

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISILOGIA VEGETAL**

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE GENÓTIPOS DO GÊNERO
*Plectranthus***

JULIANA DE MAGALHÃES BANDEIRA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Mestre em Ciências (M.Sc.).

**PELOTAS
Rio Grande do Sul – Brasil
Março de 2007**

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

B214a Bandeira, Juliana de Magalhães
 Análise da diversidade genética entre genótipos do gênero
Plectranthus / Juliana de Magalhães Bandeira ; orientador
Eugenia Jacira Bolacel Braga ; co-orientador José Antonio
Peters, Valmor João Bianchi. – Pelotas, 2007. – 60f. – Disser-
tação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Fisiologia
Vegetal. Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelo-
tas. Pelotas, 2007.

1.Fisiologia vegetal. 2. *Plectranthus*. 3.RAPD. 4.Cultura
in vitro. 5.Extração de óleos essenciais. 6.Diversidade genéti-
ca. I.Peters, José Antonio. II.Bianchi, Valor João. III.Título

CDD: 581.15

JULIANA DE MAGALHÃES BANDEIRA

ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE GENÓTIPOS DO GÊNERO
Plectranthus

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Mestre em Ciências (M.Sc.).

Aprovada : 26 de março de 2007

Dr. Ariano Martins de Magalhães Jr.

Dr^a. Rosa Lia Barbieri

Dr^a. Beatriz Helena Gomes Rocha

Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga
(Orientadora)

Aos meus pais, Celso e Ieda,

Aos meus irmãos, Rafael, Carolina, Letícia e Felipe

Dedico.

Ao meu namorado, Sérgio e amigos

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pelotas (UFPel), através do Departamento de Botânica, pela oportunidade e estrutura para realização deste trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga pela orientação, colaboração, incentivo, auxílio e amizade, assim como aos professores co-orientadores Dr. José Antonio Peters e Dr. Valmor João Bianchi.

Ao Dr. Marcos Antonio Bacarin pelo empréstimo das dependências do Laboratório de Metabolismo Vegetal e materiais necessários para o desenvolvimento de parte da pesquisa.

Aos professores, colegas e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal pelo aprendizado, amizade e incentivo.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas pelo auxílio e incentivo, os quais se fizeram presentes em todos os momentos desta caminhada. Em especial ao Alexandre de Carvalho, Antelmo Ralph Falqueto, Cláudia Simone Madruga Lima, Fabrizio da Fonseca Barbosa, Guilherme Cardoso, Isabel Corrêa da Silva Rodrigues, Letícia Mascarenhas Pereira Barbosa, Márcia Vaz Ribeiro e Silvia Rubin.

E, é claro, a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	vii
SUMÁRIO	viii
SUMMARY	x
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	6
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Análise da similaridade genética de quatro espécies do gênero <i>Plectranthus</i>	11
3.1.1 Material vegetal.....	11
3.1.2 Extração de DNA.....	12
3.1.3 Amplificação do DNA pela técnica de RAPD (<i>Randomly Amplified</i> <i>Polymorphic DNA</i>).....	13
3.2 Avaliação do teor do óleo essencial de quatro espécies do gênero <i>Plectranthus</i>	15
3.2.1 Material vegetal.....	16
3.2.2 Determinação do teor de água.....	16
3.2.3 Extração, separação e quantificação do óleo essencial.....	16
3.3 Estabelecimento <i>in vitro</i> de três espécies do gênero <i>Plectranthus</i>	18
3.3.1 Material Vegetal.....	18

3.3.2	Desinfestação do material vegetal para inoculação <i>in vitro</i>	19
3.3.3	Meio de cultivo para estabelecimento de gemas e meristemas...	19
3.3.4	Meios alternativos para estabelecimento do <i>P. grandis</i> e <i>P. barbatus</i>	20
3.3.5	Avaliações dos experimentos de estabelecimento <i>in vitro</i>	21
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1	Análise da similaridade genética de quatro espécies do gênero <i>Plectranthus</i>.....	22
4.1.1	Caracterização molecular.....	22
4.2	Avaliação do teor do óleo essencial de quatro espécies do gênero <i>Plectranthus</i>.....	30
4.2.1	Determinação do teor de água.....	30
4.2.2	Extração, separação e quantificação do óleo essencial.....	31
4.3	Estabelecimento <i>in vitro</i> de três espécies do gênero <i>Plectranthus</i>	32
4.3.1	Estabelecimento de gemas e meristemas <i>in vitro</i>	32
4.3.2	Estabelecimento do <i>P. grandis</i> e <i>P. barbatus</i> em meios alternativos.....	34
5	CONCLUSÕES	39
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

LISTA DE ABREVIATURAS

MS.....	meio de cultura de Murashige & Skoog
WPM.....	meio de cultura de Lloyd & McCown
ANA.....	ácido α -naftalenoacético
BAP.....	6-benzilaminopurina
AG ₃	ácido giberélico
g L ⁻¹	grama(s) por litro
mg L ⁻¹	miligrama(s) por litro
μ g μ L ⁻¹	micrograma(s) por microlitro
ng μ L ⁻¹	nanograma(s) por microlitro
μ g mL.....	micrograma(s) por mililitro
μ L.....	microlitro(s)
mM.....	milimolar
mL.....	mililitro(s)
mg.....	miligrama(s)
μ mol m ⁻² s ⁻¹	micromol por metro ao quadrado por segundos
°C.....	graus Celsius
V.....	volts
cm.....	centímetros
mm.....	milímetro(s)
rpm.....	rotações por minutos
b.s.....	base seca
b.u.....	base úmida

SUMÁRIO

BANDEIRA, Juliana de Magalhães, M.Sc. Universidade Federal de Pelotas, março de 2007. **Análise da diversidade genética entre genótipos do gênero *Plectranthus***. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga. Conselheiros: Dr. José Antonio Peters e Dr. Valmor João Bianchi.

Plantas medicinais são amplamente utilizadas pela população, pois são importantes fontes de produtos químicos naturais. Entretanto, podem apresentar problemas na sua utilização com relação à qualidade e à identidade genética do material vegetal. Técnicas moleculares auxiliam na identificação de espécies através da construção das impressões digitais, enquanto que a cultura de tecidos tem importante papel por proporcionar produção massiva de plantas, livres de agentes patogênicos e geneticamente uniformes. O gênero *Plectranthus* abrange espécies que são referidas como boldo por possuírem propriedades anti-dispépticas, analgésicas e estimulantes da digestão. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética entre quatro espécies do gênero *Plectranthus*, através da técnica de RAPD, analisar quantitativamente seus óleos essenciais e a micropropagação *in vitro*. A extração de DNA e amplificação foi realizada pela técnica de RAPD, de quatro espécies de *Plectranthus* (*P. grandis*, *P. barbatus*, *P. neochilus* e *P. amboinicus*). O óleo essencial destas espécies foi extraído através da hidrodestilação. Para o estabelecimento de gemas e meristemas de *P. grandis*, *P. barbatus* e *P. neochilus* foram utilizados os meios MS e MS suplementado com 0,1 mg L⁻¹ de BAP, 0,01 mg L⁻¹ de ANA e 0,1 mg L⁻¹ de AG₃, respectivamente. Como meios alternativos para o estabelecimento de gemas do *P. grandis* e *P. barbatus*, foram utilizados os meios MS e WPM íntegros e com ¾ da força de seus sais, combinados com 30 e 50 g L⁻¹ de sacarose. Maior similaridade genética foi observada entre as espécies *P. neochilus* e *P. amboinicus* (80%), seguido de *P. grandis* e *P. barbatus* (77%). Quanto à concentração de óleo essencial, *P. neochilus* foi o que apresentou maior valor (0,43% b.s.), comparado a *P. grandis* com valores bem menores

(0,09% b.s.). Após 40 dias de cultivo, *P. neochilus* foi a espécie com melhor multiplicação no meio MS, enquanto para *P. grandis* e *P. barbatus* o meio alternativo, WPM $\frac{3}{4}$ com 30 g L⁻¹ de sacarose apresentou melhor condição para o desenvolvimento de ambas as espécies. A variabilidade detectada através da análise de RAPD e a diversidade de respostas obtidas durante a multiplicação *in vitro* permitiram uma clara separação entre as quatro espécies analisadas.

SUMMARY

BANDEIRA, Juliana de Magalhães, M.Sc. Universidade Federal de Pelotas, march, 2007. **Analysis of genetic diversity among genotypes of *Plectranthus***. Advisor: Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga. Co-advisors: Dr. José Antonio Peters e Dr. Valmor João Bianchi.

Medicinal plants are widely used, therefore they are important sources of natural chemical products. However, they can present problems in their use with regard to quality and to genetic identity of the vegetal material. Molecular techniques contribute in the identification of species through the construction of fingerprints, whereas the tissue culture has important role for providing massive production of plants, free of pathogenic agents and genetically uniform. *Plectranthus* includes species that are commonly known as “boldo” for having anti-dyspeptics and analgesic properties, and stimulant of digestion. The aim of this work was to evaluate the genetic diversity among four species of *Plectranthus* genus, through RAPD technique and quantitative analysis of their essential oils and to verify the in vitro micropropagation. The DNA extraction and amplification of four *Plectranthus* species (*P. grandis*, *P. barbatus*, *P. neochilus* e *P. amboinicus*) was carried out by RAPD. The essential oil of these species was extracted by hydrodistillation. For the establishment of axillary buds and meristems of *P. grandis*, *P. barbatus* and *P. neochilus*, MS and MS medium supplemented with 0.1 mg L⁻¹ of BAP, 0.01 mg L⁻¹ of ANA and 0.1 mg L⁻¹ of GA₃, were used respectively. As alternative medium for the establishment of axillary buds of *P. grandis* and *P. barbatus*, the MS and WPM medium were used complete and with ¾ of the concentration of their salts, combined with 30 and 50 g L⁻¹ of sucrose. Higher genetic similarity was observed between species *P. neochilus* and *P. amboinicus* (80%), followed by *P. grandis* and *P. barbatus* (77%). Regarding the essential oil concentration, the *P. neochilus* presented higher value (0.43% b.s.), compared with the *P. grandis* with lower values (0.09% b.s.). After 40 days of culture, the *P. neochilus* was the species with better multiplication in MS medium, while for *P. grandis* and *P. barbatus* the alternative medium WPM¾ with 30 g L⁻¹ of sucrose presented better condition

for the development of both species. The variability detected by RAPD and the diversity of answers obtained during in vitro multiplication, allowed a clear separation among the four analyzed species.

1 INTRODUÇÃO

A adoção da fitoterapia com orientação científica, para o uso imediato de vegetais, garante a utilização correta das plantas medicinais com eficácia e qualidade, contribuindo para a melhoria do nível da saúde. De acordo com Lorenzi & Matos (2002) um dos maiores problemas da utilização de plantas medicinais é relativo à identidade destes vegetais. A fitoterapia é baseada em nomes populares os quais podem variar de acordo com a região. Tais interpretações taxonômicas errôneas podem induzir a utilização de uma planta sem o princípio ativo desejado ou, ainda, a utilização de uma planta perigosa. Por isso, a identificação correta dos vegetais é de suma importância.

Através do desenvolvimento da biotecnologia, diversas técnicas de marcadores moleculares têm permitido indicar com precisão as variações genéticas presentes no DNA de qualquer organismo. Quando marcadores moleculares são utilizados, a possibilidade de identificação de genótipos aumenta consideravelmente para todas as espécies (Mulcahy *et al.*, 1993). Marcadores moleculares são pontos de referência nos cromossomos, ou seja, são seqüências de DNA que podem ser utilizadas para detectar diferenças entre dois ou mais indivíduos (Castro & Ferreira, 2001).

Técnicas moleculares são largamente utilizadas a fim de caracterizar plantas, assim como para estudar sua filogenia. A análise de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) oferece vantagens por ser tecnicamente simples e

de rápida execução, além de não requerer nenhuma informação prévia acerca da seqüência alvo, por utilizar *primers* curtos de seqüências arbitrárias (Welsh & McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990; Nakajima *et al.*, 1998). Esta técnica é baseada na reação de polimerase em cadeia (PCR), a qual promove a amplificação do DNA, permitindo a comparação direta dos alelos, através da composição dos nucleotídeos da seqüência. Desta forma, podem-se comparar os organismos em nível molecular sem a influência do meio ambiente ou da idade do tecido (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

No início da década de 90, técnicas usadas para distinguir cultivares ao nível de DNA permitiram acessar a variabilidade genética dentro do *pool* gênico de espécies cultivadas, assim como identificar a diversidade disponível em bancos de germoplasma e populações naturais de plantas (Salla *et al.*, 2002).

