



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA VEGETAL**

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* e CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE  
GENÓTIPOS DO GÊNERO *Alternanthera***

**SÍLVIA RUBIN**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Pelotas, sob a  
orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eugenia Jacira  
Bolacel Braga, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Fisiologia Vegetal, para  
a obtenção do Título de Mestre em  
Ciências (M.S).

**PELOTAS**  
**Rio Grande do Sul**  
**Junho de 2007**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA VEGETAL**

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE  
PLANTAS DO GÊNERO *Alternanthera***

**SÍLVIA RUBIN**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Pelotas, sob a  
orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eugenia Jacira  
Bolacel Braga, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Fisiologia Vegetal, para  
a obtenção do Título de Mestre em  
Ciências (M.S).

**PELOTAS**  
**Rio Grande do Sul**  
**Junho de 2007**

**SÍLVIA RUBIN**  
**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* e CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE**  
**PLANTAS DO GÊNERO *Alternanthera***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eugenia Jacira Bolacel Braga, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências (M.S).

Banca Examinadora:

---

Dr<sup>a</sup>. Lindamir Hernandez Pastorini

---

Dr<sup>a</sup> Beatriz Helena Gomes Rocha

---

Dr<sup>a</sup>. Rosa Lia Barbieri

---

Dr<sup>a</sup>. Eugenia Jacira Bolacel Braga  
(Orientadora)

“A sabedoria é resplandecente, não murcha, mostra-se facilmente para aqueles que a procuram. Ela se deixa encontrar por aqueles que a buscam. Ela se antecipa, revelando-se espontaneamente a aqueles que a desejam. Quem por ela madruga, não terá grande trabalho, pois a encontrará sentada junto de sua porta”.

Livro da sabedoria, capítulo 6, versículos de 12 a 15.

Aos meus pais  
Ivo e Eleni,  
às minhas irmãs  
Flávia e Cláudia e  
ao meu sobrinho  
Ígor,  
com amor e carinho,  
dedico o meu trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade da realização do curso.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Eugênia Jacira Bolacel Braga, ao Prof. Dr. José Antonio Peters e ao Prof. Dr. Valmor João Bianchi, pela orientação.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Élen Nunes Garcia, pelo auxílio prestado na identificação botânica das espécies.

Ao Dr. Amaury da Silva Junior, ao professor Delvino Nolla da Universidade de Passo Fundo (UPF) e ao Prof. Dr. Dirceu Agostinetto, pela contribuição na obtenção dos genótipos.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, pela colaboração prestada, em especial à Juliana de Magalhães Bandeira, à Cláudia Simone Madruga Lima, à Aniheb Prestes Vieira e à Isabel Corrêa da Silva Rodrigues.

Aos professores, colegas e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Fisiologia vegetal pela boa convivência.

## ÍNDICE

|                                                                                                                                            |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| SUMÁRIO                                                                                                                                    | vi   |
| SUMMARY.....                                                                                                                               | viii |
| INTRODUÇÃO GERAL.....                                                                                                                      | 1    |
| CAPÍTULO I: PROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Alternanthera</i> spp.....                                                                    | 5    |
| Introdução.....                                                                                                                            | 5    |
| Material e Métodos.....                                                                                                                    | 7    |
| Resultados e Discussão.....                                                                                                                | 11   |
| Conclusões.....                                                                                                                            | 29   |
| CAPÍTULO II: ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM PLANTAS DO GÊNERO <i>Alternanthera</i> spp. COM MARCADORES MOLECULARES DO TIPO RAPD ..... | 30   |
| Introdução.....                                                                                                                            | 30   |
| Material e Métodos .....                                                                                                                   | 34   |
| Resultados e Discussão .....                                                                                                               | 44   |
| Conclusões.....                                                                                                                            | 58   |
| Considerações Finais                                                                                                                       | 59   |
| Referências Bibliográficas.....                                                                                                            | 60   |
| Apêndice.....                                                                                                                              | 76   |

## SUMÁRIO

RUBIN, Sílvia. M.S. Universidade Federal de Pelotas, junho, 2007. **Propagação *in vitro* e caracterização molecular de plantas do gênero *Alternanthera***. Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eugenia Jacira Bolacel Braga. Co-orientadores: Prof. Dr. José Antonio Peters e Prof. Dr. Valmor João Bianchi.

As plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos experimentais para a síntese de novos fármacos. O gênero *Alternanthera* é conhecido por possuir plantas com propriedades medicinais e empregadas com esta finalidade pela medicina popular. Dentre elas destacam-se a *A. dentata* Moench., *A. brasiliana* L., *A. tenella* Colla e *A. philoxeroides* Mart., com propriedades diurética, antiinflamatória, digestiva, hepatoprotetora, antioxidante, analgésica, antibiótica, antitumoral e depurativa. Nos últimos anos tem ocorrido um aumento da demanda por plantas com propriedades medicinais, fazendo-se necessário estudos mais aprofundados em relação às características morfológicas, fisiológicas e moleculares destes vegetais. O objetivo deste estudo foi avaliar o processo de micropropagação, otimizando o sistema de cultivo *in vitro*, e verificar a similaridade genética entre os genótipos das plantas coletadas em diferentes localidades da Região Sul do Brasil. Inicialmente foram executados os procedimentos básicos de micropropagação, incluindo as etapas de estabelecimento *in vitro*, multiplicação e aclimatização. Na micropropagação foram utilizadas diferentes combinações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mg L<sup>-1</sup>) e ANA (0,0 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>) e avaliados os parâmetros de crescimento. Constatou-se que, o melhor meio para o cultivo *in vitro* *Alternanthera brasiliana* foi o MS sem adição de fitorreguladores e este meio adicionado de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA, sem a adição de BAP. Nestes meios desenvolveram-se plantas aptas para a aclimatização. A adição de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA na etapa de cultivo *in vitro* melhorou o desenvolvimento do sistema radicular durante a fase de aclimatização. A análise molecular foi realizada utilizando-se a técnica de RAPD. Foi verificada a possível existência de variabilidade entre plantas de *Alternanthera brasiliana* e o potencial da técnica em detectar variabilidade intra e interespecífica de *A. dentata*, *A. philoxeroides*,



*A. brasiliiana*, *A. tenella* e *A. sessilis* provenientes de diferentes locais da Região Sul do Brasil. Não foi possível constatar polimorfismo entre as plantas de *A. brasiliiana* e entre as plantas de *A. dentata*. No entanto, foi possível diferenciar as seis diferentes espécies analisadas e observar variabilidade entre as plantas de *A. philoxeroides* e *A. tenella*.

## SUMMARY

RUBIN, SÍLVIA. M.S. Universidade Federal de Pelotas, june, 2007. **Propagation *in vitro* and molecular characterization of *Alternanthera* genotypes.** Advisor: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eugenia Jacira Bolacel Braga. Co-advisors: Prof. Dr. José Antonio Peters and Prof. Dr. Valmor João Bianchi.

The plants are biologically important sources of natural actives products, many of the which are constituted in experimental models for the synthesis of new medicines. The genus *Alternanthera* is known by possessing plants with medicinal properties and are employed with this purpose for the popular medicine. Among they stand out *A. dentata* Moench., *A. brasiliiana* L., *A. tenella* Colla and *A. philoxeroides* Mart., with diuretic properties, anti-inflammatory, digestive, hepatic-protector, antioxidant, analgesic, antibiotic, anti-tumor and depurifying effect. In the last years, it was verified an increase demand for medicinal plants and it is made necessary studies in relation to the morphologic, physiologic and molecular characteristics of these plants species. The objective of this study was to evaluate the micropropagation process, optimizing the cultivation *in vitro* system, and to verify the genetic similarity among the plants collected at different places of the South Area of Brazil. The basic procedures of micropropagação include the *in vitro* establishment, multiplication and acclimatization of the plantlets. In the micropropagation different BAP (0.0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0 and 2.5 mg L<sup>-1</sup>) and ANA (0.0 and 1,0 mg L<sup>-1</sup>) concentrations were used and growth parameters was evaluated. It was verified for *Alternanthera dentate brasiliiana* that the best medium for the *in vitro* cultivation was MS medium without plant growth regulators and in the medium added of ANA (1.0 mg L<sup>-1</sup>), without the BAP addition. In these medium the plants developed sufficient to the acclimatization stage. The addition of 1,0 mg L<sup>-1</sup> of ANA in the stage of *in vitro* cultivation improved the root system development during the acclimatização stage. The molecular analysis was conducted using the RAPD technique, in order to look for a possible polymorphisms among the genotypes of *Alternanthera brasiliiana* and the potential of the technique in detecting variability intra and interespecific of *A. dentata*, *A. philoxeroides*, *A. brasiliiana*, *A. tenella*, and *A. sessilis* plants harvesting at different places of the South Area of Brazil. Through the RAPD technique it was not possible to verify polymorphisms among the *A. brasiliiana* plants and among the *A. dentata*

plants. However, it was possible to differentiate the six different analyzed species and to observe variability among the plants of *A. philoxeroides* and *A. tenella*.

## INTRODUÇÃO GERAL

A importância do emprego das plantas no tratamento de diversas enfermidades é expressiva, e isso pode ser constatado pelo aumento do consumo de fitoterápicos pela população no contexto mundial. O Brasil leva uma vantagem considerável, por ser um território extremamente rico, com valiosa biodiversidade vegetal (Souza *et al.*, 2003).

Nas últimas décadas o aumento da procura por novos medicamentos que sirvam como uma opção terapêutica eficaz, de menores efeitos colaterais para os pacientes com baixos custos, fez com que aumentasse, cada vez mais, o número de centros de pesquisas dedicados à fitoterapia nas universidades brasileiras (Bosembecker, 2001).

Segundo Bosembecker (2001), mais de 40% dos medicamentos farmacêuticos produzidos no Brasil, têm princípios ativos retirados de plantas. O país possui uma vasta e riquíssima flora, uma fábrica natural de medicamentos farmacêuticos baratos e eficazes, com cerca de 15 mil espécies diferentes de ervas e plantas com propriedades medicinais, representando uma fonte inesgotável para os pesquisadores de fitologia.

O gênero *Alternanthera*, pertencente à família *Amaranthaceae*, tem sido reconhecido pelas suas propriedades farmacológicas, pois foram identificados vários compostos biologicamente ativos, entre eles os triterpenóides, como as saponinas, que possuem atividades reconhecidas como antinoceptivas e antiinflamatórias, os flavonóides, as antraquinonas, os cromoalcalóides, as betaínas, as betaciclinas, os triterpenos e os esteróides, com uma

predominância de D7-esteróides como o principal metabólito secundário (Souza *et al.*, 1998; Salvador & Dias, 2004).

As espécies *Alternanthera dentata* (Moench.) Stuchilik ex R.E. Fries, *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze, *Alternanthera tenella* Colla e a *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) St. Hil. são plantas herbáceas nativas de todo o Brasil, que apresentam relevante importância pelas suas propriedades medicinais e por serem consideradas plantas infestantes e nocivas principalmente de pastagens, culturas anuais e perenes (Lorenzi & Matos, 2002).

*A. dentata*, conhecida popularmente por penicilina, possui características, propriedades e nomes populares semelhantes à *A. brasiliana*, sendo considerada por alguns botânicos como a mesma espécie. *A. dentata* apresentando como única diferença a coloração, geralmente arroxeada das folhas e ramos, a presença de brácteas mais longas que as tépalas e com margens lacerado-denteadas. Ambas as espécies são consideradas e utilizadas como tendo os mesmos usos fitoterápicos (Lorenzi & Matos, 2002).

A *Alternanthera brasiliana* é popularmente conhecida como "Terramicina" ou "Penicilina". Trabalhos recentes relatam os efeitos analgésicos de extratos hidroalcoólicos obtidos de partes aéreas da *A. brasiliana*, e análises fitoquímicas preliminares indicam a presença de terpenos, esteróides e compostos fenólicos, sendo  $\beta$ -sitosterol, o constituinte mais importante. Alguns estudos demonstraram que *A. brasiliana* apresenta atividade *in vitro* contra vários vírus, incluindo o da herpes simples (Luca *et al.*, 2001).

Uma das características mais relevantes da espécie *Alternanthera brasiliana* é a presença de betalaínas (betacianinas e betaxantinas). Essas substâncias são pigmentos praticamente exclusivos das famílias da ordem Centrospermae e parecem ocorrer em substituição das antocianinas, comuns em outras angiospermas (Mabry, 1980).

Segundo estudos feitos na Universidade do Vale do Itajaí – SC, utilizando extratos hidroalcoólicos de *A. brasiliana*, foi constatado o efeito analgésico, contra cólicas em ratos, induzidas por ácido acético, devido à presença dos esteróides, terpenos e componentes fenólicos. O extrato mostrou-se mais potente do que algumas drogas comumente utilizadas como a

aspirina e dipirona, o que confirma o seu uso popular contra processos dolorosos (Souza *et al.*, 1998; Brochado *et al.*, 2003).

Num estudo farmacológico *in vitro* com extratos obtidos da *A. brasiliiana* com solventes orgânicos, realizado pela USP (Universidade de São Paulo), observou-se uma significativa citotoxicidade em tumores e considerável atividade anti-tumoral (Nihei *et al.*, 2001).

*A. brasiliiana* é popularmente usada contra inflamação, tosse e diarreia, verificando que o extrato etanólico ou aquoso das suas folhas demonstraram um efeito inibitório sobre células inflamatórias do sistema imune, sendo que estes metabólitos secundários são capazes de bloquear mitoses de linfócitos humanos *in vitro*, sem qualquer efeito tóxico (Brochado *et al.*, 2003).

A seleção de linhagens, variedades ou quimiotipos altamente produtores tem sido o método geralmente usado para a obtenção de plantas com elevado teor de substâncias ativas. Essa estratégia tem sido bem sucedida devido à biodiversidade das espécies nativas com grande variação no nível de metabólitos secundários de uma mesma espécie. Em muitos casos, a única fonte de matéria-prima para o fitoterápico é a planta nativa. A variabilidade da expressão gênica e do genótipo, tipo de tecido vegetal, fatores ambientais e período de colheita podem influenciar drasticamente o conteúdo dos metabólitos almejados (França, 2004).

O estudo da propagação de espécies utilizadas na medicina popular tem sido intensificado nos últimos anos, devido ao crescente investimento em pesquisas para a descoberta de novos fármacos e da utilização da fitoterapia como um meio alternativo para cura de enfermidades (Abreu *et al.*, 2003).

As técnicas biotecnológicas, quando o cultivo tradicional não é a melhor opção, constituem uma ferramenta interessante e útil para a propagação de exemplares de propriedades desejáveis, tais como resistência a pragas e outras condições de estresse, alta produtividade e elevado rendimento em substâncias ativas de interesse (França, 2004).

A principal limitação considerada para a utilização de produtos naturais como fonte de novos produtos farmacêuticos está relacionada à complexidade do processo de avaliação e pela presença de misturas biológicas de germoplasma, de difícil caracterização. Porém, técnicas e processos de engenharia estão superando rapidamente estas limitações e demandando a

implantação de programas de conservação e melhoramento de germoplasma (Nisbert & Moore, 1997).

A caracterização genética através do uso de marcadores moleculares possibilita a estimativa de vários índices genéticos, o conhecimento da organização de genomas e da variabilidade genética entre e dentro de populações. Em termos de melhoramento genético, a variabilidade está contida no pool gênico, que é definido como um conjunto de genótipos caracterizados pela similaridade na frequência e associação alélica, sendo que tais genótipos usualmente exibem um padrão geográfico de distribuição (Grattapaglia & Machado, 1998).

Dentre os marcadores moleculares baseados em PCR (*Polymerase Chain Reaction*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) tem demonstrado ser eficiente para a análise do DNA (Willians *et al.*, 1990), detecção de polimorfismo genético, identificação varietal e mapeamento. Marcadores do tipo RAPD também são usados para avaliar níveis de fluxo gênico entre espécies (Arnold *et al.*, 1991) e a detecção da introgressão de genes em diversas plantas (Castillo *et al.*, 1994; Gomez *et al.*, 1996).

Considerando a importância ecológica e medicinal do gênero *Alternanthera*, o qual compreende plantas nativas e consideradas invasoras de algumas culturas agronômicas, como citado por Lorenzi & Matos (2002) e, pelas propriedades medicinais e potencialidades farmacológicas de suas plantas, torna-se importante a realização de estudos fisiológicos e biotecnológicos para a sua melhor produção, preservação e aplicabilidade.

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi estudar o processo de micropropagação de plantas de *Althernanthera* sp. otimizando o sistema de cultivo *in vitro* e avaliar a similaridade intra e interespecífica de plantas do gênero *Alternanthera* spp. coletadas em diferentes localidades do Brasil.

## **CAPÍTULO I**

### **PROPAGAÇÃO *IN VITRO* de *Alternanthera* spp**

#### **INTRODUÇÃO**

A propagação *in vitro* de tecidos vegetais é uma técnica que se destaca na produção comercial e industrial de plantas, assim como no manejo, intercâmbio e conservação de germoplasma, em pesquisas na área de fisiologia vegetal e produção industrial *in vitro* de compostos secundários (Giacometti, 1990).

Estudos da propagação *in vitro* de plantas medicinais vêm sendo realizados com o objetivo de estabelecer parâmetros aperfeiçoados para a obtenção de plantas com excelente qualidade fitossanitária, identidade genética, caracterização bioquímica e alta produção de metabólitos secundários (Murch *et al.*, 2004).

A micropropagação é efetiva para a rápida multiplicação de espécies das quais é necessário obter alta uniformidade de progênie. Assim, o interesse em usar esta técnica para a propagação de plantas medicinais e aromáticas aumentou significativamente (Dode *et al.*, 2003).

A proliferação *in vitro* de plantas, a partir da cultura de gemas e/ou meristemas é basicamente uma extensão da propagação vegetativa aplicada em grande número de plantas herbáceas e lenhosas, sendo geralmente o mais rápido, eficiente e confiável método de micropropagação (Pereira *et al.*, 2003).

A cultura *in vitro* pode potencializar a produção de substâncias químicas de alto valor e pode ser utilizada para a obtenção de plantas



geneticamente uniformes, que podem ser fonte para preparações farmacêuticas menos variáveis (Bolta *et al.*, 2000; Diniz *et al.*, 2004).

Plantas medicinais cultivadas por longos períodos e submetidas a várias podas apresentam declínio na produção de princípios ativos ou de óleos essenciais. Assim, a renovação e re-introdução de plantas jovens são imprescindíveis para a manutenção da alta produtividade de suas substâncias medicinais e cultivo economicamente viável (Pereira *et al.*, 2003).

O uso de reguladores de crescimento nas diferentes fases do processo pode ser considerado como essencial para a realização de cultivos *in vitro*. A presença de reguladores de crescimento no meio de cultura propiciou amplo avanço das técnicas que constituem a biotecnologia atual. O uso de citocinina e auxina pode ser muito favorável na fase de multiplicação, sendo o tipo e a concentração os principais fatores que influenciam no processo (Souza *et al.*, 2003).

O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial de espécies do gênero *Alternanthera*, respectivamente representado pela *Alternanthera brasiliana* L., *Alternanthera dentata* Moench. e *Alternanthera philoxeroides* Mart., quanto à capacidade de estabelecimento e multiplicação *in vitro*, bem como, quanto a aclimatização das plantas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de Botânica do Instituto de biologia da Universidade Federal de Pelotas, durante os anos de 2005 e 2006.

### Material vegetal

Foram utilizadas plantas adultas das espécies *Alternanthera dentata*, *A. brasiliana* e *A. philoxeroides*, coletadas respectivamente em Joinville/SC (abril de 2006), Frederico Westphalen/RS (fevereiro de 2005) e Rio Grande/RS (junho de 2006), estabelecidas como mudas em casa-de-vegetação com umidade relativa de aproximadamente 80% e temperatura controlada de 25 – 30°C, em vasos de polietileno com capacidade de cinco litros, onde permaneceram. O material para o estabelecimento *in vitro* foi coletado logo após o plantio das mudas na casa-de-vegetação.

### Estabelecimento *in vitro*

Um exemplar de cada um dos três genótipos foi estabelecido *in vitro*. Para etapa de estabelecimento *in vitro* foram utilizados segmentos nodais de brotações novas contendo duas gemas axilares. As brotações retiradas das plantas foram levadas para o laboratório, selecionadas, sendo suas folhas removidas. Posteriormente, na câmara de fluxo laminar, o material foi imerso em álcool 70% por 20 segundos e colocado em hipoclorito de sódio 1% com três gotas de tween por 20 minutos, permanecendo sob agitação mecânica por

15 minutos. Decorrido este período, foi enxaguado três vezes com água estéril na câmara de fluxo laminar, imerso em álcool 70% por 20 segundos e enxaguado com água estéril novamente, para posterior inoculação no meio de cultivo.

