas contendo 0,02%v/v trietilamina, na programação com gradiente de: 0-5 min, com 50% B; 5-10 min, 50-60% B; 10-15 min, 60% B; 15-20 min, 60-65% B; 20-30 min, 65% B; 30-32 min, 65-50% B e 32-45 min, 50% B. A coluna µBondapak C18 300 x 3,9 mm, tamanho de partícula de 10 µm e pré-coluna Supelcosil LC-18 (2,0 cm x 2,1 mm, 5 µm) foram aplicadas a 25 °C. O volume de injeção de amostra foi de 20 µL em triplicata. A detecção foi programada com cromatogramas a 255, 280 e 305 nm e espectros na faixa de 220 - 400 nm.

2.5. Identificação dos alcaloides através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detecção de Arranjo de Fotodiodos (HPLC-DAD)

A identificação dos alcaloides nos genótipos analisados foi determinada pela HPLC-DAD a partir do tempo de retenção da respectiva substância, cromatograma expandido, espectro UV típico obtido e posterior comparação com os espectros UV dos padrões de catarantina (CAT), vindolina (VDL), vimblastina (VBL) e vincristina (VCR).

2.6. Análise quantitativa dos alcaloides através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detecção de Arranjo de Fotodiodos (HPLC-DAD)

2.6.1. Preparo dos padrões e da curva de calibração

Uma série de diluições em metanol (concentrações de 1,0 a 240 µg/mL) dos padrões de vindolina (Oakwood Chemical, EUA) e catarantina (MedChemExpress, EUA) foi preparada a partir de uma solução metanólica estoque de 1 mg/mL para traçar a curva de calibração. Já para os alcaloides vimblastina (MedChemExpress, EUA) e vincristina (MedChemExpress, EUA) utilizaram-se as concentrações de 0,5 a 120 µg/mL. As curvas de calibração foram construídas através das áreas de integração apresentadas nos cromatogramas (gerados pelo *software* do equipamento) *versus* as concentrações das diluições injetadas no instrumento cromatográfico.

2.6.2. Quantificação do teor e cálculo da produção dos alcaloides por genótipo

Os teores de catarantina (CAT), vindolina (VDL), vincristina (VCR) e vimblastina (VBL) foram quantificados em miligramas por grama (mg/g de BFO_s) através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detecção de Arranjo de Fotodiodos (HPLC-DAD), interpolando as áreas dos picos destes metabólitos de cada genótipo na curva de calibração dos padrões.

A produção de CAT, VDL, VCR e VBL por genótipo, dadas em miligramas (mg), foi calculada pela multiplicação da produção de biomassa foliar seca (g) pelo teor do alcaloide (mg/g de BFO_s).

2.7. Análise da diversidade genética via marcador de DNA do tipo ISSR

Foram considerados na análise da diversidade genética somente os genótipos de *C. roseus* inseridos na quantificação do teor e no cálculo da produção dos alcaloides por genótipo.

2.7.1. Coleta e extração de DNA genômico

Para extração do DNA genômico foram coletadas, e devidamente identificadas, folhas jovens colhidas em cada um dos genótipos analisados. No Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular de Plantas (LCBMP) do DFITO/IA/UFRRJ, as folhas foram submetidas ao processo de extração de DNA pelo método CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) (DOYLE & DOYLE, 1990), com algumas modificações (FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1998). Após quantificação, em Nanodrop (Thermo Scientific Nanodrop 2000, EUA), o DNA utilizado nas análises foi diluído para a concentração de 5ng.μL⁻¹.

2.7.2. Seleção de *primers* ISSR

Foi realizado um *screening* com 58 *primers* ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), dos quais, 15 apresentaram polimorfismo. As sequências e temperaturas de anelamento dos 15 *primers* ISSR encontram-se descritas na Tabela 6.

Tabela 6. Relação de *primers* do tipo ISSR utilizados com respectivas temperaturas de anelamento (TA).

Sequência 5' – 3'	TA (°C)
(CT) ₈ G	52°C
(GTG) ₃ GC	52°C
(TG) ₈ A	52°C
(GAA) ₆ AA	52°C
G(CTA) ₆	52°C
(ATG) ₆ G	52°C
(GACA) ₄	50°C
(AC) ₈ T	50°C
(AG) ₈ YT	50°C
(TC) ₈ AGG	50°C
(GT) ₆ GG	48°C

Continua.	
Sequência 5' – 3'	TA (°C)
(GATA) ₂ (GACA) ₂	48°C
(AG) ₈ C	45°C
(GA) ₆ CC	42°C
(CT) ₈ TG	40°C

Legenda: Y = C ou T.

2.7.3. Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

As reações de amplificação foram realizadas conforme Williams *et al.* (1990), com algumas modificações. As concentrações adotadas para um volume final de reação de 13 µL de solução foram: 1,5 µL de solução de DNTP a 100 µM; 1,5 µL de solução tampão 20x para PCR; 0,5 µL de MgCl₂ a 2,4 mmol L⁻¹; 0,12 µL da enzima Taq DNA Polimerase, 6,38 µL de água ultrapura, 2,0 µL de DNA (5ng.µl⁻¹) e 1,0 µL de *primer* a 0,3 µM.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador (Eppendorf Mastercycler Pro, Alemanha), conduzidas da seguinte maneira: um minuto a 94°C para a desnaturação inicial, seguida de 40 ciclos, um composto por um minuto a 94°C, 40-52°C por um minuto (dependendo do *primer* ISSR utilizado, Tabela 6) e três minutos a 72°C. Por fim, a extensão final por sete minutos a 72°C.

2.7.4. Fotodocumentação e obtenção da matriz binária

Os produtos das reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%. Nos poços foram depositados um mix de 6 µL, contendo 2 µL de DNA, 2 µL GelRed (Biotium, Hayward, CA, EUA) e 2 µL de *blue juice*. Os produtos amplificados foram fotodocumentados em fotodocumentador Bio-imaging System (MiniBis Pro, Israel). As imagens, de alta resolução, foram capturadas no programa GelCapture (versão 7.0.15). Os perfis ISSR foram obtidos pela ausência (valor zero) e presença de bandas de alta intensidade (valor 1). Após análise das bandas foi obtida a matriz binária, a qual foi submetida a análise estatística da diversidade.

2.8. Análises estatísticas

Estimou-se a média e o desvio padrão da produção de biomassa de folhas secas (BFO_s) em 79 genótipos de *C. roseus*. Em seguida, foi realizada uma estatística descritiva (média, mínimo, máximo, amplitude, desvio padrão e coeficiente de variação) para a produção de BFO_s, bem como para os teores e produções de CAT, VDL e VBL nos genótipos selecionados.

No caso da análise da diversidade molecular, inicialmente, a matriz de dados binários foi submetida ao cálculo da dissimilaridade de Jaccard (1-J) (JACCARD, 1908). A análise de agrupamento foi realizada usando o algoritmo UPGMA (SOKAL & MICHENER, 1958). Para estimar o número ótimo de grupos no dendrograma foi utilizada a técnica de *Kelley-Gardner-Sutcliffe (kgs)* (KELLEY *et al.*, 1996). O ajuste entre as matrizes fenéticas e cofenéticas foi estimado a partir da correlação cofenética (SOKAL & ROHLF, 1962), utilizando o teste de Mantel com 1000 permutações (MANTEL, 1967).

A diversidade molecular também foi estimada via índices de Shannon (H') (SHANNON, 1948) e de Pielou (J') (PIELOU, 1966).

Todas as análises estatísticas foram realizadas no Programa R, versão 4.2.3 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2023).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação da produção de biomassa de folhas secas (BFO_s) da Coleção de Trabalho

A média de produção de biomassa de folhas secas (BFO_s) na população analisada foi estimada em 14,04 g ± 3,57 g (Tabela 7). Dos 79 genótipos avaliados, mantidos sob telado cultivados em vasos de oito litros, 15 deles apresentaram a produção de BFO_s estatisticamente superior à média da população. Entre os superiores, a maior e menor produção de biomassa de folhas secas (BFO_s) foi de 22,40 e 17,68 g por planta, respectivamente (Tabela 7). Sharma *et al.* (2012) observaram em 197 linhagens endogâmicas de vinca um peso seco foliar médio de 38,20 g ± 1,27 g. Entretanto, vale ressaltar que estes genótipos já estão em processo de melhoramento e foram cultivados no campo. Naeem *et al.* (2015) estimaram o peso seco foliar em plantas de *C. roseus* cultivadas em vasos e obtiveram valores variando de 15,24 a 21,05 g, após 120 dias do plantio. Portanto, os nossos resultados foram mais próximos dos obtidos pelos referidos autores, ou seja, quando as plantas também se desenvolveram em vasos.

Tabela 7. Produção de biomassa de folhas secas (BFO_s) em gramas nos genótipos de *C. roseus*.

Genótipos	BFO _s (g)
UFRRJ VIN004/05(PAB)	22,40
UFRRJ VIN005/09(PAB)	22,30
UFRRJ VIN013/25(PAB)	21,34
UFRRJ VIN007/14(PAB)	20,89
UFRRJ VIN004/02(AUT)	20,30
UFRRJ VIN044/37(PAB)	20,15
UFRRJ VIN007/13(PAB)	20,08
UFRRJ VIN004/01(AUT)	19,53
UFRRJ VIN004/03(AUT)	18,91
UFRRJ VIN056/48(AUT)	18,89
UFRRJ VIN005/07(PAB)	18,53
UFRRJ VIN029/34(PAB)	18,01
UFRRJ VIN029/32(PAB)	17,88
UFRRJ VIN044/39(PAB)	17,85
UFRRJ VIN013/22(PAB)	17,68
Média da população (79 plantas)	14,04
Desvio padrão	3,57

3.2. Detecção qualitativa dos alcaloides por meio do reagente de Dragendorff

Na reação via reagente de Dragendorff, dos 79 genótipos analisados, 76 (96,20%) foram positivos para a presença de alcaloides, por exibir a formação de precipitado vermelho/alaranjado (Figura 9A). Ao passo que, apenas UFRRJ VIN007/14(PAB), UFRRJ VIN013/21(PAB) e UFRRJ VIN050/41(PAB) não apresentaram o referido precipitado e, portanto, foram negativos para a presença de alcaloides (Figuras 9B, 9C e 9D). Vale ressaltar

que o genótipo UFRRJ VIN007/14(PAB) esteve entre os genótipos superiores para a produção de biomassa de folhas secas (BFO_s) (Tabela 7). Dentre os 15 genótipos superiores para BFO_s, o UFRRJ VIN007/14(PAB) foi descartado das etapas de extração e quantificação do teor dos alcaloides por resultar negativo na detecção qualitativa de alcaloides (Figura 9B).

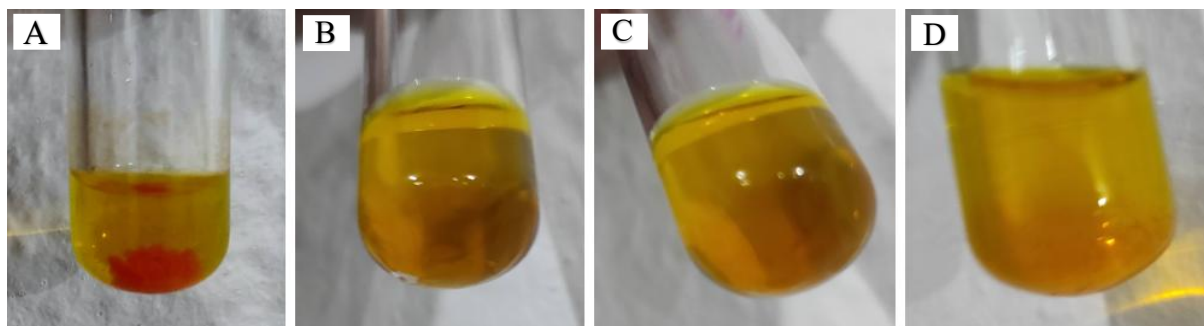


Figura 9. Detecção qualitativa dos alcaloides em extratos de folhas de *C. roseus* através do reagente de Dragendorff. A) Formação de precipitado alaranjado, indicando a presença de alcaloides no genótipo UFRRJ VIN004/02(AUT). Não formação de precipitado alaranjado nos genótipos UFRRJ VIN007/14(PAB) (B), UFRRJ VIN013/21(PAB) (C) e UFRRJ VIN050/41(PAB) (D) e, portanto, foram negativos para a presença de alcaloides.

3.3. Análise quantitativa dos alcaloides através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detecção de Arranjo de Fotodiodos (HPLC-DAD)

3.3.1. Curvas de calibração dos padrões dos alcaloides catarantina (CAT), vindolina (VDL) e vimblastina (VBL)

As equações e significâncias de regressão linear, os valores do coeficiente de determinação (R^2) e os coeficientes de variação (CV) para os padrões de CAT, VDL e VBL são apresentados na Tabela 8. Observou-se excelente linearidade ($R^2 > 0,999$ - Tabela 8) de regressão significativa nas faixas de concentrações testadas (1,0 - 240 $\mu\text{g/mL}$ para CAT, VDL e 0,5 - 120 $\mu\text{g/mL}$ para VBL) a 280 nm. Nas equações, x representa a concentração do alcaloide ($\mu\text{g/mL}$) e y representa a área de integração (μAbs).

Tabela 8. Faixa de concentrações testadas, limite de quantificação (LQ), equações de regressão linear e suas significâncias (p), coeficientes de determinação (R^2) e coeficientes de variação (CV) do método para os padrões dos alcaloides catarantina (CAT), vindolina (VDL) e vimblastina (VBL).

Padrões	Faixa de Trabalho ($\mu\text{g/mL}$)	LQ ($\mu\text{g/mL}$)	Equações de regressão linear	p	R^2	CV (%)
CAT	1,0 - 240	1,0	$y = 3.413.x - 4.450$	1,06E-12	0,9998	$\leq 6,6$
VDL	1,0 - 240	1,0	$y = 9.820.x - 17.839$	1,64E-12	0,9998	$\leq 8,0$
VBL	0,5 - 120	0,5	$y = 6.812.x - 15.944$	4,85E-08	0,9998	$\leq 5,7$

Os coeficientes de variação das réplicas de injeção foram $\leq 6,6$ e $\leq 8,0\%$ para os padrões dos alcaloides CAT e VDL, respectivamente. Para a VBL, o coeficiente de variação das réplicas de injeção foram $\leq 5,7\%$ (Tabela 8). Esses resultados indicam a boa precisão do método e estabelecendo o valor de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ como limite de quantificação (LQ), mínimo da faixa de trabalho, para a CAT e VDL, e de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ como LQ para a VBL (Tabela 8).

3.3.2. Quantificação do teor e cálculo da produção dos alcaloides catarantina (CAT), vindolina (VDL) e vimblastina (VBL) por genótipo

Em HPLC-DAD, os genótipos superiores (Tabela 7) foram submetidos à detecção dos alcaloides diméricos VBL e VCR, e seus precursores monoméricos, CAT e VDL. Os alcaloides diméricos VBL e VCR são derivados da condensação dos alcaloides monoméricos CAT e VDL (SERTEL *et al.*, 2011; ZHU *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2015; MALL *et al.*, 2019; GUPTA *et al.*, 2020). A CAT, VDL e VBL apresentaram a mesma ordem de eluição observada no trabalho de Naaranlahti *et al.* (1987). A VBL foi detectada em 13 das 14 plantas analisadas (Figura 10, excetuando o genótipo UFRRJ VIN029/32(PAB)). Já CAT e VDL estiveram presentes em todas (Figuras 10A-O).

A vincristina (VCR) não foi detectada em nenhuma das plantas aqui estudadas. Pan *et al.* (2016) não observaram a presença de VCR nas folhas, flores, caule e raiz em plantas de vinca aplicando o método HPLC-DAD. Identicamente, Singh *et al.* (2000) não identificaram VCR em três dos dez genótipos de *C. roseus* analisados com o método HPLC-DAD. Digvijay *et al.* (2004) não constataram VCR nas folhas do genótipo Cr-5 utilizando o HPLC-DAD e foram observados baixos teores de VCR nos outros quatro genótipos (Cr-1, Cr-2, Cr-3 e Cr-4). Gupta *et al.* (2005) verificaram baixos teores de VCR em dez acessos de vinca usando o método HPLC-DAD. Portanto, é possível inferir que existe uma certa dificuldade na seleção de plantas de vinca visando a VCR, devido à sua baixa concentração ou ausência nas plantas de *C. roseus*.

A maior concentração de VBL nos genótipos superiores para BFO_s foi de 0,77 mg/g de BFO_s (Tabela 9). Este valor pode ser considerado alto quando extraído em folhas de plantas desenvolvendo no campo (CHU *et al.*, 1997; ASLAM *et al.*, 2010; BASKARAN *et al.*, 2013; PAN *et al.*, 2016). Pan *et al.* (2016) relataram ter encontrado teor de 0,05 mg/g de VBL em folhas de *C. roseus*. Já Aslam *et al.* (2010) verificaram teores entre 2,10 e 10,90 µg/g (0,0021 e 0,0109 mg/g, respectivamente). Enquanto Chu *et al.* (1997) observaram concentrações entre 2,4 e 9,4 µg/g (0,0024 e 0,0094 mg/g, respectivamente) de VBL. Baskaran *et al.* (2013) relataram rendimentos de VBL de 0,0026% (0,0452 mg/g) para a cultivar Dhawal, e de 0,004% para os mutantes *necrotic leaf* (0,0400 mg/g) e *nerium leaf* (0,0322 mg/g) de *C. roseus*. Assim como no presente trabalho, os pesquisadores supracitados extraíram os alcaloides em biomassa de folhas secas e quantificaram a VBL também em HPLC-DAD.

Teores de VBL semelhantes aos encontrados no presente trabalho (Tabela 9) foram relatados por Guo *et al.* (2013) ($0,81 \pm 0,006$ mg/g de peso seco) em cultivo *in vitro* de células em suspensão após tratamento com elicitores regulatórios, inibidores de lochnericina ciclooxygenase (LCO) e dois precursores metabólicos. Kumar *et al.* (2018) observaram teores bastante elevados de vimblastina após analisar 39 genótipos de *C. roseus* em LC-MS (Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas). Neste estudo, o genótipo CR4R exibiu $1,638 \pm 0,302$ mg/g de extrato seco.

