

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS**

**ECOLOGIA MOLECULAR, VARIABILIDADE GENÉTICA, QUÍMICA E**  
**CULTIVO *IN VITRO* DE *Hesperozygis ringens* BENTH..**

**FERNANDO FRACARO**

**SÃO CARLOS, 2006**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS**

**ECOLOGIA MOLECULAR, VARIABILIDADE GENÉTICA, QUÍMICA E CULTIVO *IN***

***VITRO* DE *Hesperozygis ringens*. BENTH.**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, visando à obtenção do grau de Doutor em Ciências, área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais.

**Orientador: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray**

**FERNANDO FRACARO**

**SÃO CARLOS, 2006**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

F798em

Fracaro, Fernando.

Ecologia molecular, variabilidade genética, química e cultivo in vitro de *Hesperozygis ringens* Benth / Fernando Fracaro. -- São Carlos : UFSCar, 2006.  
89 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Biologia molecular. 2. Plantas aromáticas. 3. Variabilidade genética. 4. Espécies em extinção. I. Título.

CDD: 574.88 (20<sup>a</sup>)

Dedico,

Dedico este trabalho aa minha esposa Sandra, pela compreensão durante este período.

## AGRADECIMENTOS

Manifesto sinceros agradecimentos a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho, em particular:

- Ao meu orientador prof. Dr Sergio Echeverrigaray, pela orientação e constante preocupação na execução deste trabalho e, sobretudo, pela amizade e por despertar em mim o agradável prazer em trabalhar com a pesquisa científica e a incansável busca pelo conhecimento.
- A Dra. Luciana Atti Serafini e ao Grupo da Divisão de Produtos Naturais, pelo auxílio nas análises de óleos essenciais em *Hesperozygis ringens*.
- Aos colegas da divisão de Biotecnologia Vegetal, pela colaboração na realização deste trabalho.
- Aos colegas do Curso de Doutorado, Aluizio, Ana Beatriz, Eugênio e Rosângela, pela amizade.
- A Universidade de Caxias do Sul e ao Instituto de Biotecnologia por ceder suas instalações para eu poder realizar este trabalho.
- A Universidade Federal de São Carlos, em especial ao Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, pela oportunidade no programa.
- Ao Conselho de Aperfeiçoamento de Profissionais de Ensino Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b>	VII
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	IX
<b>RESUMO</b>	XI
<b>ABSTRACT</b>	XIII
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
2.1 Biodiversidade e Plantas Aromáticas.....	3
2.2 Metabolismo secundário de plantas aromáticas.....	4
2.3 Características químicas do gênero <i>Hesperozygis</i> .....	5
2.4 Marcadores Moleculares em estudo de populações.....	6
2.5 Micropropagação de espécies aromáticas.....	11
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	14
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	15
<b>4.1. VARIABILIDADE GENÉTICA EM <i>Hesperozygis ringens</i> BENTH. (Lamiaceae): UMA PLANTA AROMÁTICA E MEDICINAL DO SUL DO BRASIL AMEAÇADA DE EXTINÇÃO</b> .....	16
Resumo.....	18
Abstract.....	19
Introdução.....	20
Materiais e Métodos.....	22
Resultados e Discussão.....	25
Conclusões.....	30

Referências Bibliográficas.....	31
<b>4.2. ANÁLISE DA VARIABILIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE</b> <b><i>Hesperozygis ringens</i> BENTH. (<i>Lamiaceae</i>). DAS POPULAÇÕES DE</b> <b>CAÇAPAVA DO SUL E ALEGRETE .....</b>	<b>40</b>
Resumo.....	42
Abstract.....	43
Introdução.....	44
Materiais e Métodos.....	45
Resultados e Discussão.....	48
Conclusões.....	50
Referências Bibliográficas.....	51
<b>4.3. EFEITO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO E NITRATO DE</b> <b>PRATA NA MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Hesperozygis ringens</i> BENTH.,</b> <b>UMA PLANTA AROMÁTICA SUL-AMERICANA AMEAÇADA DE</b> <b>EXTINÇÃO. ....</b>	<b>57</b>
Resumo.....	59
Abstract.....	60
Introdução.....	61
Materiais e Métodos.....	63
Resultados e Discussão.....	65
Conclusões.....	69
Referências Bibliográficas.....	70
<b>5. DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>74</b>

<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>77</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>78</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>85</b>
	8.1. Extração de DNA total (método Doyle & Doyle, 1987).....	85
	8.2. Extração e identificação dos componentes químicos presentes nos óleos essenciais de <i>Hesperozygis ringens</i> . ....	86
	8.3. Composição dos meios de cultivo utilizados na micropropagação.....	88
	8.4. Fotografias mostrando detalhes de <i>Hesperozygis ringens</i> .....	89

## LISTA DE TABELAS

<b>4.1</b>	<b>VARIABILIDADE GENÉTICA EM <i>Hesperozygis ringens</i> BENTH. (<i>Lamiaceae</i>): UMA PLANTA AROMÁTICA E MEDICINAL DO SUL DO BRASIL AMEAÇADA DE EXTINÇÃO.</b>	
1.	Número total e número de fragmentos polimórficos obtidos através de marcadores moleculares RAPD em cada <i>primer</i> utilizado nas quatro populações analisadas.....	35
2.	Número total e número de fragmentos polimórficos obtidos através de marcadores moleculares ISSR em cada <i>primer</i> utilizados nas quatro populações analisadas.....	35
3.	Média da similaridade dentro e entre populações de <i>Hesperozygis ringens</i> obtidas através de marcadores moleculares RAPD ..	36
4.	Médias de frequência da presença de segmentos amplificados e cálculos de frequências alélicas e heterose considerando equilíbrio de Hardy-Weinberg, nas quatro populações de <i>H. ringens</i> avaliadas.....	36
<b>4.2</b>	<b>ANÁLISE DA VARIABILIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Hesperozygis ringens</i> BENTH. (<i>Lamiaceae</i>). DAS POPULAÇÕES DE CAÇAPAVA DO SUL E ALEGRETE .</b>	

1. Principais compostos obtidos por análise em GC-MS do óleo essencial de duas populações de <i>Hesperozygis ringens</i> (CS- Caçapava do Sul e SFA- São Francisco de Assis).....	54
<b>4.3. EFEITO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO E NITRATO DE PRATA NA MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Hesperozygis ringens</i> BENTH., UMA PLANTA AROMÁTICA SUL-AMERICANA AMEAÇADA DE EXTINÇÃO.</b>	
1. Efeito de quatro meios de cultivo na propagação <i>in vitro</i> de <i>Hesperozygis ringens</i> .....	72
2. Número e comprimento de brotos de <i>H. ringens</i> obtidos em meio MS suplementados com diferentes concentrações de benziladenina (BA). .....	72
3. Influência de concentrações de nitrato de prata na micropropagação de <i>Hesperozygis ringens</i> em meio MS acrescido de 4.4 µM BA.....	73
4. Efeito de concentrações de benziladeninana micropropagação de <i>H. ringens</i> em meio MS com 2mg l <sup>-1</sup> de nitrato de prata.....	73
<b>8.3 ANEXOS</b>	
1. Composição dos meios de cultivo utilizados na micropropagação.....	88

## LISTA DE FIGURAS

### 4.1. VARIABILIDADE GENÉTICA EM *Hesperozygis ringens* BENTH. (*Lamiaceae*): UMA PLANTA AROMÁTICA E MEDICINAL DO SUL DO BRASIL AMEAÇADA DE EXTINÇÃO.

1. Localização geográfica das quatro populações de *Hesperozygis ringens* estudadas e a área de ocorrência das espécies baseada em coleções de herbário.  
1- Alegrete; 2- São Francisco de Assis; 3- Caçapava do Sul 1; Caçapava do Sul 2..... 37
2. Dendrograma concenso baseado nos coeficientes de Jaccard, obtido pela análise de marcadores RAPD e ISSR. Populações: CSA- Caçapava do Sul 1, CSB- Caçapava do Sul 2, AL- Alegrete, SFA- São Francisco de Assis. Os números acima das linhas internas correspondem a probabilidade (%) de agrupamento baseadas em 1000 permutações..... 38
3. Distribuição espacial dos indivíduos e populações de *H. ringens* avaliadas através da análise de componentes principais com base nos dados conjuntos das análises de RAPD e ISSR.  $\Delta$ - Caçapava do Sul A,  $\blacktriangledown$  - Caçapava do Sul B,  $\circ$ - Alegrete, e  $\square$  - São Francisco de Assis..... 39

### 4.2. ANÁLISE DA VARIABILIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Hesperozygis ringens* BENTH. (*Lamiaceae*). DAS POPULAÇÕES DE CAÇAPAVA DO SUL E ALEGRETE

1. Dendrograma baseado na composição química dos óleos essenciais de duas populações de <i>Hesperozygis ringens</i> (CS- Caçapava do Sul e SFA- São Francisco de Assis), construído através da análise de agrupamento pelo método UPGMA.....	55
2. Distribuição de 2 populações de <i>Hesperozygis ringens</i> com base nos componentes principais calculados através da análise da composição química de óleos essenciais. ....	56
<b>8.4. ANEXOS</b>	
Fotografias mostrando detalhes de <i>Hesperozygis ringens</i> .....	89

## RESUMO

*Hesperozygis ringens*, pertencete à família Lamiaceae, é uma planta aromática nativa do Sul do Brasil com sua ocorrência restrita aos campos sulinos, principalmente nos municípios de Caçapava do Sul, Alegrete e São Francisco de Assis. Devido à algumas atividades agropastoris como sucessivas limpezas e queimadas para renovação das pastagens associados com alguns fatores como baixa eficiência na propagação das sementes, esta espécie encontra-se em processo de extinção. Visando analisar o efeito destas atividades e o grau do processo de extinção em que esta planta se encontra foram utilizados marcadores moleculares RAPD e ISSR na tentativa de avaliar a variabilidade genética, também foi avaliada a variabilidade química através dos óleos essenciais e o efeito de reguladores de crescimento na micropropagação. Com o uso de marcadores moleculares registrou-se um baixo fluxo gênico entre as populações avaliadas, com identidades genéticas distintas, separando as amostras em grupos isolados como Alegrete, São Francisco de Assis e Caçapava do Sul, este último avaliado em duas coletas A e B as quais revelaram um maior cruzamento entre as amostras. A variabilidade química confirmou os dados obtidos com marcadores RAPD e ISSR, pois separou as populações em grupos isolados, apresentando alguns compostos com baixa frequência, como limoneno e linalol na população de São Francisco de Assis, e outros estiveram ausentes, como sabineno em Caçapava do Sul. Na propagação *in vitro* o meio de cultivo MS apresentou os melhores resultados, suplementado com 13,2 $\mu$ M de benziladenina e acrescido de 2mg/L de nitrato de prata, este utilizado para evitar o efeito do acúmulo de etileno. O enraizamento mostrou uma limitação com baixa eficiência, mas foi obtido em casca de arroz carbonizada, com ¼ MS suplementado com IBA. Mesmo com esta dificuldade a micropropagação pode ser uma alternativa para a propagação desta espécie

ameaçada de extinção. Com base nestes resultados aspectos ecológicos, evolutivos e de preservação são discutidos neste trabalho.

## ABSTRACT

*Hesperozygis ringens*, belongs to Lamiaceae's family, it is an aromatic plant native from the South Brazil with its occurrence restrict south fields mainly in Caçapava do Sul, Alegrete and São Francisco de Assis. Due some activities agropastoris like continuous cleanness and burning to the renovation of grassland associate with some factors like low seed efficiency propagation, these spices are in extinction process. In order to evaluate the effect of these activities at the extinction process of this plant were used molecular markers RAPD and ISSR to evaluate the genetic variability, chemical variability of the essential oils and effect of the growing regulators in the micropropagation. With molecular markers we check a low gene flow between studied populations, with distinct genetic entities, sharing the samples in isolated clusters from Alegrete, São Francisco de Assis and Caçapava do Sul, the last one was evaluate in two populations A and B witch showed a larger gene flow between samples. The chemical variability data were confirmed by markers RAPD and ISSR, because they shared the populations in two isolated groups, characterized for to present compounds with low frequency like limonene and linalool in the São Francisco de Assis population, and the others were not present as sabinene in Caçapava do Sul. In the *in vitro* propagation the MS medium showed the best results supplemented with 13.2 $\mu$ M of benzyladenine and 2mg/l of silver nitrate, witch were used to avoid ethylene accumulation effect. The rooting showed limitation with low efficiency, but was obtained with carbonized rice back, with  $\frac{1}{4}$  MS supplemented with IBA. Even with hardness the micropropagation can be an alternative for the propagation and preservations of this endangered species. Based in this results of this work were discussed about environmental, evolution and conservation aspects.

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Hesperozygis*, pertence à família *Lamiaceae*, é formado por seis espécies, cinco destas tem sua distribuição na América do Sul e uma no México. Dentro deste gênero destaca-se *Hesperozygis ringens*, popularmente denominada de “Espanta Pulga”, a qual é uma espécie aromática com sua distribuição na Serra do Sudeste e no sul das Missões. É endêmica de uma área restrita do sul do estado do Rio Grande do Sul, com seu crescimento em baixas altitudes, menores de 400 m, em solos arenosos e pedregosos. Trata-se de um arbusto lenhoso denso com 20 a 50 cm de altura, com caule bastante ramificado. As folhas são ovado rombóides (2 a 5 cm de comprimento 1,5 a 2,5 cm de largura), pecioladas, glabras, com bordos apenas dentados na metade terminal e repletas de glândulas sésseis afundadas em ambas as faces. As flores encontram-se reunidas em espigas terminais. O cálice de coloração verde apresenta-se recoberto interna e externamente por pelos curtos. A corola de coloração alva a violácea com tubo de 0,7 a 1,0 cm, internamente glabra, lábio superior de 1,3 a 1,5 cm e inferior trilobado, 1,2 a 1,6 cm, ambos com pilosidade na face externa. O lábio inferior apresenta manchas violáceas na sua região mediana. O androceu caracteriza-se pela presença de dois filetes simples sinantéricos.

*H. ringens* é popularmente utilizada como inseticida natural pois possui na constituição de seu óleo essencial o composto Pulegona, encontrado em concentrações acima de 79%, o qual possui atividade inseticida, bactericida, alelopática e nematicida. Outros compostos encontrados foram,  $\alpha$ -pineno, sabineno,  $\beta$ -pineno, limoneno, 1,8-cineol, óxido de *cis*- e *trans*-linalol, linalol, mentona, isopulegona,  $\alpha$ -terpineol, óxido de *cis*- and *trans*-pulegona, e cariofileno.

Devido à sua ocorrência endêmica em morros pedregosos, à sucessivas renovações das pastagens através das queimadas para a alimentação do gado, e sua coleta indiscriminada para

fins medicinais, associados à baixa eficiência de propagação por sementes, *Hesperozyges ringens* tem sido incluída na lista das espécies brasileiras ameaçadas de extinção.

Considerando que até o momento não foram encontradas publicações sobre diferentes formas de reprodução como a micropropagação ou cultura de tecidos deste gênero, assim como estudos envolvendo genética de populações utilizando marcadores moleculares e a variabilidade do óleo essencial, este estudo torna-se importante no monitoramento da diversidade genética a qual é fonte de toda seleção natural, contribuindo para a sustentabilidade e uso, assim como para a preservação desta espécie ameaçada de extinção.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Biodiversidade e Plantas Aromáticas.**

A biodiversidade de espécies vegetais divide-se mundialmente em cinco grandes regiões de distribuição, principalmnete nos seguintes continentes, Austrália, Ásia, África, América Central e América do Sul. Constata-se que mais da metade desta diversidade encontra-se nas florestas tropicais, cuja área corresponde a apenas 7% da superfície da terra (Soejarto, 1996). O Brasil apresenta uma grande biodiversidade por possuir a maior parte da Floresta Amazônica, detendo assim uma grande variedade de fauna e flora, caracterizando o País com a maior diversidade de espécies vegetais do planeta, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (Dias, 1996), e privilegiado por sua riqueza de megadiversidade (Mittermeier *et al.*, 2005). No Brasil esta biodiversidade está dividida em 6 principais biomas, Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Caatinga, Cerrado, Pantanal e Campos Sulinos. Estes últimos estão distribuídos nos estados de Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul, os quais encontram-se em boa parte como pastagens nativas para a criação de bovinos e ou ovinos, ou são convertidos ao cultivo de grandes lavouras de produção de soja, milho, arroz, sorgo, dentre outros. Desta forma essa biodiversidade vem sendo afetada diretamente pela ação antrópica principalmente devido ao desmatamento, conversão de paisagens naturais em plantações, pastagens ou áreas urbanas e industriais. No Sul do País os Campos Sulinos tem sido afetados principalmente pela ação humana devido às queimadas realizadas com a finalidade de renovação das pastagens, e esta forma de condução das pastagens não é apropriada para muitas espécies que se desenvolvem nesses locais. Segundo Gottlieb *et al.*, (1996), a interferência humana na natureza chegará a causar grandes extinções, além disso, a variabilidade que pode ser perdida é imprescindível

para a manutenção da diversidade genética, a qual é fonte de toda seleção natural e artificial, assim como base para domesticação de espécies. (Ehrlich, 1988).

Em termos de diversidade, principalmente quando nos referimos à sobrevivência das espécies vegetais, destacando as plantas aromáticas e medicinais, em seus ambientes naturais os metabólitos secundários são muito importantes para esta adaptação, por serem responsáveis pela produção de defesas químicas, contra ataque de predadores herbívoros ou patógenos microbianos ou pela proteção do ambiente como resinas e ceras (Cole 1994), e a perda desta diversidade pode contribuir para colocar em risco muitas espécies.