Realizada a desinfestação, foram seccionados 15 segmentos nodais de aproximadamente 1,0 cm contendo duas gemas. Estes explantes foram inoculados individualmente, em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio, constituído da concentração de sais e vitaminas do meio MS (Murashige & Skoog, 1962), adicionado de 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 7 g L<sup>-1</sup> de ágar, sendo o pH ajustado para 5,8 antes da adição do ágar. Os 15 tubos de ensaio contendo os explantes, foram acondicionados em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, permanecendo por três dias no escuro e, após, transferidos para luz, sob densidade de fluxo de fótons de 48 µmoles m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas, permanecendo sob estas condições por um período de 30 dias.

### **Multiplicação *in vitro* de *A. brasiliensis***

Considerando que somente a *A. brasiliensis* apresentou problemas de desenvolvimento *in vitro*, durante o estabelecimento, a mesma foi escolhida para os estudos de estabelecimento de um protocolo eficiente de micropropagação.

Explantes oriundos das plantas pré-estabelecidas foram utilizados como material inicial na etapa de multiplicação *in vitro*.

O meio de cultura utilizado foi o MS (Murashige & Skoog, 1962), com 7,0 g L<sup>-1</sup> de ágar, pH ajustado para 5,8, antes da adição do ágar, e suplementado com diferentes combinações de BAP (6-benzilaminopurina) (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mg L<sup>-1</sup>) e ANA (ácido α-naftaleno acético) (0,0 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>), constituindo os tratamentos (Tabela 1). O meio foi distribuídos em frascos de 250 ml e autoclavados a 1,5 atm e temperatura de 121°C por 20 minutos. Os frascos com os explantes foram colocados em sala de incubação, onde permaneceram por 30 dias sob fotoperíodo de 16 horas, densidade de fluxo de fótons de 48 µmoles m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e temperatura de 25 ± 2°C.

**Tabela 1-** Combinações de ANA e BAP testadas na multiplicação *in vitro* de *Alternanthera brasiliana*, representadas pelos tratamentos T1 a T2

| Tratamentos | ANA mg L <sup>-1</sup> | BAP mg L <sup>-1</sup> |
|-------------|------------------------|------------------------|
| <b>T1</b>   | 0,0                    | 0,0                    |
| <b>T2</b>   | 0,0                    | 0,5                    |
| <b>T3</b>   | 0,0                    | 1,0                    |
| <b>T4</b>   | 0,0                    | 1,5                    |
| <b>T5</b>   | 0,0                    | 2,0                    |
| <b>T6</b>   | 0,0                    | 2,5                    |
| <b>T7</b>   | 1,0                    | 0,0                    |
| <b>T8</b>   | 1,0                    | 0,5                    |
| <b>T9</b>   | 1,0                    | 1,0                    |
| <b>T10</b>  | 1,0                    | 1,5                    |
| <b>T11</b>  | 1,0                    | 2,0                    |
| <b>T12</b>  | 1,0                    | 2,5                    |

No final do período de cultivo foram avaliados: os valores médios para comprimento da parte aérea, número de brotos, número de entrenós, número de gemas, número de raízes, massa seca e fresca da raiz e comprimento das mesmas.

A massa fresca e seca média da raiz foi medida em balança semi-analítica. Para avaliação da massa seca, o material vegetal permaneceu em estufa a uma temperatura média de 70° C, onde permaneceu até adquirir massa constante.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x6, sendo seis concentrações de BAP e duas concentrações de ANA no meio de cultura, totalizando 12 tratamentos. Cada tratamento constou de 10 repetições, sendo cada uma representada por um frasco contendo três explantes. Os resultados dos tratamentos foram comparados estatisticamente, submetendo-os à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, através do pacote estatístico SANEST – Sistema de Análise Estatística (Zonta & Machado, 1984).

## **Aclimatização das plantas**

Para a aclimatização, plantas oriundas dos melhores tratamentos *in vitro* foram transferidas para solo e mantidas em casa-de-vegetação.

Após 30 dias foi avaliada a média das seguintes variáveis: comprimento da parte aérea, número de folhas, número de entrenós, número de gemas, número de brotos, número de raízes, comprimento das raízes, massa fresca e seca da parte aérea e da raiz e a percentagem de sobrevivência. As medidas de massa foram realizadas conforme descrito anteriormente.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado totalizando dois tratamentos. Cada tratamento constou de 10 repetições e os resultados dos tratamentos foram comparados estatisticamente, submetendo-os à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, através do pacote estatístico SANEST – Sistema de Análise Estatística (Zonta & Machado, 1984).

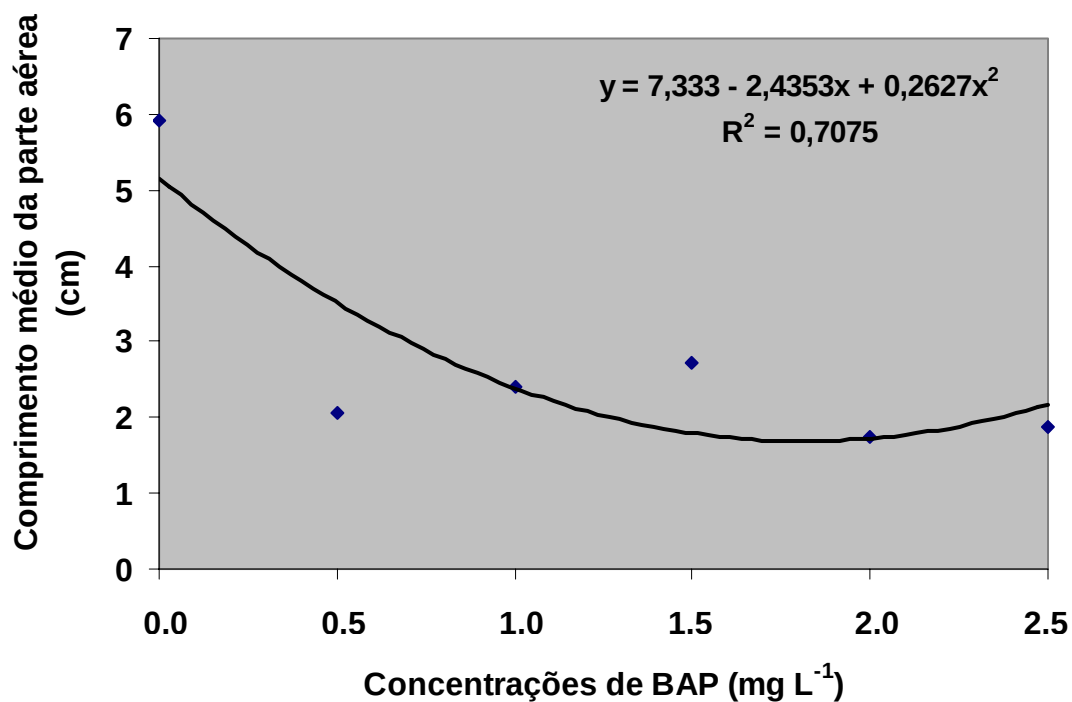
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Estabelecimento *in vitro*

As plantas de *A. dentata* e *A. philoxeroides* apresentaram 100% de sobrevivência na fase de estabelecimento, demonstrando um bom desenvolvimento *in vitro* em meio MS sem a adição de fitorreguladores, desenvolvendo parte aérea e sistema radicular satisfatoriamente. Porém, as plantas da espécie *A. brasiliiana* não formaram raízes e brotos capazes de permitir um desenvolvimento normal para a sua manutenção *in vitro*, sendo então a espécie utilizada para a continuidade dos experimentos de multiplicação.

### Comprimento médio da parte aérea

Os melhores resultados referentes ao comprimento médio da parte aérea das plantas de *A. brasiliiana* foram obtidos em meio MS sem a adição de BAP e ANA e em meio MS adicionado de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA (Figuras 1 e 2 e Tabela 2, respectivamente). Não houve interação significativa entre os fatores analisados, porém, obteve-se diferenças significativas entre as concentrações de BAP (Figura 1) e ANA (Tabela 2), consideradas separadamente. Assim, o valor máximo foi obtido no tratamento sem adição de BAP, 5,93 cm de comprimento (Figura 1), e 3,00 cm para as plantas desenvolvidas em meios contendo somente ANA (Tabela 2).

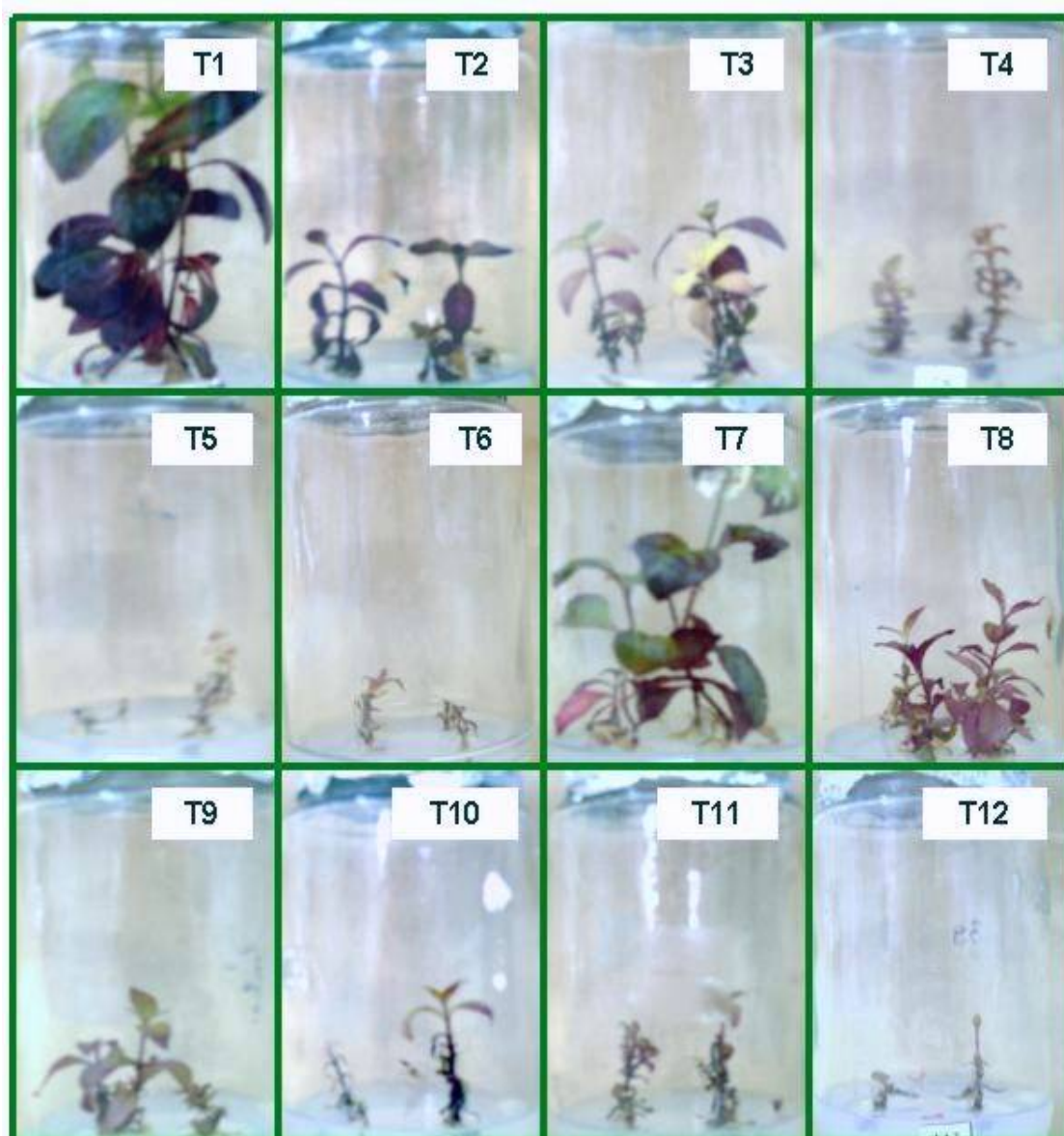


**Figura 1:** Comprimento médio da parte aérea (cm) de plantas de *A. brasiliana* desenvolvidas *in vitro* em meio MS durante 30 dias, submetidas a diferentes concentrações de BAP.

**Tabela 2:** Comprimento médio da parte aérea (cm) de plantas de *A. brasiliana* desenvolvidas *in vitro*, durante 30 dias, em meio MS com e sem a presença de ANA

| ANA (mg L <sup>-1</sup> ) | Comprimento médio da parte aérea (cm) |
|---------------------------|---------------------------------------|
| 0,0                       | 2,58 B                                |
| 1,0                       | 3,00 A                                |

\*Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey.



**Figura 2-** Detalhes das plantas de *Alternanthera brasiliana* nos frascos após 30 dias de cultivo *in vitro* nos tratamentos: T1(0,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 0,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP); T2. (0,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP); T3 (0,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP); T4 (0,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP); T5 (0,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP); T6 (0,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP); T7 (1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 0,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP); T8 (1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP); T9 (1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP); T10 (1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP); T11 (1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP); T12 (1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP).



Resultados semelhantes foram obtidos por Rubin *et al.* (2006), com *Thymus vulgaris* L., em que o maior comprimento médio (5,50 cm) foi obtida no tratamento com 0,25 mg L<sup>-1</sup> de ANA sem adição de BAP, evidenciando que a presença de BAP provocou uma diminuição do alongamento da parte aérea e o emprego de ANA sem a adição de BAP foi favorável ao aumento da mesma. Beduhn (2005), também constatou que, para *Mentha piperita* L., o comprimento médio da parte aérea atingiu maiores proporções (8,0 cm) com 0,25 mg L<sup>-1</sup> de ANA e ausência de BAP.

Semelhantemente, Lu (2005), em *Vitis thunbergii* Sieb. et Zucc., observou que a melhor concentração de ANA para o alongamento das brotações foi 0,5 mg L<sup>-1</sup>, com maior média de 5,1 cm. Da mesma forma, Paiva *et al.* (1988), trabalhando com *Strelitzia reginae* Banks, verificaram que concentrações superiores a 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP foram prejudiciais ao crescimento da parte aérea e a ausência deste regulador determinou os melhores resultados.

Os resultados obtidos neste trabalho, para esta variável, também encontraram correspondência aos resultados obtidos por Lin *et al.* (2003), na micropropagação de *Polygonum multiflorum* THUNB, uma planta medicinal, onde 88 a 100% dos brotos apresentaram maior comprimento médio da parte aérea em MS complementado com ANA ou ácido indolil-3-butírico (AIB). De forma semelhante, mas com o emprego de ácido indolilacético (AIA) ao invés de ANA, Han *et al.* (2004), em estudo com *Lilium longiflorum* Georgia, uma planta ornamental, obtiveram maior média para o comprimento da parte aérea (3,6 cm) com 0,05 mg L<sup>-1</sup> de AIA.

Nadeem *et al.* (2000) obtiveram maior média (10 cm) para o comprimento da parte aérea de *Podophyllum hexandrum* Royle., uma importante erva medicinal, em meio MS suplementado com 0,09 mg L<sup>-1</sup> de AIA. Beduhn (2005) observou que em relação a esta mesma variável, para plantas de *Melissa officinalis* L., cultivadas *in vitro*, a presença do BAP não teve efeito significativo, sendo que a maior média (2,78 cm) foi obtida em meio MS na ausência de fitorreguladores. Juliani *et al.* (1999), em estudos com *Lippia junelliana* (Mold.) Tronc., uma espécie medicinal, também obtiveram maior média para o comprimento da parte aérea (8,5 cm) em MS na ausência de fitorreguladores.

Por outro lado, o maior comprimento médio da parte aérea (0,32 cm) de *Lychnophora pinaster* Mart., uma medicinal, foi obtido com concentrações baixas de BAP ( $0,07 \text{ mg L}^{-1}$ ), sendo que, o comprimento médio das plantas decrescia com o aumento nas doses deste regulador (Souza *et al.*, 2003). Estes resultados apóiam os resultados obtidos para esta variável neste trabalho, pois, conforme Lane (1979); Leshem *et al.* (1988) e Grattapaglia & Machado (1998), as citocininas utilizadas durante a fase de propagação *in vitro*, de forma geral, promovem formação de partes aéreas, mas seu excesso pode ser tóxico e levar ao encurtamento dos entrenós.

Segundo Dodds & Roberts (1999), suplementos de auxina-citocinina são necessários na regulação da divisão celular, alongamento celular, diferenciação celular e formação de órgãos. Contudo, conforme Lane & Dougald (1982), Torres *et al.* (1998) e Taiz & Zeiger (2004), a interação entre as citocininas e as auxinas endógenas dos tecidos são necessárias para o crescimento da parte aérea *in vivo*, com promoção da divisão e alongamento celular. Porém, segundo os mesmos autores, o tecido pode apresentar autonomia na síntese de auxinas e citocininas, podendo a aplicação exógena gerar um desbalanço interno entre estes fitorreguladores ocasionando efeito tóxico sobre a formação e crescimento dos mesmos.

Conforme Santos (2003), os efeitos decorridos do balanço entre os diferentes hormônios de crescimento sobre o desenvolvimento *in vitro* dependem do genótipo testado, tornando necessário o estudo individualizado para cada espécie ou cultivar.

### **Número médio de brotos**

O maior número médio de brotos (5,50 brotos por planta) foi obtido no tratamento contendo  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP sem a adição de ANA (Tabela 3). Observou-se que a adição de ANA não apresentou efeito significativo sobre esta variável.

**Tabela 3:** Número médio de brotos formados por plantas de *A. brasiliiana* desenvolvidas *in vitro* em meio MS, durante 30 dias, sob diferentes combinações de BAP e ANA

| Concentrações de ANA (mg L <sup>-1</sup> ) | Concentrações de BAP (mg L <sup>-1</sup> ) |         |         |         |         |         |
|--------------------------------------------|--------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
|                                            | 0,0                                        | 0,5     | 1,0     | 1,5     | 2,0     | 2,5     |
| 0,0                                        | 1,37 aB                                    | 1,86 aB | 1,80 aB | 1,07 aB | 5,50 aA | 1,00 bB |
| 1,0                                        | 1,30 aA                                    | 2,12 aA | 1,20 aA | 1,30 aA | 1,00 bA | 2,20 aA |

\*Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não apresentam diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey.

O resultado obtido para esta variável é semelhante ao obtido por Beduhn (2005) na multiplicação *in vitro* de *Melissa officinalis*, onde foi obtido melhores resultados para o número médio de brotos utilizando somente 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP como regulador, com 3,99 brotos por explante. Hiregoudar *et al.* (2003) na micropropagação de *Feronia limonia* (L.) Swingle, planta de importância medicinal, obtiveram o melhor resultado, com um número médio de 11 brotos por explante em meio MS suplementado com 1,0 mg de L<sup>-1</sup> BAP. Resultado semelhante também foi observado no cultivo *in vitro* de *Cynara scolymus* L., onde o valor máximo para o número de brotações foi de 5,0 em meio MS com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, decaindo com a diminuição da concentração (Brutti *et al.*, 2000). Lal *et al.* (1988) obtiveram maior número médio de brotos durante a propagação de *Picrorhiza kurroa* Royle ex Benth., uma planta medicinal, usando 1,0 a 5,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, resultados estes não diferem do obtido no presente trabalho para a variável em questão, no entanto, demonstram uma maior flexibilidade e adaptabilidade da espécie *Picrorhiza kurroa* para doses variáveis e consideravelmente altas de BAP.

As citocininas são utilizadas para superação da dominância apical dos brotos e aumento da taxa de multiplicação. Desse modo, ocorre um grande número de brotações por meio do crescimento de meristemas laterais. As citocininas e auxinas endógenas do tecido vegetal apresentam efeito sinérgico na indução da divisão e diferenciação celular para o crescimento da planta, formação de seus órgãos e reconstituição de seus tecidos. O balanço interno de auxinas e citocininas constitui-se fator determinante na diferenciação celular e tipos de tecidos e órgãos formados. Se a proporção de auxina para citocinina aumenta, há a tendência de ocorrer maior formação de raízes, contudo, se a proporção de auxina para citocinina diminui, há a

tendência de ocorrer maior formação de brotos; porém, se for intermediária, há maior tendência de formação de calo. (Torres *et al.*, 1998; Taiz & Zeiger, 2004; Villa *et al.*, 2005).

### Número médio de entrenós

A combinação de 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA determinou um aumento significativo do número médio de entrenós por planta (5,33), contudo, não se observou diferença significativa entre as médias das demais combinações (Tabela 4).