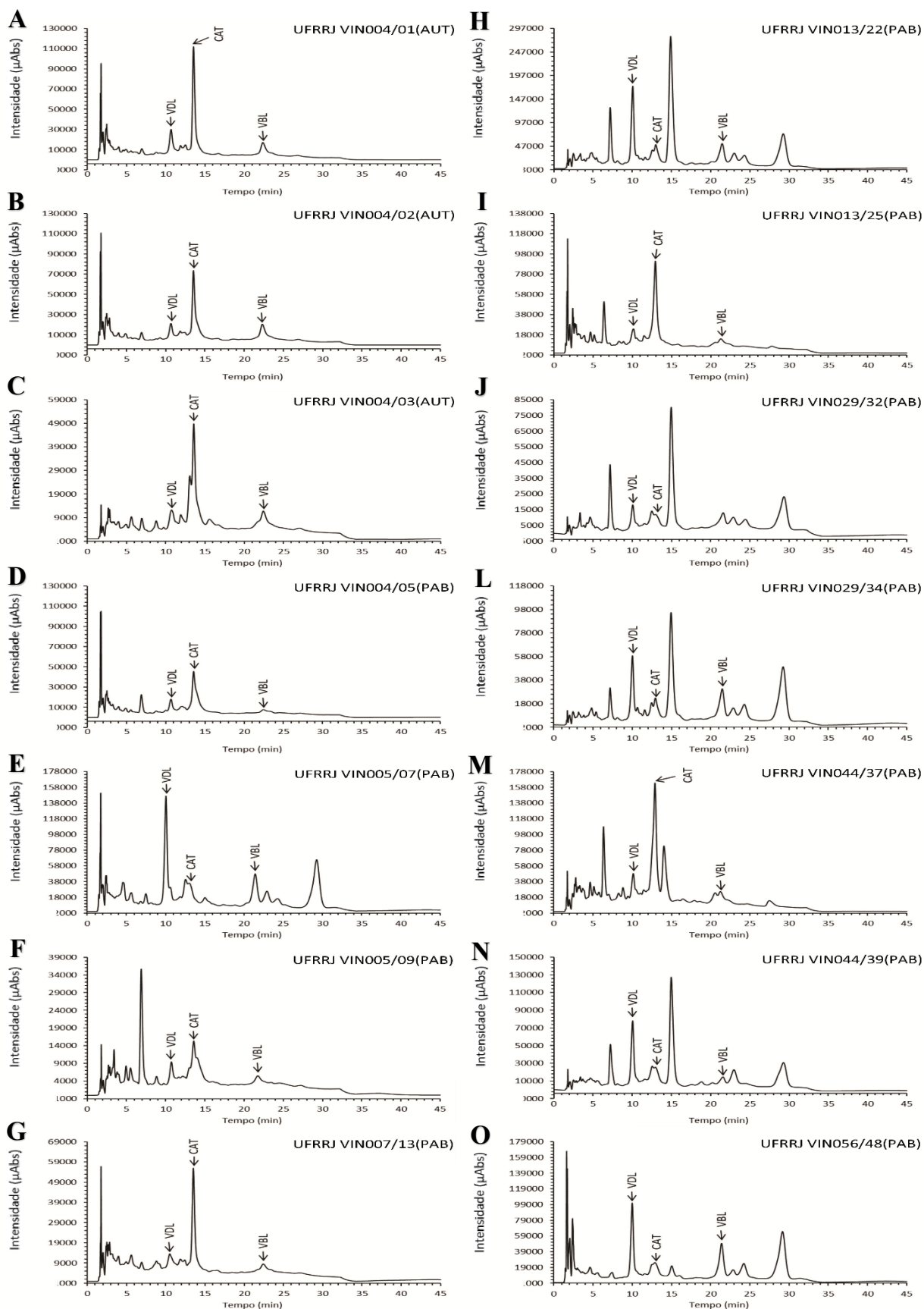


Figura 10. Cromatogramas normalizados em HPLC-DAD. Picos com mesma retenção e espectro dos alcaloides vindolina (VDL), catarantina (CAT) e vimblastina (VBL) em 14 genótipos de *C. roseus*.

Na presente pesquisa, três dos 14 genótipos analisados apresentaram teores de VBL superiores à média ($0,25 \pm 0,26$ mg/g de BFO_s - Tabela 9), a saber: UFRRJ VIN013/22(PAB) ($0,77$ mg/g de BFO_s), UFRRJ VIN005/007(PAB) ($0,69$ mg/g de BFO_s) e UFRRJ VIN056/48 (PAB) ($0,58$ mg/g de BFO_s) (Tabela 9). Os mesmos genótipos se destacaram para produção de VBL por planta. Estima-se que uma planta do genótipo UFRRJ VIN013/22 (PAB) tenha potencial para produzir $13,61$ mg de VBL em uma só colheita. Enquanto os genótipos UFRRJ VIN005/007(PAB) e o UFRRJ VIN056/48(PAB) apresentam potencial para produzir $12,79$ e $10,96$ mg de VBL por planta, respectivamente (Tabela 9).

De acordo com Aslam *et al.* (2010), a produção de VBL em uma planta é considerada muito baixa. Segundo estes autores, a diferenciação e o desenvolvimento dos tecidos da planta são os fatores centrais que regulam a biossíntese de VBL. Uma hipótese para os reduzidos níveis de VCR e VBL é a separação espacial dos locais biossintéticos. Os precursores biossintéticos (CAT e VDL) são produzidos em regiões distintas nas folhas. A CAT se acumula inteiramente nos exsudatos de cera na superfície da folha, enquanto a VDL é produzida dentro de células especializadas da folha chamadas de idioblastos e canais laticíferos (YU & DE LUCA, 2013). Segundo Roepke *et al.* (2010), esta separação espacial dos alcaloides monoméricos CAT e VDL fornece uma explicação para os baixos teores dos alcaloides diméricos VCR e VBL em *C. roseus*.

Apesar da complexidade da biossíntese de VBL, nos genótipos UFRRJ VIN013/22(PAB), UFRRJ VIN005/007(PAB) e UFRRJ VIN056/48(PAB) foram observadas produções bastantes satisfatórias em plantas cultivadas em vasos (Tabela 9). Schlaepfer e Mendoza (2010) encorajaram a produção de VCR e VBL em plantas cultivadas no campo.

As concentrações de CAT e VDL variaram entre $1,05$ e $0,14$ mg/g de BFO_s, e $0,86$ a $0,07$ mg/g de BFO_s, respectivamente (Tabela 9). Essas estimativas foram superiores a maioria das referências disponíveis na literatura (VERMA *et al.*, 2008; MU *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2014; JEONG & LIM, 2018). Exceção apenas para os relatos de Gupta *et al.* (2020) e Chung *et al.* (2011). Estes autores relataram, respectivamente, teores de VDL da ordem de $5,47$ e $2,08$ mg/g. Chung *et al.* (2011) estimaram o teor de catarantina em $2,90$ mg/g de peso seco foliar na cultivar *Pacifica Peach*, cultivada em vasos. Portanto, na literatura existem concentrações de CAT e VDL muito acima dos nossos resultados (Tabela 9).

De forma semelhante à VBL, os genótipos com maiores teores de CAT em relação à média ($0,52 \pm 0,27$ mg/g de BFO_s - Tabela 9) foram os mesmos de maior produção dessa substância por planta. São eles: UFRRJ VIN044/37(PAB) ($1,05$ mg/g de BFO_s e $21,16$ mg/planta), UFRRJ VIN013/22(PAB) ($0,97$ mg/g de BFO_s e $17,15$ mg/planta) e UFRRJ VIN007/13(PAB) ($0,89$ mg/g de BFO_s e $17,87$ mg/planta) (Tabela 9). Já para a VND, em relação à média do teor da substância ($0,33 \pm 0,24$ mg/g de BFO_s - Tabela 9) e produção por planta ($6,37 \pm 4,23$ mg) dois genótipos e três genótipos, respectivamente, se destacaram. Para concentração de VDL o destaque foi o genótipo UFRRJ VIN013/22(PAB) ($0,86$ mg/g de BFO_s) e UFRRJ VIN005/07(PAB) ($0,61$ mg/g de BFO_s). Já para a produção de VDL, destacaram-se os mesmos dois genótipos citados anteriormente, com $15,20$ e $11,30$ mg/planta, respectivamente, e mais o UFRRJ VIN044/37 (PAB) ($11,28$ mg/planta).

Tabela 9. Quantificação do teor e produção dos alcaloides catarantina (CAT), vindolina (VDL) e vimblastina (VBL) em extratos alcaloídicos de 14 genótipos de vinca (*C. roseus*) analisados em HPLC-DAD.

Genótipos	CAT	VDL	VBL	BFO _s	CAT/planta	VDL/planta	VBL/planta
UFRRJ VIN004/01(AUT)	0,39	0,33	0,16	19,53	7,62	6,44	3,12
UFRRJ VIN004/02(AUT)	0,41	0,21	0,22	20,30	8,32	4,26	4,47
UFRRJ VIN004/03(AUT)	0,14	0,13	0,10	18,91	2,65	2,46	1,89
UFRRJ VIN004/05(PAB)	0,55	0,19	0,03	22,40	12,32	4,26	0,67
UFRRJ VIN005/07(PAB)	0,38	0,61	0,69	18,53	7,04	11,30	12,79
UFRRJ VIN005/09(PAB)	0,36	0,11	0,02	22,30	8,03	2,45	0,45
UFRRJ VIN007/13(PAB)	0,89	0,07	0,04	20,08	17,87	1,41	0,80
UFRRJ VIN013/22(PAB)	0,97	0,86	0,77	17,68	17,15	15,20	13,61
UFRRJ VIN013/25(PAB)	0,61	0,22	0,05	21,34	13,02	4,69	1,07
UFRRJ VIN029/32(PAB)	0,18	0,11	0,00	17,88	3,22	1,97	0,00
UFRRJ VIN029/34(PAB)	0,44	0,30	0,39	18,01	7,92	5,40	7,02
UFRRJ VIN044/37(PAB)	1,05	0,56	0,20	20,15	21,16	11,28	4,03
UFRRJ VIN044/39(PAB)	0,43	0,42	0,23	17,85	7,68	7,50	4,11
UFRRJ VIN056/48(AUT)	0,49	0,56	0,58	18,89	9,26	10,58	10,96
Média	0,52	0,33	0,25	19,56	10,23	6,37	4,64
Mínimo	0,14	0,07	0,00	17,68	2,65	1,41	0,00
Máximo	1,05	0,86	0,77	22,40	21,16	15,20	13,61
Amplitude	0,91	0,79	0,77	4,72	18,51	13,80	13,61
Desvio padrão	0,27	0,24	0,26	1,61	5,43	4,23	4,69
CV (%)	52,70%	70,61%	104,36%	8,21%	53,03%	66,42%	100,93%

Legenda: CAT - Catarantina expressa em miligrama por grama (mg/g) de BFO_s; VDL - Vindolina em miligrama por grama (mg/g) de BFO_s; VBL - Vimblastina em miligrama por grama (mg/g) de BFO_s; BFO_s - Produção de biomassa foliar seca em gramas (g); Produção de CAT/planta, VDL/planta e VBL/planta (mg), CV - coeficiente de variação em porcentagem (%).

Com base nos resultados obtidos, verifica-se que o genótipo UFRRJ VIN013/22(PAB) se destacou estatisticamente para as três substâncias analisadas (VBL, CAT e VDL). A relevância foi tanto para o teor quanto para a produção dessas substâncias (Tabela 9). Em relação aos mesmos quesitos, o genótipo UFRRJ VIN005/07 (PAB) também merece menção, porém, apenas para a VBL e VDL (Tabela 9). Em suma, os genótipos UFRRJ VIN013/22 (PAB) e UFRRJ VIN005/07 (PAB), citados anteriormente, merecem atenção especial quanto à produção de VBL em *C. roseus* (respectivamente, 13,61 e 12,79 mg/planta) (Tabela 9). O primeiro genótipo citado destaca-se também para a produção de VDL (15,20 mg/planta). Nesta pesquisa, o genótipo UFRRJ VIN044/37 (PAB) também foi destaque, porém, apenas para os precursores da VBL (CAT e VDL). Especialmente, em *C. roseus*, este genótipo destacou-se para a produção de CAT (21,16 mg/planta).

Em suma, é possível inferir que existem três genótipos promissores para o teor e produção de VBL. O genótipo UFRRJ VIN013/22 (PAB) merece destaque nesse quesito (Tabela 9). Por outro lado, os teores de CAT e VDL nas plantas não se mostraram promissores, visto que a literatura reporta a existência de genótipos com teores de CAT e VDL bem acima das 14 plantas de *C. roseus* aqui analisadas (Tabela 9).

3.4. Análise da diversidade genética via marcador de DNA do tipo ISSR

As plantas elencadas como superiores foram submetidas a análise de DNA via marcadores ISSR. O propósito foi garantir que a população a ser submetida à análise química disponha de alta diversidade genética. Em programas de melhoramento, a existência de uma alta diversidade genética é uma questão *sine qua non*, pois aumenta as chances de seleção de genótipos superiores. Além disso, possibilita a exploração da heterose em caso de hibridação entre genótipos.

Dos 58 *primers* do tipo ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) testados, 15 (Tabela 6) mostraram-se adequados para acessar a diversidade genética entre os 14 genótipos de *C. roseus*, uma vez que exibiram fragmentos com bom perfil de amplificação. Desta maneira, foram amplificadas 304 bandas ISSR. Dessas, 300 (98,69%) foram polimórficas e quatro (1,31%) monomórficas, com uma média de 20,27 fragmentos por *primer*.

O menor número de bandas foi encontrado no *primer* (GT)₆GG com seis bandas. Por outro lado, o maior número, no *primer* (GACA)₄ com 40 bandas, todas elas polimórficas (Figura 11). Amorim (2019) também observou o *primer* (GACA)₄ como o mais polimórfico em genótipos de vinca. Além de (GACA)₄, os *primers* (GTG)₃GC, (AG)₈C, (GATA)₂(GACA)₂, (CT)₈G, (GA)₆CC, (CT)₈TG, (AC)₈T, (TC)₈AGG, (AG)₈YT, G(CTA)₆ e (ATG)₆G exibiram 100% de polimorfismo. Este resultado demonstra a ótima performance dos *primers* ISSR na análise da diversidade genética. Enquanto (GAA)₆AA, (TG)₈A e (GT)₆GG exibiram, respectivamente, 94,12, 90,00 e 66,67% de polimorfismo.

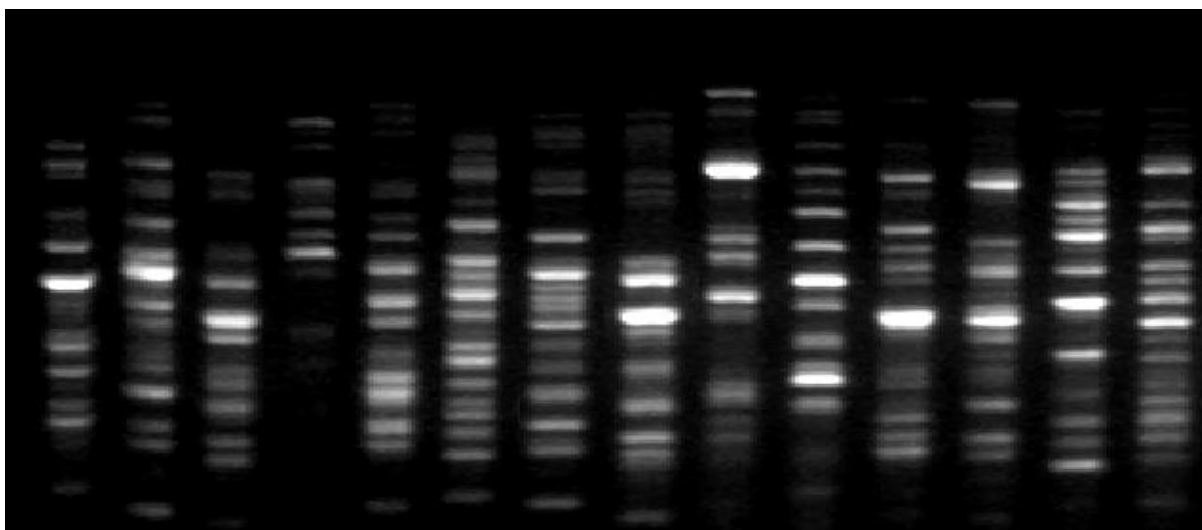


Figura 11. Padrão de amplificação pelo *primer* (GACA)₄ de ISSR em gel de agarose de 14 genótipos de *C. roseus*. Ordem dos genótipos no gel (da esquerda para a direita): UFRRJ VIN004/01(AUT), UFRRJ VIN004/02(AUT), UFRRJ VIN004/03(AUT), UFRRJ VIN004/05(PAB), UFRRJ VIN005/07(PAB), UFRRJ VIN005/09(PAB), UFRRJ VIN007/13(PAB), UFRRJ VIN013/22(PAB), UFRRJ VIN013/25(PAB), UFRRJ VIN029/32(PAB), UFRRJ VIN029/34(PAB), UFRRJ VIN044/37(PAB), UFRRJ VIN044/39(PAB) e UFRRJ VIN056/48(AUT).

Na análise de agrupamento, verificou-se que as matrizes fenética e cofenética apresentaram uma boa correspondência. O coeficiente de correlação cofenética entre as referidas matrizes foi estimado em 0,71, significativo a 1% de probabilidade pelo teste de Mantel (MANTEL, 1967). De acordo com Rohlf (1970), valores de correlação cofenética superiores a 0,70 indicam um bom ajuste entre as matrizes de distância e a matriz de agrupamento resultante.

A diversidade genética pode ser analisada pela verificação do número de grupos formados no dendrograma. Com base no algoritmo *kgs* (KELLEY *et al.*, 1996) foi observado a formação de quatro grupos estatisticamente distintos (Figura 12). Dos quatro grupos, apenas um grupo foi representado por apenas um genótipo, a saber: UFRRJ VIN004/01(AUT) (grupo I). O grupo III, o segundo menor, agrupou os seguintes genótipos: UFRRJ VIN044/39(PAB) e UFRRJ VIN056/48(AUT). O grupo IV, o maior grupo, foi formado por sete genótipos, o que representa metade (50%) das plantas analisadas. A formação de grupos muito grandes sugere, normalmente, *a priori*, que a diversidade genética pode ser baixa. O segundo maior (grupo II) agrupou quatro genótipos, isto é, UFRRJ VIN044/37(PAB), UFRRJ VIN013/25(PAB), UFRRJ VIN013/22(PAB) e UFRRJ VIN029/34(PAB).

A magnitude das distâncias genéticas no dendrograma são também de grande importância para verificação da diversidade. Com base no dendrograma (Figura 12), é possível observar que as medidas de dissimilaridades variaram de 0,65 a 0,83, o que leva à distância genética média estimada em 0,80. A máxima dissimilaridade (0,83) foi observada entre o genótipo UFRRJ VIN004/01(AUT), do grupo I, com os demais genótipos (Figura 12). A menor dissimilaridade ocorreu entre os genótipos UFRRJ VIN044/39(PAB) e UFRRJ VIN056/48(AUT), ambos do grupo III.

Há indícios de que a diversidade entre 14 genótipos de *C. roseus* seja alta, visto que a média das distâncias genéticas (0,80) foi próxima da unidade (1,00) e a menor distância genética (0,65) também foi elevada. Além da diversidade genética entre os grupos formados, também se

verificou diversidade intragrupos. A distância genética média dentro dos grupos II e IV foi de 0,76 e 0,79, respectivamente.

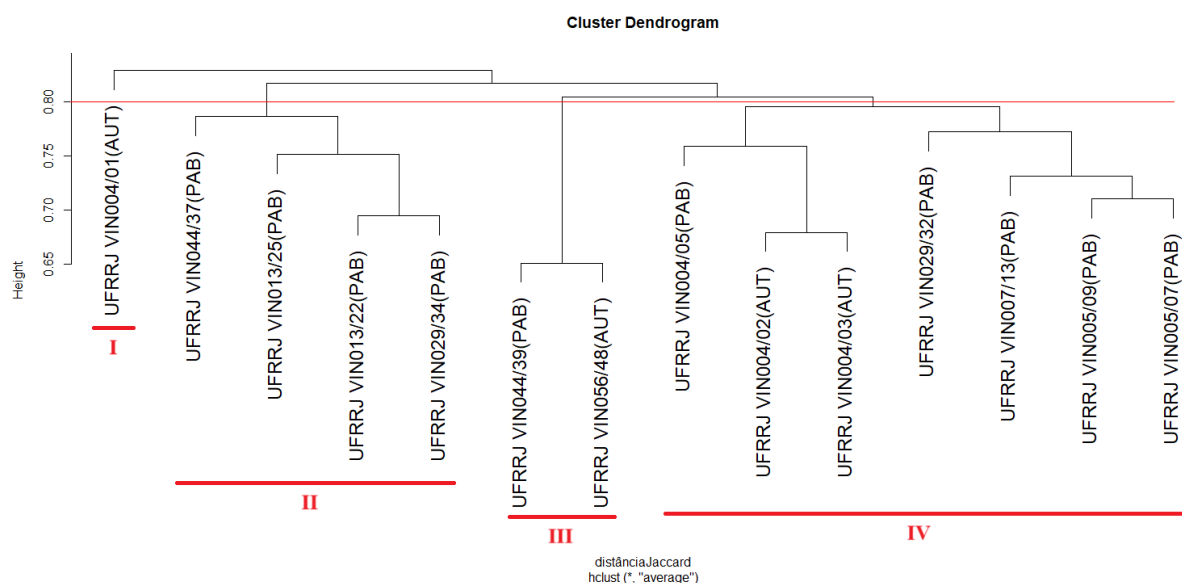


Figura 12. Dendrograma obtido a partir da dissimilaridade de Jaccard e método de agrupamento UPGMA entre 14 genótipos de *Catharanthus roseus* com desempenho superior para produção de biomassa de folhas secas (BFO_s).