A demanda de plantas medicinais para utilização na cura ou prevenção de doenças, torna o cultivo e o extrativismo destes vegetais uma prática cada vez mais executada na agricultura nacional. No entanto, a exploração de plantas medicinais da flora brasileira, através da extração direta, nos ecossistemas tropicais, tem levado à redução drástica das populações naturais dessas espécies, seja pelo processo predatório de exploração, ou pelo desconhecimento dos mecanismos de perpetuação das mesmas. Dessa forma, se faz necessário a domesticação e o cultivo para a obtenção da matéria-prima de interesse farmacêutico, incorporando a conservação de genótipos em bancos de germoplasma, juntamente com a implantação de reservas genéticas (Reis & Mariot, 2002; Castro *et al.*, 2004).

Diante da crescente demanda econômica mundial, esforços de pesquisadores e estudiosos são requeridos, no intuito de fornecer informações relativas às plantas de uso medicinal, sendo que a inexistência de material para propagação com controle fitossanitário é um dos maiores problemas enfrentado pelos seus produtores (Montanari Jr., 2003).

A multiplicação *in vitro* tem a finalidade de produzir plantas em larga escala, com qualidades morfológicas e fisiológicas, garantindo o mínimo de variação somaclonal, evitando a extração predatória. Estes objetivos são alcançados através do controle da composição do meio, das condições da planta matriz, considerando a qualidade e origem dos explantes (Torres *et al.*, 1998; Kerbauy, 1999).

A utilização de plantas medicinais que já tiveram o valor dos fármacos confirmados esbarra na dificuldade de obtenção de matéria prima de qualidade e na quantidade necessária para suprir a demanda requerida pelo mercado nacional e internacional. Para se ter uma produção confiável de drogas terapêuticas, é recomendado o cultivo em larga escala de plantas medicinais (Mantel *et al.*, 1985; Lindsey & Jones, 1985; Corrêa, 1994; Amaral & Silva, 2003).

A micropropagação tem sido direcionada a atividades comerciais, objetivando a limpeza clonal e multiplicação de espécies ornamentais, florestais, agronômicas e medicinais. A micropropagação de espécies aromáticas e medicinais justifica-se pela crescente demanda da indústria farmacêutica por plantas indexadas, livres de vírus, com alta qualidade fitossanitária, fisiológica e morfológica, podendo ter a capacidade de síntese de metabólitos secundários potencializada, através do melhoramento genético (Martins, 1995; Rout, *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2001; Oliveira & Martins, 1998), além de possibilitar a obtenção de plantas altamente homogêneas, possibilitando o aproveitamento da heterose, sem as limitações da produção de sementes, e ainda há possibilidade de conservação de germoplasma, garantindo a manutenção da biodiversidade (Echeverrigary *et al.*, 2001).

A composição química dos metabólitos está relacionada com seus diferentes sítios de produção. Os tricomas glandulares, por exemplo, podem secretar diversas substâncias (Fahn, 1975), entre estas, óleos essenciais, que são bastante comuns e ocorrem em gêneros de Verbenaceae, Lamiaceae, Solanaceae, Asteraceae e Geraniaceae (Metcalf & Chalk, 1950).

A produção de óleo essencial pode atuar na proteção da parte aérea da planta contra o ataque de herbívoros e patógenos (Werker, 1993), sendo que a atividade biológica dos metabólitos secundários é de interesse para diversas indústrias (Duke, 1994). Portanto, conhecer a estrutura, e estabelecer uma relação com a produção de princípios ativos, pode contribuir significativamente no auxílio e na manutenção de caracteres de interesse comercial, através de programas de melhoramento genético (Franco *et al.*, 1999). Estes compostos são de grande interesse comercial às indústrias químicas, uma vez que não apresentam efeitos colaterais, e, portanto não acumulam resíduos tóxicos no

organismo como os medicamentos sintéticos, demonstrando maior eficiência (Mantel *et al.*, 1985; Montanari Jr., 2003).

Além da extração e composição dos óleos, a toxicologia do chá de diversas plantas tem sido levada em consideração. O controle de qualidade da droga vegetal é imprescindível, pois muitas espécies de vegetais são vendidas sem nenhuma garantia de qualidade, favorecendo a venda de espécies falsificadas além do armazenamento inadequado do vegetal durante sua comercialização (Mouco *et al.*, 2003).

A família Lamiaceae é extensa, amplamente difundida e é adaptada a quase todos os habitats. Caracteriza-se pela existência de inúmeras espécies utilizadas como aromáticas e medicinais, devido à presença de óleos essenciais, produzidos nos pêlos glandulares ou escamas, densamente situados nos caules e folhas (Weberling & Schwantes, 1986).

De acordo com Abdel-Mogib *et al.* (2002), o gênero *Plectranthus* L'Her pertence à subfamília Nepetoideae da tribo Ocimaeae, família Lamiaceae, e é considerado um dos mais ricos em óleos essenciais, tendo como principais constituintes os monos e sesquiterpenos. Este gênero compreende muitas plantas de interesse medicinal e econômico, entretanto sua composição química é pouco conhecida.

Das 300 espécies do gênero *Plectranthus*, 62 são mencionadas por possuírem propriedades medicinais, alimentícias, flavorizantes, antissépticas, repelentes e por serem utilizados como pastagens e plantas ornamentais (Lukhoba *et al.*, 2006).

De acordo com Marques *et al.* (2006) várias espécies deste gênero, muitas referidas como boldo, são utilizadas como plantas medicinais devido às suas propriedades anti-dispépticas, analgésicas e estimulantes da digestão.

Desta forma, foram estudadas quatro espécies do gênero *Plectranthus*, com propriedades medicinais semelhantes, as quais são conhecidas popularmente como boldo (*P. grandis*, *P. barbatus*, *P. neochilus* e *P. amboinicus*). *Plectranthus barbatus* Andrews e *Plectranthus grandis* (Cramer) R.H. Willemse, conhecidos como falso-boldo e boldo-grande, respectivamente, são muito semelhantes e, por isso, são bastante confundidos, sendo ambos utilizados para os mesmos fins na medicina popular (Lorenzi & Matos, 2002). Estudos moleculares realizados por Passinho *et al.* (2000), através da técnica

de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) demonstraram a existência de diversidade genética entre ambas as espécies. *Plectranthus neochilus* (Schlechtre) (boldo-gambá), segundo Lorenzi & Matos (2002), é uma planta herbácea muito aromática, com uso semelhante ao de *P. barbatus*. De acordo com Lukhoba *et al.* (2006), *P. amboinicus* (Lour.) Spreng. também possui propriedades medicinais semelhantes às das espécies anteriormente mencionadas.

Além das propriedades medicinais, *P. barbatus* tem sido utilizado como indicador da fertilidade do solo, para fazer adubo, e, também, tem sido plantado às margens de rios para impedir a erosão do solo (Drummond, 1953; Mwangangi, 1982; Riley & Brokensha, 1988).

Por causa das semelhanças taxonômicas, diversas nomenclaturas têm sido utilizadas para a mesma espécie de *Plectranthus*, tornando difícil a coleta de informações sobre a utilização etnobotânica deste gênero. Além do mais, as espécies de *Plectranthus* comumente utilizadas para fins medicinais possuem um grande número de sinônimas (Lukhoba *et al.*, 2006).

Devido à semelhança das propriedades farmacológicas, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a diversidade genética de quatro espécies do gênero *Plectranthus* (*P. grandis*, *P. barbatus*, *P. neochilus* e *P. amboinicus*), através da técnica de RAPD e da análise quantitativa dos seus óleos essenciais, além de averiguar o comportamento *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Atualmente, o custo para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos ou semissintéticos é muito elevado e tem se mostrado pouco frutífero. Furlam (1998) destaca que 30% dos U\$S 300 bilhões referentes ao mercado de medicamentos estão relacionados aos produtos obtidos através de vegetais, exigindo uma maior atenção na área de cultivo.

Segundo dados da Associação Brasileira da Indústria de Fitoterápicos, o setor movimenta R\$ 1 bilhão por ano e emprega mais de 100 mil pessoas. Como o país não investe em pesquisas de plantas medicinais, cerca de 80% dos fitoterápicos registrados no Brasil são de plantas estrangeiras (Castro *et al.*, 2004). Estima-se que 250.000 a 500.000 espécies vegetais superiores já foram descritas, que cerca de 5% têm sido estudadas fitoquimicamente e uma menor porcentagem já foi avaliada quanto aos aspectos biológicos. O Brasil possui 30% das florestas tropicais, com 40 a 200 mil espécies vegetais, das quais 10 mil são medicinais (Cechinel Filho & Yunes, 1998; Castro *et al.*, 2004).

No Brasil, 63% dos medicamentos disponíveis são consumidos por apenas 20% da população, o restante possui como única fonte terapêutica o uso dos recursos naturais. Até o momento, ainda não se conhece quase nada sobre a composição química de 99,6% das plantas da flora nacional, estimadas entre 40 mil a 55 mil espécies. Além disso, uma grande quantidade de compostos secundários isolados de plantas medicinais, com estrutura química

já determinada, ainda não foram estudados quanto às suas atividades biológicas (Stangarlin *et al.*, 2005). Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) demonstram que cerca de 80% da população mundial faz o uso de algum tipo de erva na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável. Desse total, pelo menos 30% ocorreu por indicação médica. A ABIFITO (2006) estima que 82% da população brasileira utiliza, no tratamento de suas doenças, produtos à base de plantas medicinais. Diversos fatores, principalmente econômicos e sociais, têm contribuído para o desenvolvimento de práticas de saúde que incluam a utilização de plantas medicinais (Silva & Casali, 2000).

Os fitoterápicos representam hoje 10% do capital da indústria farmacêutica mundial, responsável pela movimentação de US\$ 30 bilhões no ano de 2002. Só nos Estados Unidos, entre 1994 e 2000, as vendas cresceram de US\$ 500 milhões para US\$ 5 bilhões. No Brasil, chega a US\$ 550 milhões, com previsão de dobrar este valor até 2010 (Mendonça, 2003). Segundo uma estimativa feita pela *PhytoPharm Consulting*, em Berlim, até 2007, a fitoterapia deve movimentar cerca de US\$ 47 bilhões anualmente, sendo que os EUA podem vir a se tornar o maior mercado de medicamentos fitoterápicos do mundo, responsáveis por uma participação de US\$ 20 bilhões, seguido pela Europa (US\$14 bilhões) e Ásia (US\$ 10 bilhões). Os demais países, incluindo o Brasil, seriam responsáveis por um total de US\$ 3 bilhões anuais (Herbarium, 2006).

O interesse crescente pelos fitoterápicos tem suas razões, afinal, está ligada a um mercado potencial da ordem de bilhões de dólares, seja em países industrializados ou em países em desenvolvimento. Além de apresentar menores efeitos colaterais, fornecendo uma maior segurança ainda quando utilizados de forma adequada, a final, em excesso podem causar toxidez. O tempo de desenvolvimento e o custeio para a produção de um novo fitoterápico de qualidade são reduzidos, sendo despendidos no máximo cinco anos, demandando investimentos da ordem de 2 a 3 milhões de dólares, o que contrasta com a dificuldade de desenvolvimento de novas drogas sintéticas, já que este processo é extremamente caro e demorado, como por exemplo, nos últimos 20 anos o lançamento no mercado de um novo fármaco sintético,

requer investimentos da ordem de 500 a 600 milhões de dólares e, um espaço de tempo nunca inferior a 10 ou 15 anos (Revista Brasileira de Medicina, 2002).

A comercialização de plantas pode se tornar um produto de exportação, gerando lucros ao produtor rural e ao país. Atualmente, o Brasil exporta ipê-roxo, espinheira-santa, erva-de-bicho, fáfia, catuaba, chapéu-de-couro, capim-limão e erva-príncipe, principalmente para os Estados Unidos e Itália. Em contrapartida, o Brasil importa mais de 1,5 mil toneladas por ano de folhas secas de sálvia, arnica, ginkgo, babosa, arruda, erva-doce, alcaçuz, alfazema e até cabelo de milho, os quais são utilizados como diuréticos, além de extratos e essências para atender as necessidades da indústria nacional (Wilke, 2003).

As rotas que sintetizam os metabólitos primários fornecem moléculas que são utilizadas como precursoras da síntese dos metabólitos secundários. Desta forma, as rotas metabólicas estão sob controle da constituição genética do organismo, sendo que durante estádios particulares do desenvolvimento, ou durante períodos de estresse, entre outros fatores ambientais, as rotas dos metabólitos secundários são estimuladas. Conclui-se que as mesmas são resultantes da especialização celular e que sua manifestação durante certas fases do desenvolvimento do organismo deve-se à expressão diferencial dos genes (Mantel *et al.*, 1985; Castro *et al.*, 2004).