**Tabela 4-** Número médio de entrenós formados por plantas de *A. brasiliiana* mantidas *in vitro* durante 30 dias sob diferentes combinações de BAP e ANA

| Concentrações de ANA (mg L <sup>-1</sup> ) | Concentrações de BAP (mg L <sup>-1</sup> ) |         |        |         |         |         |
|--------------------------------------------|--------------------------------------------|---------|--------|---------|---------|---------|
|                                            | 0                                          | 0.5     | 1      | 1.5     | 2       | 2.5     |
| 0                                          | 3,05 aA                                    | 3,75 aA | 4,8 aA | 3,8 aA  | 4,5 aA  | 3,05 bA |
| 1                                          | 3,75 aA                                    | 4,8 aA  | 3,8 aA | 4,45 aA | 4,25 aA | 5,33 aA |

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Resultado semelhante foi obtido por Souza (2004) no cultivo *in vitro* de *Matricaria chamomilla* L., que obteve maior produção de segmentos nodais com a adição de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,05 mg L<sup>-1</sup> de ANA ou na ausência deste (média de 18,16 e de 19,7 respectivamente).

A resposta *in vitro* depende do tipo de explante utilizado e das condições fisiológicas dos mesmos, bem como do genótipo. Assim, Al-Bahrany (2002) e Carvalho *et al.*, (2004a) obtiveram maior número de brotos e segmentos nodais em *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing e *Agave palmari* Engelm empregando meio MS e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 1,0 mg L<sup>-1</sup> de cinetina e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA, respectivamente. Na multiplicação *in vitro* de *Cattleya x mesquittae*, Ramos & Carneiro (2005) constataram que a adição de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP proporcionou um incremento de 40% na multiplicação. Porém, o uso de ambos os fitorreguladores (0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA + 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP) proporcionou a formação de brotações menores e mais robustas.

Beduhn (2005), no cultivo *in vitro* de *Melissa officinalis* e *Mentha piperita*, observou um padrão de resultado diferenciado ao apresentado neste trabalho. O desenvolvimento de brotos e segmentos nodais (10,53 para *Melissa officinalis* e 5,75 para *Mentha piperita*) foi melhor com o emprego de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP no meio de cultura na ausência de ANA. Da mesma forma, na multiplicação de *Averrhoa bilimbi* L. (Oliveira *et al.*, 2001) e na multiplicação de *Vitis thunbergi*, (Lu, 2005), obtiveram os melhores resultados com a adição de 1,0 mg L<sup>-1</sup> (8,50 segmentos nodais) e de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP (14,7 segmentos nodais) no meio de cultura, respectivamente.

Segundo Torres *et al.*, (1998) e Taiz & Zeiger (2004), a citocinina adicionada ao meio de cultura está relacionada à formação da parte aérea de plantas, com maior formação de brotos, segmentos nodais e gemas adventícias, sendo que doses mais elevadas podem ser tóxicas e impedir o desenvolvimento da planta. Segundo esses autores, a presença de citocinina no meio de cultura, principalmente em concentrações mais elevadas, pode acarretar o encurtamento dos entrenós e aumentar o seu número, juntamente com o número de gemas.

### Número médio de gemas

A adição de 1,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP na ausência de ANA gerou o maior número médio de gemas (12,87). No entanto, a adição de ANA manteve as médias altas e estáveis, mesmo nas concentrações mais elevadas de BAP (2,0 e 2,5 mg L<sup>-1</sup>) (Tabela 5).

**Tabela 5:** Número médio de gemas formadas por planta de *A. brasiliiana* desenvolvida *in vitro* em meio MS, durante 30 dias, sob diferentes combinações de BAP e ANA

| Concentrações de ANA (mg L <sup>-1</sup> ) | Concentrações de BAP (mg L <sup>-1</sup> ) |          |         |          |         |          |
|--------------------------------------------|--------------------------------------------|----------|---------|----------|---------|----------|
|                                            | 0,0                                        | 0,5      | 1,0     | 1,5      | 2,0     | 2,5      |
| 0,0                                        | 8,85 aB                                    | 9,91 aAB | 6,50 aB | 12,87 aA | 2,50 bC | 5,50 bBC |
| 1,0                                        | 8,55 aA                                    | 9,43 aA  | 7,10 aA | 9,05 bA  | 7,75 aA | 9,40 aA  |

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não apresentam diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey

Diniz *et al.* (2004), trabalhando com *Heliconia stricta* Huber, obtiveram maior número médio de gemas (2,4) em meio MS suplementado com 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Semelhantemente, Naser *et al.* (2004) e Zolet (2006), em estudos com *Salvia fruticosa* Mil. e *Tagetes erecta* L., obtiveram maior número médio de gemas empregando apenas 0,17 mg L<sup>-1</sup> (15,38 gemas por planta) e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP (4,3 gemas por planta), respectivamente. Chaves *et al.* (2005), trabalhando com *Physalis peruviana* L., obtiveram maior número médio de gemas (7,69) em MS suplementado com 0,3 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

Segundo Chaves *et al.* (2005), a citocinina é indispensável na fase de multiplicação, induzindo a superação da dominância apical e a proliferação de gemas axilares. O efeito sinérgico das auxinas e citocininas sobre uma planta ou tecidos da mesmas, dependerá muito da sua interação com o genótipo em estudo (Hall, 1999;. Taiz & Zeiger, 2004). Neste experimento observou-se grande formação de gemas axilares e adventícias no tratamento contendo somente 1,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

### **Número médio de raízes**

A presença de ANA no meio de cultura, na ausência de BAP, favoreceu o desenvolvimento radicular das plantas (Figura 3 e Tabela 6). O número médio de raízes foi superior nos tratamentos sem a adição de BAP, independente da presença de ANA (Tabela 6). Nos demais tratamentos nos quais foi adicionada citocinina, com ou sem ANA, o número de raízes foi muito baixo e não variou estatisticamente entre as concentrações empregadas. O ANA não reverteu o efeito negativo do BAP na formação de raízes, de modo que foram verificados valores médios reduzidos sempre que utilizadas combinações com BAP (Tabela 6).

**Tabela 6:** Número médio de raízes formadas por planta de *A. brasiliiana* desenvolvidas *in vitro*, durante 30 dias, sob diferentes combinações de BAP e ANA

| Concentrações de ANA (mg L <sup>-1</sup> ) | Concentrações de BAP (mg L <sup>-1</sup> ) |         |         |         |         |         |
|--------------------------------------------|--------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
|                                            | 0,0                                        | 0,5     | 1,0     | 1,5     | 2,0     | 2,5     |
| 0,0                                        | 7,00 aA                                    | 0,56 aB | 0,86 aB | 0,56 aB | 0,55 aB | 0,56 aB |
| 1,0                                        | 7,35 aA                                    | 0,94 aB | 0,58 aB | 0,66 aB | 0,53 aB | 0,90 aB |

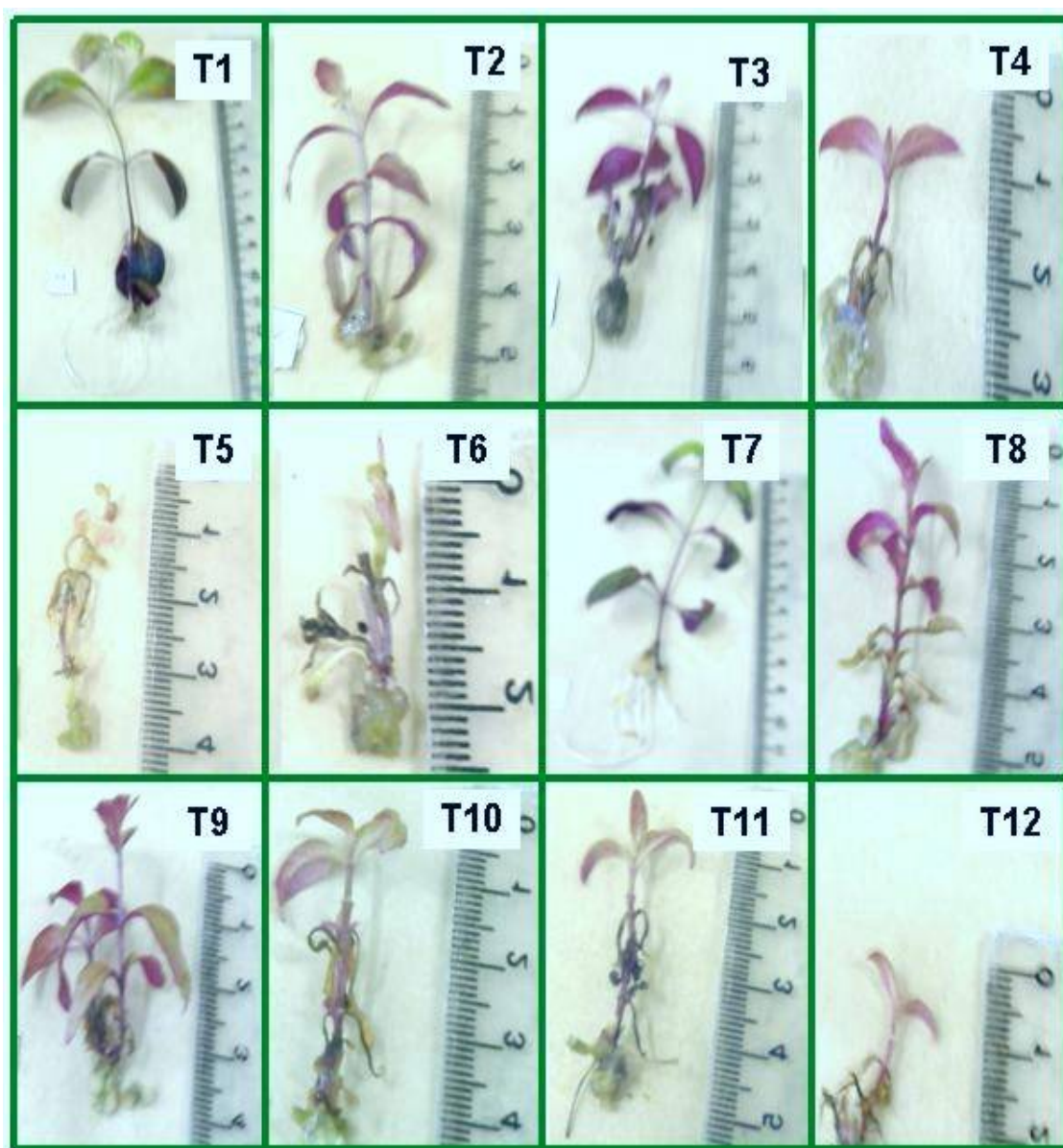
\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não apresentam diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey.

De forma semelhante, Hiregoudar *et al.* (2003), na micropropagação de *Feronia limonia*, obtiveram maior número médio de raízes por planta (7,6) em meio MS acrescido de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Porém, Brutti *et al.* (2000), na micropropagação de *Cynara scolymus* L., constataram maior formação de raízes por planta (3,6) quando adicionada maior concentração de ANA (3,0 mg L<sup>-1</sup>) em meio MS.

Semelhante ao obtido neste estudo para a variável número médio de raízes, Beduhn (2005), em estudos com *Mentha piperita*, cultivada *in vitro*, constatou o maior número médio de raízes (15,48) em meio contendo 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA sem a adição de BAP sendo que, quando empregada, houve redução significativa na formação de raízes. Também, em estudos com *Melissa officinalis*, este mesmo autor, relatou que a combinação entre ANA e BAP não apresentou influência significativa sobre o número de raízes. Dados condizentes aos obtidos neste trabalho também foram encontrados por Lu (2005), na micropropagação de *Vitis thunbergii*, uma erva medicinal, e por Rajkumar *et al.* (2006), na micropropagação da orquídea híbrida Ascocenda 'Kangla', com maior formação de raízes por explante, 8,3 e 3,5 respectivamente, em meio MS contendo 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Souza (2004), também obteve valores semelhantes, com o maior número médio de raízes por explante (4,8) de *Anthemis nobilis* L. em meio contendo 0,3 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Neste mesmo contexto, Malik *et al.* (2005) obtiveram maior número médio de raízes (2,47) em plantas de *Garcinia indica* (Thouars) Choisy cultivada *in vitro* utilizando meio de cultura com 2,03 mg L<sup>-1</sup> de AIB. De modo semelhante, Al-Bahrany (2002), na micropropagação de *Citrus aurantifolia*, obtiveram alto número de raízes (9,0 raízes por planta) no tratamento contendo 2,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB.

De maneira geral, as raízes são mais sensíveis as citocininas, mesmo em baixas doses, do que às auxinas. Baixas doses de auxina adicionadas ao meio de cultura induzem aumento na produção de raízes em plantas ou explantes, pois aumentam a razão endógena de auxina/citocinina nos tecidos. Contudo, doses mais elevadas de auxinas podem ser tóxicas à planta como um todo e mais ainda ao sistema radicular, que é mais sensível a estes fitorreguladores do que outros órgãos da planta. Assim, mesmo baixas doses de citocininas acrescidas ao meio de cultura podem ser prejudiciais ao enraizamento, com menor formação e alongamento das raízes, que são mais sensíveis às citocininas do que às auxinas (Rout *et al.*, 2000; Taiz & Zeiger, 2004; Rout *et al.*, 2006).





**Figura 3-** Detalhes das plantas de *Alternanthera brasiliana* após 30 dias de cultivo *in vitro* nos tratamentos: T1(0,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 0,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP); T2. (0,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP); T3 (0,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP); T4 (0,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP); T5 (0,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP); T6 (0,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP); T7 (1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 0,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP); T8 (1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP); T9 (1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP); T10 (1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP); T11 (1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP); T12 (1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP).

### Média da massa fresca e seca da raiz

Os teores médios de massa fresca e seca obtidos foram estatisticamente superiores nos tratamentos sem BAP, independente da presença ou ausência de ANA (Tabelas 7 e 8). Por outro lado, a presença de BAP, nas concentrações empregadas, afetou negativamente estas variáveis, não havendo diferença significativa entre elas.

**Tabela 7:** Massa fresca média das raízes formadas por planta de *A. brasiliana* desenvolvidas *in vitro* em meio MS, durante 30 dias, sob diferentes combinações de BAP e ANA

| Concentrações de ANA (mg L <sup>-1</sup> ) | Concentrações de BAP (mg L <sup>-1</sup> ) |         |         |         |         |         |
|--------------------------------------------|--------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
|                                            | 0,0                                        | 0,5     | 1,0     | 1,5     | 2,0     | 2,5     |
| 0,0                                        | 1,10 aA                                    | 0,26 aB | 0,42 aB | 0,26 aB | 0,26 aB | 0,26 aB |
| 1,0                                        | 1,20 aA                                    | 0,46 aB | 0,26 aB | 0,26 aB | 0,27 aB | 0,36 aB |

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não apresentam diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey.

**Tabela 8:** Massa seca média das raízes formadas por planta de *A. brasiliana* desenvolvidas *in vitro* em meio MS, durante 30 dias, sob diferentes combinações de BAP e ANA

| Concentrações de ANA (mg L <sup>-1</sup> ) | Concentrações de BAP (mg L <sup>-1</sup> ) |         |         |         |         |         |
|--------------------------------------------|--------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
|                                            | 0,0                                        | 0,5     | 1,0     | 1,5     | 2,0     | 2,5     |
| 0,0                                        | 0,74 aA                                    | 0,08 aB | 0,16 aB | 0,08 aB | 0,08 aB | 0,08 aB |
| 1,0                                        | 0,78 aA                                    | 0,18 aB | 0,08 aB | 0,08 aB | 0,08 aB | 0,13 aB |

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não apresentam diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey.

Na micropropagação de *Myriophyllum spicatum* L. (macrófita aquática), Zhou *et al.*, (2006) constataram que o meio MS acrescido de 0,2 mg L<sup>-1</sup> de ANA aumentou significativamente a indução, o número médio (em torno de 10 por planta), o comprimento médio (em torno de 13 cm) e a massa seca média (em torno de 4,5 mg) de raízes. De forma semelhante, Zhou *et al.*, (2006), para *Potamogeton crispus* L. (macrófita aquática), constataram que o meio MS sem fitorreguladores ou, com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA aumentou significativamente a indução, o número médio (em torno de 9 por planta), o comprimento médio (em torno de 21 cm) e a massa seca média (em torno de 2,0 mg) de raízes. .

Alguns autores utilizam outras auxinas para a indução do enraizamento. Assim, Malik *et al.*, (2005) empregaram 2,03 mg L<sup>-1</sup> de AIB para aumentar a produção de raízes em *Garcinia indica* cultivada *in vitro*. De forma semelhante, Sreekumar *et al.* (2000), na micropropagação de *Hemidesmus indicus* R. Br., constataram que o meio MS contendo 1,99 mg L<sup>-1</sup> de AIB foi o melhor para o enraizamento, melhorando a sobrevivência das plantas aclimatizadas, bem como, aumentando a biomassa da parte aérea e das raízes (13,5 g por planta) das plantas aclimatizadas, com satisfatória produção de raízes.

Segundo Giacometti (1999) e Taiz & Zeiger (2004), baixas doses de auxina induzem a formação de raízes e o aumento em sua biomassa. Isso, porque as auxinas, em associação com as citocininas endógenas do tecido da planta, promovem a indução da formação de meristemas radiculares, a continuação do desenvolvimento dos mesmos em raízes, bem como o crescimento das mesmas. O crescimento da raiz está intimamente relacionado às auxinas, que, além de promover a divisão celular nestes órgãos, juntamente com as citocininas, promovem o alongamento celular, com conseqüente produção de biomassa.

Desta forma, a adição de pequenas doses de auxinas em meio de cultura pode levar a um aumento da produção de raízes, pois a auxina exógena em baixas concentrações parece interagir de forma benéfica com as citocininas endógenas dos tecidos do explante, aumentando a proporção auxina/citocinina nos mesmos e induzindo um maior e melhor enraizamento (Gerrit & Baskin 2000; Rout *et al.*, 2000; Taiz & Zeiger, 2004; Rout *et al.*, 2006).

### **Comprimento médio das raízes**

Os valores médios obtidos referentes ao comprimento das raízes foram estatisticamente superiores nos tratamentos sem BAP, independente da presença ou ausência de ANA (Tabela 9). Por outro lado, a presença de BAP, nas concentrações empregadas, afetou negativamente esta variável.

**Tabela 9:** Comprimento médio de raízes formadas por plantas de *A. brasiliiana* desenvolvidas *in vitro* em meio MS, durante 30 dias, sob diferentes combinações de BAP e ANA

| Concentrações de ANA (mg L <sup>-1</sup> ) | Concentrações de BAP (mg L <sup>-1</sup> ) |         |         |         |         |         |
|--------------------------------------------|--------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
|                                            | 0,0                                        | 0,5     | 1,0     | 1,5     | 2,0     | 2,5     |
| 0,0                                        | 6,75 aA                                    | 0,82 bC | 2,50 aB | 0,56 aC | 0,57 aC | 0,64 bC |
| 1,0                                        | 6,42 aA                                    | 1,84 aB | 0,50 bC | 0,58 aC | 0,77 aC | 1,92 aB |

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não apresentam diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey.

De forma semelhante, Roy & Banerjee (2002), em estudos realizados *in vitro* com *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr., uma herbácea medicinal, obtiveram maior média (2,48 cm) para o comprimento médio das raízes em meio MS suplementado com 1mg L<sup>-1</sup> de ANA e ausência de BAP.

Dados condizentes aos obtidos neste trabalho também foram encontrados por Lu (2005), na micropropagação de *Vitis thunbergii*, e por Rajkumar *et al.* (2006), na micropropagação da orquídea híbrida Ascocenda 'Kangla', com maior comprimento médio das raízes, 3,3 e 1,7 cm respectivamente, obtido em meio MS suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Al-Bahrany (2002), na micropropagação de *Citrus aurantifolia*, obtiveram o melhor alongamento das raízes (4,8 cm) em meio contendo 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA ou AIB.

Resultado semelhante ao obtido neste trabalho, porém com outra auxina, foi obtido por Malik *et al.* (2005), na propagação *in vitro* de *Garcinia indica*, uma importante planta medicinal, em que o maior comprimento das raízes (5,88 cm) foi obtido com 2,03 mg L<sup>-1</sup> de AIB.

Nair & Seeni (2001), na micropropagação de *Celastrus paniculatus* Willd. ssp. *paniculatus* (Celastraceae), também obtiveram resultado semelhante ao encontrado neste experimento. Os autores verificaram que o melhor meio para o enraizamento e maior comprimento médio (2.41 cm) da raiz foi o MS contendo 1,0 mg L<sup>-1</sup> de AIA. Segundo os autores, o emprego deste fitorregulador na concentração citada foi ideal também para a aclimatização, a qual apresentou uma percentagem de sobrevivência de 84%.

Segundo Beemster & Baskin (2000), as auxinas promovem a divisão e o alongamento celular em caules e raízes, contudo, a sensibilidade destes órgãos são diferenciadas a este fitorregulador, sendo que, as raízes são mais

sensíveis às auxinas do que a parte aérea. A sensibilidade de um determinado órgão de uma planta qualquer a diferentes doses de um determinado fitorregulador também depende do genótipo da mesma, mas de maneira geral, doses consideradas baixas de auxinas aumentam o alongamento das raízes e, doses consideradas mais elevadas de auxinas induzem a formação de etileno nos tecidos das raízes. A consequência da produção de etileno na raiz, é o seu menor alongamento e sua maior espessura, com diminuição da formação de raízes secundárias e maior formação de pêlos absorventes.