No que tange à estimativa da diversidade genética foram estimados os índices de Shannon (H') e de Pielou (J) entre os genótipos elencados como superiores para produção de BFO_s (Tabela 7). De maneira geral, verificou-se elevada diversidade molecular, haja vista as estimativas de 5,66 e 0,96 obtidas via H' e J , respectivamente. Sabe-se que quanto maior o índice de Shannon, maior será a diversidade genética. Já o índice de Pielou varia de zero a 1,0, logo valores próximos a 1,0 indicam maior diversidade. Os referidos índices corroboram os resultados obtidos na análise de agrupamento UPGMA (Figura 12) e apontam para a existência de alta diversidade genética entre os genótipos analisados.

A literatura reporta a existência de alta diversidade genética em *C. roseus* (SHOKEEN *et al.*, 2007; SHAW *et al.*, 2009; QING *et al.*, 2011; LAL *et al.*, 2011; AMORIM *et al.*, 2023). Em trabalhos de melhoramento genético a existência de alta diversidade genética é fator primordial para o sucesso no processo da seleção de plantas e, portanto, para a continuidade de programas de melhoramento (ALLARD, 1960; CARENA, 2021; SALGOTRA & CHAUHAN, 2023; SANCHEZ *et al.*, 2023). Por outro lado, a escassez de diversidade implica em reduzidas chances de se obter progênies com boa recombinação alélica e alto vigor. Sem dúvida, a alta diversidade genética entre genótipos representa um recurso valioso para programas de melhoramento genético, já que aumenta as chances de seleção de genótipos superiores.

Com base no dendrograma (Figura 12) pode-se dizer, que os valores máximos da produção de VBL, VDL e CAT (Tabela 9) foram observados em genótipos do grupo II (Figura 12). A produção de VBL/planta também se destacou no genótipo UFRRJ VIN056/48(AUT) pertencente ao grupo III, e no grupo IV com a presença de UFRRJ VIN005/07(PAB). Mishra *et al.* (2001) observaram três grupos com bastante potencial para a produção de alcaloides em *C. roseus* ao estudar a diversidade genética através de caracteres morfoagronômicos. No grupo 'A', de modo geral, as plantas de vinca exibiram alto teor de vincristina e vimblastina nas folhas. O grupo 'B' caracterizou-se pela alta produção de biomassa de raízes e folhas e alta concentração de vimblastina nas folhas. O grupo 'D' apresentou alta produção de biomassa foliar com alto

teor de vincristina. Ainda segundo Mishra *et al.* (2001), certos acessos dos grupos 'A', 'B' e 'D' poderiam ser envolvidos em hibridações, visando a obtenção de progênies superiores para produção de alcaloides em *C. roseus*.

A diversidade genética também proporciona a exploração da heterose em caso de hibridações (cruzamentos) entre genótipos. Para isso, as hibridações devem ser feitas entre genótipos divergentes, mas que apresentem também desempenho superior em relação aos caracteres de interesse. Algumas hibridações podem ser recomendadas a partir dos resultados obtidos na Tabela 9 e Figura 12. Para a VBL, por exemplo, é recomendado o cruzamento entre os genótipos UFRRJ VIN013/22(PAB) e UFRRJ VIN005/07(PAB), pertencentes aos grupos II e IV, respectivamente, com distância genética de 0,82 (Figura 12). Também é aconselhável o cruzamento entre o genótipo UFRRJ VIN013/22(PAB) com o UFRRJ VIN056/48(AUT), os quais pertencem, respectivamente, aos grupos II e III, e com distância estimada entre eles de 0,79 (Figura 12). Outras combinações possíveis entre os genótipos UFRRJ VIN013/22(PAB), UFRRJ VIN005/07(PAB) e UFRRJ VIN056/48(AUT) também são recomendáveis. Todos os cruzamentos mencionados acima podem resultar em progênies superiores para produção de VBL em *C. roseus*.

Contudo, a seleção de genótipos para estudos relativos à estabilidade da produção de alcaloides nas plantas durante diferentes períodos de colheita se constitui, a princípio, na real prioridade do programa de melhoramento da vinca na UFRRJ. É provável que a produção de BFO_s e de alcaloides sejam caracteres quantitativos e de forte influência ambiental. No trabalho de Sharma *et al.* (2012), a herdabilidade para as variáveis relacionadas a produção de biomassa e de alcaloides em *C. roseus* foram de baixas a moderadas. Isto, possivelmente, ratifica a natureza poligênica da produção de biomassa e de alcaloides, pois as herdabilidades estimadas indicaram forte a moderada influência do ambiente sobre estas variáveis.

Em uma pesquisa conduzida na Índia, Mall *et al.* (2019) constataram que o teor de VCR e VBL foi maior durante o verão, especialmente em junho, quando a temperatura diurna atingiu 40°C. Nas estações de inverno e primavera, o teor desses alcaloides diminuiu. Isso evidencia o efeito do ambiente sobre os níveis dos alcaloides produzidos nas folhas de vinca. Alam *et al.* (2017) apontaram para uma forte influência do ambiente sobre a produção de alcaloides em vinca. De acordo com esses autores, a síntese de alcaloides na espécie ocorre sob alta complexidade, uma vez que os precursores de alcaloides utilizam diferentes vias bioquímicas.

Portanto, como o desempenho dos genótipos, possivelmente, pode se diferenciar ao longo do tempo, torna-se necessário maiores avaliações sobre a produção de BFO_s e de VBL nos genótipos aqui selecionados. De todo modo, a presente pesquisa identificou genótipos promissores para produção de VBL. Ademais, tais genótipos podem ser clonados e indicados para a produção de VBL em Seropédica-RJ.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que foi possível a identificação de genótipos promissores para o teor de VBL, uma vez que três dos 14 genótipos analisados se destacaram, estatisticamente, para teores de VBL nas folhas, a saber: UFRRJ VIN013/22(PAB) (0,77 mg/g de BFO_s), UFRRJ VIN005/07(PAB) (0,69 mg/g de BFO_s) e UFRRJ VIN056/48(PAB) (0,58 mg/g de BFO_s). Tais genótipos também se destacaram para produção de VBL por planta. Por outro lado, a seleção de genótipos para os teores de CAT e VDL não foi promissora.

A diversidade molecular foi alta entre os genótipos elencados como superiores para a produção de BFO_s, haja vista as distâncias genéticas obtidas corroboradas pelos índices de diversidade de Shannon e de Pielou.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAM, P.; SHARAF-ELDIN, M. Limited production of plant derived anticancer drugs vinblastine and vincristine. **Planta Medica**, v. 82, n. 5, 2016.
- ALAM, M. M.; NAEEM, M.; KHAN, M. M. A.; UDDIN, M. Vincristine and vinblastine anticancer Catharanthus alkaloids: pharmacological applications and strategies for yield improvement. In: NAEEM, M.; AFTAB, T.; KHAN, M. M. A. **Catharanthus roseus: Current Research and Future Prospects**. Springer, p. 277-307, 2017.
- ALLARD, R. W. **Principles of plant breeding**. London: J. Wiley, 1960. 485 p.
- AMORIM, G. T. dos S. Modo de reprodução preferencial em genótipos de vinca (*Catharanthus roseus* [L.] G. DON). **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, UFRRJ: Seropédica, RJ. 2019. 81 p.
- AMORIM, G. T. S.; PINTO, T. O.; SILVEIRA, T. O.; SOUZA, M. A. A.; MENEZES, B. R. da S.; DAMASCENO JUNIOR, P. C. *Catharanthus roseus* [L.] G. Don: allogamy as the main reproductive strategy and autogamy as a supposed reproductive guarantee mechanism. **South African Journal of Botany**, v. 154, p. 32-40, 2023.
- ASLAM, J.; MUJIB, A.; FATIMA, Z.; SHARMA, M. P. Variations in vinblastine production at different stages of somatic embryogenesis, embryo, and field-grown plantlets of *Catharanthus roseus* L. (G) Don, as revealed by HPLC. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 46, n. 4, p. 348-353, 2010.
- AZIZ, S.; SAHA, K.; SULTANA, N.; AHMED, S.; AL-MANSUR, A. Phytochemical and elemental screening on leaves and flowers of *Catharanthus roseus*: An important medicinal plant of Bangladesh. **International Journal of Chemical Sciences**. v. 12, p. 1328-1336, 2014.
- BASKARAN, K.; SRINIVAS, K. V. N. S.; KULKARNI, R. N. Two induced macro-mutants of periwinkle with enhanced contents of leaf and root alkaloids and their inheritance. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 701-703, 2013.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**. Disponível em: http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php. Acessado em: 15/07/2024.
- BRASIL, 2023. **Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**. Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/>. Acessado em: 19/09/2023.
- CARENA, M. J. Germplasm enhancement and cultivar development: the need for sustainable breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 21, p. e385621S4, 2021.
- CARVALHAES, S. F.; COSTA, D. L.; MAZZEI, J. L.; TADDEI, L. E. M.; D'AVILA, L. A. Alternative extraction of alkaloid anticarcinogens from Brazilian "vinca rosea" using Ion exchange chromatography. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 83-85, 2002.
- CHU, I. H.; BODNAR, J. A.; BOWMAN, R. N.; WHITE, E. L. Determination of vincristine and vinblastine in *Catharanthus roseus* plants by high performance liquid

chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of liquid chromatography & related technologies**, v. 20, n. 8, p. 1159-1174, 1997.

CHUNG, I. M.; KIM, E. H.; LI, M.; PEEBLES, C. A. M.; JUNG, W. S.; SONG, H. K.; AHN, J. K.; SAN, K. Y. Screening 64 cultivars *Catharanthus roseus* for the production of vindoline, catharanthine, and serpentine. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 4, p. 937-943, 2011.

DIAS, M. I.; SOUSA, M. J.; ALVES, R. C.; FERREIRA, I. C. F. R. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 82, p. 9-22, 2016.

DIGVIJAY, S.; SHASHI, P.-R.; SUCHI, S.; KUMAR, R. S.; RAGHAVENDRA, M.; SUSHIL, K. Simultaneous quantification of some pharmaceutical *Catharanthus roseus* leaf and root terpenoid indole alkaloids and their precursors in single runs by reversed-phase liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 87, n. 6, p. 1287-1296, 2004.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1998. 220 p.

FOX, E. R.; UNGURU, Y. Oncology drug shortages in the USA - business as usual. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 17, n. 3, p. 128-129, 2020.

GUIMARÃES, G.; CARDOSO, L.; OLIVEIRA, H.; SANTOS, C.; DUARTE, P.; SOTTOMAYOR, M. Cytogenetic characterization and genome size of the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **AoB Plants**, p. 1-10, 2012.

GUO, Z. G.; LIU, Y.; GONG, M. Z.; CHEN, W.; LI, W. Y. Regulation of vinblastine biosynthesis in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 112, n. 1, p. 43-54, 2013.

GUPTA, M. M.; SINGH, D. V.; TRIPATHI, A. K.; PANDEY, R.; VERMA, R. K.; SINGH, S.; SHASANY, A. K.; KHANUJA, S. P. S. Simultaneous determination of vincristine, vinblastine, catharanthine, and vindoline in leaves of *Catharanthus roseus* by high-performance liquid chromatography. **Journal of chromatographic science**, v. 43, n. 9, p. 450-453, 2005.

GUPTA, A. K.; SHUKLA, A. K.; SINGH, P.; MALL, M.; YADAV, S.; SHASANY, A. K.; SHANKER, K.; BASKARAN, K.; SUNDARESAN, V.; TALHA, M.; SRIVASTAVA, A.; GUPTA, S.; KHARE, P.; MANI, D. N.; SAMAD, A. CIM-Sushil: A high vindoline yielding variety of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, v. 42, n. 1-2, p. 51-63, 2020.

HEMMATI, N.; AZIZI, M.; SPINAB, R.; DUPIRE, F.; AROUEI, H.; SAEEDI, M.; LAURAINMATTAR, D. Accumulation of ajmalicine and vinblastine in cell cultures is enhanced by endophytic fungi of *Catharanthus roseus* cv. Icy Pink. **Industrial Crops and Products**, v. 158, 2020.

JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. **Bulletin de la Société vaudoise des sciences naturelles**. v. 44, p. 223-270, 1908.

JEONG, W. T.; LIM, H. B. A UPLC-ESI-Q-TOF method for rapid and reliable identification and quantification of major indole alkaloids in *Catharanthus roseus*. **Journal of Chromatography B**, v. 1080, p. 27-36, 2018.

KAUSHIK, S.; TOMAR, R. S.; GUPTA, M.; MISHRA, R. K. An overview of *Catharanthus roseus* and medicinal properties of their metabolites against important diseases. **European Academic Research**, v. 5, n. 2, 1237-1247, 2017.

KELLEY, L. A.; GARDNER, S. P.; SUTCLIFFE, M. J. An automated approach for clustering an ensemble of NMR derived protein structures into conformationally-related subfamilies. **Protein Engineering**, v. 9, p. 1063-1065, 1996.

KULKARNI, R. N.; BASKARAN, K.; JHANG, T. Breeding medicinal plant, periwinkle [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don]: a review. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, v. 14, n. 4, p. 283-302, 2016.

KUMAR, S.; SINGH, A.; KUMAR, B.; SINGH, B.; BAHADUR, L.; LAL, M. Simultaneous quantitative determination of bioactive terpene indole alkaloids in ethanolic extracts of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don by ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 151, p. 32-41, 2018.

KUMAR, S.; SINGH, B.; SINGH, R. *Catharanthus roseus* (L.) G. Don: A review of its ethnobotany, phytochemistry, ethnopharmacology and toxicities, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 284, p. 1-44, 2022.

LAL, S.; MISTRY, K. N.; SHAH, S. D.; THAKER, R.; VAIDYA, P. B. Genetic diversity assessment in nine cultivars of *Catharanthus roseus* from Central Gujarat (India) through RAPD, ISSR and SSR markers. **Journal of research in Biology**, v. 1, n. 8, p. 667-675, 2011.

LISCOMBE, D. K.; O'CONNOR, S. E. A virus-induced gene silencing approach to understanding alkaloid metabolism in *Catharanthus roseus*. **Phytochemistry**, v. 72, n.16, p. 1969-1977, 2011.

MALL, M.; VERMA, R. K.; GUPTA, M. M.; SHASANY, A.K.; KHANUJA, S. P. S.; SHUKLA, A. K. Influence of seasonal and ontogenic parameters on the pattern of key terpenoid indole alkaloids biosynthesized in the leaves of *Catharanthus roseus*. **South African Journal of Botany**, v. 123, p. 98–104, 2019.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, v. 27, n. 2, p. 209-202, 1967.

MISHRA, P.; UNİYAL, G. C.; SHARMA, S.; KUMAR S. Pattern of diversity for morphological and alkaloid yield related traits among the periwinkle *Catharanthus roseus* accessions collected from in and around Indian subcontinent. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 48, n. 3, p. 273-286, 2001.

MU, F.; YANG, L.; WANG, W.; LUO, M.; FU, Y.; GUO, X.; ZU, Y. Negative-pressure cavitation extraction of four main vinca alkaloids from *Catharanthus roseus* leaves. **Molecules**, v.17, n. 8, p. 8742-8752, 2012.

NAARANLAHTI, T.; NORDSTRÖM, M.; HUHTIKANGAS, A.; LOUNASMAA, M. Determination of *Catharanthus* alkaloids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 410, p. 488-493, 1987.

NAEEM, M.; AFTAB, T.; ANSARI, A. A.; IDREES, M.; ALI, A.; KHAN, M. M. A.; UDDIN, M.; VARSHNEY, L. Radiolytically degraded sodium alginate enhances plant growth, physiological activities and alkaloids production in *Catharanthus roseus* L. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 8, n. 4, p. 606-616, 2015.

NEJAT, N.; VALDIANI, A.; CAHILL, D.; TAN Yee-How; MAZIAH, M.; ABIRI R. Ornamental exterior versus therapeutic interior of Madagascar Periwinkle (*Catharanthus roseus*): The two faces of a versatile herb. **The Scientific World Journal**, v. 2015, p. 1-19, 2015.

PAN, Q.; SAIMANC, M. Z.; MUSTAFAB, N. R.; VERPOORTEB, R.; TANG, K. A simple and rapid HPLC-DAD method for simultaneously monitoring the accumulation of alkaloids and precursors in different parts and different developmental stages of *Catharanthus roseus* plants. **Journal of Chromatography B**, v. 1014, p. 10-16, 2016.

PHAM, H. N. T.; VUONG, Q. V.; BOWYER, M. C.; SCARLETT, C. J. Phytochemicals derived from *Catharanthus roseus* and their health benefits. **Technologies**, v. 8, n. 4, 80, 2020.

PIELOU, E. C. The measurement of diversity in different types of biological collections. **Journal of Theoretical Biology**, v. 13, p. 131–144, 1996.

QING, Y. D.; BINYE, P.; KUN, R. D. L. ISSR analysis of genetic relationships between forty varieties of *Catharanthus roseus*. **Journal of Shanghai Jiaotong University-Agricultural Science**, v. 27, p. 138–142, 2011.

R DEVELOPMENT CORE TEAM (2023). **R: a language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL. <https://www.R-project.org/>.

ROEPKE, J.; WU, M.; SALIM, V.; THAMM, A. M. K.; MURATA, J.; PLOSS, K.; BOLAND, W.; DE LUCA, V. Vinca drug components accumulate exclusively in leaf exudates of Madagascar periwinkle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 34, p. 15287–15292, 2010.

ROHLF, F. J. Adaptive Hierarchical clustering schemes. **Systematic Zoology**. v. 18, p. 58-82, 1970.

SAADEDIN, S. M. Genetic diversity and alkaloids profile evaluation of *Catharanthus roseus* L. based on RAPD molecular markers and RP-HPLC analysis. **Pakistan Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 541-551, 2018.

SALGOTRA, R. K.; CHAUHAN, B. S. Genetic diversity, conservation, and utilization of plant genetic resources. **Genes**, v. 14, n. 1, p. 1-20, 2023.

SANCHEZ, D.; SADOUN, S. B.; MARY-HUARD, T.; ALLIER, A.; MOREAU, L.; CHARCOSSET, A. Improving the use of plant genetic resources to sustain breeding programs' efficiency. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 120, n. 14, p. 1-9, 2023.

SCHLAEPFER, L.; MENDOZA, J. A. Medicinal plants as potential agents against cancer, relevance for Mexico. **Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas**, v. 41, n. 4, p. 18-27, 2010.