## **2.2. Metabolismo secundário de plantas aromáticas.**

Os metabólitos secundários estão vinculados à sobrevivência do indivíduo no ambiente em que ele se encontra. Eles permitem que o indivíduo responda à pressão dos fatores ecológicos e climáticos, possibilitando a relação do indivíduo com sua fonte de nutrientes, com seus predadores e também permitem ao indivíduo se vincular com sua espécie (população) e facilitar sua reprodução. A aplicabilidade dos metabólitos secundários está relacionada com medicamentos, aromas, sabores, corantes naturais, etc. (Moyna e Menéndez, 2001). Muitos dos metabólitos secundários são produzidos por plantas as quais são umas importantes fontes de produtos naturais biologicamente ativos (Calixto e Yunes, 2001), muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Pesquisadores da área de produtos naturais mostraram-se impressionados pelo fato desses produtos encontrados na natureza revelarem uma gama quase inacreditável da diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (Wall e Wani, 1996). Dentre esta diversidade de compostos produzidos pelas plantas, parte deles são encontrados nos óleos essenciais, os quais podem ser definidos como o material volátil presente em plantas

e geralmente de odor e fragrância características. São misturas complexas de terpenos, terpenos oxigenados, sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados. Também podem conter pequenas quantidades de diterpenos e outros componentes (Atti-Serrafini *et al.*, 2001). De acordo com Mann (1987), existem três pontos de origem e produção de compostos secundários, diferenciados mediante seus precursores: a) ácido chiquímico como precursor de inúmeros compostos aromáticos; b) aminoácidos, fonte de alcalóides e peptídeos; e c) acetato, que através de duas rotas biossintéticas, origina compostos como acetatos, terpenos, esteróis e outros.

Os óleos voláteis são produzidos em estruturas secretoras especializadas, tais como pelos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (Simões *et al.*, 2002).

A família *Lamiaceae* é uma das principais fontes produtoras de compostos voláteis, caracterizando-se por apresentar principalmente compostos terpenóides os quais possuem importante atividade biológica, como, atividade anti insetos, anti bacteriana e anti fúngica, dentro desta família podemos encontrar no gênero *Hesperozygis*, a espécie *H. ringens* que possui no seu óleo essencial estas atividades características.

### **2.3. Características químicas do gênero *Hesperozygis*.**

O gênero *Hesperozygis* pertence à família *Lamiaceae*, a qual é caracterizada por apresentar altas concentrações de óleo essencial (Cantino e Sanders, 1986), este tendo importante utilidade na indústria de alimentos e cosméticos. Dentre os principais gêneros produtores de óleo essencial podemos citar, *Mentha*, *Rosmarinus*, *Thymus* e *Lavandula* (Lawrence, 1992).

O gênero *Hesperozygis* é formado por seis espécies, cinco restritas ao sul do Brasil (Pereira e Pereira, 1973) e uma citada para o México (Cantino e Sanders, 1986). *H. ringens* é vulgarmente chamada de “espanta pulga”, a qual é um arbusto lenhoso encontrado principalmente na região Sudeste e sul das Missões do estado do Rio Grande do Sul. Estudos realizados por von Poser *et al.*, (1996) indicaram ação alelopática e propriedades antiparasíticas dos extratos de *H. ringens*, estes resultados foram atribuídos principalmente à presença do composto pulegona encontrado em 79,2% do óleo essencial. E *H. rhododon* encontrada na formação da Serra do Mar nos estados do Paraná e São Paulo as principais características químicas encontradas foram mentona (43,4%) e pulegona (29,6%). Extratos destas duas espécies obtidos através de hidrodestilação de folhas foram avaliados quanto ao potencial alelopático em sementes de alface. Todas as concentrações avaliadas afetaram o desenvolvimento de radículas, mesmo na maior concentração avaliada (1:64) onde observou-se necrose nas radículas. Também os extratos alcoólicos apresentaram atividade alelopática em todas as concentrações avaliadas, porém o efeito foi significativamente maior para os extratos de *H. ringens* (von Poser *et al.*, 1996).

#### **2.4. Marcadores Moleculares em estudo de populações.**

Por marcador molecular define-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA, correspondente a regiões expressa ou não do genoma. Os diversos tipos de marcadores moleculares disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada, pela habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade. Segundo

Milach (1998), os tipos de marcadores moleculares de DNA podem ser divididos em dois grupos: os de hibridização e amplificação de DNA.

Entre os marcadores mais conhecidos baseados em hibridização encontram-se os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*; Botstein *et al.*, 1980) e minissatélites ou locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*; Jeffreys *et al.*, 1985). Entre aqueles mais conhecidos revelados por amplificação estão os marcadores do tipo: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*; Williams *et al.*, 1990); microssatélites (Litt & Luty, 1989); AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*; Vos *et al.*, (1995) e ISSR (Inter Simple Sequence Repeat; Zietkiewicz, e Labuda, 1994).

Segundo Ferreira e Gratapaglia (1996), marcadores moleculares apresentam algumas vantagens sobre os marcadores morfológicos. Na utilização de marcadores morfológicos, grande esforço e planejamento são necessários para a construção de mapas genéticos, pois o reduzido número de marcadores analisáveis por linhagem limita a capacidade discriminativa e a precisão da análise, exigindo a análise de um grande número de cruzamentos. Em contrapartida, um grande número de locos de marcadores molecular pode ter seus alelos estudados em populações segregantes de cruzamentos específicos, fato este que facilita o desenvolvimento de mapas genéticos. Adicionalmente, marcadores moleculares podem detectar alto grau de polimorfismo para cada loco estudado, ao contrário do que geralmente acontece com marcadores morfológicos.

Alguns marcadores moleculares apresentam-se como co-dominantes, enquanto que marcadores morfológicos são, em sua maioria, dominantes ou recessivos (Tanksley, 1983; Beckman & Soller, 1988; Burr *et al.*, 1983; Stuber, 1992). Os marcadores moleculares podem ser empregados para caracterizar o genótipo de um indivíduo em qualquer estágio de desenvolvimento a partir de simples amostras de tecidos, ou mesmo de células, permitindo acelerar o processo de seleção e recombinação dos indivíduos.

Em termos de análises filogenéticas, os marcadores moleculares apresentam como vantagens o fato de não serem afetados por fatores ambientais, permitindo assim a determinação de relações filogenéticas entre materiais de distintas origens, o grande número de genes avaliáveis e a independência, até certo ponto, da pressão de seleção (Swofford *et al.*, 1996), também marcadores moleculares RAPD tem sido usados em estudos genéticos e moleculares por serem simples e rápido método para a análise da diversidade e similaridade genética. Além disso apresenta a vantagem de não necessitar o conhecimento do genoma a ser avaliado (Ali *et al.*, 2005).

RAPD é basicamente uma variação do protocolo de PCR, com duas características distintivas, segundo Ferreira e Gratapaglia (1996): a) utiliza-se de um *primer* único ao invés de um par de *primers*; b) o *primer* único possui uma seqüência arbitrária e, portanto, sua seqüência alvo é desconhecida.

Em comparação com outros marcadores moleculares, RAPD apresenta uma série de vantagens práticas que podem ser resumidas em simplicidade e rapidez. Por exemplo, marcadores RAPD foram de 4 a 6 vezes mais eficientes do que RFLP no mapeamento de polimorfismos ligados a locos de resistência a doenças, e 10 vezes mais eficientes em tempo e mão-de-obra (Paran *et al.*, 1991). Marcadores RAPD não necessitam o desenvolvimento prévio de uma biblioteca de sondas específica para o organismo de interesse; por esse fato, não se faz necessário o uso de isótopos radioativos ou marcação não radioativa. Outra vantagem é a pequena quantidade de DNA utilizada para a análise genotípica de um indivíduo.

A técnica de RAPD possibilita amostrar regiões de DNA repetitivo, pois os *primers* utilizados para detecção de variação ao nível de DNA são arbitrários, apresentando também, grande sensibilidade na detecção de polimorfismo para a identificação de genótipos e obtenção de *fingerprints* (Foolad *et al.*, 1993). Além disso, RAPD oferece uma técnica

alternativa de clonagem de segmentos genômicos, extremamente simples e eficiente (Gratapaglia & Sederoff, 1994).

Assim como em muitas outras plantas, os marcadores moleculares têm sido utilizados com sucesso em estudos de plantas aromáticas e medicinais, principalmente na determinação de diversidade genética, caracterização de quimiotipos, identificação de materiais comerciais e pureza varietal.

Estudos envolvendo marcadores moleculares na estimativa da variabilidade genética, associados a dados geográficos e ecológicos, tem permitido estabelecer relações de grande valor tanto para a manutenção de bancos de germoplasma *ex-situs*, quanto *in situs*, e para a escolha de materiais em programas de melhoramento de plantas aromáticas e medicinais. Entre os trabalhos nesta área, podem ser citados aqueles desenvolvidos entre populações e espécies do gênero *Melaleuca* (Aiken *et al.*, 1998), em *Salvia fruticosa* (Skoula *et al.*, 1999), em *Artemisia annua* (Sangwan *et al.*, 1999) e em duas espécies de *Eucalyptus* (Byrne, 1999), entre outros.

Estudos realizados por Sangwan *et al.* (1999), aplicando a técnica de RAPD em *Artemisia annua*, permitiram avaliar a variabilidade genética da espécie e correlacioná-la com a quantidade de artemisinina, principal composto medicinal desta espécie, abrindo as portas para o melhoramento genético deste caráter. Já a aplicação de marcadores de RAPD no estudo de variabilidade genética em *Ocimum gratissimum* (Vieira *et al.*, 2001), permitiram estabelecer significativas correlações entre os grupos formados pela análise hierárquica dos dados genéticos e a composição em óleos essenciais dos distintos genótipos. Resultados semelhantes foram obtidos em outras plantas, tais como *Salvia fruticosa* (Skoula *et al.*, 1999), *Thymus vulgaris* (Echeverrigaray *et al.*, 2001) e *Tanacetum vulgare* L. (Keskitalo *et al.*, 2001).

Também o uso deste marcador molecular tem aplicação em estudos de população, onde um dos maiores desafios da conservação é preservar a variabilidade genética e processos evolucionários nas populações viáveis de importância ecológica para prevenir uma potencial extinção (Soulé and Simberloff, 1986). Populações isoladas em particular estão sujeitas a endogamia e deriva gênica, e a variabilidade genética esperada nestas populações é baixa quando esperada em populações maiores, o que pode ser detectado pelo uso de marcadores moleculares (Karron, 1997).

Quanto à caracterização de materiais comerciais e determinação da variabilidade disponível para fins de melhoramento genético de plantas aromáticas e medicinais, cabe citar os trabalhos realizados em *Humulus lupulus* (Sustar-Vozlic & Javornik, 1999) e em lavandas (Echeverrigaray & Agostini, 2000) onde foram caracterizados e as distâncias genéticas estimadas pelo uso de marcadores moleculares RAPD.

Os marcadores moleculares ISSR são dominantes, muito utilizados em estudos de variabilidade, os quais são marcadores semiarbitrários amplificados por PCR na presença de um *primer* complementar para a seqüência microssatélite (Bornet e Branchard 2001), assim como RAPD não requerem informação da seqüência ser amplificada. Cada banda de DNA corresponde à seqüência delimitada por dois microssatélites invertidos e possuem maior reprodutibilidade devido ao maior comprimento dos *primers* (Zietkiewicz et al., 1994).

Os marcadores moleculares ISSR são utilizados de várias formas, como por exemplo, na caracterização de coleções genéticas de Saccharinae, Andropogonae e Poaceae, os quais foram capazes de discriminar taxons e identificar clones (Hodkinson *et al.*, 2002). Também muito bem utilizados em espécies do gênero *Diplotaxis* (Brassicaceae) onde os autores sugeriram a origem bifilética deste (Martin e Sánchez-Yélamo, 2000). Em programas de melhoramento os marcadores moleculares ISSR foram aplicados para identificar produtos da fusão de protoplastos, pois possuíam algumas vantagens sobre outras formas de avaliação

como, morfológica a qual pode ser de difícil visualização, citológica a qual pode não distinguir entre fusões, e marcadores bioquímicos os quais são influenciados por condições ambientais (Scarano *et al.*, 2002). Juntamente com RAPD separaram diferentes acessos de *Prunus* sp e identificaram diferentes espécies provenientes de diferentes locais como Espanha e Itália (Martins *et al.*, 2003). Outro aspecto abordado com este marcador molecular juntamente com RAPD foi identificar a baixa variabilidade genética de *Pinus squamata* onde foi obtida uma variabilidade de 1,13% (RAPD) e 2,43% (ISSR), sugerindo que durante o período evolucionário desta espécie ocorreu deriva gênica e autofecundação, característica de pequenas populações, assim como atividades humanas que aceleraram a baixa diversidade genética deixando esta espécie criticamente ameaçada de extinção (Zhang *et al.*, 2005). Assim sendo, a caracterização genética com marcadores possibilita a estimativa de vários índices genéticos e o conhecimento da organização da distribuição da variabilidade entre e dentro das populações (Simões *et al.*, 2002).

## **2.5. Micropropagação de espécies aromáticas.**

A cultura de tecidos tem como definição básica o cultivo asséptico de qualquer parte viva da planta constituída por frações de tecidos, órgãos ou mesmo células em meio de cultura, sob condições controladas de umidade, temperatura e luminosidade, para gerar uma nova planta. Esta técnica baseia-se principalmente, na capacidade de células vegetais originarem novas células, e se diferenciarem em tecidos e órgãos, originando uma nova planta. Tal propriedade é dita totipotencialidade. Segundo George (1993), a micropropagação ou cultivo *in vitro* possui vários estágios de desenvolvimento, o primeiro é a seleção e preparação da planta mãe ou doadora, pois a partir deste todos os explantes serão geneticamente idênticos. No segundo estágio é feita a assepsia da planta matriz, que se inicia

com a seleção da planta doadora até os processos de desinfestação, neste processo qualquer microrganismo que for introduzido juntamente com a cultura obterá todas as condições necessárias ao seu desenvolvimento e inviabilizará a propagação. O terceiro estágio refere-se a propagação de novos propágulos com a formação de novos brotos adventícios através de indeterminados ciclos de cultura. No quarto estágio as plântulas ainda são muito pequenas e incapazes de realizar sua própria atividade fotossintética e sobreviver sem fontes artificiais de carboidratos, portanto os explantes devem ser enraizados e passar por um processo de alongação. No quinto e último estágio é a transferência das plantas propagadas para o ambiente, este chamado de aclimação, onde as plantas são transferidas para uma casa de vegetação, sendo gradualmente reduzida a umidade relativa e aumentada a intensidade luminosa, para após este período serem transferidas para o campo.

A utilização de técnicas biotecnológicas em plantas, tais como a micropropagação, cultura de células e tecidos, biotransformação ou engenharia genética, podem resolver alguns dos problemas relacionados com a utilização de metabólitos secundários de origem vegetal. Dentre várias técnicas, a micropropagação de plantas aromáticas e medicinais tem se difundido nos últimos anos pela possibilidade de aumento rápido do número de indivíduos geneticamente idênticos a partir de plantas selecionadas; produção de mudas durante todo o ano mesmo em regiões onde as plantas não apresentam condições para a propagação sexuada; produção de plantas com elevada qualidade sanitária livre de bactérias, fungos ou nematóides; obtenção de plantas altamente homogêneas a partir de plantas heterozigotas, possibilitando o aproveitamento do vigor-híbrido, sem as limitações da produção de sementes e possibilidade de conservação de germoplasma, garantindo a manutenção da biodiversidade. (Echeverrigaray et al., 2001).

Também podemos citar a aplicação do cultivo *in vitro* em estudos de processos fisiológicos e de desenvolvimento, utilizando a morfogênese como sistema modelo, também

tem sido muito utilizado os estudos de micropropagação na conservação de recursos genéticos através de bancos de germoplasma *in vitro*, os quais possuem algumas vantagens dos bancos a campo os quais estão sujeitos a intempéries climáticas ataque de patógenos, períodos de dificuldade econômica, além do trabalho em laboratório ser mais confortável, (Withers e Williams, 1998).

Em estudos fisiológicos ou de populações de plantas também são muito úteis os usos de técnicas da engenharia genética como a transformação, técnica definida como sendo a introdução controlada de ácidos nucleicos em um genoma receptor (Tachini e Walbot, 1986) excluindo-se portanto a introdução por fecundação. As principais técnicas utilizadas na transformação são, o uso do vetor *agrobacterium*, polietilenoglicol, eletroporação, microinjeção, macroinjeção, aceleração de partículas entre outras (Brasileiro e Dusi, 1999). Como exemplo da aplicação destas técnicas podemos citar o trabalho de Tan et al., (2005), onde foram quantificados os mecanismos e o fluxo gênico em *Arabidopsis thaliana*, inserindo a proteína GFP (Green Fosphorecent Protein). Com isso verificou-se que a dispersão do pólen estava limitada em 0,5m assim sugerindo o baixo autocruzamento e a polinização sendo realizada por insetos.

Dentro deste contexto, estudos envolvendo micropropagação, marcadores moleculares avaliando a variabilidade genética, variabilidade na composição química de óleos essenciais e composição de extratos não voláteis são muito importantes nos estudos para a conservação desta espécie, visto que durante o desenvolvimento desta tese não foram encontrados na literatura trabalhos relatando estes assuntos.

### 3. OBJETIVOS

Devido à interferência humana no habitat de *Hesperozygis ringens*, relacionados com fatores ambientais e genéticos, esta espécie encontra-se em processo de extinção, desta maneira procuramos discutir neste trabalho resultados que possam colaborar para sua preservação de acordo com os objetivos decorrentes no trabalho.

1. Avaliar a variabilidade genética através de marcadores moleculares RAPD e ISSR de *H. ringens*.
2. Avaliar a variabilidade química dos óleos essenciais de *H. ringens*.
3. Avaliar o efeito de citocininas e auxinas na micropropagação de *H. ringens*.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

**4.1. Variabilidade Genética em *Hesperozygis ringens* Benth. (*Lamiaceae*):**

**Uma planta aromática e medicinal do sul do Brasil ameaçada de extinção.**

**4.1. Variabilidade Genética em *Hesperozygis ringens* Benth. (*Lamiaceae*): Uma planta aromática e medicinal do sul do Brasil ameaçada de extinção.**

Fernando Fracaro<sup>1,2</sup> e Sergio Echeverrigaray<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, R. Francisco Getúlio Vargas, 1130, 95001-970, Caxias do Sul, RS, Brasil. <sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.