Considerando que os fitoquímicos mais valorizados são produtos originados a partir do metabolismo secundário, os quais possuem substâncias suficientes com elevada complexidade estrutural, tornando difícil ou mesmo impossível de serem sintetizados artificialmente. Desta forma, as plantas são importantes fontes tradicionais de diversos fármacos (Rout *et al.*, 2000).

Os óleos voláteis podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, dependendo da família, como pêlos glandulares (Lamiaceae), células parenquimáticas diferenciadas (Laureaceae, Piperaceae, Poaceae), canais oleíferos (Apiaceae) e em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (Pinaceae, Rutaceae). Estes óleos podem estar presentes em determinadas partes como nas flores, folhas, cascas, madeira, raízes, rizomas, frutos ou sementes. Embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleos voláteis, sua composição pode variar de acordo com sua localização. Óleos voláteis obtidos de diferentes órgãos de uma mesma planta podem apresentar composição química, caracteres físico-químicos e odores bem distintos. Cabe

salientar que a composição química de um óleo volátil, extraído do mesmo órgão de uma mesma espécie vegetal, pode variar significativamente, de acordo com a época de coleta, estágio de desenvolvimento, condições climáticas e de solo (Simões & Spitzer, 2003).

Muitos estudos têm sido realizados em relação à produção de óleos essenciais. Santos-Gomes & Fernandes-Ferreira (2003) avaliaram esta característica em brotos cultivados *in vitro* de *Salvia officinales* L., onde segmentos nodais foram estabelecidos em meios de cultivo com diferentes suplementações hormonais. Os óleos essenciais foram extraídos dos brotos através da técnica de hidrodestilação, seus compostos foram identificados, sendo que a concentração dos reguladores de crescimento aparentemente influenciou no acúmulo dos óleos, provavelmente conseqüente do acúmulo de biomassa.

Estes compostos possuem funções biológicas importantes para a planta, pois apesar de não serem essenciais para o crescimento e desenvolvimento do indivíduo, são essenciais para a sobrevivência e continuidade da espécie dentro do ecossistema, sendo responsáveis pela defesa da planta contra agentes externos como doenças, pragas, radiação solar, dentre outros. A qualidade destas substâncias é fortemente influenciada pelas técnicas de cultivo e pelas características genéticas da população sob cultivo (Montanari Jr., 2003).

A espécie *P. barbatus* é comumente utilizada e conhecida como falso boldo, boldo do reino ou boldo brasileiro, é originária da África tropical e Índia. Provavelmente foi trazida pelos portugueses da Índia, ainda no período colonial, por isso o nome boldo do reino, pois foi introduzida pelo Reino de Portugal. Durante este período era muito comum os colonizadores distribuírem em suas colônias, nas Américas e nas ilhas do Atlântico, mudas e sementes de plantas medicinais e espécies coletadas no oriente. Por isso, há muito tempo, certas plantas foram incorporadas à nossa flora, de tal forma que já são consagradas como sendo plantas brasileiras (daí o nome boldo brasileiro). Esta espécie é bastante confundida com o boldo verdadeiro ou boldo do chile, *Peumus boldus* Mol., da família Monimiaceae (Lorenzi & Matos, 2002).

O boldo brasileiro apresenta ação terapêutica no estômago e no fígado, em estudos com as folhas empregadas em maceração aquosa apresentaram

ação hipossecretora gástrica, ou seja, diminuíram a produção de suco gástrico além de diminuir também sua acidez. Podendo ser empregado como auxiliar nos tratamentos de gastrite, dispepsia, azia e mal estar gástrico de uma forma geral. Como é rico em substâncias amargas, que até o momento ainda não estão bem elucidadas quimicamente, o boldo também é empregado para problemas hepáticos como má digestão, ressaca, entre outros (Simões *et al.*, 1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análise da similaridade genética de quatro espécies do gênero *Plectranthus*

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).

3.1.1 Material vegetal

Foram utilizadas plantas de *P. grandis*, *P. barbatus*, *P. neochilus* e *P. amboinicus* provenientes de diferentes localidades, conforme a Tabela 1. As plantas oriundas de Porto Alegre (RS) foram cedidas pelo Instituto Zoobotânico; as de Passo Fundo (RS) pelo Prof. Delvino Nolla da Universidade de Passo Fundo (UPF) e as de Florianópolis (SC) pela Farmácia Natureza. Todas as plantas foram devidamente identificadas utilizando chaves taxonômicas de Lamiaceae no Laboratório de Anatomia Vegetal.

Duas plantas matrizes de cada espécie foram cultivadas em vasos com 30 cm de diâmetro, contendo terra como substrato, mantidos em casa-de-

Vegetação, de março de 2005 a março de 2007, com umidade relativa de aproximadamente 70% e temperatura controlada de 25 - 30 °C.

Coletou-se em tubos de polipropileno (2 mL) aproximadamente 150 mg de folhas jovens (último par de folhas expandidas) das quatro espécies de *Plectranthus* e das diferentes localidades (Tabela 1), as quais foram armazenadas em ultrafreezer a -80 °C, até o processamento das amostras, para extração de DNA.

Tabela 1- Espécies de *Plectranthus* utilizadas nas análises de similaridade genética e seus respectivos locais de coleta

Espécie	Fonte do material	Código
<i>P. grandis</i>	Pelotas/RS	PgPel
<i>P. grandis</i>	Florianópolis/SC	PgFlo
<i>P. neochilus</i>	Pelotas/RS	PnPel
<i>P. neochilus</i>	Porto Alegre/RS	PnPOA
<i>P. amboinicus</i>	Pelotas/RS	PaPel
<i>P. barbatus</i>	Pelotas/RS	PbPel
<i>P. barbatus</i>	Porto Alegre/RS	PbPOA
<i>P. barbatus</i>	Passo Fundo/RS	PbPF
<i>P. barbatus</i>	Reserva Indígena de Passo Fundo/RS	PbRIPF
<i>P. barbatus</i>	Florianópolis/SC	PbFlo

3.1.2 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de folhas previamente isoladas, utilizando o método CTAB 2%, conforme descrito por Doyle & Doyle (1987). Cerca de 150 mg de cada amostra foi macerada em cadinho contendo nitrogênio líquido e, logo após, transferidas para tubos de microcentrífuga de 2 mL, onde foi adicionado 900 µL de tampão de extração (CTAB 2% e 1% de β-mercaptopol), agitando até homogeneizar a amostra, seguida da incubação em banho-maria a 65 °C por 45 min. Após as amostras terem atingido a temperatura ambiente, foi adicionado igual volume (900 µL) de clorofórmio:álcool isoamílico (C:IA, 24:1), agitando por 5 min. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a uma velocidade de 12.000 rpm por 10 min; aproximadamente 700 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo de 1,5 mL. Em seguida, foi

adicionado igual volume (700 μL) de etanol gelado ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) e as amostras foram suavemente agitadas até a visualização do *pellet*. As amostras foram novamente centrifugadas a 12.000 rpm para precipitação do DNA e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 500 μL de tampão de lavagem por 20 min, seguido de uma rápida lavagem com 200 μL de etanol absoluto. O material ficou em câmara de fluxo laminar exposto à temperatura ambiente até a completa evaporação do etanol. O *pellet* foi ressuspensão com 100 μL de TE pH 8,0 contendo RNase ($10\text{ }\mu\text{L mL}^{-1}$) e incubado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 1 h. Foi realizada uma segunda etapa de extração, onde foi adicionado 400 μL de CTAB 2% e após homogeneizar a reação foi acrescentado 700 μL de C:IA, repetindo todo o processo de centrifugação e purificação do DNA, conforme descrito acima, sendo que o *pellet* final foi diluído em água MilliQ autoclavada.

A quantificação do DNA foi realizada após a eletroforese em gel de agarose 0,8%, comparando a intensidade das bandas com marcador λ DNA/*Hind* III, na concentração de $0,5\text{ }\mu\text{g }\mu\text{L}^{-1}$, e, posteriormente, diluído em água MilliQ autoclavada para a concentração de trabalho de aproximadamente $10\text{ ng }\mu\text{L}^{-1}$, para ser utilizado na reação de PCR.

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

Inicialmente foram realizadas reações de PCR para o *screening* com *primers* de RAPD utilizando DNA de *P. grandis* (Figura 1). Os *primers* foram selecionados em função da nitidez e número das bandas e estes tiveram a reação de amplificação por RAPD repetidas para as demais espécies. Foi utilizado um total de 36 *primers*, sendo eles: decâmeros dos kits da Operon – OPX (01 ao 20), OPA (01 e 07), OPAC (07, 16 e 19), OPB (01, 05, 18, 19 e 20), OPF (07 e 19), OPI07 e da *British Columbia University* – UBC (50, 53, 410).

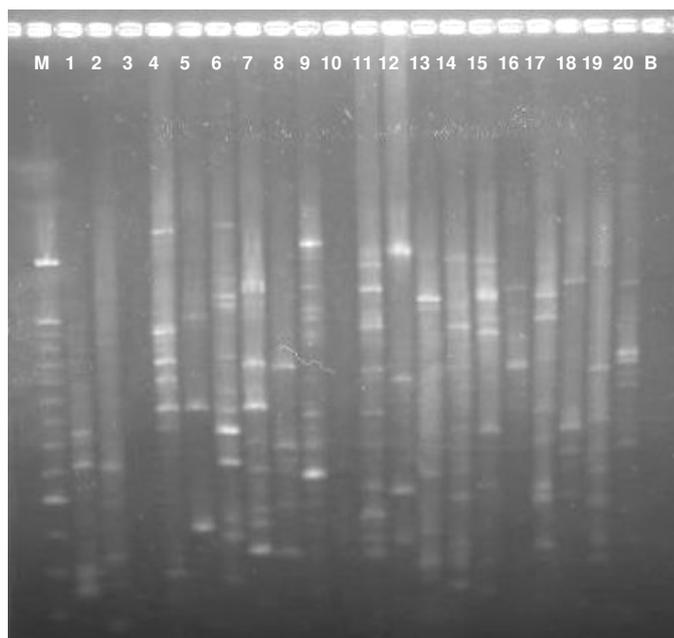


Figura 1- Reação de RAPD realizada para o *screening* dos *primers*, utilizando DNA do *P. grandis* ($20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$). M - marcador 100pb, 1–20 - *primers* OPX01 à OPX20, B - prova em branco.

As reações de amplificação foram conduzidas em um aparelho termociclador de marca MJ Research, Inc, modelo PTC-1000 (*Programmable Thermal Controller*) com o seguinte perfil térmico: o primeiro ciclo de $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 min e 30 s, $36 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 s e $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 min; segundo ciclo repetido por 19 vezes, a $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 s, $36 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 s, $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 e $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 min; o terceiro ciclo a $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 s, $36 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 s, $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 45 s e $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 min (repetido 18 vezes), e para finalizar um único ciclo de $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min.

As reações foram realizadas em tubos de polipropileno de 0,5 mL e o mix para as reações de PCR tiveram um volume final de $25 \mu\text{L}$ contendo: $14,5 \mu\text{L}$ de água MilliQ estéril, $2,5 \mu\text{L}$ de Tampão 10X (10mM Tris-HCl pH 9,5, 50 mM KCl), $1 \mu\text{L}$ de Magnésio (MgCl_2 50 mM), $1,8 \mu\text{L}$ de dNTPs (2,5 mM), $3 \mu\text{L}$ de cada *primer* (10 μM), $0,2 \mu\text{L}$ de *Taq* DNA polimerase –Invitrogen ($5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) e $2 \mu\text{L}$ de DNA genômico ($10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$). 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 utilizando DNA proveniente de duas extrações distintas para cada uma das espécies.

Os fragmentos de DNA amplificados com os *primers* do RAPD foram separados por eletroforese horizontal em gel agarose 1,5%, a 65 V por cerca de 90 min. Após a corrida eletroforética o gel foi submetido a um banho de brometo de etídio ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$), durante 40 min. Posteriormente, o gel foi visualizado na luz UV e fotodocumentado com auxílio de um sistema de fotodocumentação, modelo E-BOX-100 – marca Vilber Lourmat.

Os fragmentos das reações de PCR foram classificados 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, a fim 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, a matriz com os dados binários foi utilizada para a análise de *Bootstrapping* (com 1000 replicações), buscando inferir a confiança de cada agrupamento representado graficamente no dendrograma.

3.2 Avaliação do teor de óleo essencial de quatro espécies do gênero *Plectranthus*

As análises foram conduzidas segundo metodologia utilizada por Barbosa (2005), no Laboratório de Metabolismo Vegetal, do Departamento de Botânica, no Instituto de Biologia, da Universidade Federal de Pelotas (DB/IB/UFPel).

3.2.1 Material vegetal

As mudas das quatro espécies de *Plectranthus* foram propagadas por estaquia e cultivadas em casa-de-vegetação com umidade relativa de aproximadamente 70% e temperatura controlada de 25 - 30 °C, por três meses, aproximadamente, até fornecerem quantidade de material suficiente para o estabelecimento do experimento.