### **Aclimatização**

Foram utilizadas, para a etapa de aclimatização, plantas cultivadas *in vitro*, tanto na ausência como na presença de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA sem a adição de BAP, T1 e T7 respectivamente. Esta escolha se deve ao fato das plantas pertencentes a estes tratamentos terem demonstrado melhores condições de formação e crescimento da parte aérea e raiz.

Os resultados da aclimatização revelaram existir uma uniformidade entre o crescimento e desenvolvimento das plantas aclimatizadas dos dois tratamentos. Houve diferença significativa entre as médias de duas variáveis (número médio de raízes e número médio de brotos) (Tabela 10). As plantas oriundas do meio MS (T1), apresentaram número médio de brotos significativamente maior do que as plantas provenientes do meio MS +  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA (T7). Porém, as plantas de T7 apresentaram número médio de raízes significativamente superior às plantas de T1.

**Tabela 10:** Parâmetros de crescimento analisados após 30 dias de aclimatização de plantas de *A. brasiliana* cultivadas *in vitro*

| Variáveis                   | Tratamentos |         |
|-----------------------------|-------------|---------|
|                             | T1          | T7      |
| Altura                      | 16,47 A     | 14,76 A |
| Nº. de folhas               | 14,88 A     | 13,01 A |
| Nº. de entrenós             | 7,11 A      | 7,01 A  |
| Nº. de gemas                | 14,04 A     | 12,26 A |
| Nº. de brotos               | 2,61 A      | 1,80 B  |
| Nº. de raízes               | 39,17 B     | 48,87 A |
| Comprimento da raiz         | 11,17 A     | 10,85 A |
| Massa fresca da parte aérea | 2,44 A      | 1,96 A  |
| Massa fresca da raiz        | 0,51 A      | 0,45 A  |
| Massa seca da parte aérea   | 0,27 A      | 0,22 A  |
| Massa seca da raiz          | 0,03 A      | 0,06 A  |

\*Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey. T1 (plantas provenientes do cultivo em meio MS sem fitorreguladores); T7 (plantas provenientes do cultivo em meio MS + 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA).

As auxinas são hormônios de crescimento implicados em inúmeros processos de desenvolvimento, incluindo a inibição de raízes laterais; diferenciação do tecido vascular, estabelecimento da dominância apical e respostas trópicas (Davies, 1995). Muitas das respostas às auxinas resultam de mudanças na expansão e divisão celular, mas essas respostas podem variar em diferentes tecidos. Por exemplo, a auxina promove a divisão celular de células do periciclo que leva à formação de raízes laterais (Laskowski *et al.*, 1995), mas inibe a divisão celular em meristemas laterais de brotos, resultando em dominância apical (Hilman, 1984).

Segundo Taiz & Zeiger (2004), as auxinas em concentrações fisiológicas são essenciais para o crescimento da planta, tanto da parte aérea quanto da raiz. Se utilizada em baixas concentrações no cultivo *in vitro*, a auxina pode induzir um maior número e comprimento de raízes, contudo, atua aumentando a dominância apical e diminuindo o número de brotações secundárias. Esse fenômeno pode ser observado na aclimatização das plantas, constatando-se o efeito residual da auxina aumentando o número de raízes e diminuindo o número de brotações.

Conforme Torres *et al.* (1998) e Taiz & Zeiger (2004), auxinas em baixas concentrações induzem a um melhor crescimento e formação do sistema radicular, aumentando a sua massa fresca e seca. Neste trabalho, observou-se

o efeito das auxinas na promoção de maior número de raízes nas plantas *in vitro* e este mesmo efeito continuado nestas plantas durante a aclimatização.

Na micropropagação de *Feronia limonia*, uma planta medicinal, Hiregoudar *et al.* (2003), observaram melhor enraizamento das plantas (83,3%), com 7,16 raízes por explante, em meio MS suplementado com 0,18 mg L<sup>-1</sup> de ANA, sendo que, este tratamento favoreceu a aclimatização das plantas em solo.

Lu (2005) na micropropagação de *Vitis thunbergii*, obteve maior enraizamento (100%) em meio MS contendo 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA, com formação de 8,3 raízes por explante. O emprego da referida dose de ANA foi benéfica para a aclimatização das plantas em solo, com 95% de sobrevivência. Também Li *et al.* (2003), na micropropagação de *Helianthemum songaricum* Schrenk, obtiveram maior de enraizamento (76 %) em MS ½ contendo 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA. O emprego da referida dose de ANA foi benéfica para a aclimatização das plantas em solo, com 67% de sobrevivência.

De forma semelhante, Martin (2003), na micropropagação de *Rotula aquatica* Lour, uma planta aromática e medicinal, obteve melhores resultados no enraizamento (5,6 raízes por explante) e posterior aclimatização das plantas empregando meio MS suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Plantas cultivadas no meio citado apresentaram uma sobrevivência de 80 % durante a fase de aclimatização.

Roy & Banerjee (2002), na micropropagação de *Geodorum densiflorum*, uma herbácea ornamental e medicinal, obtiveram alta percentagem de enraizamento (83,9%), maior comprimento das raízes (2,48 cm) e maior médio de brotos em plantas cultivadas em 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA, sendo que, as plantas provenientes deste tratamento, demonstraram melhor aclimatização, com 60% de sobrevivência.

## CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos neste trabalho e nas condições em que foram realizados os experimentos, é possível concluir que:

Existem diferenças fisiológicas entre as espécies de *Alternanthera* spp. quanto à capacidade de estabelecimento *in vitro*.

A adição de BAP aumenta a taxa de multiplicação de brotos, gemas e entrenós de *Alternanthera brasiliana*.

A ausência de BAP nos meios de cultura, com ou sem ANA, favorece o crescimento e desenvolvimento de plantas de *Alternanthera brasiliana* para posterior aclimatização.

Plantas de *Alternanthera brasiliana* desenvolvidas em meios sem BAP apresentam altas taxas de aclimatização.

O cultivo em meio MS sem a adição de fitorreguladores é suficiente para a micropropagação de *Alternanthera brasiliana*, por ser mais econômico e por proporcionar plantas com satisfatório crescimento e desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular.



## **CAPÍTULO II**

### **ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM PLANTAS DO GÊNERO *Alternanthera* COM MARCADORES MOLECULARES DO TIPO RAPD**

#### **INTRODUÇÃO**

Biodiversidade refere-se à variação dentro do mundo vivo, enquanto diversidade genética representa a variação de hereditariedade dentro e entre populações de organismos e, neste contexto, entre espécies de plantas. Este *pool* de variação genética dentro de uma população com fecundação cruzada é a base para seleção e também para o melhoramento de plantas. Assim, a conservação da diversidade genética de plantas é essencial para o presente e futuro bem-estar humano. Para isso, a ênfase atual é entender a distribuição e extensão disponível da diversidade genética em espécies de plantas, de forma que a diversidade genética possa ser seguramente conservada e eficazmente usada (Rao & Rodgkin, 2002).

Nodari & Guerra (2004) associaram o conceito de diversidade à variação genética existente em dada espécie, propondo a heterozigosidade esperada como medida para quantificar a diversidade. Esse conceito possibilita a associação dos mecanismos microevolutivos à idéia de variação dentro das espécies e, portanto, relaciona a quantificação da diversidade ao processo evolutivo.

A extensão da distribuição da diversidade genética em espécies de plantas depende de sua evolução em determinados sistemas ecológicos e geográficos, de fatores de seleção e, freqüentemente, de muitos fatores

humanos. Muito da grande quantidade da diversidade em espécies pode ser encontrada dentro de populações individuais, ou dividida entre várias populações diferentes. Entender melhor a diversidade genética e sua distribuição é essencial para sua conservação e uso, ajudando a determinar o que, como e onde conservar, melhorando a compreensão de taxonomia, origem e evolução de qualquer espécie de planta de interesse e seus parentes selvagens (Rao & Rodgkin, 2002).

A análise da diversidade pode ser feita com o uso de marcadores genéticos, ou seja, características que permitem detectar diferenças entre dois ou mais indivíduos ou organismos. Do ponto de vista molecular, um marcador genético (ou *loco* marcador) serve para identificar um local ou uma região de um cromossomo (Nodari & Guerra, 2004).

Dentre os marcadores genéticos estão os marcadores moleculares, baseados na análise direta do DNA, a exemplo da técnica de RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*) que tem sido demonstrada ser efetiva na distinção de gêneros, espécies e cultivares (Hosoki *et al.*, 1997).

Na técnica de RAPD um oligonucleotídeo iniciador ou *primer* é usado em uma reação em cadeia da polimerase (PCR), amplificando sucessões de DNA fortuitas. Os fragmentos amplificados são separados por eletroforese em géis de agarose, para posterior registro dos perfis de DNA (Willians *et al.*, 1990). Estes perfis podem ser usados para estudar variação genética e identificar genes específicos, na identificação de espécies, subespécie e variedades, tendo como principal vantagem o fato de não requerer informação prévia do genoma (Xu *et al.*, 2002).

Polimorfismos das técnicas baseados em PCR resultam da variação de seqüência dos *primers*, os quais se ligam em suas seqüências complementares a diferentes distâncias sobre a fita de DNA molde (Barcaccia *et al.*, 2003).

RAPD é um simples, efetivo e barato método de obtenção de marcadores polimórficos baseados em PCR com *primers* arbitrários, amplificando uma parte dos segmentos de DNA aleatoriamente distribuídos pelo genoma (Carvalho *et al.*, 2004b).

A caracterização de germoplasma vegetal com técnicas moleculares tem um papel crescente e importante na administração e utilização de recursos genéticos de plantas. Há muitos marcadores de DNA polimórficos disponíveis

para identificação e proteção de genótipos. O tempo requerido para a obtenção destes marcadores depende do tipo de ensaio ou técnica (RAPD, AFLP, marcadores de microssatélite, etc.), que deve ser adequado ao estudo que se queira realizar (Xu *et al.*, 2002).

Desde o seu desenvolvimento, a análise molecular com a técnica de RAPD foi usada para estudar o polimorfismo, em análise de *fingerprinting* e, também, correlacionar estes dados com o modo de reprodução (vegetativa, autopolinização, partenogênese de haploidia, ou fertilização cruzada) (Smelcerovic *et al.*, 2006).

Marcadores do tipo RAPD mostraram-se totalmente úteis no estudo da genética de muitas espécies de plantas, como *Myracrodruon urundeuva* F.F. et M.F. (Reis & Grattapaglia, 2004), *Brassica campestris* L. (Cao *et al.*, 2005), *Ananas comosus* L. Merr. (Kato *et al.*, 2004), *Malus x domestica* Borkh (Royo & Itoiz, 2004). *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. (Venkatachalam & Priya, 2004), *Cunila galioides* Benth (Fracaro *et al.*, 2005), *Ocimum* spp. (Vieira *et al.*, 2003) e *Alternanthera philoxeroides* Mart. (Wang *et al.*, 2005).

RAPD é um marcador dominante, de rápida implementação em laboratório, independe de variações ambientais, portanto pode ser utilizado para análise de polimorfismo em qualquer fase de desenvolvimento do material vegetal (Rasul *et al.*, 2007).

Diferenças de apenas um par de bases (mutações de ponto) são suficientes para causar a não complementaridade do primer com o sítio de iniciação de um segmento. Outras fontes de polimorfismo podem incluir deleções de sítios de iniciação adjacentes a uma distância acima daquela que a DNA polimerase é capaz de percorrer. Assim, o polimorfismo genético detectado pelos marcadores RAPD tem natureza binária, isto é, o segmento amplificado está presente ou ausente no gel (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Baseado no exposto, o objetivo deste trabalho foi verificar por marcadores do tipo RAPD a possível existência de variabilidade entre plantas de *Alternanthera brasiliensis*, oriundas de 10 diferentes localidades da Região Sul do Brasil, e avaliar o potencial da técnica em detectar variabilidade intra e interespecífica de *Alternanthera dentata* Moench. Stuchilik, *Alternanthera philoxeroides* Mart. Griseb, *Alternanthera brasiliensis* L. Kuntz var. *brasiliensis*,

*Alternanthera Tenella* Colla, Mem., *Alternanthera sessilis* L. DC.e *Altenanthera* spp. provenientes de diferentes locais do Brasil.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Local de realização do experimento**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas, do Departamento de Botânica, no Instituto de Biologia, da Universidade Federal de Pelotas (LCTP/DB/IB/UFPel), no ano de 2006.

### **Fonte do material vegetal**

As plantas provenientes das diferentes localidades (Tabela 1 e 2) foram plantadas em vasos com capacidade de cinco litros, utilizando-se o substrato Plantmax<sup>®</sup>, e cultivadas em casa-de-vegetação com umidade relativa de aproximadamente 80% e temperatura controlada de 25 – 30 °C, onde permaneceram de dois a 12 meses até o início do experimento, sendo mantidas nestas condições durante e mesmo após o término do mesmo. Na Figura 1 é apresentado detalhes das plantas na casa-de-vegetação, as quais foram utilizadas em dois diferentes experimentos.

Para a extração de DNA, as amostras foram coletadas em tubos de polipropileno (2 mL). Aproximadamente 150 mg de folhas jovens (último par de folhas expandidas) dos genótipos em estudo foram coletadas e armazenadas em ultrafreezer à –80 °C, até o processamento das amostras, pelo protocolo de extração.



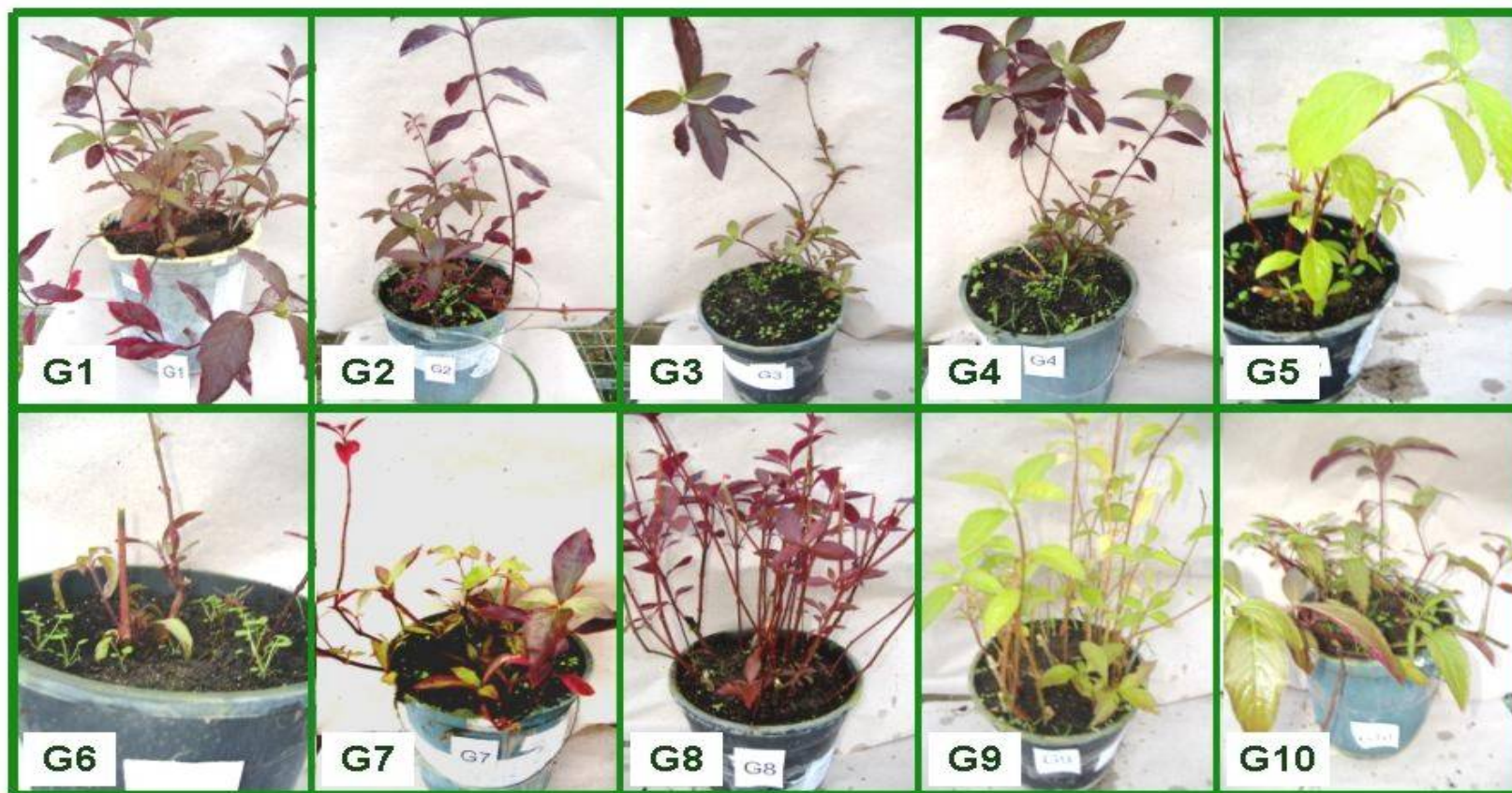
**Figura 1-** Plantas de *Alternanthera* spp. mantidas na casa-de-vegetação.

## Experimento I: Verificação da existência de variabilidade genética entre plantas de *Alternanthera brasiliana*

Para este experimento foi utilizado um exemplar de cada genótipo (todos de origem clonal diferente) de *Alternanthera brasiliana* oriundas de várias localidades, conforme apresentado na Tabela 1, Figuras 2 e 3, que foram submetidos à análise molecular com a técnica de RAPD.

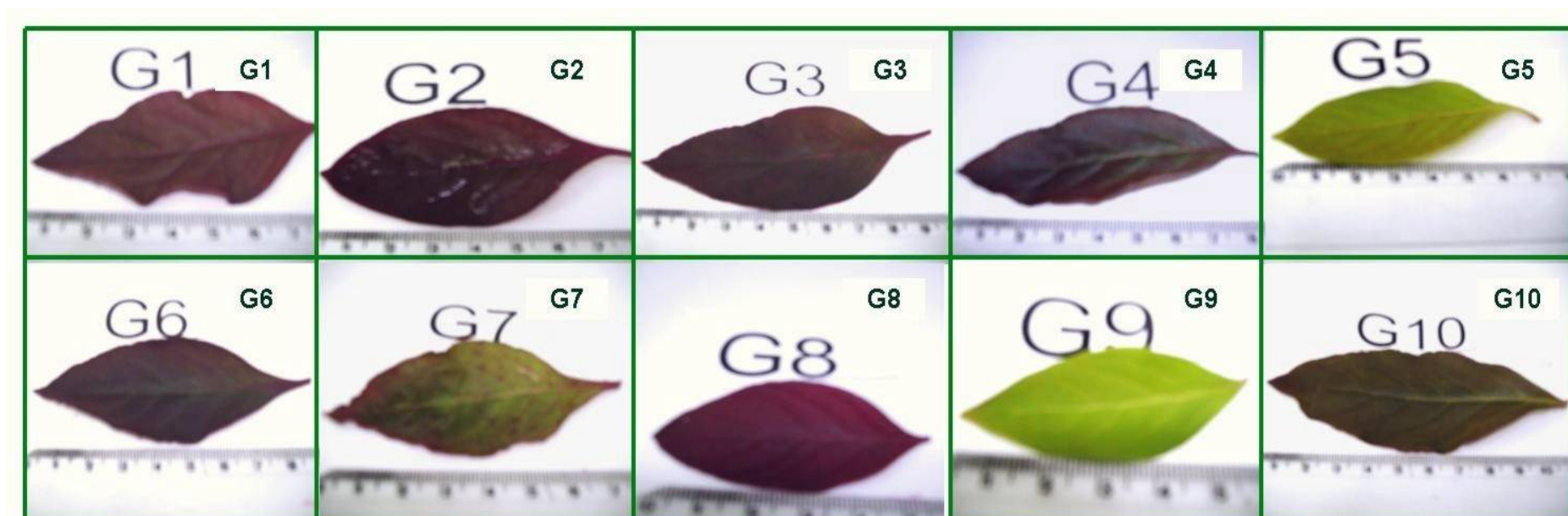
**Tabela 1-** Plantas de *Alternanthera brasiliana* oriundas de diferentes locais de coleta na Região Sul do Brasil

| Genótipos | Locais de coleta | Ponto de coleta                                           | Data de coleta    |
|-----------|------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------|
| G1        | Caiçara/RS       | No centro da cidade em jardim                             | Maio de 2006      |
| G2        | Porto Alegre/RS  | Em horto na Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul     | Outubro de 2005   |
| G3        | Porto Alegre/RS  | Em vaso na Faculdade de Agronomia                         | Junho de 2006     |
| G4        | Passo Fundo/RS   | Em borda de Mata                                          | Agosto de 2006    |
| G5        | Água Santa/RS    | Coletado em borda de mata                                 | Agosto de 2006    |
| G6        | Santa Maria/RS   | Em horto na Universidade de Santa Maria (UFSM)            | Julho de 2006     |
| G7        | Joinville/SC     | Em horto na Universidade de Joinville Univille (Univille) | Abril de 2006     |
| G8        | Joinville/SC     | Coletada em jardim na cidade                              | Julho de 2006     |
| G9        | Palhoça/SC       | Em praia de restinga                                      | Julho de 2006     |
| G10       | Curitiba/PR      | Em canteiro no centro da cidade                           | Fevereiro de 2005 |



**Figura 2** – Detalhes das plantas de *Alternanthera brasiliana* mantidas em casa-de-vegetação, onde se pode verificar as diferenças morfológicas entre os genótipos de *Alternanthera brasiliana* provenientes de diferentes localidades: G1 (Caiçara/RS); G2 (Porto Alegre/RS - Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul); G3 (Porto Alegre/RS-Faculdade de Agronomia); G4 (Passo Fundo/RS); G5 (Água Santa/RS); G6 (Santa Maria/RS); G7 (Joinville/SC - Univille); G8 (Joinville/SC); G9 (Palhoça/SC); G10 (Curitiba/PR).