## RESUMO

*Hesperozygis ringens* Benth. (*Lamiaceae*) é uma planta aromática e medicinal, caracterizada por altas concentrações de pulegona, endêmica das serras do sudeste do Rio Grande do Sul, e atualmente considerada dentro da relação das espécies em risco de extinção. No presente estudo foi avaliada a variabilidade genética intra e interpopulacional de *H. ringens* através de marcadores moleculares RAPD e ISSR. Os resultados mostraram que populações de *H. ringens* são geneticamente estruturadas, com baixo fluxo gênico entre as populações confirmando a fragmentação imposta pela ação antrópica. Populações destas duas áreas de ocorrência são geneticamente diferentes. Baixa variabilidade intrapopulacional e heterozigiosidade foram detectadas indicando deriva gênica e endogamia. Baseado nestes dados estratégia de conservação são discutidas.

Palavras chave: *Hesperozygis ringens*, ISSR, RAPD, Conservação.

## ABSTRACT

*Hesperozygis ringens* Benth. (*Lamiaceae*) is an aromatic and medicinal plant, characterized by a high concentration of isopulegone, endemic of the mountains of southeast Rio Grande do Sul, Brazil and currently considered on the endangered list. The present study evaluated the intra and interpopulation genetic variability of *H. ringens* by means of RAPD and ISSR molecular markers. The results showed that *H. ringens* populations are genetically structured, with low gene flow between populations confirming the fragmentation imposed by anthropic action. Populations from the two areas of occurrence are genetically different. Low intrapopulation variability and heterozygosity were detected indicating genetic drift and inbreeding. Based on the data conservation strategies are discussed.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Hesperozygis* Epling (Lamiaceae) é constituído por aproximadamente seis espécies, cinco das quais são limitadas as regiões sul e sudeste do Brasil (Pereira e Pereira, 1973) e uma mencionada no México (Cantino e Sanders, 1986).

*Hesperozygis ringens* Benth. É uma das espécies sul americanas, sendo descrita como um arbusto lenhoso, 20 a 50 cm de altura, com caule bastante ramificado. As folhas são ovado rombóides (2 a 5 cm de comprimento 1,5 a 2,5 cm de largura), pecioladas, glabras, com bordos apenas dentados na metade terminal e repletas de glândulas sésseis afundadas em ambas as faces. As flores encontram-se reunidas em espigas terminais. O cálice de coloração verde apresenta-se recoberto interna e externamente por pelos curtos. A corola de coloração alva a violácea com tubo de 0,7 a 1,0 cm, internamente glabra, lábio superior de 1,3 a 1,5 cm e inferior trilobado, 1,2 a 1,6 cm, ambos com pilosidade na face externa. O lábio inferior apresenta manchas violáceas na sua região mediana. O androceu caracteriza-se pela presença de dois filetes simples sinantéricos.

Em termos de composição química, esta espécie caracteriza-se por apresentar altas concentrações de óleos essenciais (4% do peso seco), tendo como componente principal a pulegona (98.5%) (Von Poser *et al.*, 1996). A pulegona possui atividade antimicrobiana, antifúngica, inseticida e alelopática (Economou e Nahrstedt, 1991; Franzois *et al.*, 19997 e Von Poser *et al.*, 1996).

*Hesperozygis ringens* é nativa e endêmica da serra do sudeste e da região sul das Missões do Rio Grande do Sul, ocorrendo em elevações pedregosas. A sua baixa ocorrência a tem incluída na lista oficial das espécies ameaçadas de extinção (Ministério do Meio Ambiente, 2003). Tal situação é agravada pela fragmentação decorrente da intensa atividade pecuária e a utilização de queimadas como forma de condução de pastagens, que caracterizam toda a região de ocorrência desta espécie. A fragmentação de habitats é considerada uma das

mais importantes perdas de diversidade em plantas, já que influencia diretamente a dispersão do organismo, reduzindo o fluxo gênico, aumentando a endogamia, e afetando conseqüentemente a capacidade de competição e adaptação da espécie (Heywood e Iriondo, 2003 e Oostermeijerand den Nijs, 2003).

O uso de marcadores moleculares na avaliação da variabilidade genética tem se tornado uma ferramenta importante para o estudo de populações de diversas espécies, incluindo plantas aromáticas e medicinais (Bucci *et al.*, 1997; Esselman *et al.*, 1999; Fisher *et al.*, 2000; Deshpande *et al.*, 2001 e Viccini *et al.*, 2004). Neste sentido Escudero *et al.*, (2003) considerou a necessidade urgente de integrar a informação decorrente de estudos genéticos com levantamentos demográficos e dados ecológicos para formular estratégias eficientes de conservação.

Dentro deste contexto o presente estudo teve como objetivo estudar a variabilidade intra e interpopulacional de *Hesperozygis ringens* usando marcadores moleculares RAPD (Random amplified polymorphic DNA) e ISSR (inter simple sequence repeat), visando a conservação *in situ* e *ex situ* desta espécie aromática nativa.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material Vegetal**

Quatro populações representativas da área de ocorrência da espécie foram usadas para analisar a variabilidade intra e interpopulacional de *Hesperozygis ringens*, denominadas: Caçapava do Sul População A, Caçapava do Sul População B, População de Francisco de Assis e População de Alegrete (Figura 3). Cada população foi avaliada através da análise de vinte plantas coletadas de forma a representar a área. Uma amostra de cada coleta foi depositada no Herbário da Universidade de Caxias do Sul.

### **Isolamento de DNA total:**

A extração de DNA total foi realizada através do método CTAB descrito por (Doyle e Doyle, 1988) utilizando-se 200 mg de material foliar macerados em nitrogênio líquido. A quantidade de DNA extraído foi avaliada através de análise espectrofotométrica a 260nm. As leituras  $A_{260/280}$  variaram de 1,75 a 1,90. A integridade do DNA foi analisada por eletroforese em géis de agarose 0,8% em tampão TBE (50mM Tris, 50mM ácido bórico, 2.5mM EDTA, pH 8.3).

### **Amplificação RAPD-PCR e ISSR-PCR.**

As reações de PCR foram realizadas em volume final de 25 $\mu$ l. A reação para amplificação por RAPD foi constituída por 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25% Triton X100, 200 mM de cada dNTP (dATP, dGTP, dTTP and dCTP), 30ng de *primer*, 20ng de DNA genômico uma unidade de Taq DNA polymerase (Gibco).

As amplificações foram desenvolvidas utilizando termociclador (MJ Research PT 100, Watertown, Mass). Os parâmetros de termociclagem para desnaturação, anelamento e

extensão das fitas de DNA foram 92°C por 5 min seguidos por 40 ciclos de 92°C (45 seg), 40°C (1 min 30 seg), 72°C (2 min), e finalmente uma extensão final de 72°C por 5min.

Para a amplificação de DNA foram utilizados inicialmente os 100 *primers* dos Kits OPA, OPC, OPD, OPZ e OPW da Operon Technologies (Alameda, Califórnia) onde foram testados em uma amostra da população A de Caçapava do Sul. Baseado nos resultados obtidos foram selecionados 17 *primers* quanto ao número de bandas, intensidade de bandas e reprodutibilidade (Tabela 1).

As reações de ISSR (volume final 25 µL) continham 20mM Tris-HCl (pH 8.4); 50mM KCl, 200mM de cada dNTP; 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 µM de *primer*; 1 unid de Taq polymerase; 2% de formamida e 25 ng de DNA.

As condições de amplificação foram um ciclo inicial de 5 min. a 94°C seguido por 40 ciclos a 94°C por 1 min para abertura das fitas de DNA, 45 seg. a temperatura específica de cada *primer* (46 a 54°C) para anelamento dos *primer*, e 2 min a 72°C para extensão, e uma extensão final de 5 min a 72°C.

Os Produtos amplificados foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1.5% em tampão TBE 1X (50mM Tris, 50 mM ácido bórico, 2,5 mM EDTA, pH 8.3), sob voltagem constante de 90 volts. O tamanho dos produtos amplificados foi determinado por comparação com o DNA do fago Lambda digerido com as enzimas de restrição EcoRI e *HindIII*. Os géis foram corados com brometo de etídio e as bandas visualizadas sob luz ultravioleta. Os géis foram digitalizados em aparelho Uvidoc (Uvitec).

#### **Análise dos dados:**

As matrizes dos dados foram construídas com os produtos amplificados obtidos na análise dos géis de RAPD e ISSR codificando presença (1) ou ausência (0) dos fragmentos.

Para fins de análise foram considerados todos os fragmentos entre 2000 e 100 pares de bases que amplificaram de forma consistente nas duas repetições realizadas.

A matriz binária (1/0) foi utilizada para o cálculo dos coeficientes de similaridade de Jaccard entre cada par de acessos. A relação entre as plantas e as populações foi avaliada através da construção de dendrogramas usando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages) e a análise dos componentes principais. Estas análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa computacional SPSS 10.0 software (SPSS Inc., Chicago, Illinois). A análise de permutações (1000 permutações) e AMOVA foram realizadas com o auxílio dos programas WinBoot (Yap e Nelson, 1996) e GenAlEx (Peakall e Smouse, 2001) respectivamente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo levantamento de acervo de herbários (Coelho de Souza, 1997) *Hesperozygis ringens* está limitada as regiões de Caçapava do Sul e São Sepé na serra Encantada, Alegrete na serra de Caverá, São Francisco de Assis na serra do Boqueirão, e Bom Jesus e Cambará na serra do Nordeste. Entretanto, a avaliação de excicatas mostrou que as Amostras coletadas na serra do Nordeste correspondem na verdade a *Hesperozygis nitida*, espécie morfológicamente semelhante a *H. ringens*. Isto é importante mencionar pois diz respeito aos nossos esforços em coletar todas as populações. Somente quatro populações foram encontradas, fato que confirma a situação crítica da espécie. Assim sendo as quatro populações estudadas no presente trabalho representam toda a área de distribuição conhecida desta espécie.

As análises de RAPD com os 17 *primers* selecionados geraram um total de 126 bandas, 89 das quais foram polimórficas (70.63%). O número médio de segmentos amplificados por *primer* foi de 7.4 (Tabela 1). Já nas análises realizadas com marcadores ISSR, foram obtidas 53 bandas, 24 das quais foram polimórficas (45%), com uma média de 5.8 bandas por *primer* (Tabela 2). Em ambos os casos os produtos amplificados obtidos variaram entre 250 e 1700 pb, com uma média de aproximadamente 500 pb. A diferença no nível de polimorfismo detectado entre os marcadores pode ser atribuída ao tipo de região amplificada em cada caso, já que os marcadores ISSR amplificam regiões conservadas presentes entre as seqüências microssatélites, enquanto os marcadores RAPD amplificam regiões aleatórias ao longo do genoma (Zietkiewicz *et al.*, 1994).

Tanto os marcadores RAPD como ISSR permitiram identificar todas as plantas analisadas, confirmando a eficiência dos marcadores moleculares escolhidos na identificação de genótipos vegetais (Weising *et al.*, 1995 e Mattioni *et al.*, 2002).

Os coeficientes de similaridade de Jaccard calculados com base nos marcadores RAPD variaram entre 0.894 e 0.190, com uma média de  $0.483 \pm 0.165$ . Estes valores foram similares

aos obtidos utilizando marcadores ISSR, 0.995 e 0.182 com uma média de  $0,491 \pm 0,166$ , indicando que, mesmo observando diferenças no número de produtos amplificados e polimorfismo, ambos marcadores possuem relações similares entre si. Além disso, a análise da correlação de Pearson entre as distâncias obtidas com os dois tipos de marcadores mostrou que as mesmas são altamente correlacionadas (0.897), e podem ser processadas em conjunto.

A tabela 3 mostra que a média da similaridade intrapopulacional, para os dados conjuntos entre os dois marcadores, variaram de 0.835 (Caçapava do Sul B) para 0.790 (Alegrete), enquanto que a similaridade média entre as populações foi de 0.704. Estes resultados (Tabela 3) mostram menor variabilidade intrapopulacional do que interpopulacional. Além disso, estes dados sugerem que o fluxo gênico entre as populações é limitado entre distâncias maiores como entre as populações de São Francisco de Assis e Alegrete (41,25 km) Mas ocorre com relativa freqüência entre populações próximas como Caçapava do Sul A e B (1200m).

A freqüência de segmentos amplificados, considerando unicamente as bandas polimórficas, nas plantas analisadas foi de  $0,474 \pm 0,275$ , apresentando uma distribuição linear, com baixa freqüência de alelos raros e elevada freqüências de alguns alelos em todas populações estudadas. Considerando as populações em equilíbrio de Hardy-Weinberg, a heterozigose para os fragmentos analisados variou entre 0,107 para Caçapava do Sul B e 0,229 para a população de Alegrete, com uma média geral de 0,164 (Tabela 4).

O dendrograma obtido usando o algoritmo UPGMA baseado no coeficiente de similaridade com ambos os marcadores moleculares é apresentado na Figura 2. A análise de agrupamentos permite visualizar a formação de dois grupos, um constituído por amostras das populações de Caçapava do Sul A e B, e outro pelas populações de Alegrete e São Francisco de Assis. Assim como mostram os valores médios de similaridade (Tabela 3), as populações de Caçapava do Sul A e B apresentam baixa diversidade intrapopulacional e são muito

semelhantes, não diferindo significativamente entre elas. Por outro lado as populações de Alegrete e São Francisco de Assis apresentam maior diversidade intrapopulacional e diferem significativamente entre si, caracterizando-se como duas populações geneticamente distintas.

A identidade genética das populações avaliadas e o agrupamento das populações de Caçapava do Sul foram confirmados pela análise de componentes principais (Figura 3). Neste gráfico, que representa 57% da variabilidade, pode ser observado que as plantas pertencentes a cada população estão agrupadas, sendo que as populações de Caçapava do Sul exibem uma dispersão menor do que as de Alegrete e São Francisco de Assis. Por outro lado as populações de Alegrete e São Francisco de Assis formam grupos bem definidos, e claramente separados das populações de Caçapava do Sul pelo componente 1.

A relação entre a variabilidade genética e a distribuição geográfica, assim como a identidade genética das populações, tem sido observada em diversas espécies de plantas aromáticas como, por exemplo, *Artemisia annua* (Sangwan *et al.*, 1999), *Tanacetum vulgare* (Keskitalo *et al.*, 2001), *Primula ovalifolia* (Nan *et al.*, 2003), inclusive algumas plantas da família Lamiaceae nativas do sul do Brasil, *Cunila galioides* (Fracaro e Echeverrigaray, 2005) e *Cunila incisa* (Agostini, 2002).

O maior desafio da conservação é preservar a variabilidade genética para garantir os processos evolutivos (Soulé and Simberloff, 1982), já que em ambientes fragmentados há a tendência de perda da variabilidade genética intrapopulacional devido à baixa frequência de troca gênica (Oostermeijer and den Nijs, 2003). O limitado número de indivíduos e as elevadas taxas de autofecundação podem levar a um aumento da homozigose e redução do vigor dos indivíduos, expressão de caracteres deletérios, aumento no aborto de sementes, redução na taxa de fecundação e germinação de sementes, e conseqüentemente a um ciclo vicioso que pode levar ao desaparecimento da população (Dubash and Fenster, 2000).

Como um todo, os resultados obtidos no presente estudo mostram que as populações de *Hesperozygis ringens* são caracterizadas como entidades geneticamente distintas com uma forte relação geográfica. Os baixos níveis de heterozigose a colocam como uma espécie com alta frequência de endogamia, e conseqüentemente como espécie de alto risco. A presença de alelos característicos em três das quatro populações avaliadas, o baixo número de espécies por local e as características agropecuárias da região indicam a necessidade de manutenção de microreservas ou áreas protegidas de menor escala, com 1 a 2 hectares, como indicado por (Laguna *et al.*, 1998), para plantas endêmicas, raras ou ameaçadas. Estas pequenas áreas apresentam vantagens em termos legais e de manejo, complementando eventualmente áreas maiores de proteção.

No caso presente, além da necessidade de pequenas áreas de conservação, é necessário o constante monitoramento da variabilidade genética e a transferência de plantas ou genes de uma população para a outra, visando aumentar a heterozigose e compensar a reduzida taxa de transferência gênica interpopulacional. Para tanto, é fundamental a escolha de plantas ou progenitores que permitam alargar a base genética das populações presentes nas áreas de conservação.

Além da conservação *in situ*, levando em consideração a baixa frequência e os riscos impostos pela ação antrópica crescente nas áreas de origem de *Hesperozygis ringens*, consideramos necessária a manutenção de bancos de germoplasma *ex situ*, com vistas a manutenção da variabilidade genética e a contribuição dos programas de preservação *in situ*. Neste caso, se faz necessário a constante avaliação da variabilidade genética, seja com base em marcadores morfológicos, químicos ou genéticos como os apresentados no presente trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

O autor agradece a Universidade de Caxias do Sul pelo suporte financeiro e o uso de suas instalações, e à CAPES, pela bolsa de Doutorado concedida a F. Fracaro.

## **CONCLUSÕES**

Os dados obtidos neste capítulo permitem concluir que:

Com a avaliação através de marcadores moleculares RAPD e ISSR, foi detectada menor variabilidade intrapopulacional do que interpopulacional sugerindo limitado fluxo gênico entre as populações, caracterizando-as como entidades geneticamente distintas, com relação à sua distribuição geográfica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agostini, G. (2002). **Micropropagação, variabilidade química e genética em *Cunila incisa* Benth.** Tese de Mestrado, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brasil.
- Bucci, G., Vendramin, G.G., Lelli, L. e Vicario, F. (1997). Assessing the genetic divergence of *Pinus leucodermis* Ant. Endangered populations: use of molecular markers for conservation purposes. **Theor. Appl. Genet.** 7:1138-1146.
- Cantino, P.D. e Sanders R.W. (1986). Subfamilial classification of *Labiatae*. **J. Syst. Bot.** 1:163-185.
- Coelho de Souza, G.P. (1997). **Estudo Etnobotânico da Família *Lamiaceae* no Rio Grande do Sul, com ênfase na busca de espécies com propriedades anticonvulsivantes.** Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 167p.
- Deshpande, A.U., Apte, G.S., Bahulikar, R.A., Lagu, M.D., Kulkarni, B.G., Suresh, H.S., Singh, N.P., Rao, M.K.V., Gupta, V.S., Pant, A.e Ranjekar, P.K. (2001). Genetic diversity across natural populations of three montane plant species from the Western Ghats, India revealed by inter simple sequence repeats. **Molec. Ecol.** 10: 2397-2402.
- Doyle, J. e Doyle, J.L. (1998). Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Am. J. Bot.** 75:1238.
- Dubash, M.R. e Fenster, C.B. (2000). **Inbreeding and outbreeding depression in fragmented populations.** In: Young, A. G., Clarke, G.M. (Eds.), Genetics, demography and viability of fragmented population. Cambridge University Press, Cambridge, 35-53.