As plantas foram coletadas entre 8 e 9 horas da manhã, selecionando-se os ramos mais jovens e saudáveis. Imediatamente, foram eliminadas as folhas doentes ou atacadas por insetos. Em seguida foi realizado o desfolhamento dos ramos, segundo metodologia utilizada por (Barbosa, 2005).

3.2.2 Determinação do teor de água

Para cada uma das quatro espécies, amostras de 10 g de folhas recém colhidas foram secas em estufa a 65 – 70 °C, por um período de 72 h ou até estabilizar a massa seca, sendo realizadas três repetições de determinação da matéria seca para cada uma das repetições da extração de óleo. A quantidade de água das folhas frescas das plantas analisadas foi determinada calculando a diferença entre a matéria fresca e seca em 100 g de massa fresca expressas em porcentagem em base úmida (% b.u.), as médias foram submetidas a análise de variância com nível de 0,05 de probabilidade de erro.

3.2.3 Extração, separação e quantificação do óleo essencial

A extração do óleo essencial das quatro espécies de *Plectranthus* foi realizada por hidrodestilação, utilizando o aparelho Clevenger adaptado a um balão de fundo redondo de 1 L (Figura 2A), onde foi colocado 100 g de folhas frescas submersas em 500 mL de água destilada, com aquecimento mantido na temperatura mínima necessária à ebulição. Com o objetivo de facilitar a extração, as folhas foram cortadas transversalmente a cada 1 cm. O tempo de extração foi de cinco horas, contados a partir do momento da ebulição, o qual

foi determinado através de testes preliminares. Durante a extração foram coletadas alíquotas de 10 mL a cada hora, para não ocorrer o refluxo do óleo. Na última coleta, após as cinco horas, a coluna de extração do Clevenger foi lavada com solvente (pentano) para aproveitar os resíduos da amostra.

O material coletado durante a extração foi colocado em um funil de separação de 500 mL (Figura 2B), onde o óleo essencial foi separado da fase aquosa utilizando pentano (10 mL) como solvente extrator. Este processo foi repetido por três vezes a fim de evitar perda de material.

A fração orgânica (óleo + solvente) coletada em um erlenmeyer 100 mL foi tratada com sulfato de magnésio anidro (MgSO_4) em excesso até que não se formassem mais colóides e a solução ficasse turva, para a retirada da água remanescente. A seguir, a solução foi filtrada para um frasco âmbar e deixada à temperatura ambiente para evaporação do solvente. Após, com auxílio de uma pipeta Pasteur, o material foi transferido para um frasco de 10 mL previamente pesado. Este foi exposto às mesmas condições para total evaporação do pentano, verificado ao atingir massa constante, atestando a evaporação total do solvente.

A quantificação do óleo essencial foi realizada através de pesagem em balança analítica, com precisão de 0,0001 g. O conteúdo do óleo essencial foi quantificado por material vegetal seco (100 g mL^{-1}) e expresso em porcentagem de base seca (% b.s.). Foram realizadas três extrações de cada uma das espécies de interesse.

Após a quantificação, os recipientes contendo os óleos essenciais foram vedados com parafilme, envoltos com papel alumínio e armazenados em ultra-freezer a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$, para posteriormente serem analisados qualitativamente por cromatografia gasosa.



Figura 2– Aparelho Clevenger acoplado a um balão de fundo redondo de 1 L utilizado para extração de óleo essencial por hidrodestilação (A) e funil de separação de 100 mL utilizado para purificar o óleo essencial através e lavagens com solvente (B).

3.3 Estabelecimento *in vitro* de três espécies do gênero *Plectranthus*

Foram realizados dois experimentos, em épocas diferentes, para estabelecimento das plantas *in vitro*, tendo em vista as baixas respostas obtidas.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura Tecidos de Plantas, do Departamento de Botânica, no Instituto de Biologia, da Universidade Federal de Pelotas (LCTP/DB/IB/UFPel).

3.3.1 Material Vegetal

O material vegetal foi solicitado em hortos botânicos, devidamente identificado, procurando selecionar plantas jovens e saudáveis, sem indícios de doenças ou contaminantes. Mudas de *P. barbatus* e *P. neochilus* foram adquiridas no Instituto Zoobotânico de Porto Alegre, enquanto que as de *P.*

grandis foram gentilmente cedidas pelo Sr. Alésio dos Passos Santos da Farmácia Natureza (Florianópolis/SC). Foram preparadas exsiccatas do material de estudo e as identificações foram confirmadas com o auxílio de uma lupa através de chaves específicas da família Lamiaceae.

As mudas das plantas foram cultivadas em casa-de-vegetação com umidade relativa de aproximadamente 70% e temperatura controlada de 25 - 30 °C, até fornecerem quantidade de material suficiente para o estabelecimento do experimento, cerca de dois a três meses.

3.3.2 Desinfestação do material vegetal para inoculação *in vitro*

Brotações das plantas foram coletadas em casa-de-vegetação, levadas para o laboratório e lavadas em água corrente. Posteriormente os ramos foram selecionados tendo suas folhas removidas e seccionados de forma a isolar cada segmento nodal com duas gemas axilares. Este material foi imerso e mantido em água destilada sob agitação mecânica por 15 minutos. A seguir, em câmara de fluxo laminar, o material vegetal foi imerso em álcool 70% por 20 segundos e lavado três vezes com água esterilizada. Em seguida, submetido a um banho de hipoclorito de sódio 1% com três gotas de tween por 20 minutos, sob agitação mecânica. Na câmara de fluxo laminar, foi novamente enxaguado com água esterilizada, para posterior isolamento dos explantes e inoculação no meio de cultivo.

Foram utilizados, como fonte de explantes, na etapa de estabelecimento, gemas axilares, no primeiro experimento e meristemas no segundo.

3.3.3 Meio de cultivo para estabelecimento de gemas e meristemas

O meio básico utilizado para o estabelecimento de gemas axilares (primeiro experimento) foi o meio formulado por Murashige & Skoog (1962), conhecido como MS, com adição de 30 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar. Foram inoculadas, sob condições assépticas em fluxo laminar, 50 gemas de cada uma das brotações de *P. barbatus*, *P. neochilus* e *P. grandis*.

Para o estabelecimento dos meristemas (segundo experimento) foi utilizado o meio especial para meristema que é constituído dos sais básicos do meio MS acrescido de 0,1 mg L⁻¹ de BAP (6-Benzilaminopurina), 0,01 mg L⁻¹ de ANA (Ácido α -naftalenoacético) e 0,1 mg L⁻¹ de AG₃ (Ácido giberélico).

Neste experimento foram utilizados 50 meristemas de cada uma das brotações de *P. grandis* e *P. barbatus*, com a finalidade de estabelecer *in vitro* um maior número de plantas, tendo em vista a falta de resposta obtida a partir de gemas (primeiro experimento).

Para ambos os meios, o pH foi ajustado para 5,8 antes da adição do ágar, sendo em seguida vertidos (10 mL) em tubos de ensaio e esterilizados em autoclave sob pressão de 1,5 atm, a 121 °C, por 20 minutos.

Os tubos de ensaio contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de 25 \pm 2 °C, submetidos a uma condição de escuro por sete dias, a fim de evitar a oxidação. Após este período, foram expostos a uma densidade de fluxo de fótons de 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, provida por lâmpadas fluorescentes branca-frias, com fotoperíodo de 16 horas de luz, por 30 dias. Cada experimento de estabelecimento foi repetido por duas vezes.

As plantas sobreviventes foram multiplicadas em meio MS através de segmentos nodais de aproximadamente 1 cm, contendo duas gemas axilares, como fonte de explante, permanecendo por 40 dias de subcultivo.

3.3.4 Meios alternativos para estabelecimento do *P. grandis* e *P. barbatus*

A fim de estabelecer uma condição de cultivo *in vitro* de *P. grandis* e *P. barbatus*, por sofrerem oxidações e não terem fornecido material suficiente para micropropagação em nenhum dos tratamentos anteriores, tais espécies foram submetidas a um novo experimento de estabelecimento (terceiro experimento).

Como fontes de explante foram utilizadas 80 gemas de ambas as espécies, devidamente desinfestadas, isoladas de plantas mantidas em casa-de-vegetação com temperatura (25 - 30°C) e umidade (70%) controladas.

Foram utilizados como meios básicos para multiplicação das gemas os meios MS e o WPM - *Wood Plant Media* (Lloyd & McCown, 1980) íntegros e com $\frac{3}{4}$ da força de seus sais, combinados com duas concentrações de sacarose (30 e 50 g L⁻¹). Cada um dos oito tratamentos foi suplementado com 50 mg L⁻¹ de ácido cítrico e 40 mg L⁻¹ de cisteína, como antioxidante. O pH foi ajustado para 5,8 antes da adição do ágar. Cerca de 10 mL de cada meio de cultura foi vertido em tubos de ensaio, os quais foram em seguida esterilizados em autoclave sob pressão de 1,5 atm, a 121 °C, por 20 minutos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído de um esquema fatorial 4x2, com dez repetições, sendo cada uma, representada por um tubo de ensaio contendo uma gema, totalizando 80 gemas, para cada uma das duas espécies.

A inoculação foi conduzida em condições assépticas em fluxo laminar e os tubos de ensaio foram mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de 25 ± 2 °C, submetidos a uma condição de escuro por sete dias a fim de evitar a oxidação. Após este período, foram expostos a uma densidade de fluxo de fótons de 40 μmol m⁻² s⁻¹, provida por lâmpadas fluorescentes branca-fria com fotoperíodo de 16 horas de luz, por 40 dias.

3.3.5 Avaliações dos experimentos de estabelecimento *in vitro*

Para *P. neochilus* foram realizadas, após 40 dias de subcultivo em meio MS (primeiro experimento), avaliações da média da altura (cm), do número de gemas e do comprimento das raízes (cm) de quatro repetições, sendo cada uma representada por um frasco contendo quatro explantes.

Tendo em vista as baixas respostas obtidas *in vitro* para as espécies *P. grandis* e *P. barbatus* somente foram possíveis ser analisadas, ao final do primeiro e segundo experimento, a porcentagem de contaminação e de oxidação dos explantes.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise da similaridade genética de quatro espécies do gênero *Plectranthus*

4.1.1 Caracterização molecular

A extração do DNA genômico foi realizada com sucesso pelo método utilizado. Os *primers* foram selecionados em função da nitidez e número das bandas fornecidas pelo *screening*.

Dos 36 *primers* testados, em quatro não se obteve amplificação (OPX04, OPX10, OPX11 e OPAC16), e outros cinco por apresentarem bandas fracas (OPX02, OPX03, OPX15, OPX19 e UBC50) também não foram utilizados para a realização das análises. Dos 27 *primers* restantes, todos apresentaram polimorfismo conforme pode ser observado na Tabela 2, os quais produziram um total de 284 perfis. Destes apenas 29 (10,21%) foram monomórficos e 255 (89,79%) foram polimórficos. O número médio de polimorfismo apresentado para cada *primer* foi de 9,44. Alguns produtos polimórficos estão apresentados na Figura 3, onde pode ser observada ainda uma banda característica do *primer* OPX20, de aproximadamente 1350pb, a qual permite diferenciar

P. amboinicus dos demais genótipos, além de duas bandas características do primer OPX19, que diferenciam *P. grandis* de *P. barbatus* (± 1350 e 700 pb).