**Figura 3** – Detalhes das folhas de *Alternanthera brasiliana*, onde observa-se diferenças morfológicas entre os genótipos: G1 (Caiçara/RS); G2 (Porto Alegre/RS - Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul); G3 (Porto Alegre/RS-Faculdade de Agronomia); G4 (Passo Fundo/RS); G5 (Água Santa/RS); G6 (Santa Maria/RS); G7 (Joinville/SC - Univille); G8 (Joinville/SC); G9 (Palhoça/SC); G10 (Curitiba/PR).

## Experimento II: Avaliação da similaridade genética entre espécies do gênero *Alternanthera* spp.

Para a realização deste experimento foi empregado um genótipo de *Alternanthera* sp., *A. Brasiliana* e de *A. Sessilis*, dois genótipos de *A. tenella* e, três genótipos de *A. dentata* e de *A. philoxeroides*. Foram utilizados exemplares (de origem clonal diferente) de *Alternanthera* spp. provenientes de diferentes localidades do Brasil, conforme apresentado na Tabela 2 e Figura 4, os quais foram submetidos à análise de RAPD.

**Tabela 2-** Plantas do gênero *Alternanthera* spp. oriundas de diferentes locais de coleta da região sul do Brasil, utilizadas na análise de similaridade genética

| Genótipos | Espécie                      | Locais de coleta                                      | Município        | Data de coleta  |
|-----------|------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------|-----------------|
| G1        | <i>A. brasiliana</i>         | Em vaso na Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul  | Porto Alegre/RS  | Outubro de 2005 |
| G2        | <i>Alternanthera</i> sp.     | Praia de restinga                                     | Palhoça/SC       | Julho de 2006   |
| G3        | <i>A. dentata</i>            | Em horto na Farmácia Natureza                         | Florianópolis/SC | Abril de 2006   |
| G4        | <i>A. dentata</i>            | Em horto na Universidade de Joinville (Univille)      | Joinville/SC     | Abril de 2006   |
| G5        | <i>A. dentata</i>            | Em horto na Universidade do Vale do Itajaí (Univale)  | Tubarão/SC       | Abril de 2006   |
| G6        | <i>A. philoxeroides</i>      | Em canal de irrigação de arroz                        | Rio Grande/RS    | Junho de 2006   |
| G7        | <i>A. philoxeroides</i>      | Em gramado na Universidade Federal de Pelotas (UFPel) | Pelotas/RS       | Agosto de 2006  |
| G8        | <i>A. philoxeroides</i>      | Em gramado na Universidade de Passo Fundo (UPF)       | Passo Fundo/RS   | Agosto de 2006  |
| G9        | <i>A. tenella</i>            | Em borda de mata em Passo Fundo                       | Passo Fundo/RS   | Agosto de 2006  |
| G10       | <i>A. sessilis</i>           | Em viveiro em Majé Rio de Janeiro                     | Majé/RJ          | Agosto de 2006  |
| G11       | <i>Alternanthera tenella</i> | Em viveiro em Majé Rio de Janeiro                     | Majé/RJ          | Agosto de 2006  |



**Figura 4-** Plantas representantes de cada espécie de *Alternanthera* spp.; G1 (*A. Brasiliana* – Porto Alegre/RS, Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul); G2 (*Alternanthera* sp – Palhoça/SC); G3 (*A. dentata* – Florianópolis/SC); G4 (*A. Dentata* – Joinville/SC); G5 (*A. Dentata* – Tubarão/SC); G6 (*A. Philoxeroides* - Rio Grande/RS); G7 (*A. Philoxeroides* – Pelotas/RS); G8 (*A. Philoxeroides* – Passo Fundo/RS); G9 (*A. Tenella* – Passo Fundo/RS); G10 (*A. sessilis* - Majé/RJ) G11 (*Alternanthera tenella* - Majé/RJ).

## Extração de DNA

Para ambos os experimentos (I e II), o DNA genômico foi extraído de folhas, previamente isoladas, utilizando o método CTAB 2% (1% de  $\beta$ -mercaptanol), conforme descrito por Doyle & Doyle (1987). Cerca de 100 mg de cada amostra foi macerada em cadinho contendo nitrogênio líquido e, logo após, transferidas para tubos de micro centrífuga, de 2 mL, onde foi adicionado 900  $\mu$ L de tampão de extração e agitados por 5 min, seguida da incubação em banho-maria a 65 °C por 45 min. Após as amostras terem atingindo a temperatura ambiente, foi adicionado igual volume (900  $\mu$ L) de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), agitando por 5 min. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a uma velocidade de 12.000 rpm por 10 min; aproximadamente 700  $\mu$ L do sobrenadante foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL. Em seguida, foi adicionado igual volume (700  $\mu$ L) de etanol gelado (-20 °C) e as amostras foram gentilmente agitadas até a visualização do *pellet*. As amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 rpm por 8 min. para precipitação do DNA e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 500  $\mu$ L de tampão de lavagem por 20 min. O material ficou em câmara de fluxo laminar exposto à temperatura ambiente até a completa evaporação do tampão de lavagem. O *pellet* foi ressuspenso com 100  $\mu$ L de TE pH 8,0 contendo RNase (10  $\mu$ L mL<sup>-1</sup>) e incubado a 37 °C por 1 h. Foi realizada uma segunda etapa de extração, onde foi acrescentado 400  $\mu$ L de CTAB 2% e após homogeneizada a solução foi acrescentado 700  $\mu$ L de C:IA, repetindo todo o processo de centrifugação e purificação do DNA, conforme descrito acima, sendo que o *pellet* final foi diluído em tampão TE pH 8,0.

A quantificação do DNA foi realizada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, comparando a intensidade das bandas com marcador de DNA  $\lambda$ /Hind III, na concentração de 0,5  $\mu$ g  $\mu$ L<sup>-1</sup>. Posteriormente, diluiu-se uma amostra de trabalho com água MilliQ estéril para a concentração de 10ng  $\mu$ L<sup>-1</sup>, para ser utilizado na reação de PCR.

## **Amplificação do DNA pela técnica de RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*)**

Inicialmente foram realizadas reações de PCR para o *screening* de alguns *primers* com *Alternanthera brasiliana* (exemplar coletado em Passo Fundo) utilizando *primers* da Operon kit OPX (01 a 20). Porém, ao longo do experimento foi empregado número significativo de *primers* de outros Kits da Operon sem a realização prévia de *screening* dos mesmos. Os *primers* foram selecionados em função da nitidez e número das bandas amplificadas.

**No experimento I**, para a *A. brasiliana* foram empregados 27 *primers* decâmeros dos kits da Operon: **OPA** (01, 07), **OPB** (01, 04, 06, 08, 18 e 20), **OPAC** (16 e 19), **OPAF11**, **OPF07**, **OPI07** e **OPX** (01, 04, 06, 07, 08, 09, 11, 13, 16, 17, 18, 20); e da British Columbia University – **UBC** (53 e 410).

**No experimento II**, na análise das diferentes espécies do gênero *Alternanthera*, foram empregados 31 *primers* decâmeros dos kits da Operon: **OPA** (01, 03, 04, 05, 07, 08), **OPB** (01, 04, 06, 10, 11, 18, 19, 20), **OPAC19**; **OPF** (07, 11), **OPI07** e **OPX** (01, 04, 06, 07, 08, 09, 11, 13, 16, 18 e 20); e da British Columbia University – **UBC** (53 e 410). As reações de amplificação foram conduzidas em um aparelho termociclador de marca MJ Research, Inc., modelo PTC-100 (*Programmable Thermal Controller*) com o seguinte perfil térmico: o primeiro ciclo de 94°C por 150 s, 36°C por 30 s e 72°C por 2 min.; segundo ciclo repetido por 19 vezes, a 94°C por 20 s, 36°C por 15 s, 45°C por 15 s e 72°C por 120s.; o terceiro ciclo repetido por 18 vezes, a 94°C por 30 s, 36°C por 15 s, 45°C por 45 s e 72°C por 120 s, e para finalizar um único ciclo de 72°C por 10 min. As reações foram realizadas em tubos de polipropileno de 0,2 mL e o mix para as reações de PCR tiveram um volume final de 25 µL contendo: 2,5 µL de Tampão 10x, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 180 µM de dNTPs, 1,2 µM de primer, 1U de *Taq* DNA polimerase e 20 ng de DNA genômico. Para evitar a evaporação durante os ciclos do PCR, foi adicionada uma gota de óleo mineral em cada tubo de reação.

A reprodutibilidade dos produtos de amplificação foi testada por duas vezes utilizando DNA proveniente de duas extrações distintas para cada um dos genótipos analisados.

Os fragmentos de DNA amplificados com *primers* de RAPD foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5%, a 4V cm<sup>-1</sup> por cerca de 90 min. Após a corrida eletroforética o gel foi submetido a um banho de brometo de etídio (5 µg mL<sup>-1</sup>) durante 30 min. Posteriormente, o gel foi visualizado na luz ultravioleta usando o sistema de fotodocumentação modelo E-BOX-100 – marca Vilber Lourmat.

### **Análise dos dados**

Os fragmentos das reações de PCR foram ranquiados como presentes (1) e ausentes (0), formando uma matriz de dados binários. Para o cálculo da similaridade genética, foi utilizado o coeficiente de Dice (Nei & Li, 1979). Com base na matriz de similaridade, a análise de agrupamento foi realizada pelo método das distâncias genéticas médias (UPGMA – Unweighted Pair-Group Method With Arithmetic Means) para posterior elaboração do dendrograma com auxílio do software NTSYSpc versão 2.1 (Rohlf, 2000). Os dados de agrupamento foram utilizados para o cálculo de uma matriz cofenética, afim de verificar a representatividade do dendrograma em relação aos dados de similaridade, medido pelo coeficiente de correlação “r”. Além disso, com a utilização do programa computacional Winboot (Yap & Nelson, 1996), a matriz com os dados binários foram utilizados para a análise de *Bootstrapping* (com 1000 replicações), buscando inferir a confiança de cada agrupamento representado graficamente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

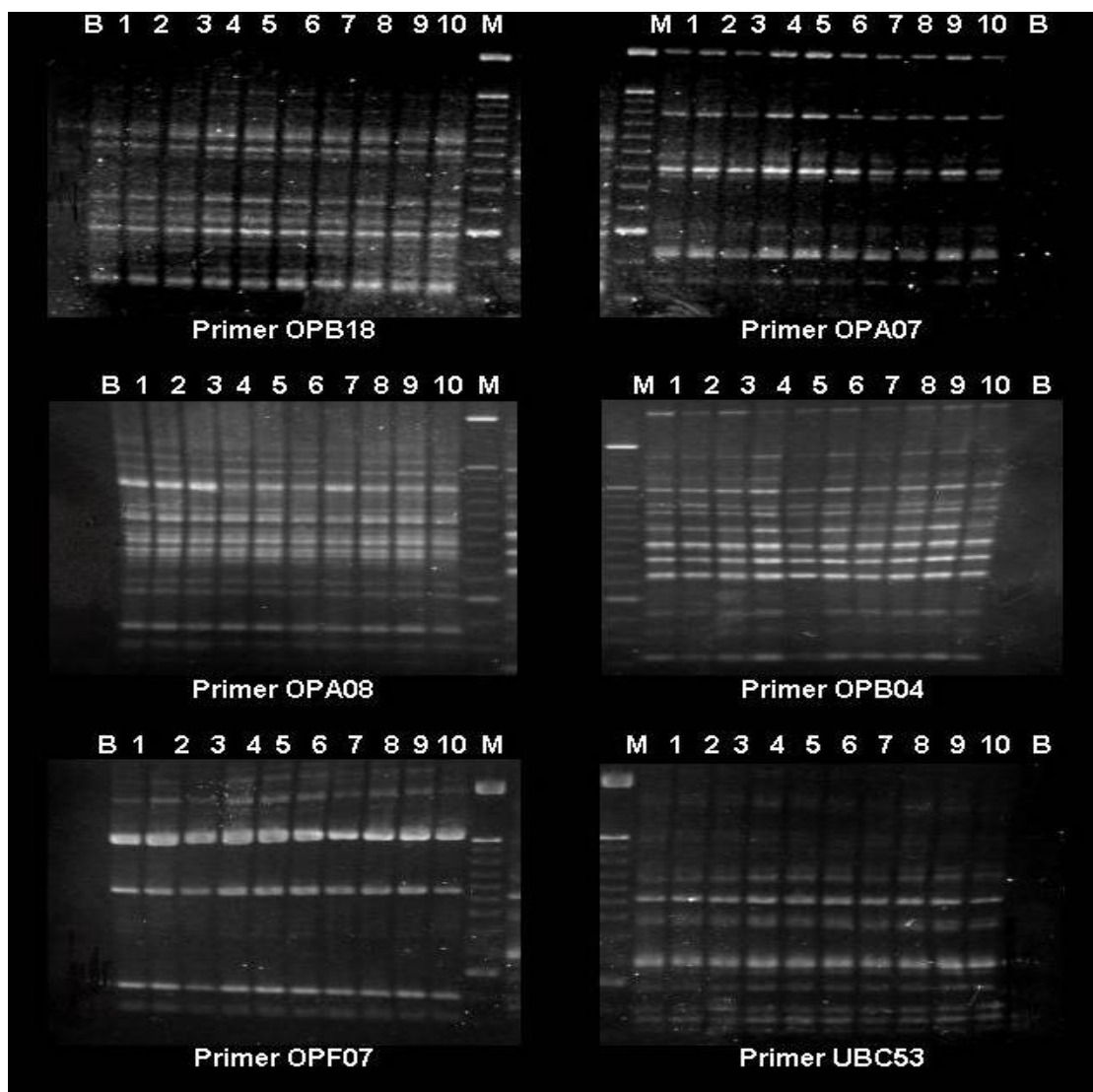
### **Experimento I: Verificação da existência de variabilidade genética entre plantas de *Alternanthera brasiliana***

Os 27 *primers* RAPD utilizados produziram um total de 280 bandas que foram 100% monomórficas, ou seja, não detectaram polimorfismo entre os 10 genótipos de *A. brasiliana* provenientes das diferentes localidades (Figura 5).

Resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho foram encontrados por Wang *et al.* (2005), que estudaram a variabilidade genética entre sete populações de *Alternanthera philoxeroides* introduzidas na China, onde são consideradas plantas invasoras e daninhas, sendo que não encontraram nenhum polimorfismo entre estas populações empregando 28 *primers* de RAPD e 23 de ISSR.

Outros autores obtiveram resultados semelhantes, porém com a obtenção de muito baixa variabilidade intraespecífica. Como exemplo cita-se o trabalho de Oiki *et al.* (2001), que avaliaram a variabilidade genética entre nove populações de *Campânula microdonta* Koidz., herbáceas endêmicas da ilha de Izu (Japão), através de marcadores RAPD, detectando polimorfismo pelo menos em uma população. Dhar *et al.*, (2006), que estudaram a similaridade genética entre 15 acessos de *Withania somnifera* Dunal. através da técnica de AFLP, constataram que os acessos eram muito semelhantes, agrupando todos juntos. Semelhantemente, Galderisi *et al.* (1999) realizaram análise de *fingerprinting*, com a técnica de RAPD, em seis cultivares de avelã (*Corylus avellana* hazelnut) difundidas na região de Campania (Sul da Itália). Os cultivares foram distinguidos com sucesso, porém observaram muito baixa variabilidade genética entre os genótipos analisados.





**Figura 5**– Produtos da amplificação com marcadores do tipo RADP em exemplares de *Alternanthera brasiliiana* gerados pelos *primers* OPB18, OPA07, OPA08, OPB04, OPF07 e UBC53, respectivamente, onde observa-se completo monomorfismo entre os genótipo. B – amostra em branco (sem adição de DNA); M – DNA Ladder 100pb. As numerações de 1 a 10 referem-se aos genótipos: G1 (Caiçara/RS); G2 (Porto Alegre/RS - Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul); G3 (Porto Alegre/RS-Faculdade de Agronomia); G4 (Passo Fundo/RS); G5 (Água Santa/RS); G6 (Santa Maria/RS); G7 (Joinville/SC - Univille); G8 (Joinville/SC); G9 (Palhoça/SC); G10 (Curitiba/PR).

Resultados bem divergentes aos do presente trabalho foram obtidos por Gavidia *et al.* (1996), que com a utilização de marcadores RAPD, diferenciaram indivíduos em uma população da planta medicinal *Digitalis obscura* L., obtendo 60% de marcadores polimórficos. De forma semelhante, porém obtendo um polimorfismo consideravelmente maior, Jamnadass *et al.* (2005) encontraram variabilidade genética entre populações de *Sesbania sesban* L., uma

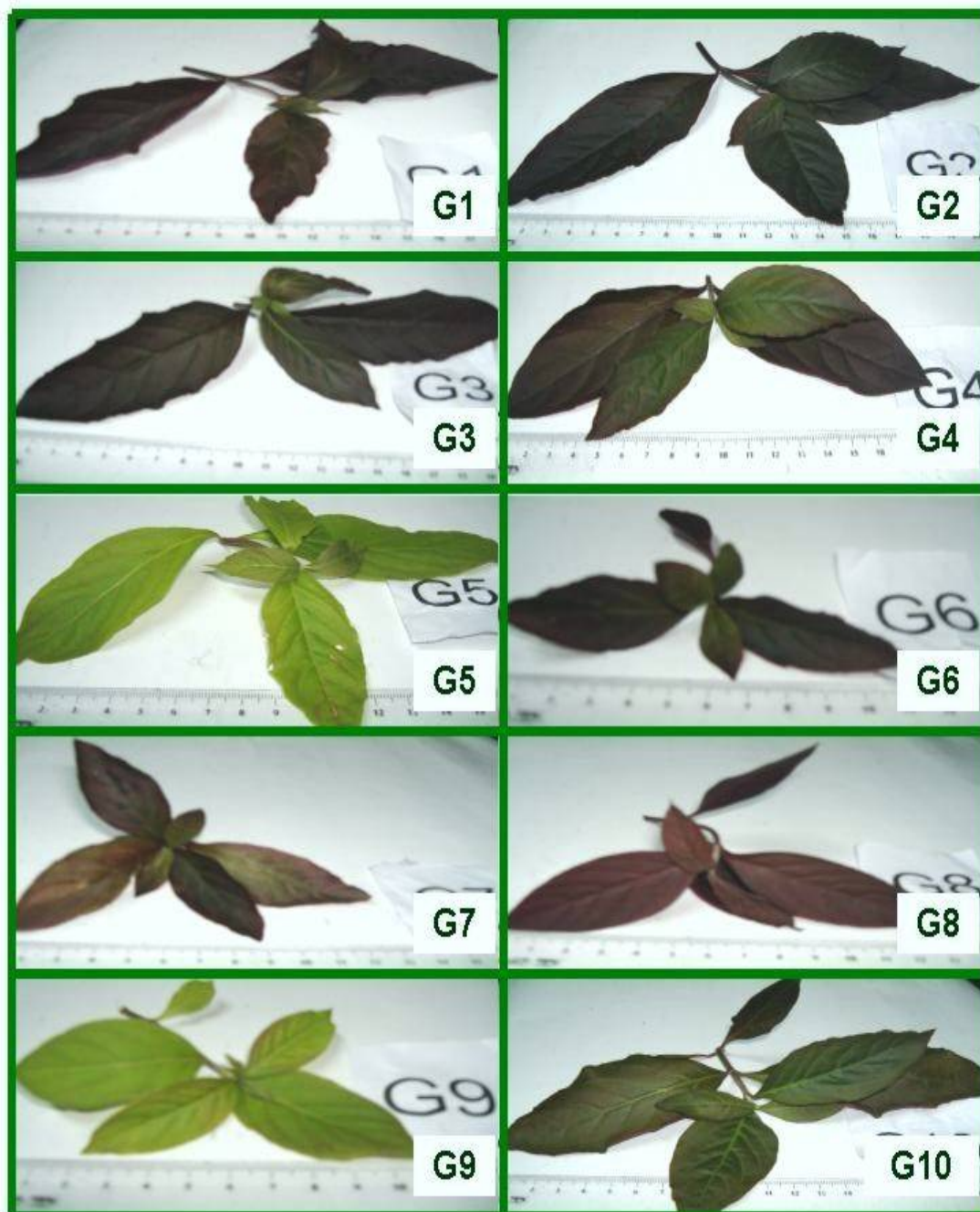


leguminosa empregada na melhoria da fertilidade do solo, utilizando marcadores RAPD constataram 70% de variação entre as populações. Anuntalabhochai *et al.*, (2007) diferenciaram 24 variedades de *Curcuma alismatifolia* Gagnep., uma planta ornamental, utilizando marcadores RAPD.