- Economou, D. e Nahrstedt, A. (1991). Chemical, physiological, and toxicological aspects of the essential oil of some species of the genus *Bytropogon*. **Plant. Med.** 57:347-351.
- Escudero, A., Iriondo, J.M. e Torres, M.E. (2003). Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. **Biol. Conserv.** 113:351-365.
- Esselman, E. J., Jianqiang, L., Crawford, D. J., Wimdus, J. L. e Wolfe, A.D. (1999). Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *Insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Mol. Ecol.** 8:443- 451.
- Fischer, M., Husi, R., Prati, D., Peintinger, M., Van Kleunen, M.e Schmid, B. (2000). RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (*Ranunculaceae*). **Am. J. Bot.** 87:1128-1137.
- Fracaro, F.,Zacaria, J. e Echeverrigaray, S. (2005). RAPD based genetic relationships between populations of three chemotypes of *Cunila galioides* Benth. **Biochem. Syst. Ecol.** 33:409-417.
- Franzois, G., Mirotsu, M., Hatziapostolou, E., Kral, J., Scouras, Z.G. e Mavagrani-Tsipidou, P. (1997). Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. **J. Agric. Food Chem.** 45:2690-2694.
- Heywood, V.H. e Iriondo, J.M. (2003). Plant conservation: old problems, new perspectives. *Biol. Conser.* 113:321-335.
- Keskitalo, M., Pehu, E. e Simon J.E. (2001). Variation in volatile compounds from tansy (*Tanacetum vulgare* L.) related to genetic and morphological differences of genotypes. **Biochem. Syst. Ecol.** 29:267-285.
- Laguna, E., Crespo, M.B., Mateo, G., López, S., Fabregat, C., Serra, L., Herrero-Borgonón, J.J., Carretero, J.L., Aguilera, A. e Figuerola, R. (1998). **Flora**

**Endémica Rara o Amenazada de la Comunidad Valenciana.** Generalitat Valenciana, Valencia.

Mattioni, C., Casasoli, M., Gonzalez, M. e Ipinza, R. (2002). Comparison of ISSR and RAPD markers to characterize three Chilean *Nothofagus* species. **Theor. Appl. Genet.** 104:1064-1070.

Ministério do Meio Ambiente. (2003). **Listas oficiais das espécies ameaçadas de extinção no Rio Grande do Sul.** Ministério do Meio Ambiente, Brasil.

Nan, P., Peng, S., Shi, S., Ren, H., Yang, J. e Zhong, Y. (2003). Interpopulation congruence in Chinese *Primula ovalifolia* revealed by Chemical and molecular Markers Using Essential Oils and ISSRs. **Z. Naturforsch.** 58:57-61.

Oostermeijer, J.G.B., Luijten, S.H. e den Nijs, J.C.M. (2003). Integrating demographic and genetic approaches in plant conservation. **Biol. Conserv.** 113:389-398.

Peakall, R. e Smouse, P.E. (2001). **GenALEx V5: Genetic Analysis in Excel.** Population genetic software for teaching and research. Australian National University, Canberra, Australia.

Pereira, C. e Pereira, E. (1973). **Flora of the Paraná State.** Labiatae family. Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro 19:77-79.

Sangwan, R.S., Sangwan, N.S., Jain, D.C., Kumar, S. e Ranade, A.S. (1999). RAPD profile based genetic characterization of chemotypic variants of *Artemisia annua* L. **Biochem. Mol. Biol. Int.** 47:935-944.

Soulé, M.E. e Simberloff, D. (1986). What do genetics and ecology tell us about the design of nature reserves? **Biol. Conserv.** 35:19-40.

Viccini, L.F., Souza da Costa, D.C. e Machado, M.A. (2004). Campos A.L, Genetic diversity among nine species of *Lippia* (*Verbenaceae*) based on RAPD markers. **Plant Syst. Evol.** 246:1-8.

- Von poser, G.L., Menut, C., Toffoli, M.E., Vérin, P., Sobral, M., Bessiére, J.M., Lamaty, G. e Henriques, A. (1996). Essential oil composition and allelopathic effect of the Brazilian Lamiaceae *Hesperozygis ringens* (Benth.) Eplig and *Hesperozygis rhododon* Eplig. **J. Agric. Food Chem.** 44: 1829-1832.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. e Meyer, W. (1995). **DNA fingerprinting in plants and fungi**. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Yap, I. e Nelson, R.J. (1996). **Winboot: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA based dendograms**. *International Rice Research Institute*, Manila, Philippines. Discussion Paper series n°14.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. e Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple Sequence Repeat (SSR)- Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. **Genom.** 20:176-183.

**Tabela 1.** Número total e número de fragmentos polimórficos obtidos através de marcadores moleculares RAPD em cada *primer* utilizado nas quatro populações analisadas.

Primer	Seqüência 5'-3'	Número total de bandas	Bandas polimórficas
OPA 02	TGCCGAGCTG	08	04
OPA 03	AGTCAGCCAC	05	03
OPA 04	AATCGGGCTG	09	08
OPA 05	AGGGGGTCTTG	06	05
OPA 09	GGGTAACGCC	04	03
OPA 11	CAATCGCCGT	08	07
OPA 12	TCGGCGATAG	05	03
OPA 13	CAGCACCCAC	06	04
OPA 14	TCTGTGCTGG	14	08
OPA 17	GACCGTTGT	11	08
OPA 18	AGGTGACCGT	07	06
OPA 19	CAAACGTCGG	08	07
OPA 20	GTTGCGATCC	04	02
OPC 19	GTTGCGAGCC	13	13
OPD 02	GGACCCAACC	05	03
OPD 08	GTGTGCCCCA	08	01
OPW 11	CTGATGCGTG	05	02
Total		126	89
Média		7.41	5.23

**Tabela 2.** Número total e número de fragmentos polimórficos obtidos através de marcadores moleculares ISSR em cada *primer* utilizados nas quatro populações analisadas.

Primer	Seqüência 5'-3'	Número total de bandas	Bandas polimórficas
P1	ACACACACACACACA	7	4
P2	GAGAGAGAGAGAGAT	6	5
P3	AGAGAGAGAGAGAGYT	5	2
P4	CTCTCTCTCTCTCTA	6	2
P5	AGAGAGAGAGAGAGAGA	7	5
P6	CACACACACACACAG	10	2
P7	GAGAGAGAGAGAGAYC	5	2
P8	CTCCTCCTCCTCRC	2	0
P9	CACACACACACACAT	5	2
Total		53	24
Média		5.8	2.6

Y= C ou T; R= A ou G.

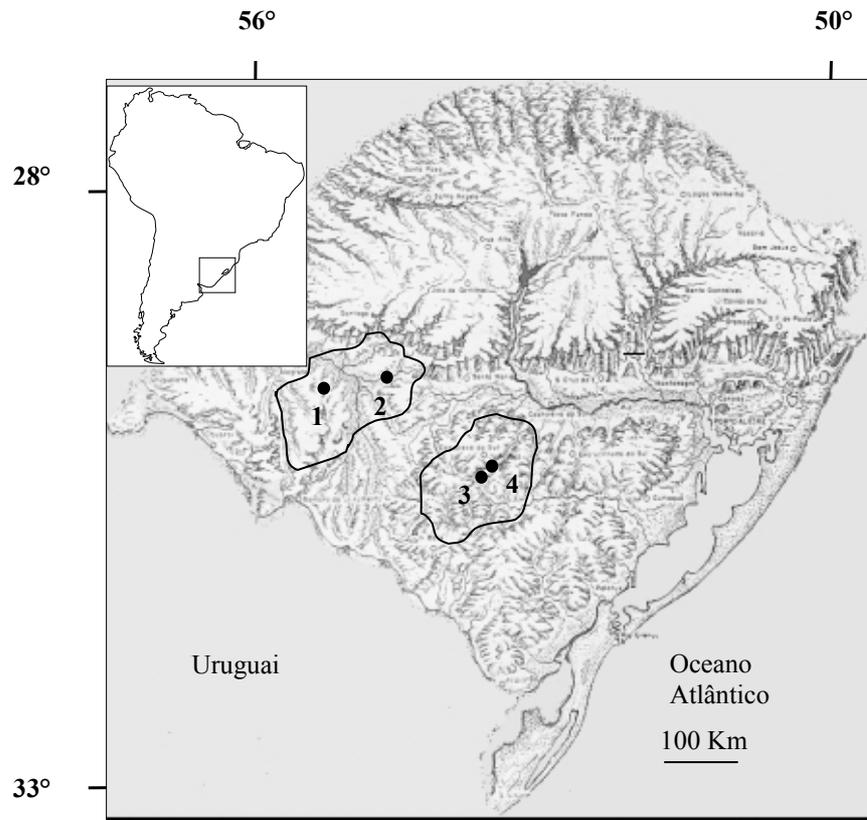
**Tabela 3.** Média da similaridade dentro e entre populações de *Hesperozygis ringens* obtidas através de marcadores moleculares RAPD e ISSR .

	Caçapava I	Caçapava II	Alegrete	S. F. Assis
Caçapava I	<b>0,875</b>	0,840	0,670	0,660
Caçapava II		<b>0,835</b>	0,680	0,665
Alegrete			<b>0,790</b>	0,710
S. F. Assis				<b>0,795</b>

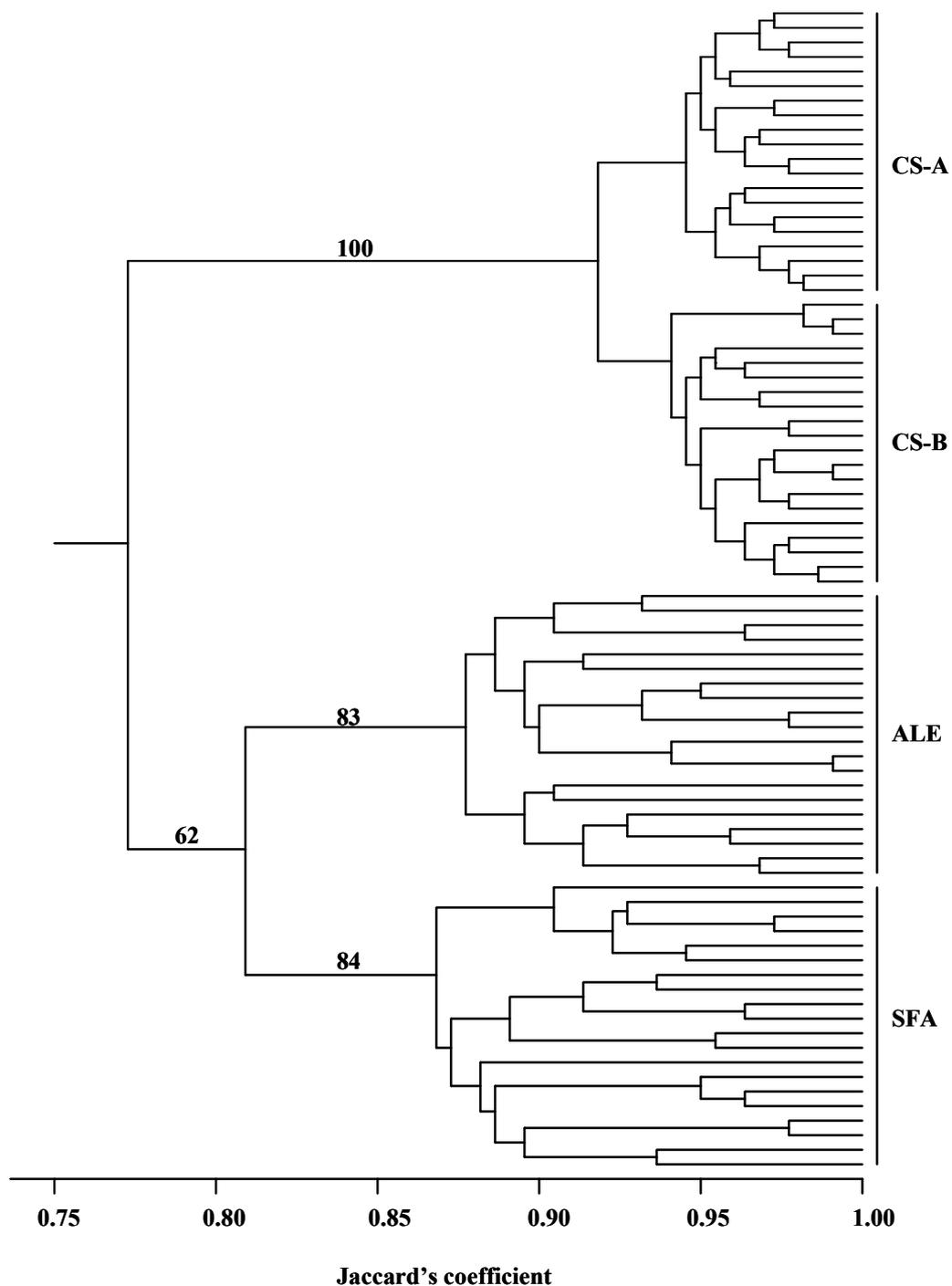
**Tabela 4.** Médias de frequência da presença de segmentos amplificados e cálculos de frequências alélicas e heterose considerando equilíbrio de Hardy-Weinberg, nas quatro populações de *H. ringens* avaliadas.

	Caçapava do Sul 1	Caçapava do Sul 2	Alegrete	São Francisco de Assis	Média
<b>Frequência</b> *	0,531	0,501	0,456	0,408	0,474
<b>P</b>	0,469	0,448	0,341	0,310	0,392
<b>Q</b>	0,531	0,552	0,659	0,690	0,608
<b>He</b>	0,123	0,107	0,229	0,195	0,164

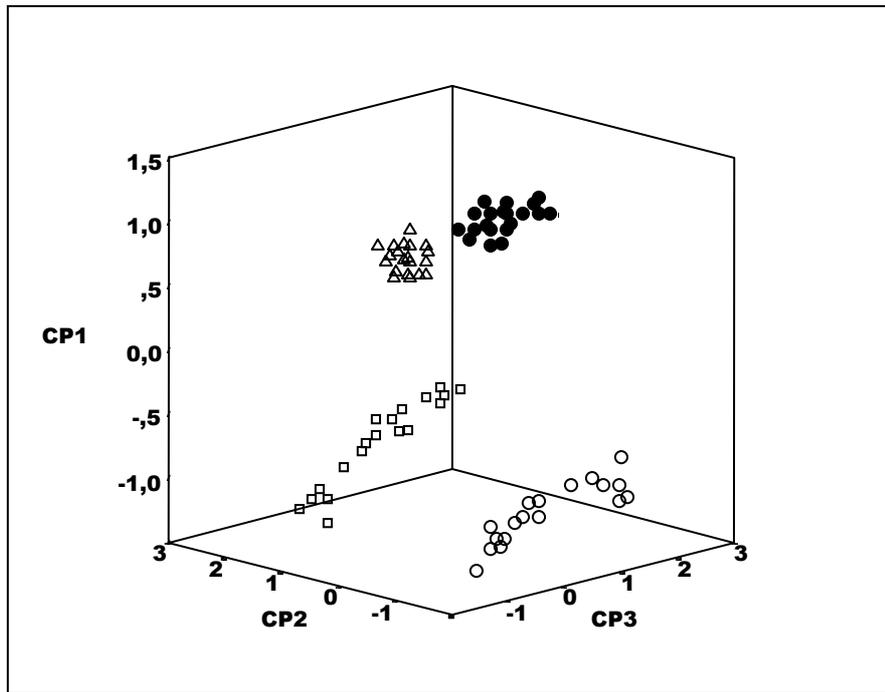
\* Frequência média de presença dos segmentos amplificados.



**Figura 1.** Localização geográfica das quatro populações de *Hesperozygis ringens* estudadas e a área de ocorrência das espécies baseada em coleções de herbário. 1- Alegrete; 2- São Francisco de Assis; 3- Caçapava do Sul 1; Caçapava do Sul 2.



**Figura 2.** Dendrograma concenso baseado nos coeficientes de Jaccard, obtido pela análise de marcadores RAPD e ISSR. Populações: CSA- Caçapava do Sul 1, CSB- Caçapava do Sul 2, AL- Alegrete, SFA- São Francisco de Assis. Os números acima das linhas internas correspondem a probabilidade (%) de agrupamento baseadas em 1000 permutações.



**Figura 3.** Distribuição espacial dos indivíduos e populações de *H. ringens* avaliadas através da análise de componentes principais com base nos dados conjuntos das análises de RAPD e ISSR.  $\Delta$ - Caçapava do Sul A,  $\blacktriangledown$  - Caçapava do Sul B,  $\circ$ - Alegrete, e  $\square$  - São Francisco de Assis.

**4.2. Análise da variabilidade do óleo essencial de *Hesperozygis ringens* Benth. (*Lamiaceae*) Das populações de Caçapava do Sul e Alegrete.**

**Análise da variabilidade do óleo essencial de *Hesperozygis ringens* Benth.  
(*Lamiaceae*) Das populações de Caçapava do Sul e Alegrete.**

Fernando Fracaro<sup>1</sup>, Sergio Echeverrigaray<sup>2</sup>, Ana Cristina Atti dos Santos<sup>2</sup> e Luciana Atti Serafini<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo. <sup>2</sup> Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil.

## **RESUMO.**

*Hesperozygis ringens* (Lamiaceae) é uma planta aromática e medicinal endêmica da serra do sudeste do Rio Grande do Sul e do sul das Missões, ocorrendo em elevações pedregosas. Devido a ação antrópica esta espécie está incluída na lista oficial das espécies ameaçadas de extinção. O óleo essencial de *H. ringens* foi usado para avaliar a variabilidade das populações de Caçapava do Sul e São Francisco de Assis. Através de hidrodestilação o óleo essencial foi quantificado e identificado usando GC/MS. Oito compostos foram extraídos, o composto isopulegona foi detectado em maior concentração ( entre 73,43 e 92,53% de rendimento do peso seco). Análise do dendrograma e de componentes principais confirmam a separação da populações por origem geográfica. Componentes significativos para a adaptação desta espécie foram observados em baixa frequência. O composto sabineno não foi detectado na população de Caçapava do Sul e os compostos Limoneno e Linalol foram detectados em baixa frequência na população de São Francisco de Assis.