Tabela 2- Polimorfismo detectado com os *primers* selecionados para as reações de RAPD das quatro espécies do gênero *Plectranthus*

Primer	Número de fragmentos amplificados		
	Monomórficos	Polimórficos	Total
OPX01	2	15	17
OPX05	0	6	6
OPX06	0	13	13
OPX07	0	17	17
OPX08	0	10	10
OPX09	1	12	13
OPX12	3	18	21
OPX13	1	2	3
OPX14	1	7	8
OPX16	0	6	6
OPX17	0	8	8
OPX18	2	10	12
OPX20	0	11	11
OPA01	3	8	11
OPA07	2	7	9
OPAC07	2	7	9
OPAC19	2	6	8
OPB01	0	13	13
OPB05	1	8	9
OPB18	2	11	13
OPB19	1	10	11
OPB20	1	7	8
OPF07	0	11	11
OPF19	1	5	6
OPI07	3	12	15
UBC53	1	8	9
UBC410	0	7	7
Total	29	255	284

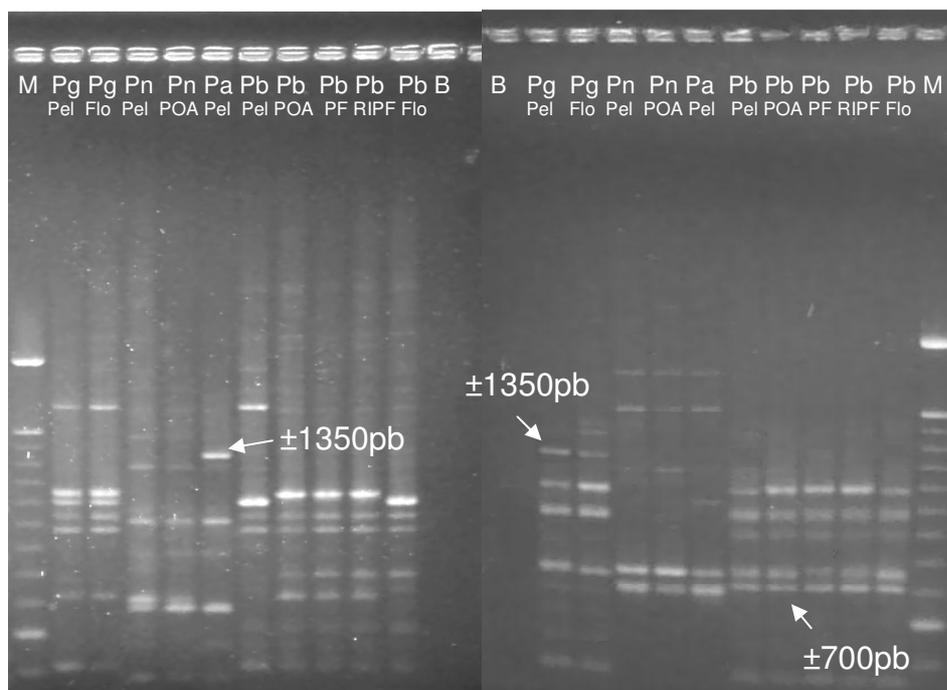


Figura 3- Produtos da amplificação com marcadores do tipo RAPD em quatro espécies de *Plectranthus*, gerados pelos primers OPB20 e OPX19, respectivamente. B – amostra em branco, sem adição de DNA; M – marcador molecular λ 100pb, Pg – *P. grandis*, Pn – *P. neochilus*, Pa – *P. amboinicus*, Pb – *P. barbatus*. Demais abreviações são correspondentes a localização de cada genótipo (Tabela 1).

Considerando somente o perfil eletroforético das plantas de *P. barbatus* de diferentes localidades, pode ser observado polimorfismo em oito dos 27 primers testados, fornecendo um total de 92 bandas, destas, 11 (11,96%) foram polimórficas e 81 (88,04%) monomórficas (Tabela 3). Alguns produtos polimórficos estão apresentados na Figura 4.

Tabela 3- Polimorfismo detectado com *primers* RAPD somente entre genótipos do *P. barbatus* provenientes de cinco diferentes locais

<i>Primer</i>	Número de fragmentos amplificados		
	Monomórficos	Polimórficos	Total
OPX08	9	1	10
OPX09	12	1	13
OPX12	20	1	21
OPX20	7	4	11
OPAC07	8	1	9
OPB05	8	1	9
OPB20	7	1	8
OPF07	10	1	11
Total	81	11	92

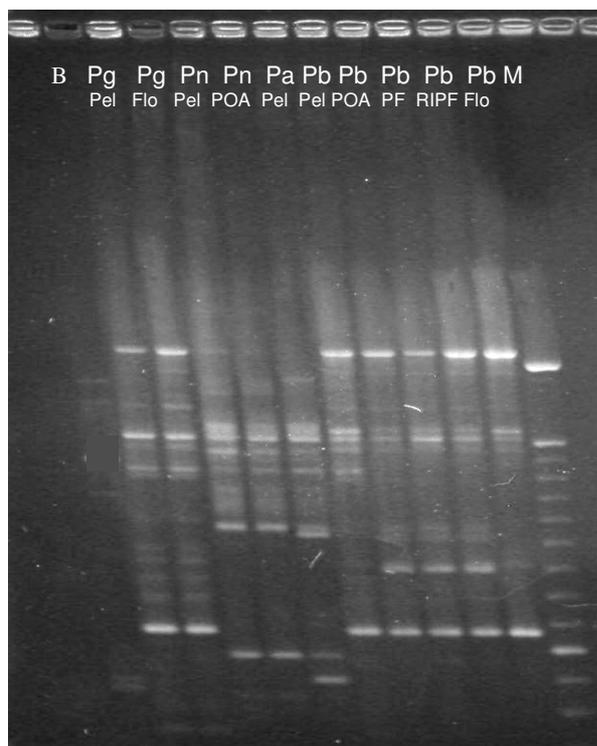


Figura 4- Produtos da amplificação de RAPD para a espécie *P. barbatus* gerados pelo *primer* OPX09. B - prova em branco, M - marcador molecular λ 100pb, Pg – *P. grandis*, Pn – *P. neochilus*, Pa – *P. amboinicus*, Pb – *P. barbatus*. Demais abreviações são correspondentes ao local de coleta do material (Tabela 1).

Conforme pode ser observado no dendrograma (Figura 5) verificou-se uma elevada similaridade, principalmente entre os genótipos do *P. barbatus*. Segundo Paton *et al.* (2004), por causa da grande similaridade dos caracteres morfológicos, algumas espécies de *Plectranthus* são difíceis de serem diferenciadas das espécies do mesmo gênero e também entre os gêneros estreitamente correlacionados.

O uso de marcadores do tipo RAPD permitiu uma clara separação entre as quatro espécies de *Plectranthus* analisadas (Figura 5). Com a utilização de 27 marcadores RAPD, obteve-se uma similaridade genética média de 53% e, na análise entre os dados da matriz de similaridade e da matriz cofenética, obteve-se um valor de correlação (r) de 0,99, demonstrando elevada representatividade dos dados de similaridade genética no dendrograma.

De maneira geral, também se obteve altos valores de *bootstrapping* em quase todos os nós do dendrograma, sendo um indicativo de que o dendrograma é consistente e realmente existe uma clara separação entre as diferentes espécies do gênero *Plectranthus* analisadas. Os menores valores de *bootstrapping* foram verificados entre *P. barbatus* de Pelotas e *P. barbatus* de Florianópolis (49,1) e entre *P. barbatus* de Passo Fundo e *P. barbatus* da Reserva Indígena de Passo Fundo (51,7) (Figura 5).

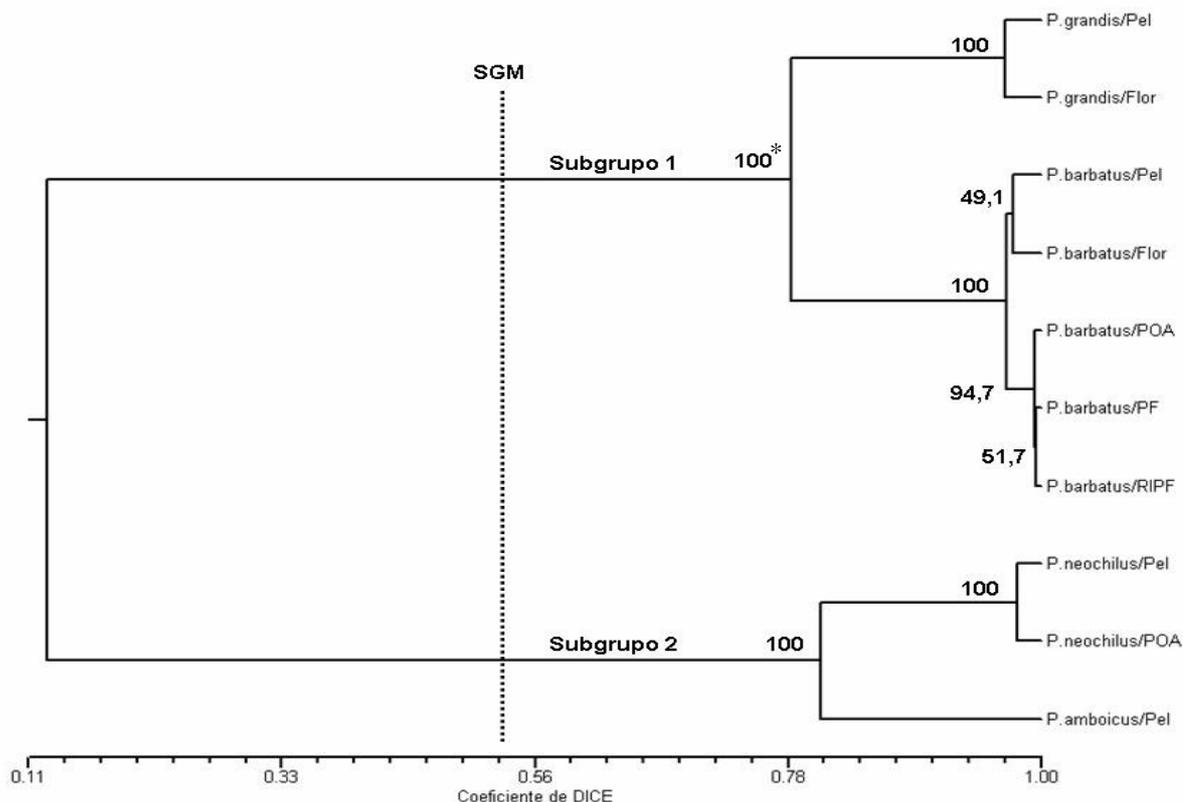


Figura 5- Dendrograma de similaridade genética obtido pelo método UPGMA com 27 *primers* RAPD, a partir de genótipos de *Plectranthus* spp. provenientes de várias localidades da Região Sul do Brasil (SMG - similaridade genética média de 53%). **Bootstrapping*.

Muito embora *Plectranthus* spp. seja alógama, era de se esperar elevada variabilidade genética intra e interespecífica. Pela inferência no dendrograma (Figura 5), embora seja possível observar uma clara separação entre as espécies estudadas, verifica-se que *P. grandis* e *P. barbatus* são mais próximos geneticamente, com similaridade em torno de 77%, indicando assim uma possível origem comum. Por outro lado, o mesmo se verifica para *P. amboicus* e *P. neochilus*, que apresentaram similaridade genética em torno de 80% entre si, porém apresentam baixa similaridade em relação às demais espécies analisadas (aproximadamente 12%) (Quadro 1 - Anexo).

Segundo Lorenzi & Matos (2002), *P. barbatus* e *P. grandis* são muito semelhantes, por isso são bastante confundidos. Lukhoba *et al.* (2006) realizaram uma revisão etnobotânica com 62 espécies de *Plectranthus*, constatando que cerca de 30% das citações literárias consideram *P. grandis*

uma sinonímia de *P. barbatus*, considerando ambas as espécies como se fossem apenas uma. No presente trabalho obteve-se uma clara separação das duas espécies, o que corrobora com a classificação realizada por Passinho *et al.* (2000), que através da técnica de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) demonstrou a existência de variabilidade genética entre ambas as espécies, atestando sua autenticidade.

Os marcadores de DNA apresentam vantagens e superam muitos dos limites dos marcadores morfológicos, confirmando que a técnica de RAPD gera polimorfismo em grande número, além de não sofrerem influência de fatores ambientais e estágio de desenvolvimento, permitindo que a planta seja identificada em qualquer estágio do ciclo vegetativo (Borém, 1998; Sansavini, 1998).

Vinte e quatro *primers* permitiram diferenciar as espécies de *P. grandis* e *P. barbatus*, apresentando um total de 164 bandas, onde 37,20% são polimórficas e 62,80% monomórficas, sendo que, destes, o que apresentou maior polimorfismo foi o *primer* OPX01, com oito bandas polimórficas, enquanto que 32,84% das 134 bandas geradas a partir de 21 *primers* RAPD possibilitaram a diferenciação entre *P. neochilus* e *P. amboinicus*.

Paton *et al.* (2004), através da análise filogenética de regiões *trnL - trnF* e *rps16*, elaboraram um dendrograma que une as espécies de *P. barbatus* e *P. amboinicus* com *bootstrap* de 67%. Diferentemente, no presente trabalho obteve-se uma similaridade genética média de 53%, onde as quatro espécies ficaram claramente separadas num primeiro subgrupo representado por *P. grandis* e *P. barbatus*, enquanto que *P. neochilus* e *P. amboinicus* se localizam no segundo subgrupo (Figura 5). Essa diferença de agrupamento está diretamente relacionada ao tipo de abordagem genômica, uma vez que a análise de RAPD detecta locos aleatórios dispersos por todo o genoma, no trabalho de Pantón *et al.* (2004) foram analisadas seqüências específicas, as quais, em se tratando de espécies relacionadas, podem conduzir a esse tipo de classificação.

De acordo com Casas *et al.* (1999), os marcadores moleculares são muito utilizados tanto para estudar a variabilidade genética entre espécies quanto para identificar a similaridade entre diferentes acessos.