SERTEL, S.; FU, Y.; ZU, Y.; REBACZ, B.; KONKIMALLA, B.; PLINKERT, P. K.; KRAMER, A.; GERTSCH, J.; EFFERTH, T. Molecular docking and pharmacogenomics of vinca alkaloids and their monomeric precursors, vindoline and catharanthine. **Biochemical Pharmacology**, v. 81, n. 6, p. 723–735, 2011.

SHANNON, C. E. **A Mathematical Theory of Communication**. Reprinted with corrections from The Bell System Technical Journal, v. 27, pp. 379–423, 623–656, 1948.

SHARMA, V.; CHAUDHARY, S.; SRIVASTAVA, S.; PANDEY, R.; KUMAR, S. Characterization of variation and quantitative trait loci related to terpenoid indole alkaloid yield in a recombinant inbred line mapping population of *Catharanthus roseus*. **Journal of Genetics**, v. 91, p. 49-69, 2012.

SHAW, R. K.; ACHARYA, L.; MUKHERJEE, A. K. Assessment of genetic diversity in a highly valuable medicinal plant *Catharanthus roseus* using molecular markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 52-59, 2009.

SHOKEEN, B.; SETHY, N. K.; KUMAR, S.; BHATIA, S. Isolation and characterization of microsatellite markers for analysis of molecular variation in the medicinal plant Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). **Plant Science**, v. 172, n. 3, p. 441–451, 2007.

SHUKLA, R.; SINGH, A.; SINGH, K. K. Vincristine-based nanoformulations: a preclinical and clinical studies overview. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 14, n. 1, p. 1-16, 2014.

SINGH, D. V.; MAITHY, A.; VERMA, R. K.; GUPTA, M. M.; SUSHIL, K. Simultaneous determination of *Catharanthus* alkaloids using reversed phase high performance liquid chromatography. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 23, n. 4, p. 601-607, 2000.

SOKAL, R. R.; MICHENER, C. D. **A statistical method for evaluating systematic relationships**. **Science Bulletin**, v. 38, p. 1409–1438, 1958.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. James. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, v. 11, n. 2, p. 33-40, 1962.

ŠKUBNÍK, J.; PAVLÍČKOVÁ, V. S.; RUML, T.; RIMPELOVÁ, S. Vincristine in combination therapy of cancer: emerging trends in clinics. **Biology**, v. 10, n. 9, 849, 2021.

TYLER, V. E. Medicinal plant research: 1953-1987. **Planta Medica**, v. 54, n. 2, p. 95-100, 1988.

VAN DER HEIJDEN, R.; JACOBS, D. I.; SNOEIJER, W.; HALLARD, D.; VERPOORTE, R. The *Catharanthus* alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 5, p. 607–628, 2004.

VERMA, A.; LAAKSO, I.; SEPPÄNEN-LAAKSO, T.; HUHTIKANGAS, A.; RIEKKOLA, M. L. A simplified procedure for indole alkaloid extraction from *Catharanthus roseus* combined with a semi-synthetic production process for vinblastine. **Molecules**, v. 12, n. 7, p. 1307-1315, 2007.

VERMA, A.; HARTONEN, K.; RIEKKOLA, M. L. Optimisation of supercritical fluid extraction of indole alkaloids from *Catharanthus roseus* using experimental design methodology—comparison with other extraction techniques. **Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques**, v. 19, n. 1, p. 52-63, 2008.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2nd Edition, Springer-Verlag, Berlin. p. 369, 1996.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetics makers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

YU, F.; DE LUCA, V. ATP-binding cassette transporter controls leaf surface secretion of anticancer drug components in *Catharanthus roseus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 39, p. 15830-15835, 2013.

ZHANG, L.; QING-HUI, G. A. I.; YUAN-GANG, Z. U.; LEI, Y. A. N. G.; YU-LIANG, M. A.; YANG, L. I. U. Simultaneous quantitative determination of five alkaloids in *Catharanthus roseus* by HPLC-ESI-MS/MS. **Chinese journal of natural medicines**, v. 12, n. 10, p. 786-793, 2014.

ZHANG, J.; HANSEN, L. G.; GUDICH, O.; VIEHRIG, K.; LASSEN, L. M.; SCHRÜBBERS, L.; & KEASLING, J. D. A microbial supply chain for production of the anti-cancer drug vinblastine. **Nature**, v. 609, n. 7926, p. 341-347, 2022.

ZHU, X.; ZENG, X.; SUN, C.; CHEN, S. Biosynthetic pathway of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus*. **Frontiers of medicine**, v. 8, n. 3, p. 285-293, 2014.

ZHU, J.; WANG, M.; WEN, W.; YU, R. Biosynthesis and regulation of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus*. **Pharmacognosy reviews**, v. 9, n. 17, p. 24-28, 2015.

Capítulo III. Proposição de descritores mínimos para a vinca (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don).

RESUMO

A vinca (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) é fonte de alcaloides utilizados no tratamento convencional da leucemia e linfomas em humanos. Ademais, a espécie é amplamente utilizada como planta ornamental, devido à imensa diversidade em aspectos florais e de folha. Apesar de sua importância, não há uma lista de descritores mínimos para a vinca disponível no Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC), vinculado ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Diante do exposto, a presente pesquisa teve por objetivo propor uma lista de descritores mínimos, normatizada e testada para a cultura da vinca, cujo propósito é distinguir genótipos de *C. roseus*. Para isso, foram elencados 15 descritores mínimos, sendo nove qualitativos e seis de origem quantitativa. Os descritores abarcaram características relacionadas às folhas, flores e ramos. Os 15 descritores mínimos foram aplicados em 77 genótipos de vinca pertencentes à Coleção de Trabalho da UFRRJ. Foram adotados alguns critérios na escolha dos descritores adequados para a descrição mínima, a saber: ser de fácil aplicação, não gerar grandes variações do descritor dentro do mesmo genótipo e não ser redundante. Após a coleta de dados, os descritores foram padronizados, conforme o *Bioversity International*. Os descritores de natureza quantitativa foram submetidos a testes de normalidade multivariada e a análise da multicolinearidade. Posteriormente, os descritores de natureza quantitativa foram transformados para descritores multicategóricos. Após a união da matriz de descritores de origem qualitativa e os de origem quantitativa, os dados foram submetidos a uma nova checagem da multicolinearidade e, em seguida, à análise de agrupamento. Utilizou-se a dissimilaridade multicategórica como método de distância, e o vizinho mais distante como método de agrupamento. O ajuste entre as matrizes de distância e de agrupamento foi baseado na correlação cofenética. Por fim, os 15 descritores mínimos elencados foram submetidos à análise da importância relativa das variáveis. Todas as matrizes testadas apresentaram distribuição normal multivariada e multicolinearidade fraca. A correlação cofenética foi estimada em 0,73. No dendrograma, a menor e maior distância genética foram estimadas em 0,13 e 1,00, respectivamente. A média das distâncias genéticas no dendrograma foi igual a 0,89. Foi possível observar no dendrograma que os 15 descritores mínimos possibilitaram a distinção de todos os genótipos analisados. Isto ocorreu até mesmo em genótipos mais relacionados geneticamente, ou seja, com a menor distância genética estimada entre eles (0,13). O descritor mínimo NRB_{qn} (número de ramos na base da planta), proposto de forma inédita, mostrou-se fundamental como um descritor útil para distinguir plantas de vinca menos divergentes. Os descritores mínimos com a maior importância relativa na distinguibilidade dos genótipos foram a cor de flor (CFLO_{ql}) (11,64%), cor da zona do olho irradiada (CZOI_{ql}) (10,00%) e cor da zona do olho ao redor do halo (CZOL_{ql}) (9,61%). Nesse sentido, as flores podem ser utilizadas para se confeccionar bons descritores mínimos para a vinca. Conclui-se, portanto, que os descritores mínimos distinguiram, de forma inequívoca, os 77 genótipos de vinca estudados.

Palavras-chave: alcaloides, estatística multivariada, melhoramento de plantas, planta ornamental.

Chapter III. Proposition of minor descriptors for periwinkle (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don).

ABSTRACT

Periwinkle (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) is a source of alkaloids used in the conventional treatment of leukemia and lymphomas in humans. Furthermore, the species is widely used as an ornamental plant due to its immense diversity in floral and leaf aspects. Despite its importance, there is no list of minimum descriptors for periwinkle available in the National Service for Plant Variety Protection (SNPC), linked to the Ministry of Agriculture, Cattle and Supplying (MAPA). In view of the above, the present study aimed to propose a standardized and tested list of minimum descriptors for the vinca crop, whose purpose is to distinguish genotypes of *C. roseus*. For this purpose, 15 minimum descriptors were listed, nine of which were qualitative and six of quantitative origin. The descriptors covered characteristics related to leaves, flowers and branches. The 15 minimum descriptors were applied to 77 periwinkle genotypes belonging to the UFRRJ Working Collection. Some criteria were adopted in choosing the appropriate descriptors for the minimum description, namely: being easy to apply, not generating large variations of the descriptor within the same genotype and not being redundant. After data collection, the descriptors were standardized, according to Bioversity International. The quantitative descriptors were subjected to multivariate normality tests and multicollinearity analysis. Subsequently, the quantitative descriptors were transformed into multicategorical descriptors. After combining the matrix of qualitative and quantitative descriptors, the data were subjected to a new multicollinearity check and then to cluster analysis. Multicategorical dissimilarity was used as the distance method, and the furthest neighbor as the clustering method. The adjustment between the distance and clustering matrices was based on cophenetic correlation. Finally, the 15 minimum descriptors listed were subjected to analysis of the relative importance of the variables. All matrices tested presented multivariate normal distribution and weak multicollinearity. The cophenetic correlation was estimated at 0.73. In the dendrogram, the smallest and largest genetic distances were estimated at 0.13 and 1.00, respectively. The average genetic distances in the dendrogram were 0.89. It was possible to observe in the dendrogram that the 15 minimum descriptors allowed the distinction of all the genotypes analyzed. This occurred even in genotypes that were more genetically related, that is, with the smallest estimated genetic distance between them (0.13). The minimum descriptor NRB_{qn} (number of branches at the base of the plant), proposed in an unprecedented way, proved to be fundamental as a useful descriptor to distinguish less divergent periwinkle plants. The minimum descriptors with the greatest relative importance in distinguishing the genotypes were flower color (CFLO_{ql}) (11.64%), color of the radiating eye zone (CZOI_{ql}) (10.00%) and color of the eye zone around the halo (CZOL_{ql}) (9.61%). In this sense, flowers can be used to create good minimum descriptors for periwinkle. It is concluded, therefore, that the minimum descriptors unequivocally distinguished the 77 periwinkle genotypes studied.

Keywords: alkaloids, multivariate statistics, plant breeding, ornamental plant.

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Catharanthus roseus* [L.] G. Don, popularmente conhecida como vinca, pertence à família Apocynaceae (MISHRA & VERMA, 2017), é diploide com $2n = 2x = 16$ cromossomos (GUIMARÃES *et al.*, 2012), apresenta flores hermafroditas e modo de reprodução preferencial alógamo (AMORIM *et al.*, 2023). Sua provável origem é a ilha de Madagascar (ALLORGE *et al.*, 2015). A espécie é perene e desenvolve-se até um metro de altura, com raízes que podem se estender até 70 cm de profundidade (NEJAT *et al.*, 2015).

A vinca é responsável pela produção de diversos alcaloides antineoplásicos, denominados de TIAs (*Terpenoid Indole Alkaloids*) (ZHU *et al.*, 2014). Além disso, a espécie chama atenção pela sua imensa diversidade quanto aos aspectos florais e de folha, por isso, no Brasil, é amplamente utilizada como planta ornamental, sendo cultivada em jardins ou diretamente em vasos. Atualmente, no Brasil, existem 127 cultivares de vinca registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (BRASIL, 2024), todas elas destinadas para fins ornamentais. Vale destacar que não há uma lista de descritores mínimos para a vinca disponível no Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC), vinculado ao MAPA. Cabe ao SNPC divulgar as espécies vegetais e os respectivos descritores mínimos necessários à abertura de pedidos de proteção de cultivares (SILVA, 2005).

As listas de descritores mínimos permitem distinguir o genótipo de interesse das demais cultivares já registradas. Porém, para a vinca, o que se verifica na literatura é a presença de listas de descritores totais (MISHRA *et al.*, 2001; KUMAR *et al.*, 2007; FLASCHENRIEM, 2016; SAMIYARSIH *et al.*, 2019; PAULA *et al.*, 2021; SOARES *et al.*, 2024). Um descritor é definido como um atributo, ou característica, passível de ser mensurada, que pode ser observada entre os diferentes acessos de uma coleção de germoplasmas (BIOVERSITY INTERNATIONAL, 2007).

Normalmente, os descritores totais são aplicados na caracterização e avaliação de coleções de germoplasmas para tornar suas propriedades agronômicas conhecidas (SALOMÃO, 2010), bem como para conhecer e estimar a diversidade genética entre genótipos (OLIVEIRA *et al.*, 1999; MISHRA *et al.*, 2001; SUDRÉ *et al.*, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2010; REIS *et al.*, 2015; SILVEIRA *et al.*, 2022). Já os descritores mínimos possuem como objetivo principal distinguir genótipos dentro de uma mesma espécie. De acordo com o Bioversity International (2007), as listas de descritores mínimos devem conter um conjunto mínimo de descritores altamente discriminatórios. Segundo Irastorza (1983), a descrição de uma variedade deve contribuir para solucionar conflitos de identificação que possam surgir no registro e proteção de cultivares, nos campos de produção de sementes e na sua comercialização.

Segundo o Bioversity International (2007), os descritores precisam ser de aplicação fácil, a fim de não gerar dúvidas na definição das classes. Ademais, os descritores mínimos devem conter um “nome”, capaz de descrever o atributo de forma simples, compacta e não ambígua; um “método”, apresentado de forma objetiva e fácil para se mensurar; e um “estado”, capaz de expressar a característica do atributo observado, conforme o Bioversity International (2007). Sem dúvida, listas de descritores mínimos padronizadas permitem simplificar a sua aplicação prática no campo.

Também é indispensável que o descritor mínimo permaneça inalterável nas plantas, independentemente do local onde elas são cultivadas e caracterizadas. As características mais apropriadas para uso como descritores são aquelas altamente herdáveis, normalmente controladas por um ou poucos genes, que se expressam igualmente em todos os ambientes, ou seja, apresentam baixa interação genótipo x ambiente (BURLE & OLIVEIRA, 2010). Nesse

contexto, enquadram-se as variáveis qualitativas, que exibem alta herdabilidade, são pouco afetadas pelo ambiente e controladas por poucos genes (FALCONER & MACKAY, 1996). Porém, variáveis quantitativas também podem, em certa medida, serem utilizadas como um descritor mínimo, desde que sejam categorizadas e de natureza oligogênica.

Diante do exposto, a presente pesquisa teve por objetivo propor uma lista de descritores mínimos, normatizada e testada para a cultura da vinca, cujo propósito é distinguir genótipos de *C. roseus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Localização da pesquisa

A pesquisa foi conduzida na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) (22°45' S; 43° 41' W), localizada no município de Seropédica, RJ. Todas as análises estatísticas foram conduzidas no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular de Plantas (LCBMP), do Departamento de Agrotecnologias e Sustentabilidade (DATS), do Instituto de Agronomia, da UFRRJ.

2.2. Material vegetal e condições experimentais

A coleta de dados foi realizada em 77 genótipos, em vez de 79 genótipos, conforme observado no capítulo I. Duas plantas apresentaram problemas de ordem fitossanitária e, por isso, foram desconsideradas no presente capítulo. Cabe ressaltar que os 77 genótipos pertencem à Coleção de Trabalho de vinca do LCBMP e foram cultivados sob telado em vasos de 8 litros contendo substrato na proporção de 1:1:1 (areia, terra e esterco bovino curtido). Todas as 77 plantas foram dispostas com espaçamento de 0,80 x 0,80 m, sem repetições, não havendo delineamento estatístico. As temperaturas mínima e máxima médias foram, respectivamente, 23,85°C e 25,09°C, enquanto a umidade relativa média foi de 71,27% (BRASIL, 2023).

2.3. Desenvolvimento dos descritores e caracterização das plantas

A escolha dos descritores foi fundamentada no critério de selecionar características que sejam pouco influenciadas pelo ambiente. Além disso, os descritores mínimos utilizados foram baseados nos seguintes quesitos: (i) entendimento, por parte do usuário, da metodologia que norteia a aplicação do descritor; (ii) a sua eficiência em descrever a estrutura alvo, retornando valores mais homogêneos possíveis dentro da planta. Em suma, buscou-se a utilização de descritores simples e de fácil aplicação, que permitam uma interpretação inequívoca.

Todos os descritores mínimos elencados foram desenvolvidos, conforme o *Guidelines for the Development of Crop Descriptor Lists* (BIOVERSITY INTERNATIONAL, 2007). Cada descritor compreendeu três elementos essenciais para simplificar sua aplicação prática no campo, a saber: um “nome”, capaz descrever o atributo de forma simples, compacta e não ambígua; um “método”, apresentado de forma objetiva e fácil para se mensurar; e um “estado”, capaz de expressar a característica do atributo observado.

Foram elencados descritores quantitativos (qn) e qualitativos (ql). Esses descritores foram desenvolvidos com base nas listas propostas por Mishra *et al.* 2001, UPOV (2004), Kumar *et al.* (2007) e Flaschenriem (2016) para a espécie *C. roseus*. Os descritores aqui utilizados foram adaptados dos referidos autores (Tabela 10). Em suma, manteve-se basicamente apenas o “nome” dos descritores consultados nos trabalhos supracitados e não os

“estados”. Também foram idealizados descritores de forma inédita (Tabela 10). Todos os descritores elencados foram utilizados na caracterização das plantas no campo.

Foram definidos 15 descritores mínimos, sendo nove de natureza qualitativa, a saber: CRA_{ql} (cor dos ramos do caule), FFO_{ql} (formato das folhas), FAFO_{ql} (formato do ápice das folhas), CH_{ql} (cor de halo), CFLO_{ql} (cor de flor), PPET_{ql} (posição entre as pétalas), CZOL_{ql} (cor da zona do olho ao redor do halo), ZOLI_{ql} (zona do olho quanto a profusão ou irradiação), CZOI_{ql} (cor da zona do olho irradiada). Outros seis descritores foram de natureza quantitativa: NRB_{qn} (número de ramos na base da planta), CPE_{qn} (comprimento médio do pecíolo), CFO_{qn} (comprimento médio foliar), LFO_{qn} (largura média foliar), AIFC_{qn} (ângulo médio de inserção da folha no caule) e DFLO_{qn} (diâmetro médio da flor) (Tabela 10). Os descritores de origem quantitativa (qn) relativos ao comprimento, largura, diâmetro e ângulo foram mensurados via análise digital de imagem através do *software* ImageJ. Vale ressaltar que o comprimento, largura e diâmetro também podem ser mensurados através de um paquímetro ou fita métrica, e o ângulo, por meio de um transferidor.

Tabela 10. Lista de descritores mínimos desenvolvidos para a vinca. A lista inclui o tipo de variável, nome do descritor, metodologia, estado e a referência de cada descritor.