## ABSTRACT

*Hesperozygis ringens* (Lamiaceae) is an aromatic, medicinal and endemic plant from the southeast and southern mountains regions of Rio Grande do Sul, Missions area, and occur in stony elevations. Due mainly anthropic action these species has led to including it in the official list of endangered species. The essential oil of *H. ringens* has used to assist variability of Caçapava do Sul and São Francisco de Assis populations. Through steam distillation the variability was quantified and identified using GC/MS. Eight compounds were extracted; Isopulegone compound was detected in a higher concentration (between 73,43 and 92,53 % of dry weight income). An analysis of the dendrograma and main component confirmed a set of populations for geographic region. Significant components for ambient adaptation of this species were observed in low frequency. Sabinene was not detected at Caçapava do Sul population and Limonene and Linalool compounds were detected in low frequency in São Francisco de Assis population.

## INTRODUÇÃO.

A Família *Lamiaceae* é caracterizada por apresentar grandes concentrações de óleo essencial (Cantino e Sanders, 1986), os quais despertam grande interesse para indústria alimentícia e cosmética (Heirich, 1992 e Lawrence, 1992). Também estes metabólitos secundários tem importantes funções biológicas como atração de polinizadores (Reinhard et al., 2004), atividade bactericida (Friedman et al., 2002) atividade antifúngica (Hammer et al., 2003), atração de predadores de seus herbívoros (Dicke e van Loon 2000) termotolerância (Delfine et al., 2000), ação antioxidante (Loreto et al., 2004) e atividade nematicida (Oka 2001).

Dentro da família *Lamiaceae* pode-se destacar o Gênero *Hesperozygis* o qual é formado por seis espécies, cinco das quais estão restritas ao sul do Brasil (Pereira e Pereira, 1973) e uma encontrada no México (Cantino e Sanders, 1986). *Hesperozygis ringens*, uma das espécies Sul Americanas, objetivo deste trabalho, é uma espécie semi lenhosa com ocorrência na região sudeste do Rio Grande do Sul, sua composição química caracteriza-se por apresentar altas concentrações de Pulegona, acima de 80%, estudos deste composto revelaram suas ações alelopáticas e antiparasíticas (von Poser et al., 1996). Devido a alguns fatores ambientais como ocorrência endêmica de *H. ringens*, intensas atividades exploratórias na agricultura, uso em atividades medicinais associados à baixa eficiência na propagação por sementes esta espécie encontra-se em processo de extinção (Secretaria Estadual do Meio Ambiente, 2002).

Portanto o objetivo deste trabalho é analisar a composição química do óleo essencial das populações de Caçapava do Sul e São Francisco de Assis, o qual pode contribuir para a preservação da espécie.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Coleta e secagem das amostras.**

Plantas de *H. ringens*, em período de florescimento, foram coletadas nos municípios de Caçapava do Sul (14 plantas) e São Francisco de Assis (15 plantas). Estas ficaram em câmara de secagem por três dias a temperatura de 40°C, antes de serem submetidas à hidrodestilação.

Uma amostra de cada coleta foi depositada no herbário da Universidade de Caxias do Sul.

### **Extração e identificação dos componentes químicos presentes nos óleos essenciais de *Hesperozygis ringens*.**

O óleo essencial foi obtido das plantas por hidrodestilação em aparelho Clevenger, descrito por Mechkovski e Akerele (1992). O material a ser extraído foi colocado em balão de fundo redondo de 3000 ml, juntamente com água até cobrir o material a ser extraído por arraste a vapor por um período de 1 hora. O óleo que é imissível com a água, é separado, e seco com sulfato de sódio anidro, o rendimento é lido em bureta graduada.

A identificação dos componentes químicos das amostras de óleo essencial foi realizada por cromatografia gasosa (GC) e cromatografia gasosa acoplada ao detector seletivo de massa (GC/MS).

Os constituintes dos óleos foram identificados por combinação de espectro de massa e índice de retenção de Kovats (Kovats, 1965; Pacakova e Feltl, 1992), utilizando solução padrão de hidrocarboneto C9 a C26, realizado em colunas de diferentes polaridades, e também por comparação com dados da bibliografia.

As análises por cromatografia gasosa foram realizadas em um Hewlett Packard 6890, equipado com processador de dados HP-Chemstation. As análises em coluna polar foram realizadas em coluna capilar HP-Innowax de Sílica fundida (30m X 320µm i.d.), 0,5µm de

espessura de filme (Hewlett Packard, Califórnia, USA), com a seguinte programação de temperatura: 40°C (8min) para 180°C a 3°C/min, 180-230°C a 20°C/min, 230°C (2min); temperatura do injetor 250°C, razão de slipt (1:50), temperatura do detector 250°C, gás de arraste H<sub>2</sub> (34 Kpa), volume injetado: 0,6 µl de amostra diluída em hexano (1:10).

As análises em coluna polar, foram realizadas em coluna capilar de sílica fundida HP-5 (30m X 320µm i.d) 0,25µm de espessura de filme (Hewlett Packard, Califórnia, USA), detector FID, com a seguinte programação de temperatura: 60°C (8min) para 60-180°C a 3°C/min, 180-230°C a 20°C/min, 230°C (20 min); temperatura do injetor 250°C, detector a 275°C modo de injeção slipt, razão de slipt 1:50, , gás de arraste H<sub>2</sub> (32 Kpa), volume injetado: 0,6 µl de amostra diluída em hexano (1:10).

Os resultados de espectro de massa dos compostos foram obtidos a partir de análises em cromatógrafo gasoso acoplado ao detector seletivo de massa Hewlett Packard 6890/MSD 5973, equipado com software HP-Chemstation e biblioteca de espectros Wiley 275 (MacLafferty et al., 1997).

As análises em coluna polar foram realizadas em coluna capilar HP-Innowax (30m X 250µm), 0,25 µm de espessura de filme (Hewlett Packard, Califórnia, USA). O programa de temperatura foi o mesmo usado na análise de GC, interface 280C, razão de slipt 1:100, gás de arraste H<sub>2</sub> (52Kpa), energia de ionização 70 ev, intervalo de aquisição de massas 40-350, volume injetado 0,4 µl de amostra diluída em hexano (1:10) “Solvent-cut” 3,5 min.

As análises em coluna apolar utilizaram coluna capilar HP-5 (30m X 250µm), 0,25 µm de espessura de filme (Hewlett Packard, Califórnia, USA). O programa de temperatura foi o mesmo usado na análise de GC, interface 280C, razão de slipt 1:100, gás de arraste H<sub>2</sub> (55,4Kpa), energia de ionização 70 ev, intervalo de aquisição de massas 40-350, volume injetado 0,4 µl de amostra diluída em hexano (1:10) “Solvent-cut” 3,5 min.

### **Análise estatística.**

Os constituintes presentes no óleo essencial identificados por cromatografia gasosa acoplada ao detector de massa foram utilizados para a análise multivariada. Foram avaliadas Distâncias Euclidianas e análise de componentes principais pelo programa computacional SPSS versão 10.0.1.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO.

Plantas de *H. ringens* foram coletadas na primavera, durante seu período de florescimento e após as coletas as plantas foram secas e posteriormente foram analisadas por cromatografia gasosa com detector de massas (GC/MS) para identificação dos compostos presentes, onde foram identificados sete compostos no total de acessos (Tabela 1). O rendimento das plantas de *H. ringens* variou entre 0,93% para a amostra sete de Caçapava do Sul e 4,89% para a amostra nove de São Francisco de Assis. Como pode ser observado na tabela 1, a porcentagem dos compostos majoritários do óleo essencial de *H. ringens* variou entre as populações analisadas e dentro destas. Os principais componentes identificados foram, beta pineno, sabineno, mirceno, limoneno, trans beta farneseno, linalol e isopulegona.

Variações químicas qualitativas e quantitativas foram observadas dentro e entre populações, quanto à presença de compostos, como por exemplo o composto sabineno, presente somente na população de São Francisco de Assis, alguns compostos apresentam baixa frequência dentro das populações como o composto trans-beta farneseno, encontra-se presente somente em cinco amostras da população de Caçapava do Sul e presente na população de São Francisco de Assis. Os compostos Limoneno e Linalol estão presentes em seis amostras das quinze avaliadas na população de São Francisco de Assis enquanto que encontram-se em todas as amostras da população de Caçapava do Sul (Tabela 1). Estas variações podem ser fundamentais para a sobrevivência da espécie em seu habitat natural, como citado anteriormente, já que estes compostos estão ligados diretamente à adaptação ao ambiente.

Uma das características importantes desta planta é por apresentar altas concentrações de pulegona, variando entre 73,43% (CS 2) e 92,53% (SFA 10) do óleo essencial. Dados também obtidos por von Poser *et al.*, (1996) na concentração de 79,2% , este composto caracteriza-se pela atividade alelopática (von Poser *et al.*, 1996), antimicrobiana e

antifúngica (Economou e Nahrstedt, 1991) inseticida (Franzois *et al.*, 19997). A análise de agrupamento através do método UPGMA (Unweighted Pair-Groups Method Average) figura 1, permitiu a construção do dendrograma e a separação por grupos de afinidade. A população de São Francisco de Assis mostrou-se dividida em dois grupos sendo que o grupo formado pelas amostras SFA8, SFA9, SFA10, SFA11, SFA12, SFA13, SFA14 e SFA15 caracteriza-se pela ausência dos compostos limoneno e linalol. Para a população de Caçapava do Sul a amostra CS7 distanciou-se das demais por apresentar a maior concentração de beta pineno (1,20%) onde a segunda maior concentração foi de 0,81% para a amostra SFA4, a concentração de mirceno de 2,07% (0,67% para SFA5) e o menor rendimento (0,93%). Resultados confirmados pela análise dos componentes principais figura 2. As amostras CS2, CS4, CS9, CS10 e CS 12, formam um subgrupo dentro da população de Caçapava do Sul possivelmente por não apresentarem os compostos beta-pineno e mirceno quando comparado com as demais amostras desta população, assim como a amostra CS14 formando outro subgrupo por não apresentar os constituintes mirceno quando comparada com as demais da mesma população e também por apresentar o composto limoneno com o maior rendimento (3,28%).

A importância ambiental dos compostos encontrados nos óleos essenciais, principalmente os terpenos, já vem sendo estudados há muito tempo, como por exemplo Cole (1992) descreve a atividade antimicrobiana, antifúngica e inseticida dos terpenos encontrados na família *Lamiaceae* os quais servem para defesa em seu habitat natural.

## CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste capítulo permitem concluir que:

Com uma análise multivariada foram observadas diferenças significativas qualitativas e quantitativas na composição do óleo essencial nas populações avaliadas de *H. ringens* e uma relação na variação química com a distribuição geográfica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cantino, P.D. e Sanders, R.W. (1986). Subfamilial classification of *Labiatae*. **Syst. Bot.** 1:163-185.
- Cole, M.D. (1992). **The significance of the terpenoids in the Labiatae**. In: harley, R.M. e Reynolds, T. (ed.). *Advances in Labiatae Science*. Royal Botanic Gardens Kew. 315-324.
- Delfine, S., Csiky, O., Seufert, G., e Loreto S. (2000). Fumigation with exogenous monoterpenes of a non isoprenoid emitting oak (*quercus suber*): monoterpene acquisition, translocation, and effect on the photosynthetic properties at high temperatures. **New Phytol.** 146:27.
- Dicke, M. e van Loon, J.J.A. (2000). Multitrophic effects of herbivore induced plant volatiles in an evolutionary context. **Entomol. Exper Appl.** 97.3:237.
- Economou, D. e Nahrstedt, A. (1991). Chemical, physiological, and toxicological aspects of the essential oil of some species of the genus *Bytropogon*. **Plant. Med.** 57:347-351.
- Franzois, G., Mirotsu, M., Hatziapostolou, E., Kral, J., Scouras, Z.G. e Mavagrani-Tsipidou, P. (1997). Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. **J. Agric. Food Chem.** 45:2690-2694.
- Friedman, M., Henika, P.R. e Mandell, R.E. (2002). Bactericidal Activities of Plant Essential Oils and Some of Their Isolated Constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. **J Food Prot.** 65.10:1545-1560.
- Hammer, K.A., Carson, C.F. e Riley, T.V. (2003). Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **J. Appl Microbiol.** 95,4:853.
- Heinrich, M. (1992). **Economic Botany of American Labiatae**. In *Advances in Labiatae Science*, Harley, R.M., Reynolds, T., Eds. The royal Botanical Gardens: Kew.

- Kováts, E. (1965). Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. **Advances in Chromatography**, 7, 229-247.
- Lawrence, B.M. (1992). **Chemical components of Labiatae oil and their exploitation**. In: Advances in Labiatae Sciences, Harley. R.M., Reynolds, T. Eds.; The Royal Botanical Gardens: Kew.
- Loreto, F., Pinelli, P., Manes, F., e Kollist, H. (2004). Impact of ozone on monoterpene emissions and evidence for an isoprene like antioxidant action of monoterpenes emitted by *Quercus ilex* leaves. **Tree Physiol.** 24:361-367.
- MacLafferty, F.W., Stenhagen, E. e Abrahamsson, S. (1997). **Registry of Mass Spectral Data**. New York: Wiley.
- Mechkovski, A. e Akerele, C.O. (1992). **Quality control methods for medicinal plant materials**, WHO/PHARM/92.559. Switzerland: World Health Organization.
- Oka, Y. (2001). Nematicidal activity of essential oil components against the root knot nematode *Meloidogyne javanica*. **Nematol.** V3,n2:159-164.
- Pacakova, V. e Feltl, L. (1992). **Chromatografic retention indices, an acid to identification of organic compounds**, London: Ellis Horwood.
- Pereira, C. e Pereira, E. (1973). Flora of the Paraná state. Labiatae family. **Arqu. Jard. Bot.** Rio de Janeiro. 19: 77-99.
- Poser, G.L. von, Menut, C., Toffoli, M.E., Verin, P., Sobral, M., Bessiere, J.M., Lamaty, G., e Henriques, A.T. (1996). Essential oil composition and allelopathic effect of the Brazilian Lamiaceae *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling and *Hesperozygis rhododon* Epling. **J. Agr. Food Chem.** 44: 1829-1832.
- Reinhard, J., Srinivasan, M.V., e zhang, S. (2004). Olfaction: Scent-triggered navigation in honeybees. **Nat.** 427:411.

Secretaria Estadual do Meio Ambiente (SEMA). (2002). **Espécies da Flora ameaçadas de extinção do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre. ([www.sema.rs.gov.br](http://www.sema.rs.gov.br)).

**Tabela 1-** Principais compostos obtidos por análise em GC-MS do óleo essencial de duas populações de *Hesperozygis ringens* (CS- Caçapava do Sul e SFA- São Francisco de Assis).

	Bpineno	Sabineno	Mirceno	Limoneno	TBFarneseno	Linalol	Isopulegona	R**
CS1	0,4	0,0	0,44	1,97	0,0	1,40	88,39	2,68
CS2	0,0	0,0	0,0	0,53	0,0	1,28	73,43	3,26
CS3	0,43	0,0	0,52	1,14	0,58	1,89	87,94	2,23
CS4	0,0	0,0	0,0	0,54	0,0	1,72	83,09	1,97
CS5	0,67	0,0	0,66	2,06	0,70	1,56	88,57	3,15
CS6	0,56	0,0	0,60	1,92	0,34	1,21	89,75	1,89
CS7	1,20	0,0	2,07	3,16	0,60	1,52	84,78	0,93
CS8	0,57	0,0	0,62	1,17	0,40	1,13	91,26	2,76
CS9	0,0	0,0	0,0	1,73	0,0	2,28	91,50	2,39
CS10	0,0	0,0	0,0	1,84	0,0	2,03	88,16	1,36
CS11	0,49	0,0	0,52	1,52	0,0	1,22	90,56	2,33
CS12	0,0	0,0	0,0	1,78	0,0	1,54	91,87	1,84
CS13	0,45	0,0	0,0	1,30	0,0	1,44	92,04	2,98
CS14	0,6	0,0	0,0	3,28	0,0	1,61	88,19	2,09
SFA1	0,68	0,72	0,56	2,06	0,80	0,97	87,24	4,28
SFA2	0,81	0,81	0,64	2,01	1,10	1,39	85,40	3,03
SFA3	0,76	0,80	0,65	2,40	1,58	1,61	84,13	3,88
SFA4	0,81	0,90	0,66	1,27	1,83	1,22	85,66	2,57
SFA5	0,67	0,72	0,67	2,58	1,46	0,87	86,09	2,90
SFA6	0,67	0,72	0,56	0,91	0,92	1,88	86,72	3,18
SFA7	0,67	0,0	0,34	0,0	1,60	0,0	86,21	3,57
SFA8	0,63	0,0	0,62	0,0	1,05	0,0	86,05	4,32
SFA9	0,47	0,0	0,47	0,0	0,51	0,0	89,70	4,89
SFA10	0,51	0,0	0,47	0,0	0,78	0,0	92,53	3,96
SFA11	0,72	0,69	0,47	0,0	0,68	0,0	88,80	2,59
SFA12	0,60	0,0	0,59	0,0	0,50	0,0	90,96	4,39
SFA13	0,74	0,75	0,50	0,0	0,82	0,0	87,69	3,17
SFA14	0,77	0,76	0,58	0,0	0,82	0,0	89,18	3,77
SFA15	0,56	0,0	0,46	0,0	0,39	0,0	89,62	3,04
T.R.*	4,30	7,46	11,09	12,55	15,69	28,97	38,21	

\* Tempo de retenção de cada composto.

\*\*Porcentagem total de cada composto identificado de cada coleta.