No presente trabalho, foi observado uma alta similaridade entre os genótipos da espécie *P. barbatus* em relação aos diferentes locais de coleta (próximo a 100%). A maior similaridade genética foi registrada entre as plantas coletadas em Passo Fundo (PF) e na Reserva Indígena de Passo Fundo (RIPF) com 99,61%, provavelmente devido à proximidade das regiões, enquanto que a maior distância genética foi observada para os espécimes coletados em Pelotas e Reserva Indígena de Passo Fundo (96,10%) (Figura 5).

Embora seja estimado que o número mínimo de *primers* polimórficos, necessários para análise de variabilidade genética usando o coeficiente de Dice seja 12, possivelmente com um maior número de *primers*, além dos 27 utilizados, poderá ser detectado maior variabilidade genética, principalmente entre os genótipos de *P. barbatus* (Valmor Bianchi, comunicação pessoal).

Apesar da técnica RAPD ser considerada por muitos pesquisadores como sendo de baixa repetibilidade dos resultados, quando utilizada corretamente e comparada a outras técnicas moleculares, conforme observado em diversos trabalhos com outros grupos de plantas, ela mostra-se eficiente no estudo da variabilidade genética. No presente trabalho demonstrou-se que a técnica RAPD é de grande aplicabilidade para estudo de variabilidade genética das espécies de *Plectranthus*. Além do mais, essa técnica é mais rápida, mais simples, requer menor quantidade de DNA e é mais barata, quando comparada às outras técnicas moleculares, conforme já mencionada por Upadhyay *et al.* (2004).

Embora no presente trabalho tenha sido detectado baixa variabilidade entre genótipos da mesma espécie, a técnica de RAPD foi eficiente para a diferenciação das mesmas, podendo ser útil também para mapear características de interesse ao melhoramento. De acordo com Shimada *et al.* (1999), análises de RAPD são capazes de revelar polimorfismo do DNA até mesmo de espécies altamente relacionadas.

Por se tratar de espécies com grande potencial de aproveitamento na produção de fármacos, a variabilidade existente entre as diferentes espécies de *Plectranthus* pode ser utilizada para seleção de genótipos com características melhoradas. Entretanto, para que isso seja possível, um estudo mais apurado sobre a variabilidade com maior número de marcadores se faz necessário, bem como deverão ser conduzidos trabalhos sobre a biologia reprodutiva destas

espécies para verificar se há possibilidade de transferência de genes entre estas espécies pelo processo de melhoramento assistido.

4.2 Avaliação do teor de óleo essencial de quatro espécies do gênero *Plectranthus*

4.2.1 Determinação do teor de água

Houve diferença estatística em relação ao teor de água nas folhas das espécies analisadas, sendo que a maior média foi apresentada para o *P. neochilus*, com 93,12% b.u., não diferindo estatisticamente do *P. amboinicus* e a menor média, de 87,16% b.u. para *P. barbatus* (Figura 6). Estes resultados foram de acordo com o esperado, já que as espécies *P. neochilus* e *P. amboinicus* se assemelham morfológicamente, ambas possuem folhas pequenas e suculentas, com aproximadamente 6 cm de comprimento. Enquanto que as outras duas espécies, são bastante confundidas entre si, possuindo folhas maiores (chegando a 12 cm de comprimento) e mais largas (com aproximadamente 10 cm de largura), além de serem menos espessas que as primeiras.

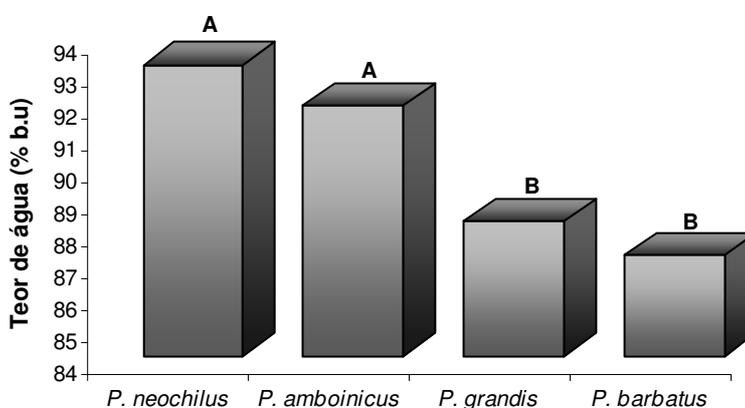


Figura 6- Determinação do teor de água por massa fresca de plantas de *Plectranthus*. As médias foram comparadas estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

4.2.2 Extração, separação e quantificação do óleo essencial

A partir dos resultados analisados, foi observada diferença significativa, ao nível de 5% de erro, em relação à quantificação do óleo essencial para as espécies de interesse (Figura 7). *P. amboinicus* possui maior teor de óleo essencial (0,43% b.s.), não diferindo apenas do *P. neochilus*, enquanto que *P. grandis* apresentou os menores valores (0,09% b.s.).

Como esperado, as espécies que apresentaram maior teor de água, possuem menor matéria seca e, conseqüentemente menor concentração de óleo essencial por grama de massa seca. O comportamento diferenciado entre as espécies é intrínseco das características morfológicas. Os dois principais grupos formados pela análise de marcadores moleculares são confirmados através deste experimento, onde foi possível observar que a concentração de óleos essenciais por grama de massa seca é menor para o primeiro grupo, composto por *P. grandis* e *P. barbatus*, e maior para o segundo, *P. neochilus* e *P. amboinicus*, demonstrando a existência de maior proximidade e similaridade entre as espécies de cada grupo.

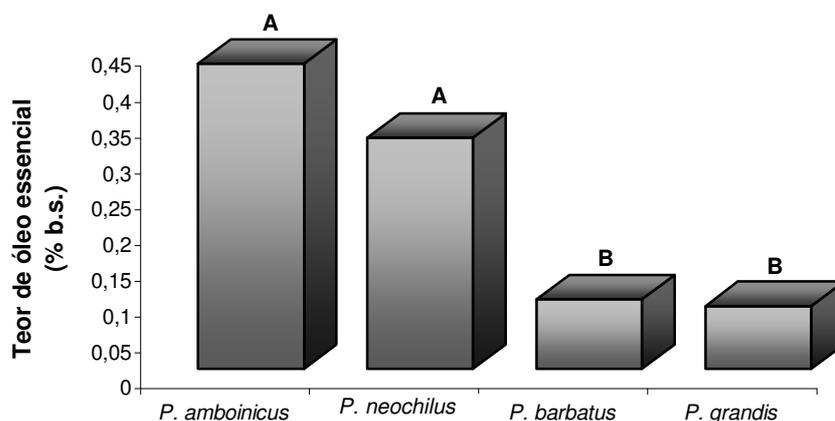


Figura 7- Teor de óleo essencial extraído de folhas frescas de quatro espécies de *Plectranthus*. As médias foram comparadas estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

De acordo com Abdel-Mogib (2002), a constituição química das espécies do gênero *Plectranthus* é pouco conhecida, sendo que estas são ricas em

óleos essenciais, possuindo em sua constituição teores abaixo de 0,5% de óleo volátil por base seca, concordando com os baixos valores encontrados no presente trabalho.

Os maiores constituintes dos óleos essenciais deste gênero são os mono e sesquiterpenos. Cerca de 140 diterpenóides já foram identificados, de glândulas foliares, para espécies de *Plectranthus* (Abdel-Mogib, 2002).

Pode ser observado um comportamento similar quanto ao teor de água e quantidade de óleo essencial (Figuras 6 e 7). Considerando que os constituintes dos óleos essenciais das quatro espécies em estudo sejam semelhantes, tanto na composição quanto na sua concentração, sugere-se que *P. amboinicus* é a espécie mais indicada para o cultivo, por apresentar menor massa seca e maior concentração de óleo essencial.

4.3 Estabelecimento *in vitro* de três espécies do gênero *Plectranthus*

4.3.1 Estabelecimento de gemas e meristemas *in vitro*

A desinfestação com hipoclorito de sódio foi efetiva, pois reduziu consideravelmente a contaminação por fungos e bactérias na primeira semana de incubação das gemas de *P. grandis*, *P. barbatus* e *P. neochilus* (primeiro experimento). Após 30 dias de cultivo no meio MS houve oxidação de quase a totalidade das gemas para as espécies de *P. grandis* (95%) e *P. barbatus* (92%), enquanto que 70% das gemas do *P. neochilus* foram bem sucedidas no estabelecimento *in vitro* em meio MS.

Esta diferença de comportamento das espécies em relação à oxidação pode ser decorrente de uma maior lignificação dos tecidos de *P. grandis* e *P. barbatus* em relação ao *P. neochilus*. De acordo com Andrade *et al.* (2002), a oxidação ocorre em função da liberação de compostos fenólicos que se concentram no interior dos frascos quando a planta é cultivada *in vitro*, os quais são precursores da síntese de lignina e liberados dos tecidos perante injúria ou senescência. O acúmulo de polifenóis e produtos de oxidação, como melanina,

suberina, lignina, cutina e calose, em torno da superfície excisada, modifica a composição do meio de cultivo, assim como a absorção de metabólitos. Os polifenóis são derivados do metabolismo secundário, os quais exercem importante papel no metabolismo das espécies e, ainda atuam na defesa contra predadores e microrganismos (Teixeira, 2001).

As gemas sobreviventes do primeiro experimento, após 30 dias de cultivo, foram transferidas para frascos de vidro contendo cerca de 40 mL de meio MS semi-sólido a fim de tentar a multiplicação. Após 40 dias de subcultivo, apenas o *P. neochilus* foi multiplicado com sucesso no meio MS sem necessidade de tratamento adicional (Figura 8A). Já as outras duas espécies, tiveram o desenvolvimento prejudicado (Figura 8B e 8C) e não apresentaram material suficiente para experimento de micropropagação.

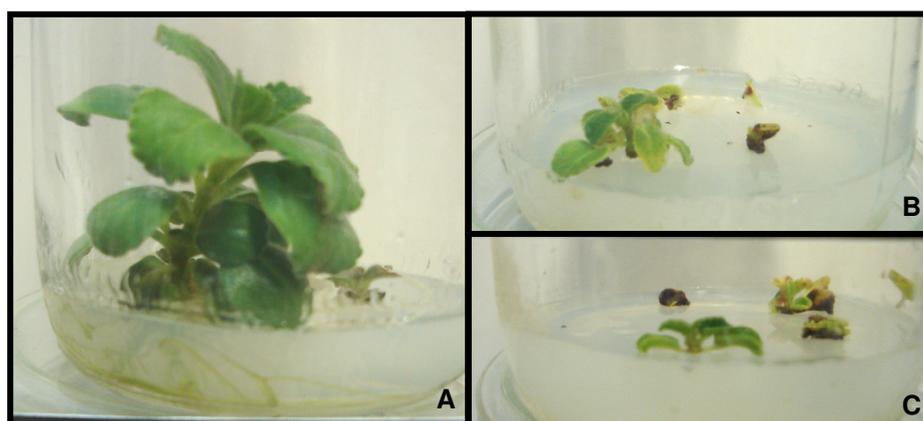


Figura 8- Aspecto das plantas de *P. neochilus* (A), *P. barbatus* (B) e *P. grandis* (C) após o estabelecimento *in vitro* de gemas axilares em meio MS por 30 dias e subcultivados em meio MS por 40 dias.

As plantas de *P. neochilus* foram multiplicadas com sucesso, através de segmentos nodais, em meio MS sem adição de nenhum tipo de regulador de crescimento. Após 40 dias de subcultivo foi observada uma altura média de 10 cm, comprimento médio das raízes de 14 cm e 13 gemas em média por planta.

Após 30 dias de cultivo dos meristemas de *P. grandis* e *P. barbatus* em meio MS suplementado com $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de AG_3 (segundo experimento), houve 100% de oxidação para ambas as

espécies. Segundo Flores *et al.* (1998), a oxidação fenólica tem sido um dos principais problemas na fase de estabelecimento de cultivos *in vitro*. Estes compostos fenólicos são oxidados pelas enzimas polifenases produzindo substâncias tóxicas, as quais atuam inibindo o crescimento dos explantes, podendo causar a morte, além de escurecer o meio de cultura (Sato *et al.*, 2001).

4.3.2 Estabelecimento do *P. grandis* e *P. barbatus* em meios alternativos

Após a primeira semana de cultivo no escuro, para evitar a oxidação dos explantes, nos meios MS e WPM íntegros e com três quartos da concentração de seus sais, combinados com 30 e 50 g L⁻¹ de sacarose, para o estabelecimento *in vitro* de *P. grandis* e *P. barbatus*, houve uma reduzida taxa de contaminação por fungos e bactérias com uma média de 12,5% para *P. grandis* e 15% para o *P. barbatus* (Tabela 4) demonstrando que o sistema de desinfestação com hipoclorito de sódio 1% foi suficiente (terceiro experimento).