Descritores Quantitativos (qn):	Referências*
NRB _{qn} - Número de ramos na base da planta: avaliado a partir da contagem dos ramos que saem da base do caule da planta. NRB _{qn} pode assumir os seguintes estados: 1- Pouco ramos (< 5 ramos), 2 - Médio (5 a 8 ramos) e 3 - Muitos ramos (> 8 ramos).	Inédito.
CPE _{qn} - Comprimento médio do pecíolo: obtido pela média do comprimento do pecíolo (cm), avaliado em 10 folhas completamente desenvolvidas por planta. CPE _{qn} pode assumir os seguintes estados: 1 - Pecíolos pequenos (< 0,70 cm), 2 - Pecíolos médios (0,70 a 1,00 cm) e 3 - Pecíolos grandes (>1,00 cm).	Mishra <i>et al.</i> (2001), UPOV (2004) e Kumar <i>et al.</i> (2007).
CFO _{qn} - Comprimento médio foliar: obtido pela média do comprimento (em cm) de 10 folhas completamente desenvolvidas por planta. CFO _{qn} pode assumir os seguintes estados: 1 - Folhas pequenas (< 6,30 cm), 2 - Folhas médias (6,30 a 8,00 cm) e 3 - Folhas grandes (> 8,00 cm).	UPOV (2004), Kumar <i>et al.</i> (2007) e Flaschenriem (2016).
LFO _{qn} - Largura média foliar: obtida pela média da largura (cm) em 10 folhas completamente desenvolvidas por planta. LFO _{qn} pode assumir os seguintes estados: 1 - Folhas estreitas (< 3,00 cm), 2 - Folhas médias (3,00 a 3,60 cm) e 3 - Folhas largas (> 3,60 cm).	UPOV (2004), Kumar <i>et al.</i> (2007) e Flaschenriem (2016).
AIFC _{qn} - Ângulo médio de inserção da folha no caule: obtido pela média das medidas entre a inserção da folha (pecíolo) e o caule em 10 folhas completamente desenvolvidas por planta. A média do ângulo de inserção da folha no caule (em graus) é dada pela divisão do valor da soma de todos os ângulos aferidos pelo número total de folhas avaliadas. AIFC _{qn} pode assumir os seguintes estados: 1 - Ângulo fechado (< 47,50 graus), 2 - Ângulo médio (47,50 a 63,50 graus) e 3 - Ângulo aberto (> 63,50 graus).	Inédito.

DFLO _{qn} - Diâmetro médio da flor: obtido a partir da média da distância (em cm) entre duas pétalas opostas em 5 flores por planta. DFLO _{qn} pode assumir os seguintes estados: 1 - Flores pequenas (< 3,00 cm), 2 - Flores médias (3,00 a 3,90 cm) e 3 - Flores grandes (> 3,90 cm).	Mishra <i>et al.</i> (2001), UPOV (2004), Kumar <i>et al.</i> (2007) e Flaschenriem (2016).
Descritores Qualitativos (ql):	Referências*
CRA _{ql} - Cor dos ramos do caule: observado com base na cor que predomina nos ramos do caule. CRA _{ql} pode assumir os seguintes estados: 1 - Verde, 2 - Marrom e 3 - Vermelho.	Inédito.
FFO _{ql} - Formato das folhas: observado com base no formato da folha. FFO _{ql} pode assumir os seguintes estados: 1 - Linear, 2 - Oblonga e 3 - Elíptica.	Mishra <i>et al.</i> (2001), UPOV (2004) e Flaschenriem (2016).
FAFO _{ql} - Formato do ápice das folhas: observado através do formato que predomina no ápice das folhas. FAFO _{ql} pode assumir os seguintes estados: 1 - Ápice arredondado e 2 - Ápice levemente pontiagudo.	Inédito.
CH _{ql} - Cor de halo: avaliado com base na cor que predomina no halo das flores. CH _{ql} pode assumir os seguintes estados: 1 - Branca e 2 - Amarela.	UPOV (2004) e Flaschenriem (2016).
CFLO _{ql} - Cor de flor: observado com base na cor que predomina nas pétalas das flores. CFLO _{ql} pode assumir os seguintes estados: 1 - Branca, 2 - Salmão, 3 - Rosa clara, 4 - Rosa escura, 5 - Vermelha clara, 6 - Vermelha e 7 - Vermelha escura.	Mishra <i>et al.</i> (2001), UPOV (2004), Kumar <i>et al.</i> (2007) e Flaschenriem (2016).
PPET _{ql} - Posição entre as pétalas: observado com base na posição entre as pétalas das flores. PPET _{ql} deve assumir os seguintes estados: 1 - Livre (pétalas sem contato ou com somente um contato), 2 - Em Contato (no mínimo dois contatos sem sobreposição ou com no máximo dois contatos com sobreposição) e 3 - Sobreposta (no mínimo três contatos com sobreposição).	UPOV (2004).
CZOL _{ql} - Cor da zona do olho ao redor do halo: obtido com base na cor que predomina na zona do olho próxima ao halo das flores. CZOL _{ql} deve assumir os seguintes estados: 1 - Sem zona do olho aparente, 2 - Branca, 3 - Amarela, 4 - Vermelha, 5 - Rosa escura e 6 - Vermelha escura.	UPOV (2004).
ZOLI _{ql} - Zona do olho quanto a profusão ou irradiação: obtido através do formato da borda da zona do olho. ZOLI _{ql} pode assumir os seguintes estados: 1 - Ausente, 2 - Discreto e 3 - Irradiante ou difuso.	UPOV (2004).
CZOI _{ql} - Cor da zona do olho irradiada: obtido com base na cor que predomina na zona do olho irradiada distante do halo das flores. CZOI _{ql} deve assumir os seguintes estados: 0 - Ausente, 1 - Branca, 2 - Rosa Clara, 3 - Rosa Escura e 4 - Vermelha.	UPOV (2004).

*O “nome” dos 15 descritores mínimos foram adaptados das referências apresentadas nesta Tabela. Em suma, manteve-se basicamente apenas o “nome” dos descritores consultados na literatura e não os “estados”.

Como recurso auxiliar para o melhor entendimento dos descritores mínimos cor de halo (CH_{ql}), cor da zona do olho ao redor do halo ($CZOL_{ql}$), zona do olho quanto a profusão ou irradiação ($ZOLI_{ql}$) e cor da zona do olho irradiada ($CZOI_{ql}$) (Tabela 10) foi aplicado um filtro no *software* CorelDRAW Standard. A aplicação deste filtro teve apenas o objetivo de permitir uma compreensão precisa da estrutura da flor a ser observada nos quatro descritores mínimos supracitados (Figura 13). Além disso, no Anexo 3 foram apresentadas imagens de todos os descritores qualitativos (ql) (Tabela 10). De acordo com Barbieri (2013), desenhos ou imagens podem auxiliar a compreensão dos estados do descritor em vários casos, evitando confusões e dúvidas que possam surgir.

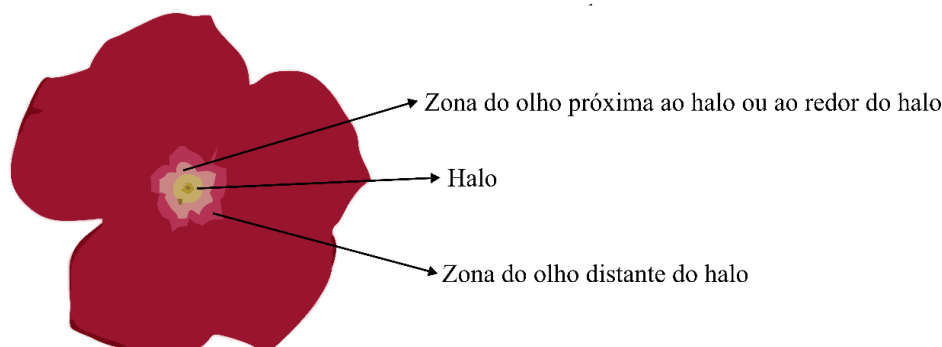


Figura 13. Imagem indicando a estrutura da flor a ser observada nos descritores mínimos CH_{ql} (cor de halo), $CZOL_{ql}$ (cor da zona do olho ao redor do halo), $ZOLI_{ql}$ (zona do olho quanto a profusão ou irradiação) e $CZOI_{ql}$ (cor da zona do olho irradiada) após aplicação de filtro no *software* CorelDRAW Standard.

2.3.1. Verificação da normalidade dos dados e padronização dos descritores quantitativos

Os dados foram submetidos a testes de normalidade multivariada. Para isso, foi aplicado o teste de Assimetria e Curtose (MARDIA, 1970). Posteriormente, os descritores quantitativos foram padronizados a partir do seguinte estimador: $Z_{ij} = \frac{X_{ij}}{S_j}$. Onde: X_{ij} = valor observado obtido pelo descritor j do genótipo i; S_j = desvio-padrão do correspondente descritor j e Z_{ij} = média reduzida, de variância unitária.

2.3.2. Análise de multicolinearidade na matriz de dados quantitativos

Todos os descritores quantitativos foram submetidos ao teste de multicolinearidade, conforme Montgomery e Peck (1981). Segundo estes autores, o grau de multicolinearidade é estabelecido através do número de condição (NC), ou seja, entre a razão do maior e menor autovalor (λ_{max} e λ_{min}) da matriz de correlação. De acordo com este diagnóstico, quando o NC for menor ou igual a 100, a multicolinearidade é classificada como fraca, quando se encontra entre 100 e 1000, seu grau é de moderado a forte; e quando maior ou igual a 1000, sua classificação é severa.

2.3.3. Categorização de descritores quantitativos em descritores qualitativos

Todos os descritores quantitativos elencados para análise, seja de classificação discreta ou contínua, foram categorizados em descritores qualitativos. Para a definição do limite do

número de classes (k), utilizou-se, inicialmente, a Regra de Sturges (STURGES, 1926), onde: $k = 1 + \log_2(n)$, sendo “ n ” o número de amostras. Posteriormente, foi utilizado a experiência do pesquisador para o ajuste final do número de classes, sempre respeitando o limite máximo determinado pela regra de Sturges. Para a definição dos intervalos de classes (amplitude das classes), foi utilizado o seguinte estimador: $AC = (V_{max} - V_{min})/k$, onde: AC = amplitude das classes, V_{max} = valor máximo da variável, V_{min} = valor mínimo da variável e k = número de classes.

Os descritores quantitativos transformados para descritores qualitativos tiveram o elemento “estado” adicionado. Em seguida, houve o espelhamento da matriz quantitativa para a qualitativa, ou seja, cada valor quantitativo correspondeu a um outro valor dentro de uma classe no descritor qualitativo também correspondente. Por fim, os descritores transformados em qualitativos foram anexados a mesma matriz dos descritores cuja origem já tinha sido qualitativa. Esta matriz final, completa, foi submetida a uma nova checagem da multicolinearidade, conforme Montgomery e Peck (1981), e posteriormente, submetida à análise de agrupamento.

2.4. Análise de agrupamento

Todos os descritores mínimos elencados foram submetidos à análise da dissimilaridade multicategórica (CRUZ & CARNEIRO, 2003) para obtenção da matriz fenética de distância, conforme o estimador: $d_{ii'} = D/C + D$. Onde: $d_{ii'}$ = dissimilaridade considerando um conjunto de variáveis multicategóricas; D = concordância de categoria; C = discordância de categoria. Em seguida, a matriz fenética foi submetida à análise de agrupamento utilizando o método do vizinho mais distante (SORENSEN, 1948) para obtenção da matriz cofenética. Por fim, foi apresentado um dendrograma anexado a um *heatmap* contendo as classes de descritores mínimos as quais cada genótipo pertence. O ajuste entre as matrizes fenética e cofenética foi estimado através da correlação cofenética (SOKAL & ROHLF, 1962), utilizando o teste de Mantel com 1000 permutações (MANTEL, 1967).

2.5. Percentual de ocorrência das classes dos descritores mínimos

O percentual de ocorrência das classes dos descritores mínimos no germoplasma analisado foi apresentado em histogramas.

2.6. Importância relativa dos descritores mínimos

A matriz contendo todos os descritores mínimos foi submetida à análise da importância relativa das variáveis, conforme Singh (1981).

Todas as análises estatísticas contidas no Material e Métodos foram realizadas no Programa R, versão 4.2.3 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2023).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proposição de descritores mínimos surge da necessidade de distinguir genótipos de *C. roseus*. Para isso, foram elencados e analisados ao todo 15 descritores para compor a lista de descritores mínimos. Seis deles foram relacionados a características das folhas (CPE_{qn}, CFO_{qn}, LFO_{qn}, AIFC_{qn}, FFO_{ql}, FAFO_{ql}), dois relativos aos ramos (NRB_{qn}, CRA_{ql}), e outros sete relacionados às flores (DFLO_{qn}, CH_{ql}, CFLO_{ql}, PPET_{ql}, CZOL_{ql}, ZOLI_{ql}, CZOI_{ql}) (Tabela 10).

Após a idealização, escolha e aplicação dos descritores para a caracterização das plantas, as variáveis quantitativas (NRB_{qn}, CPE_{qn}, CFO_{qn}, LFO_{qn}, AIFC_{qn} e DFLO_{qn} - Tabela 10) foram

submetidas ao teste de normalidade multivariado para verificação da assimetria e curtose, conforme Mardia (1970). Com base no referido teste, os dados seguiram uma distribuição normal multivariada. O mesmo conjunto de dados apresentou multicolinearidade fraca, com número de condição (NC) estimado em 4,20. Segundo Montgomery e Pack (1981), quando o NC for menor que 100, a multicolinearidade é classificada como fraca. Para Carvalho *et al.* (1999), somente o grau fraco de multicolinearidade não constitui problema sério à análise.

Posteriormente, realizou-se a transcrição dos descritores quantitativos para variáveis qualitativas multicategóricas. Para cada descritor quantitativo (qn) foram utilizados três intervalos de classes (Tabela 10). Após a confecção de uma só matriz de dados qualitativa contendo as variáveis com origem quantitativa (NRB_{qn}, CPE_{qn}, CFO_{qn}, LFO_{qn}, AIFC_{qn} e DFLO_{qn}) e qualitativa (CRA_{ql}, FFO_{ql}, FAFO_{ql}, CH_{ql}, CFLO_{ql}, PPET_{ql}, CZOL_{ql}, ZOLI_{ql} e CZOI_{ql}), procedeu-se novamente uma checagem da multicolinearidade, a qual foi classificada como fraca (NC = 40,55). Logo, os descritores mínimos aqui propostos não foram redundantes e, assim, não constituem implicações sérias para a análise.

De posse da matriz de dados constituída por 15 descritores mínimos obtidos a partir da caracterização de 77 genótipos de vinca procedeu-se a análise de agrupamento (Figura 14). O coeficiente de correlação cofenética, entre as matrizes fenética e cofenética, foi igual a 0,73. Segundo Rohlf (1970), valores de correlação cofenética superiores a 0,70 indicam um bom ajuste entre as referidas matrizes. No dendrograma, a menor e maior distância genética foram estimadas em 0,13 e 1,00, respectivamente. A média das distâncias genéticas foi igual a 0,89.

Os resultados obtidos no dendrograma mostraram que os descritores mínimos propostos foram eficientes em distinguir as 77 plantas de vinca analisadas, uma vez que não foi observada distância genética igual a zero (Figura 14). A eficiência destes descritores foi tal que eles distinguiram até mesmo os genótipos UFRRJ VIN004/01(AUT) e UFRRJ VIN004/02(AUT), UFRRJ VIN056/47(AUT) e UFRRJ VIN056/48(AUT), que são oriundos de sementes de autofecundação (AUT), com distâncias genéticas de 0,25 e 0,31, respectivamente (Figura 14).

Rodríguez-Alfonso *et al.* (2020) propuseram uma lista com 14 descritores mínimos para a cultura do abacaxi. Neste trabalho, todas as 48 cultivares de abacaxi foram separadas no dendrograma e não houve nenhuma distância genética igual a zero. Na União Internacional para a Proteção das Obtenções Vegetais (UPOV, 2024), são apresentados os descritores mínimos para os testes de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE) de 340 espécies vegetais. A vinca está entre as espécies contempladas (UPOV, 2004). Contudo, em UPOV (2004), os descritores mínimos de origem quantitativa foram declarados apenas com suas classes, sem os respectivos intervalos de medida para cada uma delas. Isso torna bastante subjetiva a alocação das plantas de vinca em qualquer uma das classes.

Os descritores mínimos são recomendados pelo Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC), vinculado ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O SNPC é o órgão competente para proteção de cultivares no Brasil, responsável, entre outras atribuições, pela divulgação das espécies vegetais e seus respectivos descritores mínimos, necessários para abertura do processo de proteção, conforme o Decreto nº 2.366/1997 (RAMOS *et al.*, 2018). Ainda não há uma lista de descritores mínimos disponível para a vinca no SNPC. Portanto, é possível inferir que os descritores mínimos são escassos para a espécie *C. roseus* ou quando existentes possuem problemas na sua padronização, o que dificulta o uso de qualquer lista de descritores mínimos.

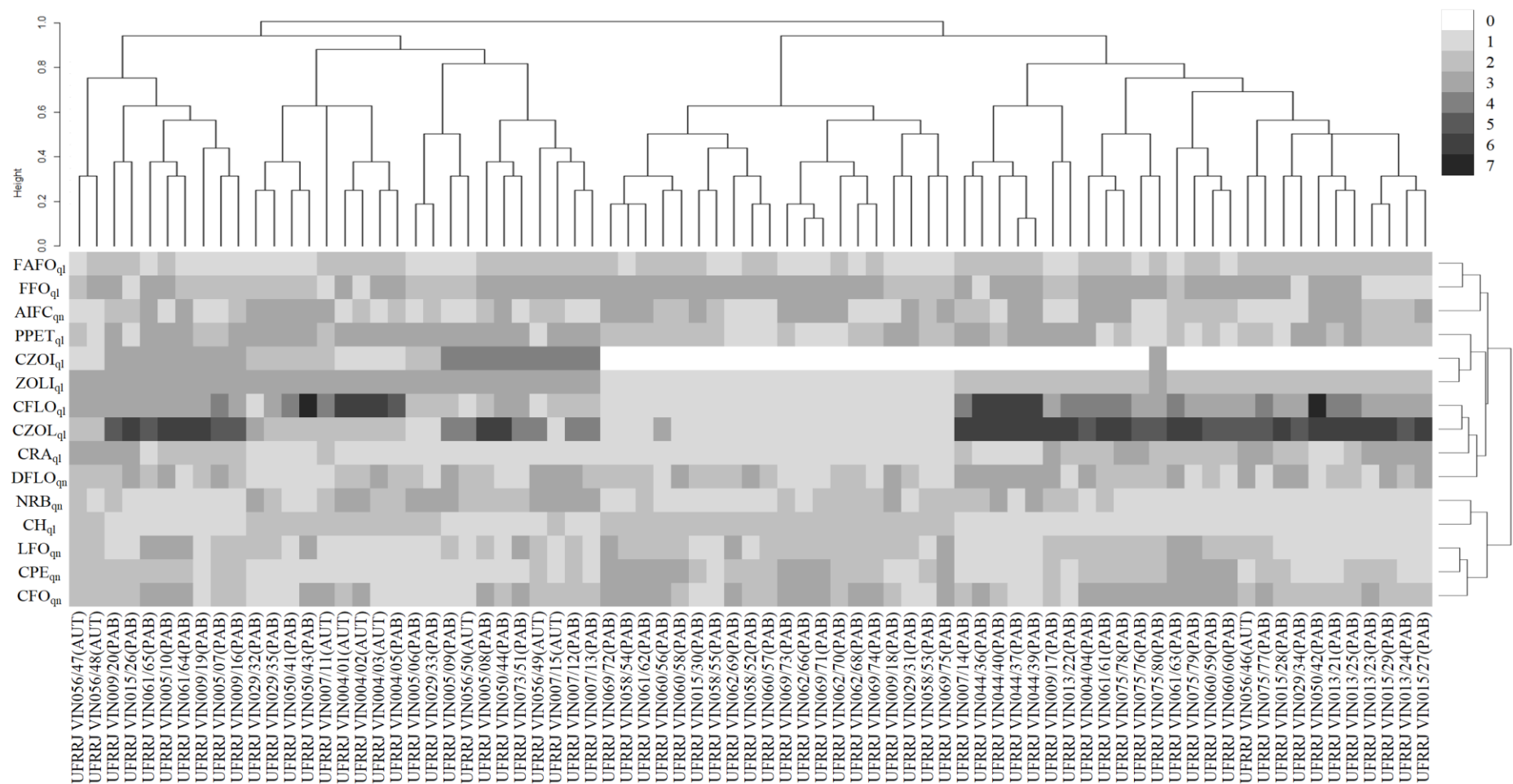


Figura 14. Dendrograma mostrando o agrupamento de 77 genótipos de vinca (*C. roseus*) com base em 15 descritores mínimos, utilizando a dissimilaridade multicategórica e o método do vizinho mais distante. O *heatmap* mostra as classes de descritores mínimos as quais cada genótipo pertence.