Considerando os resultados obtidos neste trabalho e, fundamentando-se no descrito por Nass (2001), a realização deste experimento foi importante, mesmo não se encontrando polimorfismo entre as plantas de *A. brasiliiana* oriundas dos diferentes locais de coleta no sul do Brasil. Pela importância do conhecimento da distribuição da variabilidade genética, entre e dentro dos grupos de acessos, é essencial para a adoção de estratégias eficientes para conservação de germoplasma em condições *ex situ* e *in situ*.

A não detecção de polimorfismo entre os diferentes acessos pode estar relacionada à baixa taxa de fecundação cruzada dentro da espécie, uma vez que se trata de uma planta autógama, e sendo assim, possivelmente existe alto grau de homozigose dentro da espécie. Entretanto, considerando que existem diferenças fenotípicas entre os acessos analisados, como observado no tamanho das folhas e na coloração dos caules e folhas (Figuras 3 e 6), isso leva a sugerir que a técnica de RAPD não foi eficiente para detectar o polimorfismo ao nível de DNA.

Com este resultado, verifica-se que o emprego de um maior número de *primers* RAPD ou de outro sistema de marcadores moleculares, com maior potencial de revelar polimorfismo, como AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), seja opção viável para detectar o polimorfismo ao nível molecular entre as plantas desta espécie, conseqüentemente, facilitando a discriminação de genótipos de diferentes procedências e, a identificação dos mesmos para a seleção dos detentores de variabilidade intraespecífica significativa, de modo a compor um banco de germoplasma mais representativo da espécie.



**Figura 6-** Diferenças morfológicas em folhas de plantas de *Alternanthera brasiliensis*: G1 (Caiçara/RS); G2 (Porto Alegre/RS - Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul); G3 (Porto Alegre/RS-Faculdade de Agronomia); G4 (Passo Fundo/RS); G5 (Água Santa/RS); G6 (Santa Maria/RS); G7 (Joinville/SC - Univille); G8 (Joinville/SC); G9 (Palhoça/SC); G10 (Curitiba/PR).

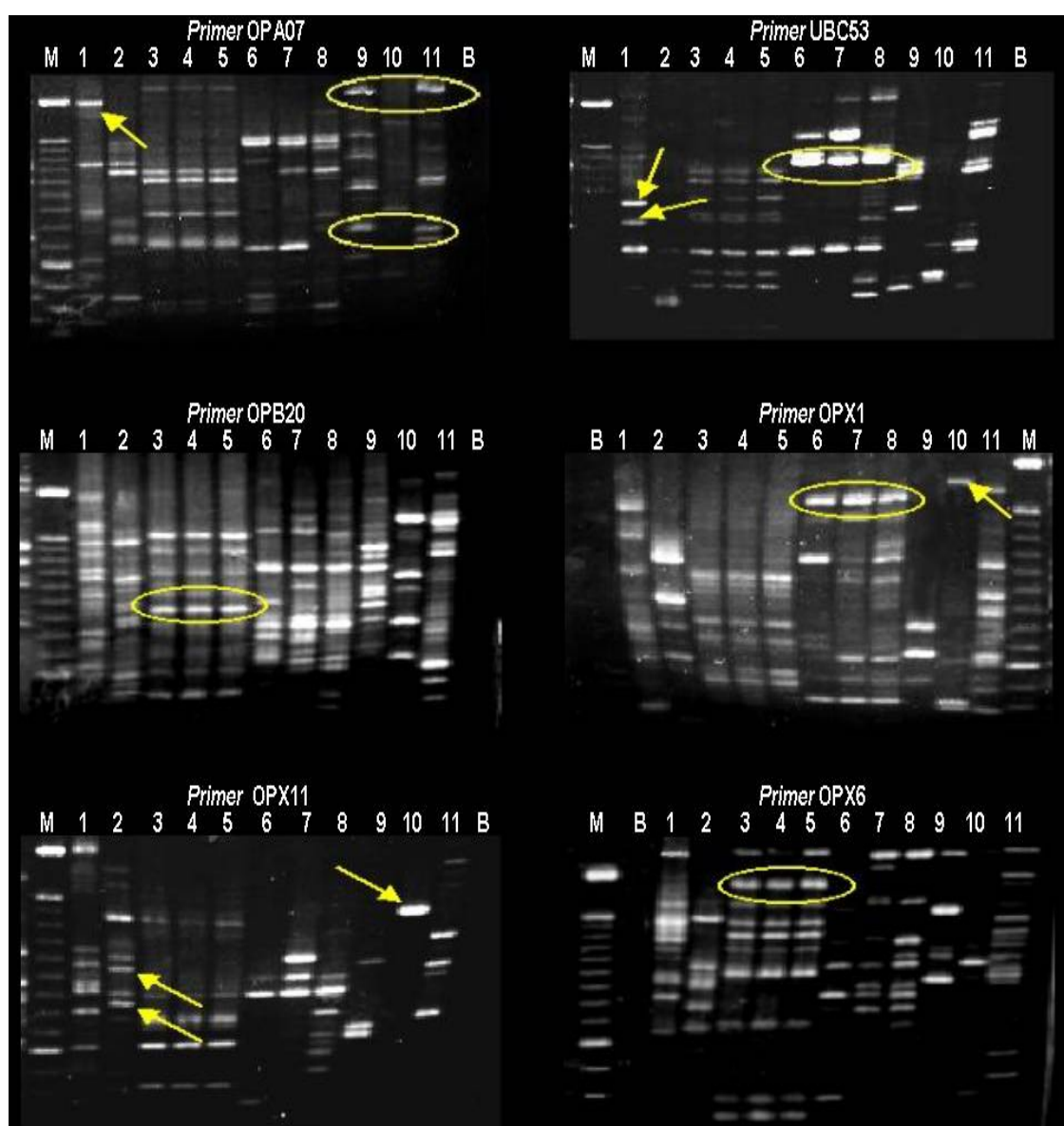
## Experimento II: Avaliação da similaridade genética entre espécies do gênero *Alternanthera* spp.

Dos 31 *primers* RAPD utilizados, todos apresentaram polimorfismo, mas apenas 14 foram considerados para o cálculo de similaridade genética entre os acessos: **OPA** (01, 04, 07), **OPB** (04, 10, 18, 20), **OPI** (07), **OPX** (01, 06, 11 e 20), **UBC** (53 e 410). Estes *primers* foram selecionados por apresentarem maior nitidez e número das bandas amplificadas. Os 14 *primers* RAPD utilizados detectaram 364 bandas (perfis) nos 11 genótipos analisados. Destas, 360 bandas, 99% foram polimórficas. O número de bandas por *primer* variou de 16 (OPA4 e OPX20) a 37 (OPB18) (Tabela 3). Dos 14 *primers* analisados todos amplificaram mais de uma banda por genótipo, com exceção do *primer* UBC410, que não amplificou nenhuma banda para o genótipo G10.

**Tabela 3** – Dados de polimorfismos obtidos com 14 *primers* de RAPD empregados no estudo da similaridade genética entre plantas do gênero *Alternanthera* spp. Pelotas-RS, 2006

| <i>Primer</i> | Nº de perfis | Nº de bandas únicas | Nº de polimorfismos | Percentagem de polimorfismo |
|---------------|--------------|---------------------|---------------------|-----------------------------|
| OPA07         | 24           | 7                   | 24                  | 100%                        |
| UBC53         | 26           | 8                   | 26                  | 100%                        |
| OPI07         | 25           | 12                  | 25                  | 100%                        |
| UBC410        | 25           | 12                  | 25                  | 100%                        |
| OPA01         | 33           | 7                   | 31                  | 94%                         |
| OPB18         | 37           | 12                  | 37                  | 100%                        |
| OPB20         | 33           | 9                   | 33                  | 100%                        |
| OPB4          | 31           | 13                  | 31                  | 100%                        |
| OPA4          | 16           | 5                   | 16                  | 100%                        |
| OPB10         | 27           | 11                  | 27                  | 100%                        |
| OPX1          | 23           | 11                  | 23                  | 100%                        |
| OPX11         | 20           | 9                   | 20                  | 100%                        |
| OPX20         | 16           | 7                   | 16                  | 100%                        |
| OPX6          | 25           | 5                   | 24                  | 96%                         |
| Média         | 25,8         | 9                   | 25,57               | 99%                         |

Os produtos da amplificação dos *primers* OPA07, UBC53, OPB20, OPX1, OPX11 e OPX20 estão representados na Figura 7, as bandas variaram entre  $\pm 300$  a  $\pm 2300$  pb, sendo salientadas algumas bandas únicas detectadas em cada espécie.



**Figura 7** – Produtos da amplificação com marcadores do tipo RADP em exemplares do gênero *Alternanthera* spp. gerados pelos primers OPA07, UBC53, OPB20, OPX1, OPX11 e OPX20, respectivamente, onde pode ser observado o polimorfismo entre os genótipos. B – amostra em branco (sem adição de DNA); M – marcador molecular DNA Ladder 100pb. As numerações de 1 a 11 referem-se aos genótipos: G1 (*Alternanthera Brasiliiana* – Porto Alegre/RS, Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul); G2 (*Alternanthera* sp – Palhoça/SC); G3 (*A. dentata* – Florianópolis/SC); G4 (*A. Dentata* – Joinville/SC); G5 (*A. Dentata* – Tubarão/SC); G6 (*A. Philoxeroides* - Rio Grande/RS); G7 (*A. Philoxeroides* – Pelotas/RS); G8 (*A. Philoxeroides* – Passo Fundo/RS); G9 (*A. Tenella* – Passo Fundo/RS); G10 (*A. sessilis* - Majé/RJ) G11 (*Alternanthera tenella* - Majé/RJ).

A média de marcadores polimórficos por *primers* (polimorfismos) foi de 25,57 (99%), variando entre 94% (OPA01) e 100% (OPA04; OPA07; UBC53; OPI07; UBC410; OPB18; OPB20; OPB4; OPB10; OPX1; OPX11 e OPX20) (Tabela 3). O grande número de marcadores exclusivos leva a consideração da existência de uma significativa diversidade genética interespecífica.

O número médio de padrões eletroforéticos por *primer* foi de 25,8, com uma média de nove bandas únicas por *primer*, considerando-se uma média de 25, 57 bandas polimórficas por *primers* (polimorfismos) (Tabela 3).

Dos 14 *primers* analisados, 10 amplificaram mais de uma banda por genótipo, o que possibilitou distinguir com maior clareza a diversidade genética entre as espécies estudadas, com exceção dos *primers* UBC410 que, não amplificou nenhuma banda em G10; OPB10 que amplificou somente uma banda em G9 e; OPX11 e OPX6 que amplificaram somente uma banda em G10. Dos 360 perfis eletroforéticos polimórficos produzidos, 128 bandas estiveram presentes em somente um genótipo, com uma média de nove bandas únicas por genótipo, demonstrando principalmente a diferença genética interespecífica (Tabela 3).

A percentagem média de polimorfismos por genótipos foi de 26%, variando de 5% (G7) a 39%, (G3, G4 e G5) e o número médio de bandas únicas por genótipo foi 21, sendo 80 o número médio de perfis eletroforéticos por genótipo e 59 o número médio de bandas (Tabela 4), evidenciando a grande distinção genética obtida entre os genótipos, com exceção de G3, G4 e G5, que mostraram-se completamente monomórficos pelo uso de marcadores RAPD.

O número de bandas amplificadas por genótipo com cada um dos *primers* utilizados variou de zero, em G10 (com o *primer* UBC410), a 14, em G11 (com o *primer* OPB18) (Tabela 5- apêndice).

A similaridade genética, estimada com base no coeficiente de Dice (Nei & Li, 1979) variou de 0,06 entre G6 e G10, G9 e G10 até 1,00 entre G3, G4 e G5 (Quadro 1 - Apêndice).

Estudo semelhante a este trabalho foi realizado por Cai *et al.* (2007), que estudaram a variação entre oito espécies de cerejeira empregando marcadores RAPD. Foram agrupados 23 cultivares de cerejeira doce e quatro de cerejeira azeda, com 67,74% e 29, 40% de variabilidade total, respectivamente. A

distância genética variou de 0,0623 a 0,2719 entre as espécies de *Prunus* spp. que foram geneticamente distintas.

Com o polimorfismo gerado com os 14 marcadores de RAPD e com base no cálculo de similaridade genética média, determinou-se o ponto médio de corte em 0,23, permitindo a identificação de seis subgrupos (Figura 8). O primeiro incluiu os genótipos G3, G4 e G5 com coeficiente de semelhança de 100%, representando a espécie *Alternanthera dentata*. Considerando que os locais de coleta foram Florianópolis/SC (G3), Joinville/SC (G4) e Tubarão/SC (G5), verifica-se que existe baixa variabilidade genética dentro desta espécie ou a técnica de RAPD não foi adequada para acessar a variabilidade existente, assim como observado no experimento I com *A. brasiliana*. Mesmo não havendo sido constatada variabilidade genética entre estes genótipos, a sua análise foi importante para a comparação da diversidade interespecífica.

**Tabela 4-** Polimorfismos obtidos para cada genótipo de *Alternanthera* spp., utilizando-se 31 *primers* RAPD empregados no estudo da diversidade genética

| Genótipos | Nº de perfis | Nº de bandas únicas | Nº de monomorfismos | Percentagem de polimorfismo |
|-----------|--------------|---------------------|---------------------|-----------------------------|
| G1        | 85           | 24                  | 61                  | 27%                         |
| G2        | 68           | 21                  | 47                  | 31%                         |
| G3        | 95           | 37                  | 58                  | 39%                         |
| G4        | 95           | 37                  | 58                  | 39%                         |
| G5        | 95           | 37                  | 58                  | 39%                         |
| G6        | 53           | 5                   | 48                  | 9%                          |
| G7        | 85           | 4                   | 81                  | 5%                          |
| G8        | 101          | 8                   | 93                  | 8%                          |
| G9        | 66           | 11                  | 55                  | 17%                         |
| G10       | 43           | 18                  | 25                  | 42%                         |
| G11       | 99           | 32                  | 67                  | 32%                         |
| Média     | 80           | 21                  | 59                  | 26%                         |

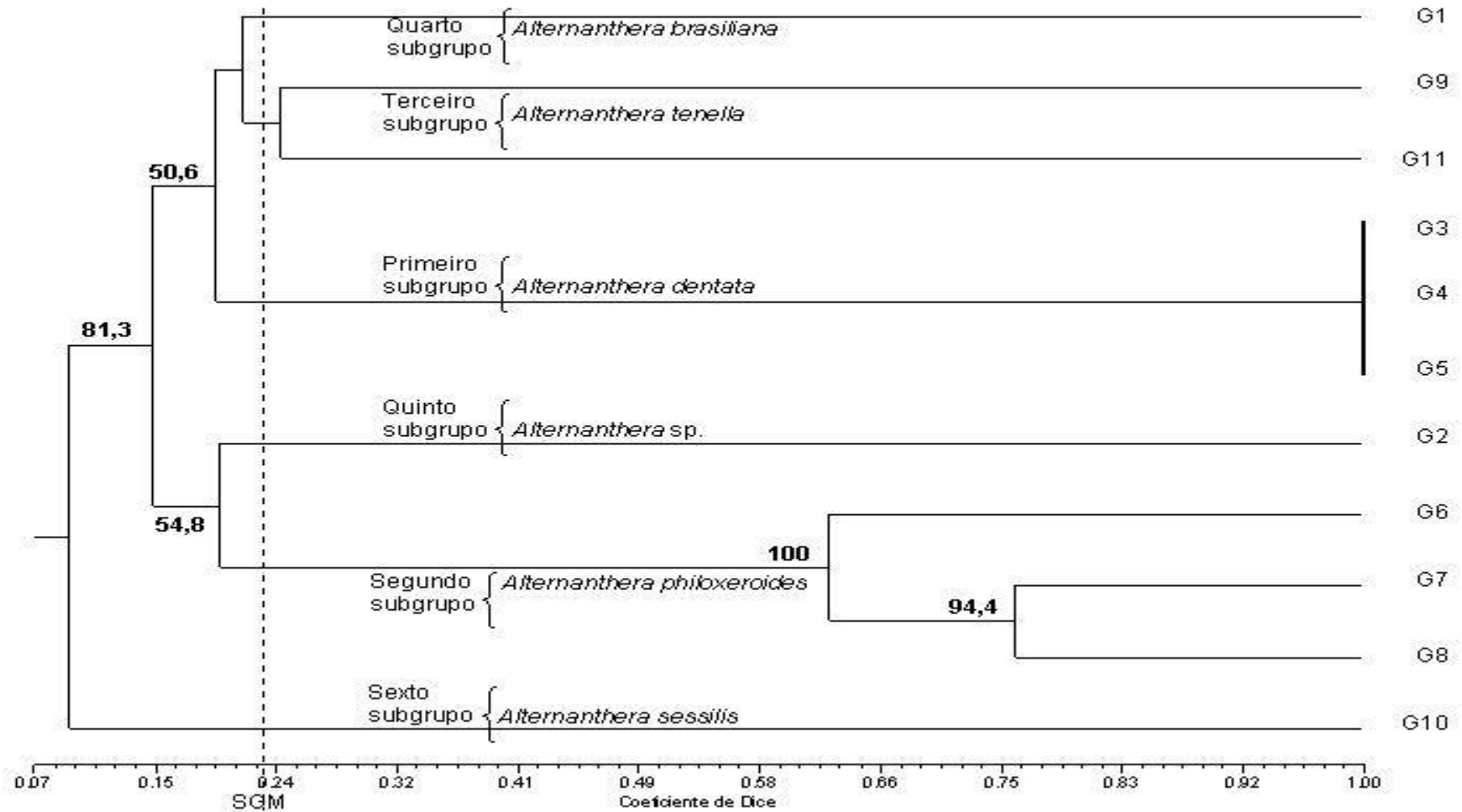
O segundo subgrupo é formado pelos genótipos G6, G7, G8 os quais apresentaram uma similaridade genética variando de 0,57 entre G6 e G8 e 0,76 entre G7 e G8, representando a espécie *Alternanthera philoxeroides*.

O terceiro subgrupo é constituído pelos genótipos G9 e G11, ambos representantes da espécie *Alternanthera tenella*, sendo que, o primeiro exemplar foi coletado em Passo Fundo e, o segundo, obtido em Majé/RJ. Com base nos dados moleculares gerados pelos 14 *primers* de RAPD, constatou-se

que dos 165 perfis amplificados entre estes dois genótipos (Tabela 4), no geral, 20 (12%) foram comuns entre os mesmos (dado não mostrado em tabela). Com isso sugere-se que G11 pertence à mesma espécie de G9, mesmo com a baixa similaridade genética revelada entre os dois genótipos (0,24). Esse resultado pode ser atribuído ao fato de G9 tratar-se de um genótipo coletado em ambiente natural (silvestre), enquanto G11 é um genótipo que já vem passando por processo de cultivo, não se sabe bem a quanto tempo e, possivelmente, tenha passado por algum processo de seleção, justificando a divergência genética entre estes exemplares de plantas analisados. Além disso, esta acentuada variabilidade genética pode estar relacionada às adaptações destas plantas a diferentes habitats e, sendo assim, estarem submetidas à pressão de seleção distinta.

Resultados semelhantes e que auxiliam na explicação destes resultados, foram obtidos por Wu *et al.* (2005) estudando as relações genéticas de 70 acessos do gênero *Houttuynia* Thunb., das províncias de Sichuan, Chongqing, Guizhou e de Jiangsu na China. Usando marcadores do tipo RAPD e ISSR, verificaram elevado polimorfismo ao nível de DNA, porém os ISSR foram mais eficientes em revelar polimorfismo do que marcadores de RAPD. A análise de agrupamento baseado em RAPD e ISSR também mostrou que a diversidade genética em áreas montanhosas e da margem da Bacia de Sichuan foi mais abundante do que ao fundo da Bacia e seus altiplanos circunvizinhos ou colinas.