Tabela 4- Porcentagem de contaminação das gemas de *P. grandis* e *P. barbatus* após sete dias de cultivo nos diferentes meios de cultura

Tipo de meio de cultura	Concentração de sacarose (g L ⁻¹)	Contaminação por fungos e bactérias (%)	
		<i>P. grandis</i>	<i>P. barbatus</i>
MS	30	10	0
MS	50	10	30
MS ³ / ₄	30	0	10
MS ³ / ₄	50	10	10
WPM	30	0	30
WPM	50	30	20
WPM ³ / ₄	30	10	10
WPM ³ / ₄	50	30	10
Total		12,5%	15%

Segundo Teixeira (2001), o cultivo dos explantes no escuro ou em baixa densidade de fluxo de fótons durante as primeiras semanas da fase de

estabelecimento, pode resultar na diminuição da oxidação fenólica. O cultivo em condições de luminosidade intermediária, mesmo após o período das primeiras semanas da etapa de estabelecimento das culturas, contribui para prevenir a oxidação e melhorar o crescimento dos explantes.

Ao término do experimento, após 40 dias de cultivo em câmara de crescimento com condição de luz e temperatura controladas, houve um elevado índice de oxidação dos explantes (Tabela 5), onde em média 52,94% das gemas de *P. grandis* oxidaram e 73,53% de *P. barbatus*.

Tabela 5- Porcentagem de oxidação das gemas de *P. grandis* e *P. barbatus* após 40 dias de incubação nos diferentes meios de cultura

Tipo de meio de cultura	Concentração de sacarose (g L ⁻¹)	Oxidação das gemas (%)	
		<i>P. grandis</i>	<i>P. barbatus</i>
MS	30	55,56	50,00
MS	50	33,33	85,71
MS ³ / ₄	30	40,00	77,78
MS ³ / ₄	50	66,67	55,56
WPM	30	87,50	85,71
WPM	50	57,14	87,50
WPM ³ / ₄	30	55,56	77,78
WPM ³ / ₄	50	28,57	77,78
Total		52,94%	73,53%

Campos (2005) observou para *Prunus* spp. que percentuais mais elevados de oxidação ocorrem em meios que apresentam concentrações maiores de sais, concordando com Teixeira (2001), o qual afirma que meios de cultivos com sais reduzidos possibilitam a redução das oxidações em explantes de espécies lenhosas. No presente trabalho, nenhum tipo de correlação entre os percentuais de oxidação e as concentrações de sais nos meios de cultivo foi observado, confirmando a possibilidade da oxidação estar relacionada com a produção de metabólitos secundários, como os compostos fenólicos sintetizados pelas espécies em estudo.

O crescimento dos explantes foi muito baixo, a maioria desenvolveu apenas o primeiro par de folhas com aspecto de hiperidricidade. Somente *P. grandis* nos meios MS com 50 g L⁻¹ de sacarose e WPM ³/₄ com 30 g L⁻¹ de

sacarose apresentaram um bom desenvolvimento com enraizamento (Figura 9B e 9C). Para *P. barbatus* no meio WPM $\frac{3}{4}$ com 30 g L⁻¹ de sacarose, as gemas se desenvolveram, apresentando o primeiro par de folhas verdes com pouca oxidação na porção basal do explante (Figura 9O).

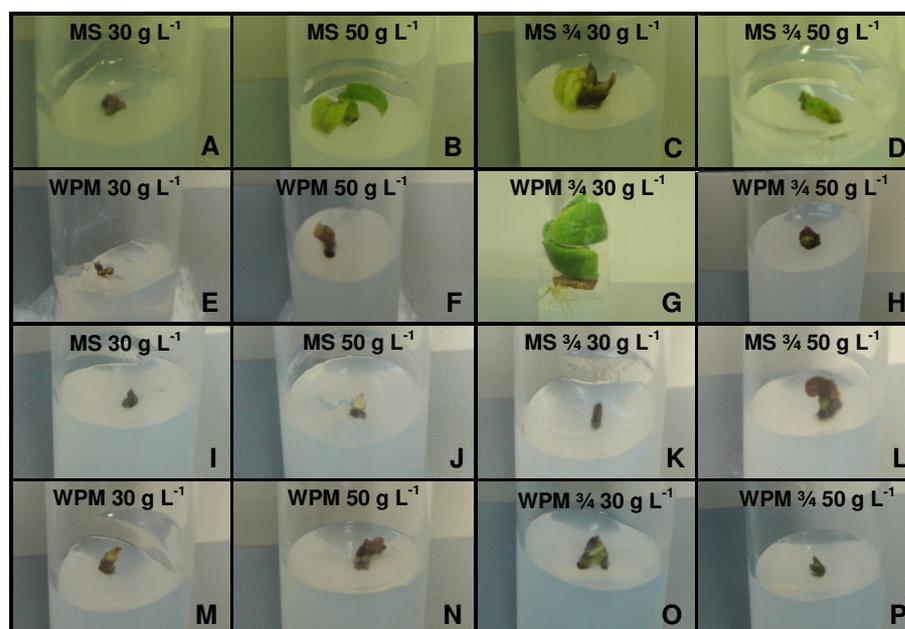


Figura 9- Aspecto das plantas de *P. grandis* (A-H) e *P. barbatus* (I-P) após 40 dias de cultivo em meio MS e WPM com $\frac{3}{4}$ da força de seus sais e na sua composição total, combinados com 30 e 50 g L⁻¹ de sacarose, suplementados com 50 mg L⁻¹ de ácido cítrico e 40 mg L⁻¹ de cisteína.

Para ambas as espécies de *Plectranthus*, a concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose apresentou melhores resultados, contrastando com estudos realizados por Romano (1995) com *Quercus suber* L. e Nicoloso *et al.* (2003) com *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, onde o aumento da concentração de sacarose favoreceu o alongamento das plantas com maior número de gemas, demonstrando a necessidade particular de cada espécie.

A sacarose é um carboidrato encontrado com abundância nos tecidos vegetais, sendo sintetizado indiretamente através da fotossíntese. Quando cultivadas *in vitro*, as plantas não produzem todo o açúcar necessário ao seu crescimento, portanto, a sacarose é adicionada ao meio de cultivo (Kyte &

Kleyn, 1999). Segundo Caldas *et al.* (1998), a sacarose é o carboidrato mais utilizado nos meios nutritivos por suportar elevadas taxas de crescimento para a maioria das espécies vegetais. A concentração de sacarose comumente utilizada no cultivo *in vitro* é de 30 g L⁻¹, no entanto, esta condição pode variar para cada espécie (Lakso *et al.*, 1986).

Segundo Hartmann *et al.* (1997), para muitas espécies de plantas pode ser utilizado o meio de cultura diluído, para o processo de multiplicação, sem a necessidade de utilizar sua composição integral, reduzindo custos laboratoriais.

A utilização de meio de cultura diluído tem demonstrado bons resultados tanto para espécies medicinais, como para outras plantas, como relatado por Oliveira & Pasqual (1995), que testaram diferentes concentrações de meio MS para estabelecer as condições ideais de propagação de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) e recomendaram a utilização de MS $\frac{3}{4}$ com 60 g L⁻¹ de sacarose. De acordo com Barros & Castro (1995), o meio MS com $\frac{3}{4}$ de seus sais e vitaminas foi o mais adequado para regeneração da macela (*Achyrocline satureoides* (Lam.) D.C.), uma planta medicinal.

No presente trabalho observou-se um melhor desenvolvimento das plantas no meio WPM diluído para ambas as espécies, concordando em parte, com estudos feitos por Bosenbecker (2001), onde a micropropagação de meristemas caulinares de camomila romana foi mais satisfatória em MS com 75% da concentração de seus sais e vitaminas.

O meio de cultura WPM tem sido descrito e utilizado como alternativa para o meio MS, sua formulação foi especialmente desenvolvida para espécies lenhosas, tendo como característica, baixas concentrações de sais (Hartmann & Kester, 1989; Grattapaglia & Machado, 1998). Segundo Harada & Murai (1996), o meio WPM tem concentrações de sais menores do que o MS e, desta forma, apresentou melhores condições para a micropropagação de *Prunus mume* Sciebold & Zucc.

Um dos mais importantes componentes do meio de cultura é o nitrogênio, sendo que o MS possui em sua constituição maiores índices de nitrogênio inorgânico enquanto que outras formulações possuem níveis mais baixos. Algumas espécies requerem ou toleram índices mais elevados deste elemento no meio de cultivo do que outras. O balanço entre NH₄⁺ e NO₃⁻ é bastante crítico para a cultura de células e regeneração de plantas. No geral,

existe uma tendência de usar níveis mais baixos de NH_4^+ do que NO_3^- nos meios de cultura de tecido de plantas (Dixon & Gonzales, 1996).

O meio WPM possui menor concentração de sais básicos do que o MS, sendo que a relação de amônio:nitrato é de 0,52 mM para o MS e 0,51 mM para o WPM, e a força iônica total é de 94,25 mM e 42,39 mM, respectivamente (McCown & Sellmer, 1987).

4 CONCLUSÕES

Através da técnica de RAPD observa-se maior similaridade genética entre as espécies *P. neochilus* e *P. amboinicus*, seguido de *P. grandis* e *P. barbatus*. Verifica-se também uma separação da espécie *P. barbatus* em relação aos diferentes locais de coleta, sendo que a maior similaridade é encontrada nas amostras coletadas em regiões mais próximas geograficamente.

Em relação à quantificação de óleos essenciais há maior concentração em *P. amboinicus* seguido de *P. neochilus*, *P. barbatus* e *P. grandis*.

Pôde ser observado que o meio MS é apropriado para o estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *P. neochilus*, enquanto que o meio WPM $\frac{3}{4}$ com 30 g L⁻¹ de sacarose é o mais adequado para o estabelecimento *in vitro* de *P. grandis* e *P. barbatus*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MOGIB, M.; ALBAR, H.A.; BATTERJEE, S.M. Review: Chemistry of the Genus *Plectranthus*. **Molecules**, King Abdulaziz University, Saudi Arábia, n.7, p.271-301, 2002.

ABIFITO – **Associação Brasileira da Indústria Fitoterápica**. Disponível em:<www.abifito.com.br> Acessado em outubro, 2006.

AMARAL, C.L.F. & SILVA, A.B. da. Melhoramento Biotecnológico de Plantas Medicinais: Produção de alcalóides e óleos essenciais. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. p.55-59, 2003. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/>>. Acessado em dezembro de 2005.

ANDRADE, M.W.; LUZ, J.M.Q.; LACERDA, A.S.; MELO, P.R.A. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Ciência e Agricultura**, Lavras. v.24, n.1, p.174-180, 2000.

BARBOSA, F.F. **Avaliação do tempo de residência no campo e da temperatura do ar de secagem sobre o teor e sobre a composição química do óleo essencial de erva-cidreira-brasileira (*Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown)**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2005. 175p. (Tese de Doutorado).

BARROS, I.B.I. & CASTRO, R.L. Influência do pH e do volume do meio MS $\frac{3}{4}$ no desenvolvimento *in vitro* de macela (*Achyrocline satureoides* (Lam.) DC.). **Horticultura Brasileira**, Brasília. v.13, n.1, p.69, 1995.

BOREM, A. **Melhoramento de Plantas**. 2^a ed. Universidade Federal de Viçosa, 1998. 453p.

BOSENBECKER, V.K. **Efeito dos reguladores de crescimento na micropropagação e organogênese em camomila romana (*Anthemis nobilis* L.)**. Pelotas, Universidade Federal de Pelotas, 2001. 98p. (Dissertação de Mestrado em Fisiologia Vegetal)

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, C.A.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SP/Embrapa-CNPQ, p.87-132, 1998.

CAMPOS, R.V. de. **Estabelecimento, multiplicação e enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* spp.** Pelotas, Universidade Federal de Pelotas, 2005. 67p. (Dissertação de Mestrado em Agronomia com concentração em Fruticultura).

CASAS, A.M.; IGARTUA, E.; BALAGUER, G.; MORENO, M.A. Genetic diversity of *Prunus* rootstocks analyzed by RAPD markers. **Euphytica**. Zaragoza, Espanha, n.110, p.139-149, 1999.

CASTRO, H.G. de & FERREIRA, F.A. **Contribuição ao Estudo das Plantas Medicinais: Carqueja (*Braccharis genistelloides*)**. Viçosa, MG: UFV, Departamento de Fitotecnia, 2001. 102p.

CASTRO, H.G. de; FERREIRA, F.A.; SILVA, D.J.H.da e MOSQUIM, P.R. **Contribuição ao Estudo das Plantas Medicinais: Metabólitos Secundários**. 2^aed. Viçosa, MG: UFV, 2004. 113p.