Foi utilizado o método de Singh (1981) para verificar os descritores mínimos de maior importância relativa na distinguibilidade dos genótipos analisados. Os descritores com maior importância relativa foram a cor de flor (CFLO_{ql}) (11,64%), a cor da zona do olho irradiada (CZOI_{ql}) (10,00%) e a cor da zona do olho ao redor do halo (CZOL_{ql}) (9,61%) (Figura 15). Estes três descritores relacionados às flores totalizaram 31,25% da importância relativa. Nesse sentido, as flores podem ser utilizadas para se confeccionar bons descritores mínimos para a vinca.

Soares *et al.* (2024) observaram herdabilidades acima de 99,00% para a cor de flor e cor da zona do olho ao redor do halo em *C. roseus*. Ambos os descritores foram considerados na presente pesquisa, ou seja, CZOL_{ql} e CFLO_{ql} (Tabela 10). Sreevalli *et al.* (2002) mencionaram o envolvimento de pelo menos seis genes na determinação da cor de flor na vinca. De acordo com Severino *et al.* (2002), descritores com alta herdabilidade refletem a menor influência do ambiente o que aumenta o poder discriminatório dos descritores. Porém, vale destacar que as estimativas de herdabilidade dependem da estrutura genética da população analisada.

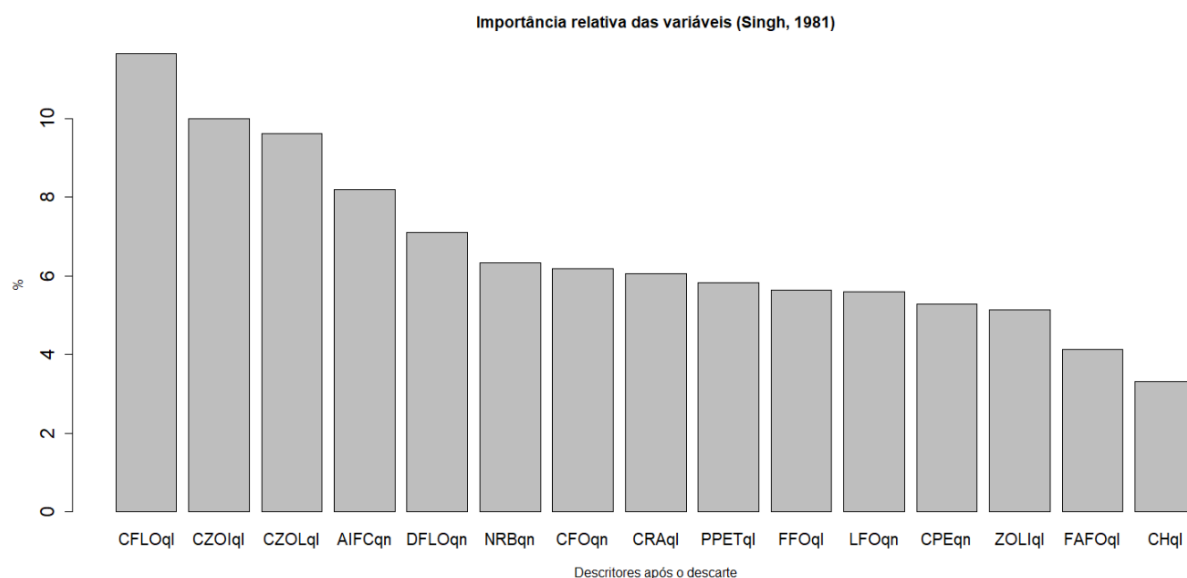


Figura 15. Percentuais de importância relativa de descritores na distinguibilidade de genótipos de vinca. Legenda: CFLO_{ql} (cor de flor), CZOI_{ql} (cor da zona do olho irradiada), CZOL_{ql} (cor da zona do olho ao redor do halo), AIFC_{qn} (ângulo médio de inserção da folha no caule), DFLO_{qn} (diâmetro médio da flor), NRB_{qn} (número de ramos na base da planta), CFO_{qn} (comprimento médio foliar), CRA_{ql} (cor dos ramos do caule), PPET_{ql} (posição entre as pétalas), FFO_{ql} (formato das folhas), LFO_{qn} (largura média foliar), CPE_{qn} (comprimento médio do pecíolo), ZOLI_{ql} (zona do olho quanto a profusão ou irradiação), FAFO_{ql} (formato do ápice das folhas) e CH_{ql} (cor de halo).

Os descritores mínimos cor de flor (CFLO_{ql}), cor da zona do olho irradiada (CZOI_{ql}) e cor da zona do olho ao redor do halo (CZOL_{ql}) foram os que apresentaram o maior número de classes, a saber: sete, cinco e seis, respectivamente (Tabela 10 e Figura 16). Portanto, descritores com maior número de classes exibiram maior importância relativa (Figura 15).

A maioria das plantas estudadas exibiu flores na cor branca (29,87%) e rosa clara (32,47%) (Figura 16). Mishra *et al.* (2001) também observaram um predomínio de flores na cor branca em 32 genótipos de vinca coletados no subcontinente indiano, Madagascar, Cingapura e Malásia. Vale mencionar que as flores de vinca na cor branca e rosa clara são muito comuns no Brasil, e tendem a ser uma característica de um germoplasma silvestre, já que a maioria das

cultivares ornamentais exibem colorações de flor bem distintas. Segundo Jhang *et al.* (2022), existem mais de 324 cultivares de *C. roseus* desenvolvidas com uma vasta gama de colorações de flores e zona do olho. Em vinca, a presença de cores na zona do olho das flores diferente da cor da pétala é predominante em genótipos ornamentais melhorados. Por isso, a zona do olho deve ser considerada na composição da lista de descritores mínimos, já que se pretende distinguir cultivares e variedades.

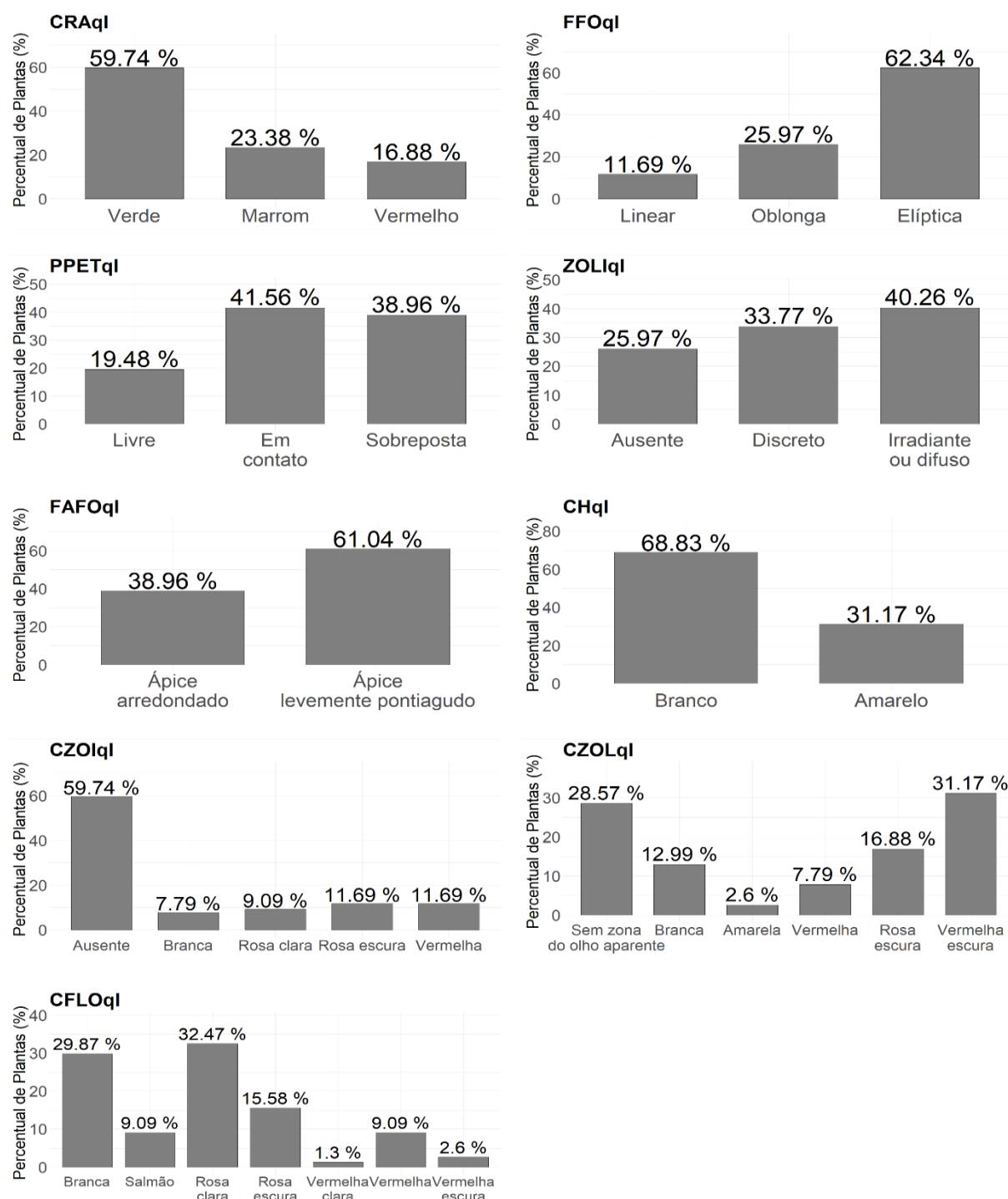


Figura 16. Distribuição dos descritores mínimos qualitativos propostos em 77 genótipos pertencentes à Coleção de Trabalho de vinca da UFRRJ. Legenda: CRA_{ql} (cor dos ramos do caule), FFO_{ql} (formato das folhas), PPET_{ql} (posição entre as pétalas), ZOLI_{ql} (zona do olho quanto a profusão ou irradiação), FAFO_{ql} (formato do ápice das folhas), CH_{ql} (cor de halo),

CZOI_{ql} (cor da zona do olho irradiada), CZOL_{ql} (cor da zona do olho ao redor do halo) e CFLO_{ql} (cor de flor).

A cor da zona do olho irradiada (CZOI_{ql}) foi classificada em ausente, branca, rosa clara, rosa escura e vermelha (Anexo 3). Estes estados foram observados, respectivamente, em 59,74, 7,79, 9,09, 11,69 e 11,69% dos genótipos analisados (Figura 16). Deste modo, na maioria das plantas analisadas predominou a ausência da zona do olho irradiada.

A cor da zona do olho ao redor do halo (CZOL_{ql}), o terceiro descritor com maior importância relativa (Figura 15), se apresentou em seis estados: sem zona do olho aparente, branca, amarela, vermelha, rosa escura e vermelha escura (Tabela 10 e Anexo 3). Este último estado foi verificado em 31,17% dos genótipos estudados e o estado sem zona do olho aparente em 28,57% (Figura 16).

Dos descritores mínimos relacionados à zona do olho das flores, a ZOLI_{ql} (zona do olho quanto a profusão ou irradiação) exibiu a menor importância relativa (5,14% - Figura 15). Para este descritor foram observados os seguintes estados: ausente, discreto e irradiante ou difuso (Tabela 10 e Anexo 3), os quais se distribuíram, respectivamente, da seguinte forma: 25,97, 33,77 e 40,26% das plantas analisadas (Figura 16).

A posição das pétalas das flores (PPET_{ql}) foi classificada da seguinte maneira: livre, em contato e sobreposta (Tabela 10 e Anexo 3), as quais foram observadas em 19,48, 41,56 e 38,96% das plantas estudadas, respectivamente (Figura 16). As variedades *Kururi White*, *Flappe Coconut* e *Flappe Lilac* foram classificadas, respectivamente, como livre, em contato e ligeiramente sobreposta (UPOV, 2004).

Entre os descritores mínimos de origem quantitativa (qn) ligados às folhas (CPE_{qn}, CFO_{qn}, LFO_{qn} e AIFC_{qn}), destaca-se o ângulo médio de inserção da folha no caule (AIFC_{qn}), por ser o quarto maior em importância relativa (8,20% - Figura 15). Neste descritor inédito (Tabela 10), os ângulos fechado e aberto apresentaram percentuais próximos, sendo 36,37% e 35,06%, respectivamente (Figura 17). Os descritores mínimos LFO_{qn} (largura média foliar) e CPE_{qn} (comprimento médio do pecíolo), ao contrário do AIFC_{qn}, apresentaram percentuais menores de importância relativa, respectivamente, de 5,59 e 5,28% (Figura 15).

Ainda no que se refere às folhas, mais especificamente quanto ao seu formato (FFO_{ql}), é possível verificar que predominou a folha elíptica (62,34% - Figura 16). Flaschenriem (2016) constatou, em vinca, o formato de folha elíptica nas cultivares PAS1053044, *Cora Lavender* e M3861D. Já no trabalho de Mishra *et al.* (2001), o formato elíptico foi minoritário, e o oblongo foi maioria em 32 acessos de vinca.

Tanto na largura média foliar (LFO_{qn}) quanto no comprimento médio do pecíolo (CPE_{qn}) predominaram os estados pequeno e médio (Tabela 10). Pecíolos pequenos (< 0,70 cm) e médios (0,70 a 1,00 cm) foram observados em 44,16 e 38,96% das plantas analisadas, respectivamente. Folhas de largura estreita (< 3,00 cm) e média (3,00 a 3,60 cm) estiveram presentes, nesta ordem, em 42,86 e 44,15% dos genótipos (Figura 17). Quanto ao comprimento médio das folhas (CFO_{qn}) observou-se que 37,66% das plantas exibiram folhas de comprimento médio, e 31 genótipos (40,26%) tiveram suas folhas classificadas como grandes (Figura 17). Ravikumar *et al.* (2023) e Soares *et al.* (2024) observaram altos valores de herdabilidade para o comprimento e largura foliar em vinca. Tais estimativas de herdabilidade próximas de 1,00 sugerem que o ambiente teve pouca influência no fenótipo observado. Um descritor mínimo ideal é aquele que tem a capacidade de se repetir no genótipo de interesse em diferentes ambientes. É certo que aqui se considera um manejo adequado da cultivar, conforme suas recomendações de cultivo.

Paula *et al.* (2021) informaram uma elevada herdabilidade (93,95%) para o diâmetro da flor em *C. roseus* e, além disso, neste mesmo trabalho, foi a variável com a maior contribuição relativa. Já na presente pesquisa, o diâmetro da flor (DFLO_{qn}) foi o quinto descritor mínimo em

importância relativa (7,10% - Figura 15). No entanto, é importante destacar que a contribuição dos descritores depende da estrutura genética da população de plantas analisadas. O DFLO_{qn} foi classificado em três estados: pequeno (< 3,00 cm), médio (3,00 a 3,90 cm) e grande (> 3,90 cm) (Tabela 10 e Anexo 3). A maioria das plantas analisadas (40,26%) foi classificada com flores médias. Em 24 genótipos (31,17%), as flores apresentaram tamanho grande, enquanto 22 (28,57%) exibiram tamanho pequeno (Figura 17).

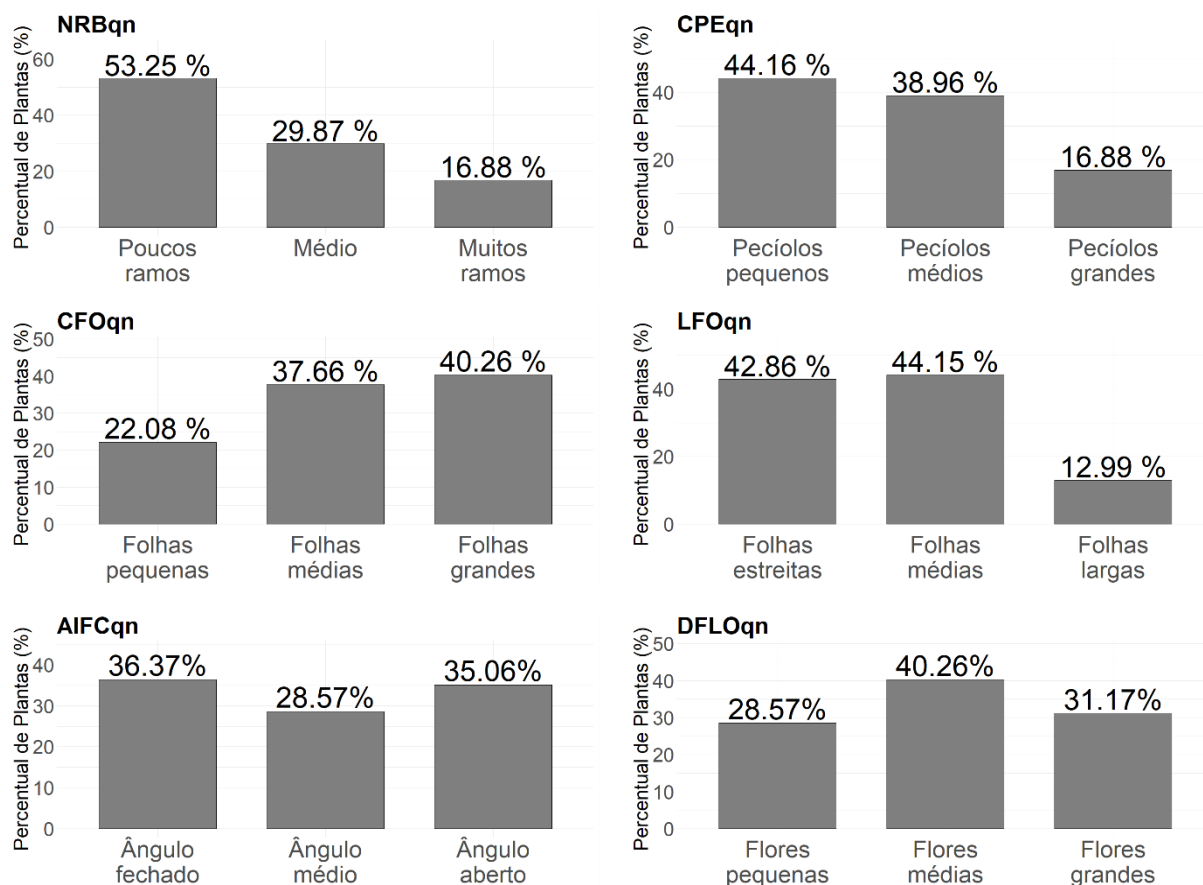


Figura 17. Distribuição dos descritores mínimos de origem quantitativa propostos em 77 genótipos pertencentes à Coleção de Trabalho de vinca da UFRRJ. Legenda: NRB_{qn} (número de ramos na base da planta), CPE_{qn} (comprimento médio do pecíolo), CFO_{qn} (comprimento médio foliar), LFO_{qn} (largura média foliar), AIFC_{qn} (ângulo médio de inserção da folha no caule) e DFLO_{qn} (diâmetro médio da flor).