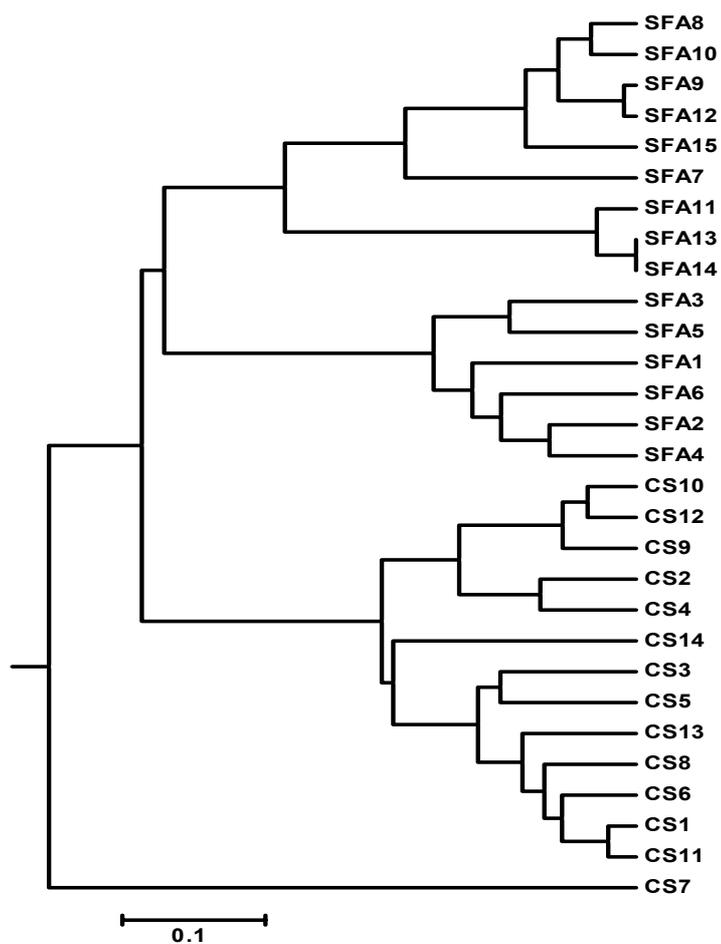


Figura 1- Dendrograma baseado na composição química dos óleos essenciais de duas populações de *Hesperozygis ringens* (CS- Caçapava do Sul e SFA- São Francisco de Assis), construído através da análise de agrupamento pelo método UPGMA.

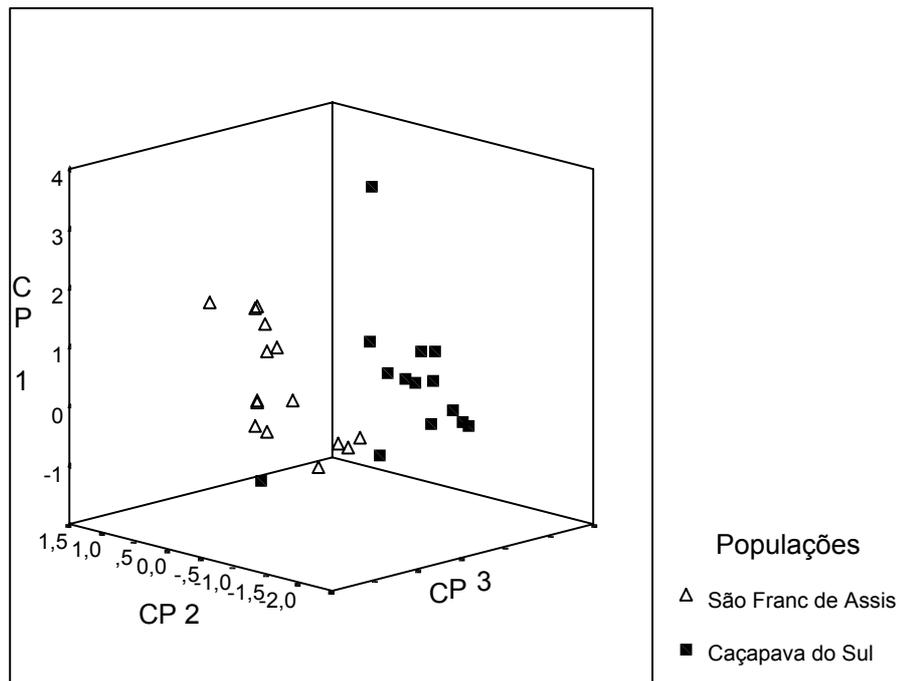


Figura 2- Distribuição de 2 populações de *Hesperozygis ringens* com base nos componentes principais calculados através da análise da composição química de óleos essenciais.

**4.3. EFEITO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO E NITRATO DE PRATA NA  
MICROPROPAGAÇÃO DE *Hesperozygis ringens* BENTH., UMA PLANTA  
AROMÁTICA SUL-AMERICANA AMEAÇADA DE EXTINÇÃO.**

**4.3. EFEITO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO E NITRATO DE PRATA NA MICROPROPAGAÇÃO DE *Hesperozygis ringens* BENTH., UMA PLANTA AROMÁTICA SUL-AMERICANA AMEAÇADA DE EXTINÇÃO.**

FERNANDO FRACARO<sup>1,2</sup> e SERGIO ECHEVERRIGARAY<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, SP, Brasil; <sup>2</sup>Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, RS, Brasil.

## RESUMO

Brotos axilares de plantas jovens de *Hesperozygis ringens* Benth. foram usados para avaliar o efeito de reguladores de crescimento, meios de cultura, e nitrato de prata no crescimento e proliferação de brotos *in vitro*. A melhor taxa de multiplicação foi obtida utilizando meio Murashige and Skoog (MS) suplementado com 13.2 $\mu$ M de benziladenina (BA) e contendo 2 mg l<sup>-1</sup> de nitrato de prata . O nitrato de prata aumenta positivamente a viabilidade dos explantes. A adição de ácido indol butírico (IBA), ácido naftaleno acético (NAA) e ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) no meio de cultura não foram eficazes. O enraizamento foi obtido em casca de arroz carbonizada umedecida com ¼ MS suplementado com IBA ou NAA. Embora até o momento o enraizamento seja uma limitação, a micropropagação pode ser uma alternativa para a preservação e propagação desta potencial espécie ameaçada de extinção.

Palavras chave: *Hesperozygis ringens*, cultivo *in vitro*, brotos axilares e *Lamiaceae*.

## ABSTRACT

Axillary buds of field plants of *Hesperozygis ringens* Benth. were used to evaluate the effect of growth regulators, culture media, and silver nitrate on the *in vitro* shoot proliferation and growing. The highest multiplication rate was obtained using Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 13.2 $\mu$ M benzyladenine (BA) and containing 2 mg l<sup>-1</sup> silver nitrate. Silver nitrate positively increased viability. The addition of indolebutyric acid (IBA), naphthaleneacetic acid (NAA) and giberelic acid (GA<sub>3</sub>) to the above culture medium was not effective. Rooting was obtained on carbonized rice bark moistened with ¼ MS supplemented with either IBA or NAA. Although at the moment rooting poses a limitation, micropropagation can be seen as an alternative for the preservations and propagation of this potentially useful but endanger species.

Keywords: *Hesperozygis ringens*, *in vitro* culture, axillary buds, *Lamiaceae*.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Hesperozygis* (*Lamiaceae*) é encontrado no sul e norte da América. Este pequeno e novo gênero é formado por seis espécies, Cinco das quais encontradas na Floresta Atlântica e serras do sul e sudeste do Brasil (Pereira e Pereira, 1973), e uma no México (Cantino e Sanders, 1986).

*Hesperozygis ringens* Benth. é endêmica de uma área restrita do sudeste do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, com seu crescimento no topo de baixas altitudes (<400m) e no meio de solos pedregosos e arenosos. Esta espécie pode ser definida como um arbusto lenhoso denso ramificado com 20-50cm de altura. As folhas são rombóides (2-5cm/1.5-2.5cm), pecioladas, uniformemente coberta por numerosas glândulas sésseis. As flores são violeta claras (1.2-1.7cm) estão agrupadas em espigas terminais (Pereira e Pereira, 1973).

*H. ringens* é popularmente utilizada como um inseticida natural, e estudos químicos revelaram um grande potencial desta espécie para a produção de óleos essenciais, com um rendimento superior a 4-5% do peso seco. O maior constituinte do óleo essencial de *H. ringens* é o composto pulegona (>79%) com a presença de  $\alpha$ -pineno, sabineno,  $\beta$ -pineno, limoneno, 1,8-cineol, óxido de *cis*- e *trans*-linalol, linalol, mentona, isopulegona,  $\alpha$ - terpineol, óxido de *cis*- and *trans*-pulegona, e cariofileno (Poser et al., 1996).

A ocorrência endêmica em morros pedregosos, a renovação das pastagens através das queimadas para o gado, e sua coleta indiscriminada para fins medicinais, associados a baixa eficiência de propagação por sementes, tem incluído *Hesperozyges ringens* na lista das espécies brasileiras ameaçadas de extinção (Secretaria Estadual do Meio Ambiente, 2002).

*Hesperozygis ringens* pode ser propagada por sementes ou por estaquia. Porém, nossa experiência mostra que a propagação convencional apresenta problemas pela viabilidade das sementes, baixa germinação, demorado e limitado enraizamento de estacas. Micropropagação pode ser uma alternativa para a multiplicação de genótipos selecionados e quimiotipos de

várias plantas aromáticas e medicinais (Bajaj et al., 1988), assim como a preservação de espécies.

Considerando que até o momento não foram encontradas na literatura publicações sobre micropropagação e cultura de tecidos deste gênero, este estudo torna-se importante. Assim o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de meios de cultivo, reguladores de crescimento e nitrato de prata na micropropagação de *Hesperozygis ringens*, na tentativa de desenvolver uma estratégia de micropropagação, podendo contribuir para a sustentabilidade e uso, assim como para a preservação desta espécie ameaçada de extinção.

## MATERIAL E MÉTODOS

Plantas jovens de *Hesperozygis ringens* Benth. Coletadas em Caçapava do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil, foram usadas como plantas matrizes nos experimentos *in vitro*. O material vegetal foi coletado durante a primavera. Brotos axilares medindo 1 a 3 mm de comprimento foram excisados e inoculados nas culturas. Os explantes foram lavados com uma solução de etanol 70% por 45 seg e subseqüentemente esterilizados com uma solução de 1 g/l<sup>-1</sup> de hipoclorito de sódio contendo 0.1% Tween 20 (p/v) por 30 min. Seguidamente lavados com água estéril, os explantes foram inoculados verticalmente em 10 ml de meio de cultura em tubos de vidro (20 x 150 mm).

Quatro composições salinas foram avaliadas: MS (Murashige e Skoog, 1962), QL (Quoirin e Lepoivre, 1977), LS (Linsmaier e Skoog, 1965) e B5 (Gamborg, 1968). Todos os meios de cultura continham 30 g l<sup>-1</sup> de sacarose como fonte de carbono. O pH dos meios foram ajustados para 5.8 antes da adição de 0.7% agar (Merck) e autoclavagem (1 atm, 127 °C, 20 min). As culturas foram mantidas a 25 ± 2 °C com 16 horas de luz com uma luminosidade de 20 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Phillips ThD 36W/84), durante o período de 40 dias. Cada tratamento consistiu em 30 a 40 brotos axilares. Os parâmetros avaliados foram: o número de brotos por explante, o comprimento dos brotos, a percentagem de viabilidade, a percentagem de explantes enraizados e o número de raízes por explante.

O efeito das concentrações das citocininas 2-isopentenyladenina (2-iP), kinetina (Kin), e benziladenina (0, 4.4 e 8.8 μM), benziladenina (BA), (0, 2.2, 4.4, 8.8, 13.2, 17.6, 26.4 e 44.4 μM), e concentrações de nitrato de prata (0, 1, 2, 4 e 8 mg l<sup>-1</sup>) na micropropagação foi avaliada em meio MS. Para avaliar o efeito da composição salina brotos axilares foram inoculados em quatro meios (MS, LS, B5 e QL), todos suplementados com 4.4 μM BA.

Para avaliar o enraizamento microexplantes com 2 a 3 cm de comprimento foram transferidos para meio MS sólido suplementado com diferentes concentrações de IBA (0 a 9.8 $\mu$ M) e NAA (0 a 10.0  $\mu$ M). Alternativamente, microexplantes foram transferidos para tubos (20 x 150 mm) contendo casca de arroz carbonizada e esterilizada suplementados com 5ml de meio  $\frac{1}{4}$  MS com diferentes concentrações de IBA (0, 2.4, e 4.8 $\mu$ M) e NAA (0, 2.5 e 5 $\mu$ M), e meio  $\frac{1}{4}$  MS acrescido de carvão ativado (2%) e as mesmas concentrações de auxinas.

Plantas enraizadas foram lavadas com água e transferidas para caixas plásticas contendo uma mistura esterilizada de areia e solo (1:1). As caixas foram gradualmente abertas durante o período de aclimação de 15 dias. As plantas aclimatadas foram transferidas para estufa.

Os dados foram submetidos à análise ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, brotos axilares de plantas com ativo crescimento vegetativo foram inoculados em meio MS suplementados com BA, kinetina ou 2-iP para avaliar o efeito de diferentes citocininas na micropropagação de *H. ringens*. O experimento mostrou que a presença de citocininas influencia positivamente na sobrevivência de *H. ringens*. Porém a única citocinina que estimulou significativamente a micropropagação desta espécie pelo acréscimo no número de brotos foi benziladenina.

Na seqüência, quatro diferentes meios de cultura suplementados com 4.4  $\mu\text{M}$  BA foram testados. Os dados apresentados na tabela 1 mostram que os meios MS, LS e B5 foram igualmente eficientes para a micropropagação de *H. ringens*. O meio QL obteve a pior viabilidade e altura de plantas. Entretanto não foram encontradas diferenças significativas entre os meios MS e B5, O primeiro foi selecionado para futuros experimentos.

Baseado nestes resultados, diferentes concentrações de BA foram avaliadas em meio MS. Os resultados apresentados na tabela 1 mostram um acréscimo no número de brotos produzidos com o aumento da concentração de BA de 0 para 26.4  $\mu\text{M}$ . Porém em concentrações de BA superiores a 17.6  $\mu\text{M}$  os explantes exibiram hiperidratação, atrofiamento, e necrose nas folhas reduzindo drasticamente a viabilidade. Hiperidratação foi freqüentemente observada em muitas outras espécies da família *Lamiaceae*, incluindo, *Minthostachys mollis* (Chebel et al, 1998), *Lavandula vera* (Andrade et al, 1999), *Mentha piperita* (Paolicchi et al, 2002), and *Origanum vulgare* (Eguchi et al, 1996), durante a micropropagação com altas concentrações de BA.

O elevado número de brotos por explantes com baixa redução na altura das plantas foi obtido em concentrações de BA de 8.8 a 13.2  $\mu\text{M}$ , níveis de BA que estimularam a micropropagação em muitas outras espécies de *Lamiaceae* como, *Majorana hortensis* (Iyver e

Pai, 1998), *Salvia splendens* (Zhong Xiong *et al*, 2001), *Thymus sipyleus* (Erdag e Yurekli, 2000), *Cunila galioides* (Fracaro e Echeverrigaray, 2002), entre outras.

A maior viabilidade de explantes observada foi da ordem de 55%, um valor que pode ser considerado baixo quando comparado com outras espécies da família *Lamiaceae* (Eguchi *et al*, 1996, Andrade *et al*, 1999, Paolicchi *et al*, 2002). Mortes ocorreram após progressiva necrose dos explantes e senescência das folhas, estes sintomas foram associados com a produção e acúmulo de etileno dentro dos tubos durante a micropropagação (George, 1996).

Para superar esta limitação foram testadas concentrações de nitrato de prata, um composto que captura etileno livre e reduz sua emissão (George, 1996; Mohiuddin *et al*, 1997). Como mostrado na tabela 3, concentrações de 2 a 4 mg l<sup>-1</sup> de nitrato de prata incorporados no meio de cultura aumentam significativamente *in vitro* a viabilidade e proliferação dos brotos, com não significantes decréscimos na altura das plantas. Porém, altas concentrações de nitrato de prata (8mg l<sup>-1</sup>) causam efeito tóxico com a conseqüente redução em todos os parâmetros, especialmente altura dos brotos.

Um novo experimento com concentrações crescentes de BA contendo 2mg l<sup>-1</sup> de nitrato de prata foi conduzido. Os resultados (Tabela 4) mostram que o aumento da viabilidade foi obtido no meio suplementado com 8.8 e 13.2 µM BA. O aumento da taxa de multiplicação foi obtido em 17.6 µM BA, porém, sinais de hiperhidratação foram observados na concentração de 13.2 µM BA. Como observado anteriormente, em 26.4 µM de BA causa hiperhidratação e necrose reduzindo drasticamente a viabilidade dos explantes e o comprimento dos brotos. Considerando todos resultados das tabelas 2 e 4, nitrato de prata não interfere na resposta de *H. ringens* para BA, mas claramente aumenta a viabilidade dos explantes.

A inclusão de 0.6 µM de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), assim como a adição de IBA e NAA (2,5 e 5 µM) no meio MS suplementados com 2mg l<sup>-1</sup> de nitrato de prata e 13.2 µM BA não

afetaram a viabilidade dos explantes, comprimento dos brotos e a multiplicação dos explantes (Dados não mostrados).

Repetidos cultivos de brotos e segmentos nodais com intervalos de 4 semanas por seis meses em meio MS com  $2\text{mg l}^{-1}$  de nitrato de prata e  $13.2\ \mu\text{M}$  BA possibilitaram a multiplicação em massa dos brotos sem a evidência de declínio das culturas.

Plântulas obtidas em meio de cultivo foram utilizadas em experimentos de enraizamento. Na primeira tentativa de enraizamento, microexplantes (1.5 a 2 cm) foram transferidos para meio MS contendo 0 a  $9.8\ \mu\text{M}$  IBA ou 0 a  $10\ \mu\text{M}$  NAA. Após 45 dias somente 20 % das plântulas em MS acrescido  $2.45\ \mu\text{M}$  IBA exibiram primórdios radiculares. Estas plântulas foram transferidas para um novo meio, mas não desenvolveram as raízes. Plântulas inoculadas com 4.9 e  $9.8\ \mu\text{M}$  IBA, formaram calos na base dos explantes e morreram após 20 dias.