CORRÊA, C.B.V. Contribuição ao estudo de *lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britt. & Wilson – erva cidreira. **Revista Brasileira de Farmácia**. n.73, v.3, p.57-64, 1992.

CORRÊA, C. *et al.* **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. Fundação de Estudos e Pesquisas em Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia, Jaboticabal, 1994.

CECHINEL FILHO, V. & YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos

sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, Itajaí, SC. v.21, n.1, p.99-105, 1998.

DIXON, R.A. & GONZALES, R.A. **Plant Cell Culture: a practical approach**. 2ªed. Oxford University Press: Irlpress, n.145, 1996. 230p.

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

DRUMMOND, H. *P. barbatus*. Andr. Herbarium specimen held at K and collected in Tanzania (*Drummond & Hemsley* 4370), 1953. In: LUKHOB, C.W.; SIMMONDS, M.S.J.; PATON, A.J. *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses. **Journal of Ethnopharmacology**. Elsevier. v.103, p.1-24, 2006.

DUKE, S.O. Commentary glandular trichomes: A focal point of chemical and structural interactions, **International Journal of Plant Science**, n.155, p.617-620, 1994.

ECHEVERRIGARAY, S; ANDRADE, L.B.; DELAMARE, A.P.L.; ZENI, A.P.D.; BICARRER, R. Cultura de tecidos micropropagação de plantas aromáticas e medicinais; In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M. de; AZEVEDO, J.L. de. **Biotechnology na agricultura e na agroindústria**. Guaíba-RS, Editora Agropecuária, 2001.

FAHN, A. **Plant Anatomy**. Toronto: Pergamon Press, 1975. 611p.

FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores Moleculares em análise genética**. 2ªed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1995. 220p.

FLORES, R.; STEFANELLO, S.; FRANCO, E.T.H.; MANTOVANI, N. Regeneração *in vitro* de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.4, n.3, p.201-205, 1998.

FRANCO, L.L. **As sensacionais 50 plantas medicinais campeãs de poder curativo**. Lobo Franco: Curitiba, 1999. 235 p.

FURLAN, M.R. **Cultivo de Plantas Medicinais**. Coleção Agroindústria, 13. Edição SEBRAE - Cuiabá. Mato Grosso, 1998. 137p.

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: SPI/Embrapa – CNPH. v.1, p.183-260, 1998.

HARADA, H. & MURAI, Y. Micropropagation of *Prunus mume*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague. v.8, p.265-267, 1996.

HARTMANN, H.T. & KESTER, D.E. **Plant propagation – principles and practices**. New Delhi: Prentice-Hall of India Private Limited, 1989.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES, F.T.J.; GENEVE, R.L. **Plant propagation – principles and practices**. Upper Saddle River, New Jersey, 1997. 770p.

HERBARIUM. **Mercado de fitoterápicos no Brasil**. Disponível em: <<http://www.herbarium.com.br>>. Acessado em outubro, 2006.

KYTE, L. & KLEYN, J. **Plants from test tubes: an introduction to micropropagation**. Timber Press: Hong Kong, 1999. 240p.

KERBAUY, G. B. **Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas**. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília, CBAB/EMBRAPA, 1999.

LAKSO, A.N.; REISCH, B.I.; MORTENSEN, J.; ROBERTS, M.H. Simulation of growth of in vitro propagated grapevines after transfer from culture by carbon dioxide enrichment. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.111, p.634-638, 1986.

LORENZI, H. & MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Instituto Plantarum de Estudo da Flora LTDA: Nova Odessa, SP, 2002. 544p.

LINDSEY, K. & JONES, M.G.K. **Biotecnologia Vegetal Agrícola**. Editorial Acríbia, S.A. Zaragoza: Espanha, 1985. 276p.

LLOYD, G. & McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined**

Proceedings International Plant Propagators Society. Cleveland, Ohio, v.30, p.421-427, 1980.

LUKHOBBA, C.W.; SIMMONDS, M.S.J.; PATON, A.J. *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses. **Journal of Ethnopharmacology.** Elsevier. v.103, p.1-24, 2006.

MANTEL, S.H.; MATTHEUS, J.A.; McKEE, R.A. Princípios de Biotecnologia em Plantas: Uma Introdução à Engenharia Genética em Plantas. **Sociedade Brasileira de Genética e Revista Brasileira de Genética.** Ribeirão Preto, São Paulo, 333 p., 1985.

MARTINS, E.R. *et al.* **Plantas Mediciniais.** Edição Imprensa Universitária UFV. Viçosa. Minas Gerais, 1995. 220p.

MARQUES, A.M.; TRINDADE, A.P.F.; LIMA, M.C.H.P.; SOARES, P.H.; KAPLAN, M.A.C. **Caracterização Química do Óleo Essencial de *Plectranthus sp.*** In: 29^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia/SP, 2006.

MENDONÇA, D. Fitoterápicos: Nosso verde vale ouro. **Pharma business,** Maio/Junho, 2003. p. 24-30. Disponível em: <www.abifito.com.br> Acessado em outubro, 2006.

McCOWN, B.H. & SELLMER, J.C. General media and vassels suitable for wood plant culture, 1987. In: CAPTAN, E.; OTUKI, M.F.; VIANA, A.M. *In vitro* culture of *Phyllanthus stipulatus* (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Botânica,** São Paulo, v.24, n.1, p.25-34, 2001.

METCALFE, C.R. & CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses.** Oxford: Clarendon Press, v.2, p.1041-1053, 1950.

MONTANARI Jr., Í. Aspectos da produção comercial de plantas medicinais nativas. **CPQBA – UNICAMP.** Campinas, São Paulo, 2003. Disponível em: <www.cpqba.unicamp.br/plmed/artigos/produção.htm> Acessado em agosto, 2006.

MOUCO, G.; BERNARDINO, M.J. e CORNÉLIO, M.L. Controle de Qualidade de Ervas Mediciniais: Controle de Qualidade de *Phyllanthus niruri* L. (quebra-

pedra). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. p.68-73, 2003. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/>>. Acessado em dezembro de 2005.

MULCAHY, D.L.; CRESTI, M.; SANSAVINI, S.; DOUGLAS, G.C.; LINSKENS, H. F.; MULCAHY, G. B.; VIGNANI, R.; PANCALDI, M. The use of random amplified polymorphic DNAs to fingerprint apple genotypes. **Scientia Horticulturae**. Amsterdam. v.54, p.89-96, 1993.

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

MWANGANGI, *P. barbatus* Andr. Herbarium specimen held at K collected from Kenya (*Mwangangi* 2241). 1982. In: LUKHOBA, C.W.; SIMMONDS, M.S.J.; PATON, A.J. *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses. **Journal of Ethnopharmacology**. Elsevier. v.103, p.1-24, 2006.

NAKAJIMA, Y.; OEDA, K. e YAMAMOTO, T. Characterization of genetic diversity of nuclear and mitochondrial genomes in *Daucus* varieties by RAPD and RFLP. **Plant Cell Reports**. Springer, v.17, p.848-853, 1998.

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

NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C.F. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de Ginseng Brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spring. Pedersen) cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. v.27, n.1, p.84-90, 2003.

OLIVEIRA, L.O. & MARTINS, E.R. O desafio das plantas medicinais brasileiras: I O caso da poaia. Campos dos Goytacazes, RJ: UENF, 1998. 73p. In: CASTRO, H.G. de; FERREIRA, F.A.; SILVA, D.J.H. da e MOSQUIM, P.R. **Contribuição ao Estudo das Plantas Medicinais: Metabólitos Secundários**. 2ªed. Viçosa, MG: UFV, 2004. 113p.

OLIVEIRA, P.D. & PASQUAL, M. Efeito de diferentes concentrações do meio MS, nitrogênio e níveis de sacarose na propagação *in vitro* de crisântemo. In: **Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 5**, Lavras/MG, 1995. Resumos... Lavras/MG: Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal – UFLA, 1995. p.139.

PASSINHO, H.C.; MARGIS, R.; FÉLIX, D.; MAIA, C. e KAPLAN, M.A.C. Genetic differentiation between *Plectranthus grandis* Cramer e *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.72, n.2, Rio de Janeiro, jun. 2000.

PATON, A.J., SPRINGATE, D., SUDDEE, S., OTIENO, D., GRAYER, R.J., HARLEY, M.M., WILLIS, F., SIMMONDS, M.S.J., POWELL, M.P., SAVOLAINEN, V. Phylogeny and evolution of basil and allies (Ocimeae, Labiatae) based on three plastid DNA regions. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. Elsevier, n.31, p.277–299, 2004.

REIS, M. S. & MARIOT, A. Diversidade natural e aspectos agronômicos de plantas medicinais. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4^a.ed. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, p.41-62. 2002.

REVISTA BRASILEIRA DE MEDICINA. Fitoterápicos: uma tendência natural. São Paulo, v. 59, n. 9, p. 637-644, 2002. especial.

RILEY, B.W. & BROKENSCHA, D. The Mbere in Kenya. Botanical Identities and Uses, vol. 2. University Press of America, 1988. In: LUKHOB, C.W.; SIMMONDS, M.S.J.; PATON, A.J. *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses. **Journal of Ethnopharmacology**. Elsevier. v.103, p.1-24, 2006.

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

ROMANO, A. A role of carbohydrates in micropropagation of cork oak. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague. v.40, n.2, p.159-167, 1995.

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

SALLA, M.F.S.; RUAS, C.F.; RUAS, P.M.; Carpentieri-Pípolo, V. Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 015-022, 2002.

SANSAVINI, S. Biotecnologie fruticole: le nuove frontiere delle ricerche per il miglioramento genético e la propagazione delle piante da frutto. **Frutticoltura**.

n.5, p.75-81, 1998. In: BIANCHI, J.V.; SANSAVINI, S.; FACHINELLO, J.C. Microsatellite markers for identification of *Prunus* spp. Rootstocks. **Scientia Agricola**, Piracicaba. v.61, n.3, p.303-306, 2004.

SANTOS-GOMES, P.C. & FERNANDES-FERREIRA, M. Essential oils produced by in vitro shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, EUA, v.51, p.2260-2266, 2003.

SATO, A.Y.; DIAS, H.C.T.; ANDRADE, L.A.; *et al.* Micropropagação de *Celtis* sp.: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, Lavras, v.7, n.2, p.117-123, 2001.

SHIMADA, T.; HAYAMA, H.; HAJI, T.; YAMAGUCHI, M.; YOSHIDA, M. Genetic diversity of plums characterized by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Euphytica**. Springer, n.109, p.143-147, 1999.

SILVA, F. & CASALI, V.W.D. **Plantas medicinais e aromáticas: Pós-colheita e óleos essenciais**. Viçosa/MG, UFV, DFT; Arte e Livros, 2000. 135p.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, P.E. **Plantas da medicina popular no Rio grande do Sul**. 5 ed. Porto Alegre, Editora UFRGS, p. 78-79, 1998.

SIMÕES, C.M.O. & SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, p. 467-495, 2003.

STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E. da S.; NOZAKI, M.H. Plantas Mediciniais: Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biociência**. p.16-21. Disponível em: <<http://www.biociencia.com.br/>>. Acessado em dezembro de 2005.

TEIXEIRA, J.B. **Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas**, 2001. Disponível em: <http://www.redbio.org/porta/encuentros/enc_2001/simposios/S-06/Joao%20Batista%20Teixeira.pdf>. Acessado em dezembro de 2006.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Volume I. Embrapa/Brasília, 1998. 509p.

TORRES, A.C.; BARBOSA, N.V. dos R.; WILLADINO, L.; GUERRA, M.G.; FERREIRA, C.F.; PAIVA, S.A.V. Meios e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas: Formulações de meios para a cultura de tecidos de plantas. **Circular Técnica nº24**. Embrapa, Brasília, p.1-20, 2001.

UPADHYAY, A.; JAYADEV, K.; MANIMEKALAI, R.; PARTHASARATHY, V.A. Genetic relationship and diversity in Indian coconut accessions based on RAPD markers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 99, p. 353-362. 2004.

WEBERLING, F. & SCHWANTES, H.O. **Taxonomia Vegetal**. Editora Pedagógica e Universitária LTDA. São Paulo, 1986. 314p.

WELSH, J. & MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**. Oxford, v. 18, p. 7213-7218. 1990.

WERKER, E. Function of essential oil-secreting glandular hairs in aromatic plants of the Lamiaceae. A review. **Flavor and Fragrance Journal**, n.8, p.249-255, 1993.

WILKE, J. Compêndio de Santa Catarina é o mais completo do Mundo. **Gazeta Mercantil**, São Paulo, 27 jul. 2003. Caderno Brasil-mercado p. b13.

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