A cor do halo das flores (CH_{ql}) e o formato do ápice das folhas (FAFO_{ql}) foram os únicos descritores mínimos com apenas duas classes (Tabela 10 e Figura 16). Na CH_{ql} houve predomínio da cor branca (68,83%) e no FAFO_{ql} predominou o formato levemente pontiagudo (61,04% - Figura 16). Ambos os descritores mínimos exibiram os percentuais mais baixos de importância relativa (Figura 15). É possível que descritores com menor número de classes tenham menor importância relativa.

O número de ramos na base da planta (NRB_{qn}), com 6,32% de importância relativa (Figura 15), foi o único descritor mínimo que conseguiu separar plantas de vinca menos divergentes, isto é, UFRRJ VIN062/66(PAB) e UFRRJ VIN069/71(PAB), UFRRJ VIN044/37(PAB) e UFRRJ VIN044/39(PAB). Entre esses pares de genótipos foi observada a menor distância genética no dendrograma, ou seja, 0,13 (Figura 14). Nesse contexto, o descritor NRB_{qn}, um descritor inédito (Tabela 10), mostrou-se fundamental como um descritor mínimo útil para distinguir plantas de vinca menos divergentes. UFRRJ VIN062/66(PAB) e UFRRJ

VIN069/71(PAB) foram plantas de poucos e médios ramos na base da planta, respectivamente. Já UFRRJ VIN044/39(PAB) foi classificado como um genótipo de muitos ramos e UFRRJ VIN044/37(PAB) com poucos ramos na base da planta (Figura 14). Este último estado foi observado em 53,25% do germoplasma estudado (Figura 17). Portanto, mais da metade das plantas analisadas foram pouco ramificadas. Ainda permanecendo na ramificação das plantas, mais especificamente na cor dos ramos do caule (CRA_{ql}), é possível notar que houve um predomínio da cor verde (59,74%) (Figura 16).

Em resumo, com base nas Figuras 16 e 17, é possível inferir que no germoplasma analisado houve um predomínio de poucos ramos na base da planta, ramos com cor verde, formato da folha elíptico, ápice da folha levemente pontiagudo, halo na cor branca e ausência da zona do olho irradiada. Tais características ocorreram em mais da metade das plantas aqui analisadas. De certa forma, as flores nas cores branca e rosa clara também predominaram.

Diante do exposto, entende-se que os descritores mínimos propostos podem contribuir de forma bastante satisfatória para o desenvolvimento da cultura da vinca, visto que contribuem para a distinção de cultivares. Com a lista de descritores mínimos aqui desenvolvida foi possível distinguir todos os genótipos analisados, mesmo aqueles mais relacionados geneticamente. Apesar dos resultados obtidos, novos descritores mínimos podem ser acrescentados a estes. De toda forma, a identificação inequívoca de variedades de vinca no Brasil e no mundo é um desafio. O desenvolvimento de ferramentas que fazem uso da biotecnologia pode e deve ser agregado a este processo.

4. CONCLUSÃO

Foram propostos 15 descritores mínimos para a cultura da vinca, a saber: número de ramos na base da planta (NRB_{qn}), comprimento médio do pecíolo (CPE_{qn}), comprimento médio foliar (CFO_{qn}), largura média foliar (LFO_{qn}), ângulo médio de inserção da folha no caule ($AIFC_{qn}$), diâmetro médio da flor ($DFLO_{qn}$), cor dos ramos do caule (CRA_{ql}), cor das flores ($CFLO_{ql}$), cor da zona do olho irradiada ($CZOI_{ql}$), cor da zona do olho ao redor do halo ($CZOL_{ql}$), cor dos ramos do caule (CRA_{ql}), posição entre as pétalas das flores ($PPET_{ql}$), formato das folhas (FFO_{ql}), zona do olho (distante do halo) quanto a profusão ou irradiação ($ZOLI_{ql}$), formato do ápice das folhas ($FAFO_{ql}$) e cor de halo (CH_{ql}). Estes descritores foram capazes de distinguir as 77 plantas de *C. roseus* analisadas. Isto ocorreu até mesmo em genótipos próximos geneticamente. A maior importância relativa na distinguibilidade dos genótipos foi verificada nos descritores mínimos relacionados às flores, a saber: cor de flor ($CFLO_{ql}$), cor da zona do olho irradiada ($CZOI_{ql}$) e cor da zona do olho ao redor do halo ($CZOL_{ql}$).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLORGE, L.; PHILLIPSON, P. B.; RAZAKAMALALA, R. *Catharanthus makayensis* L. Allorge, Phillipson & Razakamal. (Apocynaceae), a new species from Madagascar. **Candollea**, v. 70, n. 1, p. 61-66, 2015.

AMORIM, G. T. S.; PINTO, T. O.; SILVEIRA, T. O.; SOUZA, M. A. A.; MENEZES, B. R. da S.; DAMASCENO JUNIOR, P. C. *Catharanthus roseus* [L.] G. Don: allogamy as the main reproductive strategy and autogamy as a supposed reproductive guarantee mechanism. **South African Journal of Botany**, v. 154, p. 32-40, 2023.

BARBIERI, R. L. **Caracterização de germoplasma-critérios para estabelecimento de descritores**. Magistra, Cruz das Almas-BA, v. 25, I RGVNE, p. 17-21, 2013.

BIOVERSITY INTERNATIONAL. Guidelines for the development of crop descriptor lists. **Bioversity Technical Bulletin Series**. Bioversity International, Rome, Italy, 2007. 72 p.

BRASIL. **Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**. Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/>. Acessado em: 19/09/2023.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**. Disponível em: http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php. Acessado em: 15/07/2024.

BURLE, M. L.; OLIVEIRA, M. **Manual de curadores de germoplasma-vegetal: caracterização morfológica**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2010. 15 p.

CARVALHO, C. G. P.; OLIVEIRA, V. R.; CRUZ, C. D.; CASALI, V. W. D. Análise de trilha sob multicolinearidade em pimentão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 603-613, 1999.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. v. 2. Viçosa: UFV, 2003. 585 p.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. London: Longman Malaysia, 1996. 463 p.

FLASCHENRIEM, D. R. **Catharanthus variety PAS1053044**. US PP18,315 P3. 2016.

GUIMARÃES, G.; CARDOSO, L.; OLIVEIRA, H.; SANTOS, C.; DUARTE, P.; SOTTOMAYOR, M. Cytogenetic characterization and genome size of the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **AoB Plants**, p. 1-10, 2012.

IRASTORZA, M. H. **Aspectos teóricos e aplicados da descrição varietal do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1983. 146 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Sementes) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

JHANG, T.; DWIVEDI, S.; SHARMA, S. Classical breeding and trait genetics in *Catharanthus*. In: KOLE, C. **The Catharanthus Genome**. Cham: Springer International Publishing, p. 35-83, 2022.

KUMAR, S.; RAI, S. P.; KUMAR, S. R.; SINGH, D.; SRIVASTAVA, S.; MISHRA, R. K. **Plant variety of *Catharanthus roseus* named 'Ili'**. US PP18,315 P3. 2007.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, v. 27, n. 2, p. 209-202, 1967.

MARDIA, K. V. Measures of multivariate skewness and kurtosis with applications. **Biometrika**, v. 57, n. 3, p. 519-530, 1970.

MISHRA, P.; UNİYAL, G. C.; SHARMA, S.; KUMAR, S. Pattern of diversity for morphological and alkaloid yield related traits among the periwinkle *Catharanthus roseus*

accessions collected from in and around Indian subcontinent. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 48, n. 3, p. 273-286, 2001.

MISHRA, J. N.; VERMA, N. K. A brief study on *Catharanthus Roseus*: a review. **International Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 2, p. 20 – 23. 2017.

MONTGOMERY, D. C.; PECK, E. A. **Introduction to linear regression analysis**. New York: John Wiley & Sons, 1981. 504 p.

NEJAT, N.; VALDIANI, A.; CAHILL, D.; TAN Yee-How; MAZIAH, M.; ABIRI R. Ornamental exterior versus therapeutic interior of Madagascar Periwinkle (*Catharanthus roseus*): the two faces of a versatile herb. **The Scientific World Journal**, v. 2015, p. 1-19, 2015.

OLIVEIRA, V. R.; CASALI, V. W. D.; CRUZ, C. D.; PEREIRA, P. R. G.; BRACCINI, A. D. L. Avaliação da diversidade genética em pimentão através de análise multivariada. **Horticultura Brasileira**, v. 17, n. 1, p. 19-24, 1999.

PAULA, F. C.; SOARES, I. F. G.; NETO, J. D. de S.; MOULIN, M. M.; BERILLI, A. P. C. G.; NASCIMENTO, L. C.; PRETTI, I. R. Correlações fenotípicas e genotípicas a expressão de vincristina e vimblastina relativas ao efeito do solo em características concernentes a *Catharanthus roseus*. **Revista IFES Ciência**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2021.

RAMOS, S.; SOBRAL, K.; FERREIRA, J.; de ARAGAO, W. M.; COSTA, E.; RIBEIRO, F. E. **Proposta de descritores mínimos para caracterizar variedades e cultivares de *Cocos nucifera* L. e indicação de cultivares exemplos**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2018. 45 p.

RAVIKUMAR, B.; DHATT, K. K.; JHANJI, S. **Assessment of genetic parameters for diversified traits in periwinkle (*Catharanthus roseus* L.) through diallel analysis**. p. 1-11, 2023.

R DEVELOPMENT CORE TEAM (2023). **R: a language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL. <https://www.R-project.org/>.

REIS, M. V. M.; DAMASCENO, P. C.; CAMPOS, T. D. O.; DIEGUES, I. P.; FREITAS, S. C. D. Variabilidade genética e associação entre caracteres em germoplasma de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.). **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 2, p. 412-420, 2015.

RODRIGUES, H. C. D. A.; CARVALHO, S. P. D.; CARVALHO, A. A. D.; CARVALHO FILHO, J. L. S. D.; CUSTÓDIO, T. N. Avaliação da diversidade genética entre acessos de mamoneira (*Ricinus communis* L.) por meio de caracteres morfoagronômicos. **Revista Ceres**, v. 57, n. 6, p. 773-777, 2010.

RODRÍGUEZ-ALFONSO, D.; ISIDRÓN-PÉREZ, M.; BARRIOS, O.; FUNDORA, Z.; HORMAZA, J. I.; GRAJAL-MARTÍN, M. J.; HERRERA-ISIDRÓN, L. Minimal morphoagronomic descriptors for Cuban pineapple germplasm characterisation, **Horticultural Science (Prague)**, v. 47, n. 1, p. 28-35, 2020.

ROHLF, F. J. Adaptive hierarchical clustering schemes. **Systematic Zoology**, v. 18, p. 58-82, 1970.

SALOMÃO, A. N. **Manual de curadores de germoplasma-vegetal: glossário**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. 14 p.

SAMIYARSIH, S.; NAIPOSPOS, N.; PALUPI, D. Variability of *Catharanthus roseus* based on morphological and anatomical characters, and chlorophyll contents. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 20, n. 10, p. 2986-2993, 2019.

SEVERINO, L. S.; SAKIYAMA, N. S.; PEREIRA, A. A.; MIRANDA, G. V.; ZAMBOLIM, L.; BARROS, U. V. Eficiência dos descritores de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) na discriminação de linhagens de “Catimor”. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 24, n. 5, p. 1487-1492, 2002.

SILVA, H. T. **Descritores mínimos indicados para caracterizar cultivares/variedades de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2005. 32 p.

SILVEIRA, T. D. O.; MARQUES, M. D. M.; AMORIM, G. T. S.; CARVALHO, M. G. D., DAMASCENO, P. C. Genetic diversity among bitter melon genotypes assessed through morpho-agronomic variables. **Revista Caatinga**, v. 35, n. 4, p. 755-763, 2022.

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, v.41. p.237-245, 1981.

SOARES, I. F. G.; PAULA, F. C.; DE SOUZA NETO, J. D.; FERREIRA, B. C.; BERILLI, A. P. C. G.; MOULIN, M. M. Morphological diversity in varieties of *Catharanthus Roseus* [L.] G. Don. **Observatório de La economía Latinoamericana**, v. 22, n. 1, p. 2095-2111, 2024.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. James. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, v. 11, n. 2, p. 33-40, 1962.

SORENSEN, T. A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content and its application to analyses of the vegetation on Danish commons. **Biologiske skrifter**, v. 5, p. 1-34, 1948.

SREEVALLI, Y.; KULKARNI, R. N.; BASKARAN, K. Inheritance of flower color in periwinkle: orange-red corolla and white eye. **Journal of heredity**, v. 93, n. 1, p. 55-57, 2002.

STURGES, H. A. The choice of a class interval. **Journal of the american statistical association**, v. 21, n. 153, p. 65-66, 1926.

SUDRÉ, C. P.; RODRIGUES, R.; RIVA, E. M.; KARASAWA, M.; AMARAL JÚNIOR, A. T. D. Divergência genética entre acessos de pimenta e pimentão utilizando técnicas multivariadas. **Horticultura brasileira**, v. 23, n. 1, p. 22-27, 2005.

UPOV. **Union for the Protection of New Varieties of Plants. *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Guidelines for the conduct of test for distinctness, uniformity and stability**. TG/214/1Internationa, Geneva, 2004. 21 p.

UPOV. **Union for the Protection of New Varieties of Plants. List all Test Guidelines by TG Reference.** Disponível em: https://www.upov.int/test_guidelines/en/list.jsp. Acessado em: 18/06/2024.

ZHU, X.; ZENG, X.; SUN, C.; CHEN, S. Biosynthetic pathway of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus*. **Frontiers of medicine**, v. 8, n. 3, p. 285-293, 2014.

6. ANEXO

Anexo 1. Sementes de 73 genótipos de vinca (<i>Catharanthus roseus</i> [L.] G. Don) pertencentes ao Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular de Plantas (LCBMP) do DATS/IA/UFRRJ.	111
Anexo 2. Genótipos de <i>Catharanthus roseus</i> [L.] G. Don pertencentes à Coleção de Trabalho de vinca do DATS/IA/UFRRJ.	118
Anexo 3. Lista preliminar de descritores mínimos propostos para a cultura da vinca (<i>Catharanthus roseus</i> [L.] G. Don).	123

Anexo 1. Sementes de 73 genótipos de vinca (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) pertencentes ao Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular de Plantas (LCBMP) do DAST/IA/UFRRJ.

Número para identificação	Número de acesso	Nome de acesso	Lote	Sementes
34	112005	UFRRJ VIN004	16/01/2018	Autofecundação
52	114806 / 112005	UFRRJ VIN004	16/08/2019	Polinização aberta
35	112006	UFRRJ VIN005	10/01/2018	Autofecundação
42	112006	UFRRJ VIN005	28/06/2018	Polinização aberta
44	112006	UFRRJ VIN005	28/06/2018	Autofecundação
117	112006	UFRRJ VIN005	16/07/2018	Polinização aberta
148	112006	UFRRJ VIN005	05/07/2018	Polinização aberta
83	114804 / 112006	UFRRJ VIN005	23/08/2019	Polinização aberta
118	112007	UFRRJ VIN006	16/07/2018	Polinização aberta
151	112007	UFRRJ VIN006	26/08/2019	Polinização aberta
123	112008	UFRRJ VIN007	12/11/2018	Autofecundação
6	112008	UFRRJ VIN007	03/09/2018	Polinização aberta
18	112008	UFRRJ VIN007	06/11/2018	Autofecundação
22	112008	UFRRJ VIN007	09/11/2018	Autofecundação
24	112008	UFRRJ VIN007	05/11/2018	Autofecundação
31	112008	UFRRJ VIN007	16/07/2018	Polinização aberta
100	112008	UFRRJ VIN007	12/09/2018	Polinização aberta
113	112008	UFRRJ VIN007	30/08/2018	Polinização aberta
98	112009	UFRRJ VIN008	03/07/2018	Autofecundação
126	112009	UFRRJ VIN008	16/07/2018	Polinização aberta
7	112010	UFRRJ VIN009	03/09/2018	Polinização aberta
8	112010	UFRRJ VIN009	27/08/2018	Polinização aberta
17	112010	UFRRJ VIN009	29/06/2018	Autofecundação
20	112010	UFRRJ VIN009	15/11/2018	Autofecundação
106	112010	UFRRJ VIN009	21/09/2018	Polinização aberta

Continua.				
122	112010	UFRRJ VIN009	13/11/2018	Autofecundação
96	114811 / 112010	UFRRJ VIN009	23/08/2019	Polinização aberta
32	112011	UFRRJ VIN010	27/08/2018	Polinização aberta
73	112011	UFRRJ VIN010	22/08/2019	Polinização aberta
116	112011	UFRRJ VIN010	16/07/2018	Polinização aberta
10	112013	UFRRJ VIN012	27/08/2018	Polinização aberta
63	112013	UFRRJ VIN012	15/08/2019	Polinização aberta
30	112014	UFRRJ VIN013	16/07/2018	Polinização aberta
41	112015	UFRRJ VIN014	16/07/2018	Polinização aberta
150	112015	UFRRJ VIN014	28/06/2018	Polinização aberta
131	114805 / 112015	UFRRJ VIN014	07/11/2019	Polinização aberta
135	114805 / 112015	UFRRJ VIN014	29/10/2019	Polinização aberta
3	112016	UFRRJ VIN015	06/09/2018	Polinização aberta
4	112016	UFRRJ VIN015	03/09/2018	Polinização aberta
47	112016	UFRRJ VIN015	27/08/2018	Polinização aberta
102	112016	UFRRJ VIN015	12/09/2018	Polinização aberta
86	112018	UFRRJ VIN017	23/08/2019	Polinização aberta
12	112019	UFRRJ VIN018	27/08/2018	Polinização aberta
26	112019	UFRRJ VIN018	03/09/2018	Polinização aberta
93	112019	UFRRJ VIN018	23/08/2019	Polinização aberta
59	112020	UFRRJ VIN019	15/08/2019	Polinização aberta
81	112020	UFRRJ VIN019	27/11/2017	Polinização aberta
37	112025	UFRRJ VIN024	08/01/2018	Autofecundação
36	112026	UFRRJ VIN025	08/01/2018	Autofecundação
108	112029	UFRRJ VIN028	27/11/2017	Polinização aberta
119	112041	UFRRJ VIN030	16/07/2018	Polinização aberta
79	112046	UFRRJ VIN035	27/11/2017	Polinização aberta