Para superar esta limitação, um novo experimento foi conduzido em meio MS acrescido de carvão ativado (2%), e casca de arroz carbonizada, ambos suplementados com IBA (0, 2.4, e  $4.8\ \mu\text{M}$ ) e NAA (0, 2.5 e  $5\ \mu\text{M}$ ). Nenhuma raiz foi observada no meio com carvão ativado, mas plântulas enraizadas foram obtidas com casca de arroz carbonizada umedecida com meio  $\frac{1}{4}$  MS e contendo IBA ou NAA. O enraizamento variou entre 15% com  $4.8\ \mu\text{M}$  IBA para 40% com  $2.5\ \mu\text{M}$  NAA. As plântulas enraizadas exibiram bom crescimento, o dobro do crescimento com 30 dias. Raízes (1 a 3 por explante) foram curtas ( $< 2\text{cm}$ ) e exibiram uma coloração escurecida.

Plântulas enraizadas foram aclimatadas (20% viabilidade) e exibiram queda no crescimento quando transferidas para outras condições, fato que pode ser relacionado com a ineficiência do sistema radicular. Novas alternativas para solucionar este problema estão em procedimento.

Embora o enraizamento esta sendo uma limitação para a propagação *in vitro* de *H. ringens*, os dados obtidos no presente trabalho mostram que a micropropagação poderá ser uma alternativa para a preservação e propagação para o uso potencial desta espécie ameaçada.

## CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste capítulo permitem concluir que:

Uma análise geral dos dados obtidos indica que a micropropagação pode ser utilizada como ferramenta adequada na multiplicação de *H. Ringens*, mas apresenta algumas limitações como baixa taxa na multiplicação dos explantes, com dificuldades no enraizamento e aclimatação das plântulas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, L.B., Echeverrigaray, S., Fracaro, F., Pauletti, G.F. e Rota, L. T. (1999). The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera* DC). **Plant Cell Tiss. Organ Cult.** 56:2, 79-83.
- Bajaj, Y.P.S., Furmonowa, M. e Olszowska, O. (1988). **Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants.** In: Bajaj, Y.P.S, ed. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 4, Medicinal and Aromatic Plants I. (ed.), Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 60- 103.
- Chebel, A.D.V., Koroch, A.R., Juliani, H.R. e Trippi, V.S. (1988). Micropropagation of *Minthostachys mollis* (H.B.K.) Grieseb. and essential oil composition of clonally propagated plants. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 34: 249-251.
- Egushi, Y., Curtis, O.F. e Shetty, K. (1996). Interaction of hyperhydricity-preventing *Pseudomonas sp.* with oregano (*Origanum vulgare*) and selection of high phenolics and rosmarinic acid-producing clonal lines. **Food Biotechn.** 10: 191-202.
- Erdag, B.B. e Yurekli, A.K. (2000). In vitro propagation of *Thymus sipyleus* Boiss. (*Lamiaceae*). **Turkish J Biol.** 24: 81-86;.
- Fracaro, F. e Echeverrigaray S. ( 2002). .Micropropagation of *Cunila galioides*, a popular medicinal plant of south Brazil. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.** 64: 1-4.
- Gamborg, O. L., Miller, R.A. e Ojima, H. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. **Exp. Cell Res.** 50: 151-158.
- George, E.F. (1996). **Plant propagation by tissue culture.** Part 2: In practice. London: Exegetics Ltd. 575-669.
- Iyver, P.V. e Pai, J.S. (1998). Micropropagation of sweet marjoram (*Marjorana hortensis* Moench). **J. Spices Arom. Crops.** 7:1, 47-49; 1998.

- Linsmaier, E.M. e Skoog, F. (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. **Physiol. Plant.**18: 100-127.
- Mohiuddin, A.K.M., Chwdhury, M.K.U., Asbdullah, Z.C. e Napis, S. (1997). Influence of silver nitrate (ethylene inhibitor) on cucumber *in vitro* shoot regeneration. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.** 51: 75-78.
- Murashige, T. e Skoog, F. S. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Plant. Physiol.** 15: 473-497.
- Paolicchi, F., Mensuali, A.S. e Tognoni, F. (2002). Effect of clinorotation on *in vitro* cultured explants of *Mentha piperita* L. **Hortic Sci.** 92: 305-315.
- Poser, G.L. von, Menut, C., Toffoli, M.E., Verin, P., Sobral, M., Bessiere, J.M., Lamaty, G. e Henriques, A.T. (1996). Essential oil composition and allelopathic effect of the Brazilian Lamiaceae *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling and *Hesperozygis rhododon* Epling. **J. Agr. Food Chem.** 44: 1829-1832.
- Quoirin, M. e Lepoivre, P. (1977). Étude de milieus adaptés aux cultures *in vitro* de Prunus. **Acta Hortic.** 78: 437-442.
- Secretaria Estadual do Meio Ambiente (SEMA). (2002). **Espécies da Flora ameaçadas de extinção do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre. ([www.sema.rs.gov.br](http://www.sema.rs.gov.br)).
- Zhong Xiong, L., Cheng Chun, L., Hong Wei, Y., Qing Liang, S., Wen Yi, G., Hong Ming, W. e Dong Ming. (2001). P. Micropropagation technique of dwarf *Salvia splendens*. **J. Fujian Agr. Univ.** 30: 483-485.

Tabela 1. Efeito de quatro meios de cultivo na propagação *in vitro* de *Hesperozygis ringens*.

Meio de cultura	Viabilidade (%)	Nº de brotos por explante*	Comprimento de brotos (cm)*
QL	10	0,70 ± 0,23 <sup>b</sup>	1,12 ± 0,44 <sup>b</sup>
MS	45	2,15 ± 1,41 <sup>a</sup>	1,73 ± 0,54 <sup>a</sup>
LS	40	1,65 ± 0,67 <sup>a</sup>	1,68 ± 0,57 <sup>a</sup>
B5	42	2,02 ± 1,04 <sup>a</sup>	1,70 ± 0,41 <sup>a</sup>

\* Médias seguidas por mesmas letras não diferem significativamente ( $p < 0.05$ ) usando teste de Tukey.

Tabela 2. Número e comprimento de brotos de *H. ringens* obtidos em meio MS suplementados com diferentes concentrações de benziladenina (BA).

BA concentrações (µM)	Viabilidade (%)	Nº de brotos por explante*	Comprimento de brotos (cm)*
0	20	1,06 ± 1,21 <sup>b</sup>	2,83 ± 1,41 <sup>ab</sup>
2,2	30	2,50 ± 1,29 <sup>a</sup>	3,92 ± 1,53 <sup>a</sup>
4,4	40	2,25 ± 0,70 <sup>a</sup>	2,49 ± 0,77 <sup>ab</sup>
8,8	55	2,27 ± 1,55 <sup>a</sup>	2,17 ± 0,39 <sup>b</sup>
13,2	55	2,90 ± 2,30 <sup>a</sup>	1,59 ± 0,78 <sup>b</sup>
17,6	30	3,00 ± 1,09 <sup>a</sup>	1,53 ± 0,30 <sup>b</sup>
26,4	10	3,50 ± 0,70 <sup>a</sup>	1,35 ± 0,91 <sup>b</sup>

\* Médias seguidas por mesmas letras não diferem significativamente ( $p < 0.05$ ) usando teste de Tukey.

Tabela 3. Influência de concentrações de nitrato de prata na micropropagação de *Hesperozygis ringens* em meio MS acrescido de 4.4 µM BA.

AgNO <sub>3</sub> concentrações	Viabilidade (%)	Nº brotos por explante	Comprimento de brotos (cm)*
Controle	45	1,88 ± 0,92 <sup>b</sup>	1,56 ± 0,54 <sup>c</sup>
1 mg l <sup>-1</sup>	55	2,63 ± 0,80 <sup>ab</sup>	2,48 ± 0,57 <sup>a</sup>
2 mg l <sup>-1</sup>	75	3,41 ± 1,16 <sup>a</sup>	2,35 ± 0,66 <sup>ab</sup>
4 mg l <sup>-1</sup>	75	2,86 ± 0,99 <sup>ab</sup>	1,78 ± 0,58 <sup>bc</sup>
8 mg l <sup>-1</sup>	35	2,57 ± 0,53 <sup>ab</sup>	1,62 ± 0,26 <sup>c</sup>

\* Médias seguidas por mesmas letras não diferem significativamente (p<0.05) usando teste de Tukey.

Tabela 4. Efeito de concentrações de benziladeninana micropropagação de *H. ringens* em meio MS com 2mg l<sup>-1</sup> de nitrato de prata.

BA concentrações (µM)	Viabilidade (%)	Nº de brotos por explante*	Comprimento de brotos (cm)*
0	45	2,23 ± 0,83 <sup>b</sup>	2,51 ± 0,78 <sup>a</sup>
4,4	80	2,78 ± 1,03 <sup>ab</sup>	2,29 ± 0,72 <sup>a</sup>
8,8	95	3,31 ± 1,49 <sup>ab</sup>	2,00 ± 0,48 <sup>ab</sup>
13,2	90	3,68 ± 1,20 <sup>a</sup>	1,87 ± 0,60 <sup>ab</sup>
17,6	85	4,00 ± 1,11 <sup>a</sup>	2,03 ± 0,60 <sup>ab</sup>
26,4	35	3,00 ± 1,15 <sup>ab</sup>	1,58 ± 0,28 <sup>c</sup>

\* Médias seguidas por mesmas letras não diferem significativamente (p<0.05) usando teste de Tukey.

## 5. DISCUSSÃO GERAL

*Hesperozygis ringens*, é um arbusto lenhoso, pertencente à família *Lamiaceae*, este gênero é formado por seis espécies, cinco destas são encontradas na América do Sul e uma na América do Norte, principalmente no México. Esta espécie vulgarmente chamada de Espanta Pulga é utilizada como inseticida natural, pois possui na constituição de seus óleos essenciais o composto denominado Pulegona, encontrado em concentrações acima de 90%. Também possui a característica de alto rendimento de óleo essencial, em torno de 4% do peso seco.

*H. ringens* é nativa do estado do Rio Grande do Sul e endêmica da Serra do Sudeste e Sul das Missões com ocorrência em morros pedregosos, sendo descrita em São Francisco de Assis, Alegrete, Caçapava do Sul, São Sepé, Bom Jesus e Cambará, estes dois últimos municípios na serra do nordeste. Devido a seu local de crescimento, forma de renovação das pastagens como queimadas e limpeza de espécies invasoras para criação de gado, coleta para fins medicinais e baixa eficiência na germinação de sementes, tem incluído esta espécie na Lista oficial das espécies ameaçadas de extinção.

Devido a estes fatores, estudos referentes à variabilidade genética, química e formas de propagação como micropropagação podem contribuir para a preservação. Com este objetivo foram utilizados marcadores moleculares RAPD e ISSR para avaliar a diversidade genética entre as populações, foi avaliada a variabilidade química através do óleo essencial e efeito de reguladores de crescimento na propagação *in vitro* de *H. ringens*.

Inicialmete as coletas revelaram que as amostras de Bom Jesus e Cambará correspondem à outra espécie, *H. nítida*, e que na verdade *H. ringens*, não é encontrada na Serra do Nordeste. Portando para os demais estudos somente quatro espécies foram encontradas, revelando a situação crítica em que se encontra e estas populações representam toda área conhecida de distribuição.

Com os estudos de Marcadores moleculares, observamos a fragmentação de habitat, pois com marcadores RAPD e ISSR tratados em conjunto foi encontrada uma menor variabilidade intrapopulacional do que interpopulacional, sugerindo um baixo fluxo gênico entre as populações. Em populações próximas como Caçapava do Sul A e B pode ser observada que são muito semelhantes, mas quando analisamos as populações A e B de Caçapava do Sul contra Alegrete e São Francisco de Assis observamos o isolamento destas, mesmo em populações mais próximas como Alegrete e São Francisco de Assis distantes entre si por 42 quilômetros, caracterizando como populações geneticamente distintas.

A análise da variabilidade química foi realizada somente com duas populações, Caçapava do Sul e São Francisco de Assis, pois o baixo número de indivíduos e tamanho das amostras não permitiram coletas em Alegrete. Os resultados confirmam os dados obtidos com marcadores moleculares, pois as populações formaram grupos distintos quando comparados com óleos essenciais, as amostras de Caçapava do Sul separou-se das de São Francisco de Assis principalmente devido ao composto Sabineno, e também observamos a baixa frequência de alguns compostos nas populações como t-b-farneseno em Caçapava do Sul, limoneno e linalol em São Francisco de Assis.

Esta variação de diversidade tanto química como genética pode ser de fundamental importância para esta espécie, pois está relacionada com a produção de metabólitos secundários, os quais são responsáveis pela adaptação e sobrevivência em seu habitat natural. A baixa variabilidade genética observada pode ser um fator importante para o risco de extinção desta espécie pois leva a um aumento na fixação de alelos deletérios, aumento do aborto de sementes, redução na taxa de fecundação e germinação de sementes em consequência da homozigose causada pela endogamia pelo baixo número de indivíduos nas populações.

Para este caso específico uma solução importante seria a criação de microreservas, pois apresentam vantagens em termos legais e de manejo, complementando eventualmente áreas maiores de proteção, também a necessidade de pequenas áreas de conservação, é necessário o constante monitoramento da variabilidade genética para evitar a perda de alelos importantes para sua sobrevivência.

A micropropagação desta espécie mostra-se muito útil quando avaliada sob dois aspectos, o primeiro em estudos de propagação e fisiológicos visando a conservação da espécie, e o segundo sob a forma de aproveitamento de recursos naturais onde esta planta pode ser melhor aproveitada sabendo-se que apresenta em algumas amostras mais de 90% de seu óleo essencial o composto pulegona, portanto um componente quase puro.

No cultivo *in vitro* verificamos que para a produção de explantes o meio de cultivo MS apresentou o melhor rendimento e a citocinina benziladenina apresentou-se mais eficiente na concentração de 13,2 $\mu$ M acrescido de 2mg/l de nitrato de prata, este foi adicionado ao cultivo pois os explantes apresentaram acúmulo de etileno o qual inviabilizava seu desenvolvimento. No enraizamento foi verificada uma limitação para o desenvolvimento, com baixa taxa de plantas enraizadas e estas apresentando dificuldades de aclimação, isto devido à ineficiência do sistema radicular necessitando de mais estudos para melhores índices de sobrevivência.

Como citado anteriormente o acompanhamento do fluxo gênico dentro e entre populações, mais estudos sobre diferentes formas de propagação, principalmente sobre a viabilidade das sementes as quais carregam toda variabilidade das populações, assim como áreas de conservação e constante monitoramento do número de indivíduos são importantes para a manutenção e sobrevivência de *H. ringens*.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no trabalho permitem concluir que:

Com a avaliação através de marcadores moleculares RAPD e ISSR, foi detectada menor variabilidade intrapopulacional do que interpopulacional sugerindo limitado fluxo gênico entre as populações, caracterizando-as como entidades geneticamente distintas, com relação à sua distribuição geográfica.

Com uma análise multivariada foram observadas diferenças significativas qualitativas e quantitativas na composição do óleo essencial nas populações avaliadas de *H. ringens* e uma relação na variação química com a distribuição geográfica.

Uma análise geral dos dados obtidos indica que a micropropagação pode ser utilizada como ferramenta adequada na multiplicação de *H. Ringens*, mas apresenta algumas limitações como baixa taxa na multiplicação dos explantes, com dificuldades no enraizamento e aclimatação das plântulas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aitken, K., Botero, J., Zwart, R. e Teasdale, R. (1998). Detection of genetic diversity using RAPD markers in the genus *Melaleuca*. **Acta hortic.** 461: 209-217
- Ali, B.A., Huang, T., Qin, D. e Xie, Q. (2005). **The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) technology in poultry and hares research.** In: Thangaduray, D., Pullaiah, T. and Pinheiro de Carvalho, M.A.A. Genetic resources and Biotechnology. Ed Regency Publications, New Delhi, 316p.
- Atti-Serafini, L., de Barros, N.M. e de Azevedo, J.L. (2001) **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria.** Livraria e Editora Agropecuária, Guaíba, RS. 463p.
- Beckmann, J.S. & Soller, M. (1988). Restriction Fragment Length Polymorphisms *in* genetic improvement: Methodologies, mapping and costs. **Theor. Appl. Genet.** 67: 35-43.
- Bornet, B e Branchard, M. (2001). Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Marchers: Reproducible and Specifics Tools for Genome Fringerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter.** 19:209-215.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. e Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using Restriction Fragment Length Polymorphisms. **American Journal Human Genetics** 32: 314–331.
- Brasileiro, A.C.M. e Dusi, D.M.deA. (1999). **Transformação genética de plantas.** in: Torres, A.C., Caldas, L.S. e Buso, J.A. (1986). Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. EMBRAPA-SPI, Brasília, V2, p. 679-735.
- Burr, B., Evola, S.V., Burr, F.A .e Beckmann, J.S. (1983). **The application of Restriction Fragment Length Polymorphism to plant breeding.** *In:* J.K. & Hollaender, A. (eds.). Genetic engineering: principles and methods. Plenum Press, 5: 45-59.

- Byrne, M. (1999). High genetic identities between three oil mallee taxa, *Eucalyptus kochii* ssp. *kochii*, ssp. *Plenissima* and *E. horistes*, based on nuclear RFLP analysis. **Hered.** 82(2): 205-211.
- Calixto, J.B. e Yunes, R.A. (2001). **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna.** Ed. Argos. 523p.
- Cantino, P.D., e Sanders, R.W. (1986). Subfamilial classification of Labiatae. **Syst. Bot.** 1:163-185.
- Cole, M.D. (1992). **The significance of the terpenoids in the Labiatae.** In: harley, R.M. e Reynolds, T. (ed.). Advances in Labiatae Science. Royal Botanic Gardens Kew. 315-324.
- Dias, B.F.S. (1996). **A implementação da conservação sobre a diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades.** Campinas: André Tosello, 10p.
- Echeverrigaray, S. e Agostini, G. (2000). Avaliação de variabilidade genética em lavandas através de marcadores de RAPD. **Horticul. Brasil.** 18: 185-186.
- Echeverrigaray, S., Agostini, G., Atti-Serfini, L., Paroul, N., Pauletti, G.F. & Atti dos Santos, A.C. (2001). Correlation Between The Chemical And Genetic Relationships Among Commercial Thyme Cultivars. **J. Agric. Food Chem.** (*in press*).
- Echeverrigaray, S., Andrade, L.B., Delamare, A.P.L., Zeni, A.L.B. e Carrer, R. (2001). **Cultura de tecidos e micropropagação de plantas aromáticas e medicinais.** In: Atti-Serafini, L., de Barros, N.M. e de Azevedo, J.L. Biotecnologia na agricultura e na agroindústria. Livraria e Editora Agropecuária, Guaíba, RS. 463p.
- Ehrlich, P.R. (1988). **The loss of diversity, causes and consequences.** In: E.). Wilson (ed), Biodiversity, National Academy Press, Washington, Part II, 2: 21-27.
- Ferreira, M.E. e Grattapaglia, D. (1996). **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** EMBRAPA-CENARGEN, 2a ed. p.11-53.