O material vegetal referente ao genótipo G11 foi identificado botanicamente como pertencente a espécie *Alternanthera tenella*. Sendo assim, pela identificação botânica e pelo agrupamento do dendrograma, G9 e G11 foram considerados pertencentes à mesma espécie. A constatação e confirmação futura da alta variabilidade genética existente entre G9 e G11, e se realmente pertencerem à mesma espécie, confere a estes considerável importância botânica, ecológica e em estudos farmacêuticos, pela possível existência de variabilidade para uso no melhoramento buscando a produção de metabólitos secundários.



**Figura 8** – Dendrograma de similaridade genética obtido pelo método UPGMA com 14 *primers* RAPD, analisando-se genótipo do gênero *Alternanthera* provenientes de diferentes localidades do Brasil.



Com base na Figura 8, o quarto subgrupo é constituído pelo genótipo G1, representante da espécie *Alternanthera brasiliana*, o qual já havia sido analisado no experimento I. O terceiro e o quarto subgrupos estabelecem um agrupamento com coeficiente de semelhança próximo a 21,5%, o qual leva a sugerir maior proximidade filogenética entre as espécies *A. brasiliana* e *A. tenella*, em relação a *A. dentata*.

O quinto subgrupo inclui somente o genótipo G2, o qual não agrupou especificamente com nenhum outro. Entretanto, baseado nos dados de marcadores do tipo RAPD obtidos neste trabalho, sugere tratar-se de um exemplar da espécie *A. philoxeroides*, ou de uma nova espécie filogeneticamente relacionada, porém não identificada, uma vez que os genótipos do subgrupo dois são provenientes do Rio Grande do Sul e G2 tem como proveniência o litoral de Santa Catarina.

O sexto subgrupo é constituído unicamente pelo genótipo G10, representante da espécie *Alternanthera sessilis* (Figura 8).

Assim como constatado neste trabalho para espécies do gênero *Alternanthera*, Fico *et al.* (2003), empregando a técnica de RAPD para avaliar a diversidade genética entre *Aconitum vulparia* Rchb., *A. paniculatum* Lam., *A. napellus* ssp. *tauricum* Wulfen (de duas localidades diferentes), e *A. napellus* ssp. *neomontanum* Wulfen, plantas com importantes propriedades medicinais, conseguiram diferenciar de forma eficiente as espécies.

De maneira geral, alta similaridade foi verificada entre os genótipos de *A. philoxeroides* e entre os genótipos de *A. dentata*, estes por sua vez não diferenciaram entre si com os *primers* de RAPD testados. Devido à baixa similaridade entre os demais genótipos avaliados, os valores de *bootstrapping* foram significativos apenas entre os genótipos de *A. philoxeroides* e os de *A. dentata*, que variaram entre 94,4 e 100, respectivamente (Figura 8). Alto valor de *bootstrapping* foi registrado entre o nó de *A. sessilis* (G10) com os demais genótipos (81,3).

Pinheiro *et al.* (2003) obtiveram resultados interessantes e semelhantes aos obtidos neste trabalho, os quais analisaram a variabilidade genética, com base em marcadores moleculares RAPD, entre vinte acessos de açafrão, *Curcuma longa* (Zingiberaceae) obtidos em diferentes regiões do Brasil. A proporção da variabilidade genética existente entre três grupos pré-

estabelecidos, quanto à origem de coleta dos genótipos de açafrão, permitiu verificar que 44,49% da variabilidade genética ocorreu entre grupos e que a maior parte da variação se encontra entre os genótipos de cada grupo.

Na comparação entre os dados da matriz cofenética e da matriz de similaridade obteve-se alto valor de correlação  $r=0,99$ , utilizando 1000 permutações, demonstrando um alto grau de representatividade entre a matriz de similaridade e os dados do dendrograma.

Smelcerovic *et al.* (2006) realizaram a caracterização genética de seis espécies de *Hipericum* spp. da Sérvia, utilizando 52 *primers* RAPD, sendo que apenas 10 foram polimórficos e geraram 111 marcadores polimórficos. Com análises de SSR demonstraram que oito dos 10 *primers* usados foram polimórficos, obtendo valores de correlação entre dados cofenéticos e de similaridade idênticos ao do presente trabalho ( $r= 0,99$ ).

Estudo da diversidade molecular intraespecífica foi realizado também por Dey *et al.* (2006) entre genótipos de melão amargo (*Momordica charantia* L.), uma cucurbitaceae com consideráveis valores medicinais e nutricionais. Num total de 208 *primers*, 76 (36,50%) foram polimórficos. A distância genética encontrada foi de 0,07 a 0,5, sugerindo uma ampla base genética entre os genótipos.

Resultados de agrupamento e similaridade genética, entre populações de uma mesma espécie, semelhantes aos obtidos neste trabalho para *A. philoxeroides* (G6, G7 e G8), foram obtidos por Sarkhosh *et al.* (2006), que usaram marcadores RAPD para estudar a variabilidade entre 24 genótipos de romã iraniano (*Punica granatum* L.). Segundo os autores, as semelhanças mais altas e mais baixas registradas entre os genótipos foram de 0,89 e 0,29, respectivamente. Com uma similaridade média de 60% os genótipos foram divididos em quatro agrupamentos distintos, computando-se um coeficiente de correlação ( $r = 0.9$ ) relativamente alto entre a matriz de semelhança e a matriz cofenética do dendrograma. A acentuada variabilidade genética entre plantas de uma mesma espécie também foi observada por Yu *et al.* (2003), na análise das relações e variações intraespecíficas de *Eleutherococcus senticosus* (*Acanthopanax senticosus* Harms).

Resultados de estudos de genética molecular realizados por Gelsomina *et al.* (2003) também foram empregadas a fim de esclarecerem dúvidas quanto

à classificação. Com a técnica de RAPD analisaram a diversidade genética entre plantas do gênero *Aconitum* (*Aconitum vulparia*; *A. paniculatum*; *A. napellus*, ssp. *tauricum* de duas localidades diferentes e *A. napellus* ssp. *neomontanum*). O dendrograma revelou uma divisão clara entre plantas de *Aconitum* spp. com flores amareladas e azuis e, dentro do segundo agrupamento, *A. paniculatum* foi claramente separada de todas as populações que pertencem ao grupo de *A. napellus*.

Estudos sobre a variabilidade genética de plantas constitui uma importante ferramenta para conhecer a estrutura das populações naturais, bem como para identificar genótipos com as melhores características para formar bancos de germoplasma e representar ao máximo da variabilidade das espécies de interesse (França. 2004).

Existe grande número de trabalhos na literatura que tratam da análise da diversidade genética de plantas com uso de marcadores moleculares, a exemplo dos trabalhos realizados usando a técnica RAPD em *Cymbopogon* spp., consideradas plantas aromáticas e medicinais (Sangwan *et al.*, 2001; Khanuja *et al.*, 2005), em espécies do gênero *Cimicifuga* (Xu *et al.*, 2002) e em *Chrysanthemum x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura, importante planta medicinal e ornamental (Bhattacharya *et al.*, 2006; Chatterjee *et al.*, 2006). Usando RFLP e RAPD, Watanabe *et al.* (1998) estudaram a diversidade genética entre plantas medicinais do gênero *Angelica*; com marcadores RAPD e ISSR, Dangi *et al.* (2004), estudaram a diversidade genética em espécies do gênero *Trigonella*.

Conforme Nodari & Guerra (2004), a variabilidade genética dentro de uma mesma espécie constitui uma importante fonte de genes que devem ser considerados na formação de bancos de germoplasma para uso no melhoramento, na transformação gênica com intento da obtenção de maior produtividade e outras características almejadas. Genótipos divergentes enriquecem a variabilidade natural da espécie, o que confere maiores possibilidades de adaptação a diferentes ambientes, além de possíveis variações na produção de metabólitos secundários, como se trata de uma espécie de plantas medicinais.

No presente trabalho, não foi possível a diferenciação intraespecífica dos genótipos de *A. brasiliensis* e *A. dentata*. Contudo, verificou-se pela análise

com marcadores RAPD que existe ampla diversidade interespecífica entre ambas, por isso tratam-se de espécies diferentes. Porém, com base na taxonomia botânica estas espécies são muito semelhantes, de maneira que muitos autores as consideram como pertencentes a uma só, ou seja, *A. brasiliiana* (Lorenzi & Souza, 2002), o que não condiz com a classificação realizada através da técnica de RAPD. O fato de *A. brasiliiana* e *A. tenella* serem consideradas espécies bem distintas através da análise realizada com marcadores RAPD é corroborado pelo fato de que a *A. brasiliiana* mostrou-se mais semelhante geneticamente à espécie *A. tenella*, em relação a *A. dentata*.

Pinheiro *et al.* (2003) reforçam a idéia de que a caracterização molecular de germoplasma pode fornecer dados úteis para auxiliar o melhorista na identificação e na seleção dos genitores para estabelecer o programa de melhoramento, ou então evitar as redundâncias ou misturas de genótipos em estudos e programas de conservação de germoplasma.

Embora a técnica de RAPD tenha sido eficiente em revelar polimorfismo interespecífico, com base nos dados obtidos no presente trabalho, sugere-se a realização de futuras análises utilizando técnicas com maior potencial de revelar polimorfismo, a exemplo de marcadores do tipo SSR, ISSR e AFLP. Outra alternativa é a análise de seqüências ITS (*Internal Transcribed Spacer*) das espécies do gênero *Alternanthera* em questão neste estudo, especialmente para a *Alternanthera* sp., *A. brasiliiana* e *A. dentata*., a fim de verificar de maneira mais concisa a proximidade filogenética entre elas, a exemplo dos trabalhos realizados por Hosokawa *et al.* (2005) com as espécies de *Scutellaria galericulata* L. (Labiatae; marsh skullcap) and *Scutellaria lateriflora* L. (Labiatae; mad dog skullcap) e de Ngana *et al.* (1999) em espécies do gênero *Panax*.

## CONCLUSÕES

Nas condições em que foram realizados os experimentos, é possível concluir que:

Os oligonucleotídeos iniciadores do tipo RAPD não são eficientes para a detecção de polimorfismo entre genótipos das espécies *A. dentata* e *A. brasiliiana*.

Com marcadores do tipo RAPD foi possível identificar de forma clara genótipos pertencentes às espécies *A. brasiliiana*, *A. dentata*, *A. philoxeroides*, *A. tenella* e *A. sessilis*.

A espécie *A. sessilis* apresenta maior distância genética em relação às demais espécies analisadas.

Pelos dados de marcadores do tipo RAPD a espécie *A. brasiliiana* demonstrou ser mais próxima filogeneticamente de *A. tenella* em relação a *A. dentata*, contrariando a identificação botânica pela morfologia.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As espécies do gênero *Alternanthera* demonstram significativo potencial medicinal pela sua comprovada produção de metabólitos secundários ativos, os quais apresentam propriedade antiinflamatória, antiviral, antitumoral, antibiótica, antioxidante, entre outras já comprovadas. Estas propriedades tornam estas espécies altamente viáveis de serem utilizadas pela indústria farmacêutica na produção de fármacos. Esta potencialidade do gênero *Alternanthera* torna boa parte de suas espécies plausíveis de estudos bioquímicos, farmacêuticos e biotecnológicos, pela cultura de tecidos e estudos genéticos. Porém, dentre as técnicas de biologia molecular empregadas, faz-se necessário não somente para a caracterização molecular, mas também a seleção e clonagem de genes para transformação genética de plantas, visando a seleção e produção de genótipos com alta produção de princípios ativos almejados, dentre outras características vantajosas. Visando o melhoramento genético para produção de genótipos mais produtivos, há também a necessidade do uso de métodos de reprodução assistida a fim de constatar a possível transferência de genes e alelos entre genótipos, fazendo-se uso de um maior número e de outros sistemas de marcadores moleculares.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, I.N. DE; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; MORAIS, A.R. DE; GEROMEL, C.; LADEIRA, A.; LAMEIRA, O.A. Propagação *in vivo* de *Cissus sicyoides*, uma planta medicinal. **Acta Amazônica**, v. 33, n. 1, p. 1-7, 2003.

AL-BAHRANY, A.M;.. Effect of phytohormones on in vitro shoot multiplication and rooting of lime *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing. **Scientia Horticulturae**, v. 95, p. 285–295, 2002.

ANUNTALABHOCHAI, S.; SITTHIPHROM, S.; THONGTAKSIN, W.; SANGUANSEMSRI, M.; CUTLER, R. W. Hybrid detection and characterization of *Curcuma* spp. using sequence characterized DNA markers. **Scientia Horticulturae**, v. 111, p. 389–393, 2007.

ARNOLD ML, BUCKNER CM, ROBINSON JJ. Pollen-mediated introgression and hybrid speciation in Louisiana irises. **Proceeding of National Academy Science USA**, v. 88, p. 1398–1402, 1991.

BARCACCIA, G., LUCCHIN, M.; PARRINI, P. Characterization of a flint maize (*Zea mays* var. *indurata*) Italian landrace, II. Genetic diversity and relatedness assessed by SSR and Inter-SSR molecular markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.50, p. 253–271, 2003.

BEDUHN, F.A. **Estabelecimento e propagação in vitro de plantas medicinais da família Lamiaceae**. Pelotas, Departamento de Botânica,

Universidade Federal de Pelotas, 2005, 58p. (Dissertação-Mestrado em Fisiologia Vegetal).

BEEEMSTER, G.T.S.; BASKIN, T.I. Stunted Plant 1 Mediates Effects of Cytokinin, But Not of Auxin, on Cell Division and Expansion in the Root of Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 124, p. 1718–1727, 2000.

BHATTACHARYA, A. JAIME, A.; SILVA, T. DA. Molecular systematics in *Chrysanthemum x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura. **Scientia Horticulturae**, v. 109, p 379–384, 2006.

BOSEMBEKER, V.K. **Efeitos de substâncias de crescimento na micropropagação e morfogênese em camomila romana (*Anthemis nobilis* L.)**. Pelotas. Universidade Federal de Pelotas, 2001, 80 pg. (Dissertação-Mestrado em Fisiologia Vegetal).

BROCHADO, C. DE O.; ALMEIDA, A.P. DE; BARRETO, B.P.; COSTA, L.P.; RIBEIRO, L.S.; PEREIRA, R.L. DA C.; KOATZ, V.L.G. e COSTA, S.S. Flavonol Robinobiosides and Rutinosides from *Alternanthera brasiliensis* (Amaranthaceae) and their Effects on Lymphocyte Proliferation *In Vitro*. **Brazilian journal of the chemistry society**, v. 14, n. 3, p. 449-451, 2003.

BRUTTI, C.; APÓSTOLO, N.M.; FERRAROTTI, S.A.; LLORENTE, B.E.; KRYMKIEWICZ, N. Micropropagation of *Cynara scolymus* L. employing cyclodextrins to promote rhizogenesis. **Scientia Horticulturae**, v 83, p. 1-10, 2000.

CAI, Y. L.; CAO, D. W.; ZHAO, G. F. Studies on genetic variation in cherry germplasm using RAPD analysis. **Scientia Horticulturae**, v. 111, p. 248–254, 2007.



CAO; J.S.; YU; X.L.; YE; W.Z.; LU, G.; XIANG, X. Functional analysis of a novel male fertility CYP86Mfgene in Chinese cabbage ( *Brassica campestris* L. ssp. chinensismakino). **Plant Cell Reports**, v. 00, p. 1–9, 2005.

CARVALHO, J. M. F. C.; CARTAXO, G.; COSTA, J. N. da; VIDAL, M. S.; SANTOS, J. W. dos. Indução in vitro de Superbrotamento em Gemas de Espécies do Gênero *Agave*. **Revista brasileira de oleaginosas e fibrosas**, Campina Grande, v.8, n.2/3, p.869-873, 2004 a.

CARVALHO, L.C., GOULÃO, L., OLIVEIRA, C., GONÇALVES, J.C.; AMÂNCIO, S. RAPD assessment for identification of clonal identity and genetic stability of *in vitro* propagated chestnut hybrids. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 77, p. 23–27, 2004 b.

CASTILLO, O.C.; CHALMERS, K.J.; WAUGH, R.; POWELL, W. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 87, p. 934–940, 1994.

CHATTERJEE, J.; MANDAL, A. K. A.; RANADE, S. A.; JAIME, A.; SILVA, T. DA; DATTA, S. K. Molecular systematics in *Chrysanthemum x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura. **Scientia Horticulturae**, v. 110, p. 373–378, 2006.

CHAVES, A. DA C.; SCHUCH, M.W.; ERIG, A.C. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. **Ciência Agrotécnica**, v. 29, n. 6, p. 1281-1287, 2005.

DANGI, R. S.; LAGU, M. D.; CHOUDHARY, L. B.; RANJEKAR, P. K.; GUPTA, V. S. Assessment of genetic diversity in *Trigonella foenum-graecum* and *Trigonella caerulea* using ISSR and RAPD markers. **BMC Plant Biology**, v. 4, p. 1-11, 2004.

DAVIES, P.J. Introduction. In **Plant Hormones**. ed (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers), 1995, p. 1–38.

DEY, S.S.; SINGH, A.K.; CHANDEL, D.; BEHERA, T.K. Genetic diversity of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) genotypes revealed by RAPD markers and agronomic traits. **Scientia Horticulturae**, v. 109, p. 21–28, 2006.

DHAR, R. S.; VERMA, V.; SURI, K. A.; SANGWAN, R. S. ; SATTI, N. K.; KUMAR, A.; TULI, R.; QAZI, G. N. Phytochemical and genetic analysis in selected chemotypes of *Withania somnifera*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2269–2276, 2006.

DINIZ, J.D.N.; GOMES, S.O.; INNECCO, R.; ALMEIDA, J.L.; COSTA, J.T.A. Avaliação dos efeitos da quebra da dominância apical e do BAP na multiplicação *in vitro* de *Heliconia stricta* Huber. **Revista Ciência Agronômica**, v. 35, n. especial, p. 232 – 237, 2004.

DODDS, J. H.; ROBERTS, L. W. **Experiments in plant tissue culture**. Cambridge: University Press, 256p, 1999.

DODE, L.B.; BOBROWSKI, V.L.; BRAGA, E.J.B.; SEIXAS, F.K.; SCHUCH, M.W. In vitro propagation of *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 25, n. 2, p. 435-437, 2003.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução do uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. EMBRAPA: Brasília-DF, 1998, 220 p.

FICO, G.; SPADA, A.; BRACA, A.; AGRADI, E.; MORELLI, I.; TOME', F. RAPD analysis and flavonoid composition of *Aconitum* as an aid for taxonomic discrimination **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 293–301, 2003.

FRACARO, F.; ZACARIA, J.; ECHEVERRIGARAY, S. RAPD based genetic relationships between populations of three chemotypes of *Cunila galioides* Benth. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 409–417, 2005.

FRANÇA, S. de C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O. (coord.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed., Porto Alegre/Florianópolis; Editora da UFRGS/Editora. da UFSC, 2004, p. 123-141.

GALDERISI, U.; CIPOLLARO, M.; · BERNARDO G. DI; MASI, L. DE; · GALANO, G.; CASCINO, · A. Identification of hazelnut ( *Corylus avellana*) cultivars by RAPD analysis. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 652–655, 1999.

GAVIDIA, I.; AGUDO, L. DE C.; BERMTIDEZ, P. P. Selection and long-term cultures of high-yielding *Digitalis obscura* plants: RAPD markers for analysis of genetic stability. **Plant Science**, v. 121, p. 197-205, 1996.

GELSOMINA, F.; SPADA, A.; BRAÇA, A.; AGRADI, E.; MORELLI, I.; TOME, F. RAPD analysis and flavonoid composition of *Aconitum* as an aid for taxonomic discrimination. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 293–301, 2003.

GERRIT, T.S.B.; BASKIN, T.I. Mediates Effects of Cytokinin, But Not of Auxin, on Cell Division and Expansion in the Root of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 124, p. 1718–1727, 2000.

GIACOMETTI, D.C. Impacto da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. eds. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990, p. 19-25.

GOMEZ, R.; ANGEL, F.; BONIERBALE, M.W.; RODRIGUEZ, F.; TOHME, J.; ROCA, W.M. Inheritance of random amplified polymorphic DNA markers in cassava (*Manihot esculenta*) Crantz. **Genome**, v. 39, p. 1039–1043, 1996.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: Torres, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e transformação Genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI/Embrapa – CNPH,. v. 1, 1998, p.183-260.

HALL, R.D. Plant cell culture protocols. Capítulo 1: **An introduction to plant-cell culture: pointers to successs**. Totowa: editora, 1999. v. 111, p. 3-18.

HAN, B.H.; YU, H. J.; YAE, B. W.; PEAK, K. Y. In vitro micropropagation of *Lilium longiflorum* 'Georgia' by shoot formation as influenced by addition of liquid medium. **Scientia Horticulturae**, v. 103, p. 39–49, 2004.