Continua.				
82	112046	UFRRJ VIN035	27/11/2017	Polinização aberta
1	112048	UFRRJ VIN036	27/08/2018	Polinização aberta
25	112048	UFRRJ VIN036	03/09/2018	Polinização aberta
107	112048	UFRRJ VIN036	12/09/2018	Polinização aberta
114	112048	UFRRJ VIN036	30/08/2018	Polinização aberta
120	112048	UFRRJ VIN036	16/07/2018	Polinização aberta
124	112048	UFRRJ VIN036	03/09/2018	Polinização aberta
147	112048	UFRRJ VIN036	06/09/2018	Polinização aberta
33	112049	UFRRJ VIN037	27/08/2018	Polinização aberta
94	114812 / 112049	UFRRJ VIN037	18/08/2019	Polinização aberta
168	114812 / 112049	UFRRJ VIN037	22/11/2019	Polinização aberta
21	112051	UFRRJ VIN039	06/07/2018	Polinização aberta
27	112051	UFRRJ VIN039	24/08/2018	Polinização aberta
97	112051	UFRRJ VIN039	25/09/2018	Polinização aberta
28	112056	UFRRJ VIN044	27/08/2018	Polinização aberta
46	112056	UFRRJ VIN044	03/09/2018	Polinização aberta
99	112056	UFRRJ VIN044	12/09/2018	Polinização aberta
11	112086	UFFRJ VIN050	27/08/2018	Polinização aberta
15	112086	UFFRJ VIN050	10/09/2018	Polinização aberta
43	112086	UFFRJ VIN050	28/06/2018	Polinização aberta
45	112086	UFFRJ VIN050	03/09/2018	Polinização aberta
101	112086	UFFRJ VIN050	12/09/2018	Polinização aberta
121	112086	UFFRJ VIN050	25/09/2018	Polinização aberta
165	114813 / 112086	UFFRJ VIN050	22/11/2019	Polinização aberta
66	111793	UFRRJ VIN054	22/08/2019	Polinização aberta
134	111793	UFRRJ VIN054	17/10/2019	Polinização aberta
5	111794	UFRRJ VIN055	03/09/2018	Polinização aberta

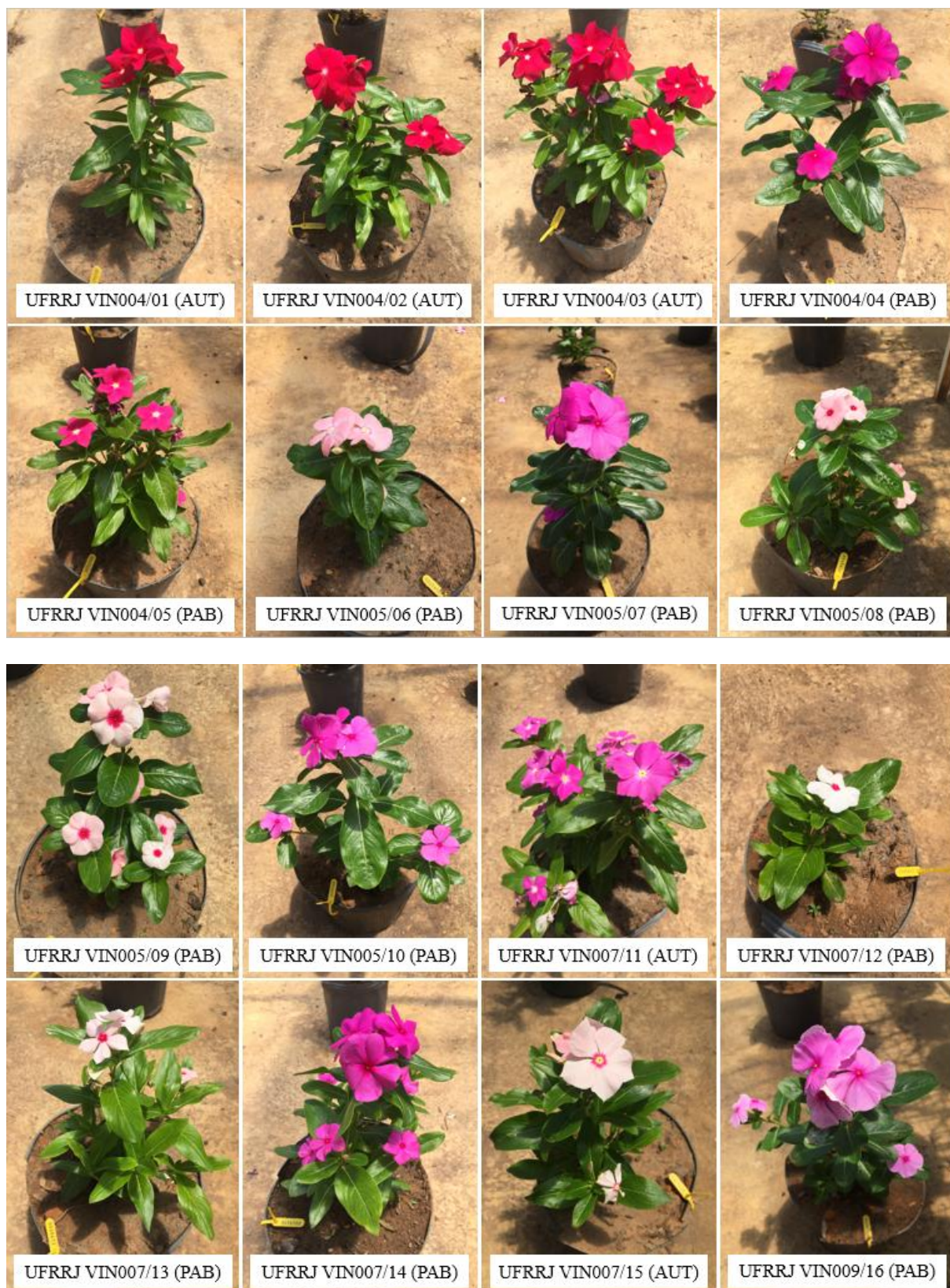
Continua.					
19	111794	UFRRJ VIN055	06/11/2018	Autofecundação	
39	111794	UFRRJ VIN055	01/11/2018	Autofecundação	
104	111794	UFRRJ VIN055	27/08/2018	Polinização aberta	
112	111794	UFRRJ VIN055	19/12/2017	Autofecundação	
115	111794	UFRRJ VIN055	30/08/2018	Polinização aberta	
140	111794	UFRRJ VIN055	15/10/2019	Polinização aberta	
23	111787	UFRRJ VIN056	05/11/2018	Autofecundação	
38	111787	UFRRJ VIN056	01/11/2018	Polinização aberta	
40	111787	UFRRJ VIN056	01/11/2018	Autofecundação	
48	111787	UFRRJ VIN056	06/09/2018	Polinização aberta	
109	111787	UFRRJ VIN056	24/04/2019	Polinização aberta	
110	111787	UFRRJ VIN056	21/09/2018	Polinização aberta	
111	111787	UFRRJ VIN056	30/04/2019	Polinização aberta	
29	111790	UFRRJ VIN057	27/08/2018	Polinização aberta	
155	112057	UFRRJ VIN058	26/08/2019	Polinização aberta	
130	112058	UFRRJ VIN059	26/08/2019	Polinização aberta	
14	112060	UFRRJ VIN060	27/08/2018	Polinização aberta	
91	112060	UFRRJ VIN060	23/08/2019	Polinização aberta	
2	112085	UFRRJ VIN061	27/08/2018	Polinização aberta	
61	112085	UFRRJ VIN061	15/08/2019	Polinização aberta	
16	112088	UFRRJ VIN062	27/08/2018	Polinização aberta	
87	112088	UFRRJ VIN062	23/08/2019	Polinização aberta	
92	112089	UFRRJ VIN063	23/08/2019	Polinização aberta	
89	112090	UFRRJ VIN064	23/08/2019	Polinização aberta	
103	112090	UFRRJ VIN064	27/08/2018	Polinização aberta	
156	112091	UFRRJ VIN065	26/08/2019	Polinização aberta	

Continua.				
153	112092	UFRRJ VIN066	26/08/2019	Polinização aberta
9	112092	UFRRJ VIN066	27/08/2018	Polinização aberta
105	112093	UFRRJ VIN067	27/08/2018	Polinização aberta
50	112093	UFRRJ VIN067	23/08/2019	Polinização aberta
62	112095	UFRRJ VIN068	15/08/2019	Polinização aberta
154	112096	UFRRJ VIN069	26/08/2019	Polinização aberta
157	112098	UFRRJ VIN070	26/08/2019	Polinização aberta
129	112099	UFRRJ VIN071	26/08/2019	Polinização aberta
70	111788	UFRRJ VIN072	22/08/2019	Polinização aberta
55	111789	UFRRJ VIN073	15/08/2019	Polinização aberta
152	111795	UFRRJ VIN074	26/08/2019	Polinização aberta
13	111798	UFRRJ VIN075	27/08/2018	Polinização aberta
159	111799	UFRRJ VIN076	26/08/2019	Polinização aberta
90	114741	UFRRJ VIN077	23/08/2019	Polinização aberta
54	114742	UFRRJ VIN078	15/08/2019	Polinização aberta
51	114743	UFRRJ VIN079	15/08/2019	Polinização aberta
163	114743	UFRRJ VIN079	22/11/2019	Polinização aberta
53	114744	UFRRJ VIN080	15/08/2019	Polinização aberta
164	114744	UFRRJ VIN080	22/11/2019	Polinização aberta
58	114745	UFRRJ VIN081	15/08/2019	Polinização aberta
136	114745	UFRRJ VIN081	29/10/2019	Polinização aberta
74	114746	UFRRJ VIN082	22/08/2019	Polinização aberta
60	114747	UFRRJ VIN083	15/08/2019	Polinização aberta
76	114748	UFRRJ VIN084	22/08/2019	Polinização aberta
167	114748	UFRRJ VIN084	22/11/2019	Polinização aberta
65	114750	UFRRJ VIN085	22/08/2019	Polinização aberta

Continua.				
64	114751	UFRRJ VIN086	15/08/2019	Polinização aberta
80	114752	UFRRJ VIN087	22/08/2019	Polinização aberta
142	114753	UFRRJ VIN088	15/10/2019	Autofecundação
143	114753	UFRRJ VIN088	15/10/2019	Polinização aberta
56	114753	UFRRJ VIN088	15/08/2019	Polinização aberta
132	114753	UFRRJ VIN088	21/10/2019	Polinização aberta
85	114754	UFRRJ VIN089	23/08/2019	Polinização aberta
49	114755	UFRRJ VIN090	16/08/2019	Polinização aberta
68	114755	UFRRJ VIN090	22/08/2019	Polinização aberta
75	114756	UFRRJ VIN091	22/08/2019	Polinização aberta
78	114757	UFRRJ VIN092	22/08/2019	Polinização aberta
72	114758	UFRRJ VIN093	22/08/2019	Polinização aberta
158	114759	UFRRJ VIN094	26/08/2019	Polinização aberta
88	114761	UFRRJ VIN095	23/08/2019	Polinização aberta
133	114761	UFRRJ VIN095	17/10/2019	Polinização aberta
138	114761	UFRRJ VIN095	15/10/2019	Polinização aberta
144	114761	UFRRJ VIN095	08/10/2019	Polinização aberta
67	114801	UFRRJ VIN096	22/08/2019	Polinização aberta
128	114801	UFRRJ VIN096	04/12/2019	Polinização aberta
125	114802	UFRRJ VIN097	16/09/2019	Polinização aberta
145	114802	UFRRJ VIN097	17/09/2019	Polinização aberta
77	114803	UFRRJ VIN098	22/08/2019	Polinização aberta
57	114807	UFRRJ VIN099	15/08/2019	Polinização aberta
127	114807	UFRRJ VIN099	16/10/2019	Polinização aberta
149	114807	UFRRJ VIN099	15/01/2020	Autofecundação
160	114807	UFRRJ VIN099	25/11/2019	Polinização aberta
161	114807	UFRRJ VIN099	25/11/2019	Polinização aberta

Continua.				
162	114807	UFRRJ VIN099	25/11/2019	Polinização aberta
166	114807	UFRRJ VIN099	22/11/2019	Polinização aberta
84	114808	UFRRJ VIN100	23/08/2019	Polinização aberta
139	114808	UFRRJ VIN100	15/10/2019	Autofecundação
141	114808	UFRRJ VIN100	15/10/2019	Polinização aberta
71	114809	UFRRJ VIN101	22/08/2019	Polinização aberta
146	114809	UFRRJ VIN101	17/09/2019	Polinização aberta
95	114810	UFRRJ VIN102	23/08/2019	Polinização aberta
69	114816	UFRRJ VIN103	22/08/2019	Polinização aberta

Anexo 2. Genótipos de *Catharanthus roseus* [L.] G. Don pertencentes à Coleção de Trabalho de vinca do DATS/IA/UFRRJ.





UFRRJ VIN009/17 (PAB)



UFRRJ VIN009/18 (PAB)



UFRRJ VIN009/19 (PAB)



UFRRJ VIN009/20 (PAB)



UFRRJ VIN013/21 (PAB)



UFRRJ VIN013/22 (PAB)



UFRRJ VIN013/23 (PAB)



UFRRJ VIN013/24 (PAB)



UFRRJ VIN013/25 (PAB)



UFRRJ VIN015/26 (PAB)



UFRRJ VIN015/27 (PAB)



UFRRJ VIN015/28 (PAB)



UFRRJ VIN015/29 (PAB)



UFRRJ VIN015/30 (PAB)



UFRRJ VIN029/31 (PAB)



UFRRJ VIN029/32 (PAB)





UFRRJ VIN056/49 (AUT)



UFRRJ VIN056/50 (AUT)



UFRRJ VIN073/51 (PAB)



UFRRJ VIN058/52 (PAB)



UFRRJ VIN058/53 (PAB)



UFRRJ VIN058/54 (PAB)



UFRRJ VIN058/55 (PAB)



UFRRJ VIN060/56 (PAB)



UFRRJ VIN060/57 (PAB)



UFRRJ VIN060/58 (PAB)



UFRRJ VIN060/59 (PAB)



UFRRJ VIN060/60 (PAB)



UFRRJ VIN061/61 (PAB)



UFRRJ VIN061/62 (PAB)



UFRRJ VIN061/63 (PAB)



UFRRJ VIN061/64 (PAB)



UFRRJ VIN061/65 (PAB)



UFRRJ VIN062/66 (PAB)



UFRRJ VIN062/67 (PAB)



UFRRJ VIN062/68 (PAB)



UFRRJ VIN062/69 (PAB)



UFRRJ VIN062/70 (PAB)



UFRRJ VIN069/71 (PAB)



UFRRJ VIN069/72 (PAB)



UFRRJ VIN069/73 (PAB)



UFRRJ VIN069/74 (PAB)



UFRRJ VIN069/75 (PAB)



UFRRJ VIN075/76 (PAB)



UFRRJ VIN075/77 (PAB)



UFRRJ VIN075/78 (PAB)



UFRRJ VIN075/79 (PAB)



UFRRJ VIN075/80 (PAB)

Anexo 3. Lista preliminar de descritores mínimos propostos para a cultura da vinca (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don).

NRB_{qn} - Número de ramos na base da planta: avaliado a partir da contagem dos ramos que saem da base do caule. NRB_{qn} pode assumir os seguintes estados:

- 1- Pouco ramos (< 5 ramos);
- 2 - Médio (5 a 8 ramos);
- 3- Muitos ramos (> 8 ramos).

CPE_{qn} - Comprimento médio do pecíolo: obtido pela média do comprimento do pecíolo (cm), avaliado em 10 folhas completamente desenvolvidas por planta. CPE_{qn} pode assumir os seguintes estados:

- 1 - Pecíolos pequenos (< 0,70 cm);
- 2 - Pecíolos médios (0,70 a 1,00 cm);
- 3 - Pecíolos grandes (>1,00 cm).

CFO_{qn} - Comprimento médio foliar: obtido pela média do comprimento (em cm) de 10 folhas completamente desenvolvidas por planta. CFO_{qn} pode assumir os seguintes estados:

- 1 - Folhas pequenas (< 6,30 cm);
- 2 - Folhas médias (6,30 a 8,00 cm);
- 3 - Folhas grandes (> 8,00 cm).

LFO_{qn} - Largura média foliar: obtida pela média da largura (cm) em 10 folhas completamente desenvolvidas por planta. LFO_{qn} pode assumir os seguintes estados:

- 1 - Folhas estreitas (< 3,00 cm);
- 2 - Folhas médias (3,00 a 3,60 cm);
- 3 - Folhas largas (> 3,60 cm).

AIFC_{qn} - Ângulo médio de inserção da folha no caule: obtido pela média das medidas entre a inserção da folha (pecíolo) e o caule em 10 folhas completamente desenvolvidas por planta. A média do ângulo de inserção da folha no caule (em graus) é dada pela divisão do valor da soma de todos os ângulos aferidos pelo número total de folhas avaliadas. AIFC_{qn} pode assumir os seguintes estados:

- 1 - Ângulo fechado (< 47,50 graus);
- 2 - Ângulo médio (47,50 a 63,50 graus);
- 3 - Ângulo aberto (> 63,50 graus).

DFLO_{qn} - Diâmetro médio da flor: obtido a partir da média da distância (em cm) entre duas pétalas opostas em 5 flores por planta. DFLO_{qn} pode assumir os seguintes estados:

- 1 - Flores pequenas (< 3,00 cm);
- 2 - Flores médias (3,00 a 3,90 cm);

3 - Flores grandes ($> 3,90$ cm).

CRA_{ql} - Cor dos ramos do caule: observado com base na cor que predomina nos ramos do caule. CRA_{ql} pode assumir os seguintes estados:



1 - Verde;



2 - Marrom;



3 - Vermelho.

FFO_{ql} - Formato das folhas: observado com base no formato das folhas. FFO_{ql} pode assumir os seguintes estados:



1 - Linear;



2 - Oblonga;



3 - Elíptica.

FAFO_{ql} – Formato do ápice das folhas: observado através do formato que predomina no ápice das folhas. FAFO_{ql} pode assumir os seguintes estados:



1 - Ápice arredondado;



2 - Ápice levemente pontiagudo.

CH_{ql} - Cor de halo: avaliado com base na cor que predomina no halo das flores. CH_{ql} pode assumir os seguintes estados:



1 - Branca;



2 - Amarela.

CFLO_{ql} - Cor de flor: observado com base na cor que predomina nas pétalas das flores. CFLO_{ql} deve assumir os seguintes estados:



1 - Branca;



2 - Salmão;



3 - Rosa clara;



4 - Rosa escura;



5 - Vermelha clara;



6 - Vermelha;



7 - Vermelha escura.

PPET_{ql} - Posição entre as pétalas: observado com base na posição entre as pétalas das flores. PPET_{ql} deve assumir os seguintes estados:



1 - Livre: pétalas sem contato ou com somente um contato;



2 - Em Contato: no mínimo dois contatos sem sobreposição ou com no máximo dois contatos com sobreposição;



3 - Sobreposta: no mínimo três contatos com sobreposição.

CZOL_{ql} - Cor da zona do olho ao redor do halo: obtido com base na cor que predomina na zona do olho próxima ao halo das flores. CZOL_{ql} deve assumir os seguintes estados:



1 - Sem zona do olho aparente;



2 - Branca;



3 - Amarela;



4 - Vermelha;

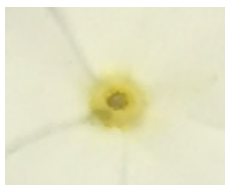


5 - Rosa escura;



6 - Vermelha escura.

ZOLI_{ql} - Zona do olho quanto a profusão ou irradiação: obtido através do formato da borda da zona do olho. ZOLI_{ql} pode assumir os seguintes estados:



1 - Ausente;



2 - Discreto;



3 - Irradiante ou difuso.

CZOI_{ql} - Cor da zona do olho irradiada: obtido com base na cor que predomina na zona do olho irradiada distante do halo das flores. CZOI_{ql} deve assumir os seguintes estados:



0 - Ausente;



1 - Branca;



2 - Rosa clara;



3 - Rosa escura;



4 - Vermelha.