- Foolad, M. R., Jones, R. A. e Rodriguez, R. L. (1993). RAPD markers for constructing intraspecific tomato genetic maps. **Plant Cell Reports** 12: 293-297.
- George, E.F. (1993). **Plant propagation by tissue culture**. Part 1. the technology. 2<sup>nd</sup> Edition. Inglaterra. Ed. Exegetics limited. 574p.
- Gottlieb. O.R., Kaplan, M.A. e Borin, M.R. (1996). **Biodiversidade:um enfoque químico biológico**. Editora da UFRJ, Rio de Janeiro.
- Grattapaglia, D. e Sederoff, R. R. (1994). Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. Using a pseudo-testcross strategy and RAPD markers. **Genet.** 137: 1121-1137.
- Hodkinson, T.R., Chase, M.W. e Renvoize, S.A. (2002). Characterization of a Genetic Resource Collection for *Miscanthus* (*Saccharinae*, *Andropogoneae*, *Poaceae*) using AFLP and ISSR PCR. **Ann of Bot.** 89:627-636.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V. e Thein, S.L. (1985). Hypervariable “minisatelite” regions in human DNA. **Nat.** 314: 67 – 73.
- Keskitalo, M., Pehu, E. e Simon, J.E. (2001). Variation in volatile compounds from tansy (*Tanacetum vulgare* L.) related to genetic and morphological differences of genotypes. **Bioch. Sistem. Ecol.** 29: 267-285.
- Karron, J.D. (1997). **Genetic consequences of different patterns of distribution and abundance**. In: Kunin, W.E., Gaston, K.J. (Eds.), *The Biology of Rarity*. Chapman and Hall, London, pp.175-189.
- Lawrence, B.M. (1992). **Chemical components of Labiatae oil and their exploitation**. In: *Advances in Labiatae Sciences*, Harley. R.M., Reynolds, T. Eds.; The Royal Botanical Gardens: Kew.

- Litt, M. e Luty, J.A. (1989). A Hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am J. Hum. Genet.** 44: 398-401.
- Mann, J. (1987). **Secondary metabolism**, 2a ed. Oxford: Clarendon, 374p.
- Martín, J.P. e Sánchez-Yélam, M.D. (2000). Genetic relationships among species of the genus *Diplotaxis* (*Brassicaceae*) using inter-simple sequence repeat markers. **Theor. Appl. Genet.** 101:1234-1241.
- Martins, M., Tenreiro, R. e Oliveira, M.M. (2003). Genetic relatedness of Portuguese almond cultivars assessed by RAPD and ISSR markers. **Plant Cell Rep.** 22: 71-78.
- Milach, S.C.K. (1998). **Principais tipos de marcadores moleculares e suas características.** *In:* S.C.K. Milach (ed.). Marcadores Moleculares em Plantas. Porto Alegre, UFRGS, p. 17-28.
- Moyna, P. e Menéndez, P. (2001). **Biotransformação de produtos naturais.** In: Atti-Serafini, L., de Barros, N.M. e de Azevedo, J.L. Biotecnologia na agricultura e na agroindústria. Livraria e Editora Agropecuária, Guaíba, RS. 463p.
- Paran, I., Kesseli, R. e Michelmore, R. (1991). Identification of Restriction Fragment Length Polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using near-isogenic lines. **Genom.** 34:1021-1027.
- Pereira, C. e Pereira, E. (1973). Flora of the Paraná state. Labiatae family. **Arqu. Jard. Bot.** Rio de Janeiro. 19: 77-99.
- Sangwan, R.S., Sangwan, N.S., Jain, D.C., Kumar, S. e Ranade, S.A. (1999). RAPD profile based genetic characterization of chemotype variants of *Artemisia annua* L. **Biochem. and Molec. Biol. Internat.** 47(6): 935-945.

- Scarano, M.T., Abbate, L., Ferrante, S. e Lucretti, S. (2002). ISSR-PCR technique: a useful method for characterizing new allotetraploid somatic hybrids of mandarin. **Plant Cell Rep.** 20: 1162-1166.
- Simões, C.M.O., Schenkell, E.P., Gosmann, G., Palazzo de Mello, J.C., Mentz, L.A. e Petrovick, P.R. (2002). **Farmacognosia, da planta ao medicamento.** Editora da UFSC, 833p.
- Skoula, M., El Hilali, I. e Makris, A.M. (1999). Evaluation of the genetic diversity of *Salvia fruticosa* Mill. Clones using RAPD markers and comparison with the essential oil profiles. **Biochem. Sistem. and Ecol.** 27: 559-568.
- Soejarto, D.D. (1996). Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. **J. Ethnopharmacol.**, 51:1-15.
- Soulé, M.E. e Simberloff, D. (1986). What do genetics and ecology tell us about the design of nature reserves? **Biolog. Conserv.** 35: 19-40.
- Stuber, C.W. (1992). Biochemical and molecular markers in plant breeding. *In*: Dudley, J. W., Hallauer, A. R. e Ryder, M. (eds.) Plant breeding reviews. Vol. 9. John Wiley & Sons, Inc.
- Sustar-Vozlic, J. e Javornik, B. (1999). Genetic relationships in cultivars of hop, *Humulus lupulus* L., determined by RAPD analysis. **Plant Breed.** 118(2): 175-181.
- Swofford, D.L., Olsen, G.J., Waddell, P.J. e Hillis, D.M. (1996). **Phylogenetic Inference** *in*: Hillis, D.M., Moritz, C. e Mable, B.K. (eds) Molecular Systematics. 2<sup>th</sup> Edition. 655p.
- Tachini, P. e Walbot, V. (1986). **Transformation of plants.** Nestlé Research News. 19-29.
- Tan, Y.Y., Xu, H.H., Tao, W.J., Hoffmann, M.H., Wang, X.F. e Lu, Y.T. (2005). Transgenic GFP as a molecular marker for approaches to quantify pollination mechanism and gene flow in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Biol.** 7:405-410.

- Tanksley, S.D. (1983). Molecular markers in plant breeding. **Plant Molec. Biol. Rep.** 1(1): 3-8.
- Vieira, R.F., Grayer, R.J., Paton, A. e Simon, J.E. (2001). Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. **Biochem. System. and Ecol.** 29: 287-304.
- von Poser, G.L., Menut, C., Toffoli, M.E., V erin, P., Sobral, M., Bessi ere, J.M., Lamaty, G. e Henriques, A. (1996). Essential oil composition and allelopathic effect of the Brazilian lamiaceae *Hesperozygis ringens* (Benth.) Eplig and *Hesperozygis rhododon* Eplig. **J. Agric. Food Chem.** 44: 1829-1832.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van De Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. e Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucl. Acid. Res.** 23: 4407-4414.
- Wall, M.E. e Wani, M.C. (1996). Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **J.Ethnopharmacol.** 51:239-254.
- Williams, J.G. Kubelik, A.R. Livak, K.J. Rafalski, L.A. . Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucl. Acid Res.** 18: 6531-6535.
- Withers, L.A. e Williams, J.T. (1998). **Conserva o in vitro de recursos gen ticos de plantas.** In: Torres, A.C., Caldas, L.S. e Buso, J.A. Cultura de tecidos e transforma o gen tica de plantas. Vol. 1. Bras lia, Ed. Embrapa 509 p.
- Zhang, Z.Y., Chen, Y.Y. e Li, De Zhu. (2005). Detection of Low Genetic Variation in a Critically Endangered Chinese Pine, *Pinus squamata*, Using RAPD and ISSR Markers. **Biochem. Genetic.** 43:239-249.

Zietkiewicz, E., A. Rafalski, e D. Labuda, (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. **Genom.** 20: 176-183.

## 8. ANEXOS

### 8.1. Extração de DNA total (método Doyle & Doyle, 1987).

Para a extração de DNA foram coletados 150 mg de material vegetal (caules e folhas), sendo macerados em nitrogênio líquido. O macerado obtido foi disposto em tubos Eppendorf de 1,5 mL, sendo então adicionados 750 µL de tampão de extração CTAB (2% CTAB, 1,4 M de NaCl; 20mM de EDTA; 100 mM de Tris HCl pH 8,0), e 2µl de 2-mercaptoetanol. A suspensão permaneceu em banho-maria a 65° C durante 15 minutos. Após esse período, foi realizada uma desproteinização com 1 volume de clorofil (clorofórmio : álcool isoamílico, 24:1). Centrifugou-se a emulsão obtida a 13000 rpm durante 10 minutos, recuperando-se o sobrenadante em um novo tubo. A precipitação do DNA foi realizada com 1 volume de isopropanol. O precipitado foi então lavado por 1 hora a -20°C com 200 µL de etanol 80%, previamente resfriado a -20°C, acrescido de 20µL de acetato de amônio (7,5 M). Foi realizada uma nova centrifugação a 13000 rpm por 1 min., seguida de remoção do etanol de lavagem e secagem do *pellet*. Os ácidos nucleicos extraídos foram ressuspensos em 200 µL de TE ( 10mM de Tris-HCl pH 8,0 e 1mM de EDTA). Posteriormente, foi realizado um tratamento com RNase (2µL de uma solução a 10mg/ml), a 37°C por 1 hora. A seguir, procedeu-se a uma nova desproteinização com 1 volume de clorofil, seguida por centrifugação (13000 rpm, 10 min.), recuperando-se o sobrenadante e precipitando o DNA com 1 volume de isopropanol. O DNA foi recuperado por centrifugação e o pellet obtido ressuspensado em 200µL de TE. O DNA foi estocado a -20°C.

## **8.2. Extração e identificação dos componentes químicos presentes nos óleos essenciais de *Hesperozygis ringens*.**

O óleo essencial foi obtido das plantas por hidrodestilação em aparelho Clevenger, descrito por Mechkovski & Akerele (1992). O material a ser extraído foi colocado em balão de fundo redondo de 3.000 ml, juntamente com água até cobrir o material a ser extraído. O princípio do método consiste em evaporar uma mistura de material vegetal e água. O vapor formado é condensado em condensador, e o óleo, que é imiscível com a água, é facilmente separado. O rendimento do óleo essencial em termos de volume/peso é lido diretamente no próprio aparelho. Em seguida o produto foi secado com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro.

A identificação dos componentes químicos das amostras de óleo essencial foi realizada por cromatografia gasosa (GC) e cromatografia gasosa acoplada a detector seletivo de massas (GC/MS).

Os constituintes dos óleos foram identificados por combinação do espectro de massas e índice de retenção de Kovats (Kovats, 1965; Pacakova & Feltl, 1992), utilizando solução padrão de hidrocarboneto C<sub>9</sub> a C<sub>26</sub>, realizado em colunas de diferentes polaridades, e também por comparação com dados da bibliografia. Os dados obtidos nas tabela relacionan-se à área de integração dos picos.

As análises por cromatografia gasosa foram realizadas em um Hewlett Packard 6890, equipado com processador de dados HP-Chemstation. As análises em coluna polar foram realizadas em coluna capilar HP-Innowax de Sílica fundida (30 m X 320 µm i.d.), 0,5 µm de espessura de filme (Hewlett Packard, Califórnia, USA), com a seguinte programação de temperatura: 40°C (8 min) para 180°C a 3C/min, 180-230°C a 20°C/min, 230°C (20 min); temperatura do injetor 250°C, razão de slipt (1:50), temperatura do detector 250°C, gás de arraste H<sub>2</sub> (34 Kpa), volume injetado: 0,6 µL de amostra diluída em hexano (1:10).

As análises em coluna apolar, foram realizadas em coluna capilar de sílica fundida HP-5 (30m X 320 µm i.d.), 0,25 µm de espessura de filme (Hewlett Packard, Califórnia, USA), detector FID, com a seguinte programação de temperatura: 60°C (8 min), 60-180°C (3°C/min), 180-230°C (20C/min), 230°C (20min), temperatura do injetor 250C, detector a 275°C, modo de injeção split, razão de split 1:50, gás de arraste H<sub>2</sub> (32 KPa), volume injetado 0,6µL de amostra diluída em hexano (1:10).

Os resultados de espectro de massa dos compostos foram obtidos a partir de análises em cromatógrafo gasoso acoplado ao detector seletivo de massas Hewlett Packard 6890/MSD5973, equipado com software HP-Chemstation e biblioteca de espectros Wiley 275 (MacLafferty *et al.*, 1997).

As análises em coluna polar foram realizadas em coluna capilar HP-innowax (30m X 250 µm), 0,25µm de espessura de filme (Hewlett Packard, Califórnia, USA). O programa de temperatura foi o mesmo usado na análise de GC, interface 280°C, razão de split 1:100, gás de arraste H<sub>2</sub> (56Kpa), energia de ionização 70 eV, intervalo de aquisição de massas 40-350, volume injetado 0,4 µL de amostra diluída em hexano (1:10) “solvent cut” 3,5 min.

As análises em coluna apolar utilizaram coluna capilar HP-5 (30m X 250 µm), 0,25 µm de espessura de filme ((Hewlett Packard, Califórnia, USA). O programa de temperatura foi o mesmo usado nas análises em GC com este tipo de coluna, interface 180°C, razão de split 1:100, gás de arraste He (55,4 KPa) energia de ionização 70 eV, intervalo de aquisição de massas 40-350, volume injetado 0,4 µL de amostra diluída em hexano (1:10). “solvent cut” 3,5 min.

### 8.3. Composição dos meios de cultivo utilizados na micropropagação.

COMPOSTOS	MEIOS DE CULTIVO				
	MS (mg/L)	B5 (mg/L)	QL (mg/L)	NN (mg/L)	N6 (mg/L)
<b>Macronutrientes</b>					
KNO <sub>3</sub>	1.900	2.500	1.800	950	2830
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	---	134	---	---	460
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.650	---	400	720	---
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	150	---	220	166
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	250	360	185	185
KH <sub>2</sub> .PO <sub>4</sub>	170	---	270	68	400
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	---	150	---	---	---
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	---	---	1.200	---	---
<b>Micronutrientes</b>					
KI	0,83	0,75	0,8	---	0,8
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,30	3	6	10	1,6
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,3	10	17	25	4,4
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,60	2	9	10	1,5
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,25	0,25	---
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025	0,025	---
CoSO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	---	---	---
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	---	---	2,5	---	---
<b>FeEDTA</b>					
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3	37,3	37,3	37,3	37,3
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8	27,8	2,78	27,8
<b>Suplementos orgânicos</b>					
Glicina	2	---	2	2	20
Ácido nicotínico	0,5	1	0,5	1	5
Piridoxina	0,5	1	0,5	1	5
Tiamina	1	10	0,1	10	10
Biotina	---	---	---	0,05	---
Ácido fólico	---	---	---	0,5	---
Mio-inositol	100	100	100	100	100
Sacarose	30.000	20.000	30.000	20.000	20.000
Ágar	0,7%	0,7%	0,7%	0,7%	0,78%

O pH dos meios MS, B5, NN e N6 foram previamente ajustados para 5,8 e do meio QL para 5,0 com solução de NaOH (0,5M), autoclavados a 120°C, sob 1 atm de pressão durante um período de 20 min.

8.4. Fotografias mostrando detalhes de *Hesperozygis ringens*.

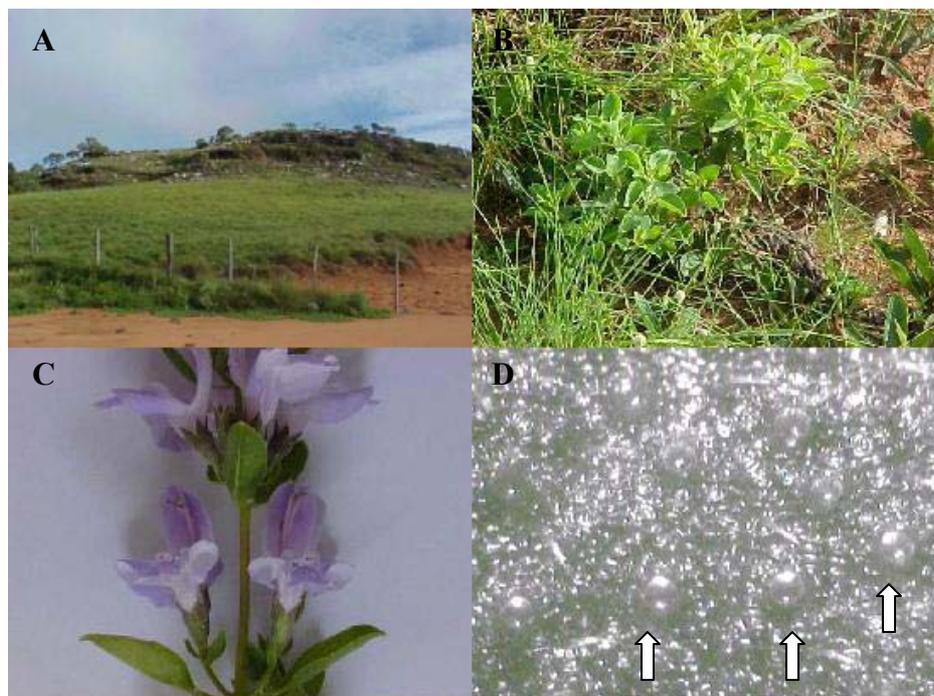


Figura 1- A- Local de coleta (São Francisco de Assis), B- Planta de *H. ringens*, C- Detalhe da flor de *H. ringens* e D- detalhe da folha mostrando bolsas oleíferas de *H. ringens*.