HILLMAN, J.R. Apical dominance. In Wilkins, M.B. **Advanced Plant Physiology**, ed (London: Pitman Publishing), 1984, p. 127–148.

HIREGOUDAR, L.V.; MURTHY, H.N.; HEMAB, P.; HAHNE, J.; PAEKK, Y. Multiple shoot induction and plant regeneration of *Feronia limonia* (L.) Swingle. **Scientia Horticulturae**, v. 98, p 357–364. 2003.

HOSOKAWA, K.; MINAMI, M.; NAKAMURA, I.; HISHIDA, A.; SHIBATA, T. The sequences of the plastid gene *rpl16* and the *rpl16-rpl14* spacer region allow discrimination among six species of *Scutellaria*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 105–108, 2005.

HOSOKI, T.; KIMURA, D.; HASEGAWA, R.; NAGASAKO, T.; NISHIMOTO, K.; OHTA, K.; SUGIYAMA, M.; HARUKI, K. Comparative study of Chinese tree peony cultivars by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Scientia Horticulturae**, v. 70, p. 67-72, 1997.

JAMNADASS, R.; HANSON, J.; POOLE, J.; HANOTTE, O.; SIMONS, T.J.; DAWSON, I.K. High differentiation among populations of the woody legume *Sesbania sesban* in sub-Saharan Africa: Implications for conservation and cultivation during germplasm introduction into agroforestry systems. **Forest Ecology and Management**, v. 210, p. 225–238, 2005.

JULIANI, H.R.(JR); KOROCH, A.R.; JULIANI, H.R.; TRIPPI, V.S. Micropropagation of *Lippia junelliana* (Mold.) Tronc. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 59, p. 175–179, 1999.

KATO, C.Y.; NAGAI, C.; MOORE, P.H.; ZEE, F.; KIM, M.S.; STEIGER, D.L.; MING, R. Intra-specific DNA polymorphism in pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) assessed by AFLP markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 51, p. 815–825, 2004.

KHANUJA, S.P.S.; SHASANY, A.K.; PAWAR, A.; LAL, R.K.; DAROKAR, M.P.; NAQVI, A.A.; RAJKUMAR, S.; SUNDARESAN, V.; LAL, N.; KUMAR, S. Essential oil constituents and RAPD markers to establish species relationship in *Cymbopogon* Spreng. (Poaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 171–186, 2005.

LAL, N.; AHUJA, PS.; KUKREJA, AK; PANDEY, B. Clonal propagation of *Picrorhiza kurroa* Royle ex Benth. By shoot tip culture. **Plant Cell Reports**; v. 7, p. 202–205, 1988.

LANE, W.D. Regeneration of pear plants from shoot meristem: tips. **Plant Science Letters**, v. 16, p.337-342, 1979.

LANE, W. D.; Mc DOUGALD, J. M. Shoot Tissue Culture of Apple: Comparative Response of Five Cultivars to Cytokinin and Auxin. **Canadian Journal Plant Science**, v. 62, p. 689-692, 1982.

LASKOWSKI, M.J., WILLIAMS, M.E., NUSBAUM, H.C.; SUSSEX, I.M. Formation of lateral root meristems is a two-stage process. **Development**, v. 121, p. 3303–3310, 1995.

LESHEM, B.; WERKER, E.; SHALER, D.P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and and carnation. **Annals of Botany**. v. 62, p. 271-276. 1988.

LI, J.; JIA, J.F.; HAO, J.G. Tissue culture and plant regeneration of *Helianthemum songaricum* Schrenk .**Shi Yan Sheng Wu Xue Bao**, v. 36, n. 4, p. 318-21, 2003.

LIN, L. C.; NALAWADE, S. M.; MULABAGAL, V.; YEH, M. S.; TSAY, H. S. Micropropagation of *Polygonum multiflorum* THUNB and quantitative analysis of the anthraquinones emodin and physcion formed in in vitro propagated shoots and plan. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v. 26, n. 10, p. 1467-71, 2003.

LORENZI, H., MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo – Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, Nova Odessa, SP, 2002, 544p.

LU, M.C. Micropropagation of *Vitis thunbergii* Sieb. et Zucc., a medicinal herb, through high-frequency shoot tip culture. **Scientia Horticulturae**, v. 107, p. 64–69, 2005.

LUCA, R. L. ; MACEDO, A. F. ; ESQUIBEL, M. ; LAGE, C. L. S. . Ação de diferentes faixas do espectro luminoso na otimização da produção de *Alternanthera brasiliana*, uma planta medicinal. In: **IV Encontro Latino-Americano de Biotecnologia Vegetal**, 2001, Goiânia. Programa e Resumos, 2001. v. 1. p. 73-73.

MABRY, T. J. "Betainins". In: BELL, E. A., B. V. Encyclopedia Of Plant Physiology. Secondary Products. **Springer Verlag**, V. 8: 513-533, 1980.

MALIK, S.K.; CHAUDHURY, R.; KALIA, R.K. Rapid in vitro multiplication and conservation of *Garcinia indica*: A tropical medicinal tree species. **Scientia Horticulturae**, v. 106, p., 539–553, 2005.

MARTIN, KP. Rapid in vitro multiplication and ex vitro rooting of *Rotula aquatica* Lour., a rare rheophytic woody medicinal plant. **Plant Cell Reports**, v. 21, n. 5, p. 415-20, 2003.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiological Plant**, v. 15, p.473 – 497, 1962.

MURCH, S.J.; LIU, C.; ROMERO, R.M. e SAXENA, P.K. *In vitro* Culture and Temporary Immersion Bioreactor Production of *Crescentia cujete*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 78, p. 63–68, 2004.

NADEEM, M.; PALNI, L.M.S.; PUROHIT, A.N.; PANDEY, H; NANDI, S.K. Propagation and conservation of *Podophyllum hexandrum* Royle: an important medicinal herb. **Biological Conservatio**, v 92, p. 121-129, 2000.

NAIR, L.G.; SEENI, S. Rapid in vitro multiplication and restoration of *Celastrus paniculatus* Willd. sub sp. *paniculatus* (Celastraceae), a medicinal woody

climber. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 39, n. 7, p., 697-704, 2001.

NASER, A.A.; JAWAD, F.M.; KARAM, N.S.; SHIBLI, R.A. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). **Scientia Horticulturae**, v. 100, 193–202, 2004.

NASS, L.L. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L.L. *et al.* (Ed.) **Recursos genéticos e melhoramento**. Rondonópolis, UFMT. 2001. 1183p.

NEI, M.; LI, W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceeding of National Academy Science**. USA. n.76, p. 5269-5273, 1979.

NGANA, F.; SHAWA, P.; BUTB, P.; WANGA, J. Molecular authentication of *Panax* species. **Phytochemistry**, v. 50, p. 787-791, 1999.

NIHEI, J.S.; DIAS, D.A.; PEREIRA, P.S. **Avaliação da atividade anti-tumoral *in vitro* de extratos vegetais de plantas da família Amaranthacea**. Tese Universidade de São Paulo - USP, 2001, 80 pg.

NISBERT, L.J.; MOORE, M. Will natural products remain an important source of drug research for the future? **Current Opinion in Biotechnology**, v.8, p. 708-712, 1997.

NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Aspectos genéticos e moleculares da produção vegetal. In: SIMÕES, C.M.O. (coord.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed., Porto Alegre/Florianópolis; Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004, pg. 29-31.



OIKI, S.; KAWAHARA, T.; , INOUE, K.; OHARA, M.; MAKI, M. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Variation among Populations of the Insular Endemic Plant *Campanula microdonta* (Campanulaceae). **Annals of Botany**. V. 87: 661 -667, 2001.

OLIVEIRA, A.Z.D. DE; ROCHA, R.H.C.; OLIVEIRA, O.F. DE; CÂMARA, F. A. A. Multiplicação *in vitro* do Bilimbi (*Averrhoa Bilimbi* L.) utilizando-se diferentes concentrações de reguladores de crescimento. **Caatinga**, v.14, n. ½, p. 37-41, 2001.

PAIVA, P.D. DE O.; PAIVA, R.; PASCAQUAL, M.; PAIVA, L. V. Estabelecimento *in vitro* de estrelícia (*Strelitzia reginae* banks.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 5, p.413-416, 1988.

PEREIRA, A.M.S. **Cultura de Tecidos de Plantas Medicinais**; disponível em: <http://www.ufmt.br/etnoplan/artigos/cultura%20de%20tecidos%20de%20plantas%20medicinaispdf>; acesso em 30/08/03.

PINHEIRO, J. B.; ZUCCHI, M. I.; TELES, F. L.; ÁZARA, N. A. Diversidade genética molecular em acessos de açafraão utilizando marcadores RAPD. **Acta Scientiarum: Agronomy**. V. 25, n. 1, p. 195-199, 2003.

RAJKUMAR, K.; KHAN, P.S.S.V.; SHARMA, G.J.A. Hybridization and *in vitro* culture of an orchid hybrid *Ascocenda* 'Kangla'. **Scientia Horticulturae**, v. 108, pg. 66–73, 2006.

RAMOS, T.V; CARNEIRO, I. F. Multiplicação *in vitro* de *Cattleya x mesquitate* pelo método do estiolamento de segmentos caulinares. In: Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão da UFG - CONPEEX, 2, 2005, Goiânia. **Anais eletrônicos do XIII Seminário de Iniciação Científica** [CD-ROM], Goiânia: UFG, 2005.

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

RASUL, M.G.; HIRAMATSU, M.; OKUBO, H. Genetic relatedness (diversity) and cultivar identification by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in teale gourd (*Momordica dioica* Roxb.). **Scientia Horticulturae**, v. 111, p. 271–279, 2007.

REIS, A.MM; GRATTAPAGLIA, D. RAPD variation in a germplasm collection of *Myracrodruon urundeuva* (Anacardiaceae), an endangered tropical tree: Recommendations for conservation. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 51, p. 529–538, 2004.

ROHLF, F.J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Port Jeerson: Appleid Biostatistics, 2000, 38 p.

ROUT, G.R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 91–120, 2000,

ROUT, G.R.A.; MOHAPATRA, A.A.; JAIN, S.M.B. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 24 531–560, 2006.

ROY, J.; BANERJEE, N. Rhizome and shoot development during in vitro propagation of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. **Scientia Horticulturae**, v. 94, p. 181–192, 2002.

ROYO, J.B.; ITOIZ, R. Evaluation of the discriminance capacity of RAPD, isoenzymes and morphologic markers in apple (*Malus x domestica* Borkh.) and

the congruence among classifications. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v 51, p. 153–160, 2004.

RUBIN, S.; LIMA, C. S. M.; BANDEIRA, J. DE M.; RIBEIRO, M. V.; BENITZ, L. C.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. Reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de *Thymus vulgaris* L. In: **Anais do 57° Congresso Brasileiro de Botânica**, Gramado/RS. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS, Laboratório de cultura de Tecidos de Plantas, 2006, p. 1-3.

SALVADOR, M.J., DIAS, D.A. Flavone C-glycosides from *Alternanthera maritima* (Mart.) St. Hil. (Amaranthaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 107–110, 2004.

SANGWAN, N. S.; · YADAV, U.; · SANGWAN, R. S. Molecular analysis of genetic diversity in elite Indian cultivars of essential oil trade types of aromatic grasses ( *Cymbopogon* species). **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 437–444, 2001.

SANTOS, E.K. dos. Totipotência celular e cultura de tecidos vegetais. In: FREITAS, L.B.; BERED, F. **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre: Ed UFRGS, 2003. p. 415-444.

SARKHOSH, A.; ZAMANI, Z.; FATAHI, R.; EBADI, A. RAPD markers reveal polymorphism among some Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes. **Scientia Horticulturae**, v. 111, p. 24–29, 2006.

SMELCEROVIC, A.; VERMA, V.; SPITELLER, M.; AHMAD, S. M.; PURI, S. C.; QAZI, G. N. Phytochemical analysis and genetic characterization of six *Hypericum* species from Serbia. **Phytochemistry**, v. 67, p. 171–177, 2006.

SOUZA, J. A. **Cultivo *in vitro* e caracterização isoenzimáticas de espécies de camomila.** Pelotas, Universidade Federal de Pelotas, 2004, 48 p. (Dissertação-Mestrado em Fisiologia Vegetal)

SOUZA, A.V.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; CORRÊA, R.M; CASTRO, E.M. DE. Germinação de Embriões e Multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart. **Ciência e Agrotecnologia**, Edição especial, p. 1532-1538, 2003.

SOUZA, M.M.; Kern, P.; Floriani, A.E.O.; Cechinel-FILHO, V. Analgesic properties of a hydroalcoholic extrat obtained from *Alternanthera brasiliana*. **Phytotherapy Research**, v.12, p. 279-281,1998.

SREEKUMAR, S.; SEEN,I S.; PUSHPANGADAN, P. Micropropagation of *Hemidesmus indicus* for cultivation and production of 2-hydroxy 4-methoxy benzaldehyde. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 62, p. 211–218, 2000.

TAIZ, L; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Trad. SANTARÉM, E. R. et al. 3ª ed., Editora Artmed. Porto Alegre, 2004, 719 pg.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J. **A. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas.** V.1, EMBRAPA/CBAB, Brasília-DF, 1998, 509p.

VENKATACHALAM, P.;-PRIYA, P. Identification, cloning and sequence analysis of a dwarf genome-specific RAPD marker in rubber tree [ *Hevea brasiliensis* (Muell.) Arg.]. **Plant Cell Reports**, v. 23, p. 327–332,2004.

VIEIRA, R. F.; GOLDSBROUGH, P.; SIMON, J. E. Genetic diversity of basil (*Ocimum* spp.) based on RAPD markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, V. 128: 94–99, 2003.

VILLA, F.; ARAÚJO, A.G. DE; PIO, L.A.S.; PASQUAL, M. Multiplicação *in vitro* da amoreira-preta (*rubus* sp.) 'ébano' em diferentes concentrações de meio MS e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 3, p. 582-589, 2005.

WANG, B.; LI, W.; WANG, J. Genetic diversity of *Alternanthera philoxeroides* in China. **Aquatic Botany**, v. 81, p. 277–283, 2005.

WATANABE, A.; ARAKI, S.; KOBARI, S.; SUDO, H.; TSUCHIDA, T.; UNO, T.; KOSAKA, N.; SHIMOMURA, K.; YAMAZAKI, M.; SAITO, K. In vitro propagation, restriction fragment length polymorphism, and random amplified polymorphic DNA analyses of *Angelica* plants. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 187–192, 1998.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSK, J.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p. 6531–6535, 1990.

WU, W; ZHENG, Y. L.; CHEN, L.; WEI, Y. M.; YANG, R. W.; YAN, Z. H. Evaluation of genetic relationships in the genus *Houttuynia* Thunb. in China based on RAPD and ISSR markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, V. 33: 1141-1157, 2005.

XU, H.; FABRICANT, D.S.; PIERSEN, C.E.; BOLTON, J.L.; PEZZUTO, J.M.; FONG, H.; TOTURA, S.; FARNSWORTH, N.R.; CONSTANTINOU, A. A preliminary RAPD-PCR analysis of *Cimicifuga* species and other botanicals used for women's health. **Phytomedicine**, v. 9, p. 757–762, 2002.

YAP, I.V.; NELSON, R.J. **Winboot**: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. Manila: IRRI, 1996. 22p. (IRRI discussion paper series, 14).

YU, C. Y.; KIM, S. H.; LIM, J. D.; KIM, M. J; CHUNG, I. M. Intraspecific relationship analysis by DNA markers and in vitro cytotoxic and antioxidant activity in *Eleutherococcus senticosus* **Toxicology in vitro**, v. 17, p. 229–236, 2003.

ZHOU, C.; AN, S.; JIANG, J.; YIN, D.; WANG, Z.; FANG, C.; SUN, Z.; QIAN, C. An in vitro propagation protocol of two submerged macrophytes for lake revegetation in east China. **Aquatic Botany**, v. 85, p., 44–52, 2006.

ZOLET, A. C. T. **Micropropagação, Florescimento *in vitro* e Aclimatização de Plantas de *Tagetes erecta* L.** Pelotas, Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Botânica, 2006, 55 p (Dissertação de Mestrado em Fisiologia Vegetal)

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A..SANEST; **Sistema de Análise Estatística para Computador. Registro na Secretaria Especial de Informática (SEI)**, sob nº 066-060 – categoria A, Pelotas, 1984.

## APÊNDICE

**Tabela 5–** Número de bandas amplificadas por genótipo com cada um dos *primers* empregados

| <i>Primers</i> | Número de bandas amplificadas |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|----------------|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                | Genótipos                     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| <i>Primer</i>  | G1                            | G2   | G3   | G4   | G5   | G6   | G7   | G8   | G9   | G10  | G11  |
| OPA07          | 6                             | 7    | 6    | 6    | 6    | 7    | 6    | 7    | 7    | 3    | 5    |
| UBC53          | 4                             | 2    | 11   | 11   | 11   | 5    | 5    | 8    | 5    | 2    | 6    |
| OPI07          | 5                             | 4    | 5    | 5    | 5    | 5    | 4    | 5    | 4    | 2    | 10   |
| UBC410         | 9                             | 2    | 5    | 5    | 5    | 4    | 6    | 7    | 4    | 0    | 6    |
| OPA01          | 7                             | 4    | 9    | 9    | 9    | 6    | 10   | 12   | 8    | 3    | 7    |
| OPB18          | 7                             | 10   | 11   | 11   | 11   | 5    | 8    | 10   | 6    | 6    | 14   |
| OPB20          | 11                            | 9    | 7    | 7    | 7    | 7    | 8    | 8    | 6    | 5    | 11   |
| OPB4           | 9                             | 7    | 5    | 5    | 5    | 3    | 5    | 5    | 7    | 7    | 13   |
| OPA4           | 3                             | 6    | 5    | 5    | 5    | 2    | 3    | 5    | 2    | 3    | 3    |
| OPB10          | 6                             | 3    | 8    | 8    | 8    | 5    | 6    | 7    | 1    | 4    | 6    |
| OPX1           | 4                             | 4    | 4    | 4    | 4    | 4    | 7    | 7    | 3    | 3    | 6    |
| OPX11          | 6                             | 4    | 6    | 6    | 6    | 4    | 3    | 6    | 3    | 1    | 4    |
| OPX20          | 4                             | 2    | 4    | 4    | 4    | 2    | 4    | 4    | 4    | 3    | 3    |
| OPX6           | 6                             | 4    | 9    | 9    | 9    | 6    | 10   | 9    | 4    | 1    | 7    |
| <b>Soma</b>    | 87                            | 68   | 95   | 95   | 95   | 65   | 85   | 100  | 64   | 43   | 101  |
| <b>Média</b>   | 6,21                          | 4,86 | 6,79 | 6,79 | 6,79 | 4,64 | 6,07 | 7,14 | 4,57 | 3,07 | 7,21 |

**Quadro 1-** Valores de similaridade genética entre 11 genótipos do gênero *Alternanthera* calculados através do coeficiente de Dice, empregando-se 14 primers polimórficos.

|            |           |           |           |           |           |           |           |           |           |            |            |  |
|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|--|
| <b>G1</b>  | 1.00      |           |           |           |           |           |           |           |           |            |            |  |
| <b>G2</b>  | 0.17      | 1.00      |           |           |           |           |           |           |           |            |            |  |
| <b>G3</b>  | 0.20      | 0.13      | 1.00      |           |           |           |           |           |           |            |            |  |
| <b>G4</b>  | 0.20      | 0.13      | 1.00      | 1.00      |           |           |           |           |           |            |            |  |
| <b>G5</b>  | 0.20      | 0.13      | 1.00      | 1.00      | 1.00      |           |           |           |           |            |            |  |
| <b>G6</b>  | 0.14      | 0.15      | 0.10      | 0.10      | 0.10      | 1.00      |           |           |           |            |            |  |
| <b>G7</b>  | 0.19      | 0.23      | 0.13      | 0.13      | 0.13      | 0.68      | 1.00      |           |           |            |            |  |
| <b>G8</b>  | 0.21      | 0.21      | 0.19      | 0.19      | 0.19      | 0.57      | 0.76      | 1.00      |           |            |            |  |
| <b>G9</b>  | 0.24      | 0.17      | 0.18      | 0.18      | 0.18      | 0.11      | 0.16      | 0.21      | 1.00      |            |            |  |
| <b>G10</b> | 0.13      | 0.13      | 0.07      | 0.07      | 0.07      | 0.06      | 0.08      | 0.10      | 0.06      | 1.00       |            |  |
| <b>G11</b> | 0.19      | 0.19      | 0.22      | 0.21      | 0.21      | 0.13      | 0.15      | 0.16      | 0.24      | 0.16       | 1.00       |  |
|            | <b>G1</b> | <b>G2</b> | <b>G3</b> | <b>G4</b> | <b>G5</b> | <b>G6</b> | <b>G7</b> | <b>G8</b> | <b>G9</b> | <b>G10</b> | <b>G11</b> |  |