

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL

Instituto de Biotecnologia

**AVALIAÇÃO DE VARIABILIDADE GENÉTICA E
QUÍMICA EM *Cunila spicata* Benth.**

MARCOS ROBERTO ALBUQUERQUE

Caxias do Sul

2004

MARCOS ROBERTO ALBUQUERQUE

**AVALIAÇÃO DE VARIABILIDADE GENÉTICA E QUÍMICA
EM *Cunila spicata* Benth.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray

Coorientadora: Profa. Dra. Luciana Atti-Serafini

Caxias do Sul

2004

A345a Albuquerque, Marcos Roberto

Avaliação de variabilidade genética e química em *cunila spicata* Benth
/ Marcos Roberto Albuquerque. – 2004.

57 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia, 2004.

Orientação: Sergio Echeverrigaray

Coorientação: Luciana Atti Serafini.

1. *Cunila spicata* Benth. 2. Variabilidade genética. 3. Variabilidade
química. 4. ISSR. 5. Preservação. I. Echeverrigaray Sergio, orient. II.
Serafini, Luciana Atti, coorient. III. Título.

MARCOS ROBERTO ALBUQUERQUE

AVALIAÇÃO DE VARIABILIDADE GENÉTICA E QUÍMICA EM *Cunila Spicata* Benth

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray

Co-orientadora: Profa. Dra. Luciana Atti Serafini

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 21 DE DEZEMBRO DE 2004.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray

Co-orientadora: Profa. Dra. Luciana Atti Serafini

Profa. Dra. Tatiana Teixeira de Souza Chies

Prof. Dr. Altemir José Mossi

Dedico esta dissertação à minha esposa Dalva e
minhas filhas Júlia e Roberta

AGRADECIMENTOS

Manifesto sinceros agradecimentos a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho. Em particular:

- Ao meu orientador Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray, os mais sinceros agradecimentos, pela oportunidade de aprendizado e convívio, pela amizade, compreensão e estímulo dispensados durante a realização deste trabalho.
- Ao bolsista Jucimar Zacaria, pela amizade, companheirismo e inestimável colaboração durante a realização deste trabalho.
- Aos colegas do laboratório de Biotecnologia Vegetal do IB/UCS pelo companheirismo e apoio na execução deste trabalho.
- A Universidade de Caxias do Sul pelo apoio financeiro ao projeto e a bolsa, sem os quais teria sido impossível a realização deste trabalho.
- Aos professores do Instituto de Biotecnologia
- Aos colegas do curso de Mestrado em Biotecnologia.
- Aos funcionários do Instituto de Biotecnologia.

RESUMO

Cunila spicata Benth. é uma planta aromática e medicinal utilizada popularmente no sul do Brasil como béquica, peitoral e sudorífera, e que apresenta comprovada atividade antiviral e anticonvulsiva. *C. spicata* é uma das 12 espécies sul-americanas do gênero *Cunila* (Lamiaceae) sendo encontrada em banhados e borda de mata de galeria no sul do Brasil, Argentina e Uruguai. Dentro deste contexto, no presente trabalho foi avaliada a variabilidade genética e química de populações de *C. spicata* coletadas nas regiões nordeste e sudeste do Rio Grande do Sul, com vistas a formação de bancos de germoplasma, determinação de estratégias de preservação e uso sustentável. Os marcadores ISSR e RAPD mostraram-se eficientes na determinação de variabilidade genética desta espécie, permitindo a identificação de todas as populações e indivíduos avaliados. As populações de *C. spicata* caracterizam-se como grupos geneticamente estruturados. Entretanto, não foi constatada formação de agrupamentos dentro da espécie, nem relação entre as distâncias genéticas e geográficas, ou entre as populações originárias das duas regiões geográficas amostradas. Por outro lado, a análise da composição dos óleos essenciais das 10 populações permitiu separar as mesmas em dois quimiotipos caracterizados por elevada concentração de α -terpineol/limoneno, e linalol, respectivamente. As populações da região sudeste enquadraram-se dentro do quimiotipo linalol, enquanto as da região nordeste no quimiotipo α -terpineol/limoneno. A relação geográfica e química é indicativa da existência de pressão de seleção quanto ao tipo de óleo essencial da região de ocorrência.

ABSTRACT

Cunila spicata Benth. is a medicinal and aromatic plant popularly used in South Brazil as bequic, expectorant and sudoriferous, and that has confirmed antiviral and anti-convulsive activities. *C. spicata* is one of the 12 South-American species of the genus *Cunila* (Lamiaceae) been currently found in swamps and borders of gallery forests in South Brazil, North Argentina and Uruguay. In this context, the present work aimed to evaluate the genetic and chemical variability of *C. spicata* populations collected at the northeast and southeast regions of Rio Grande do Sul, to subsidize the construction of a germplasm bank, to determine conservation strategies, and to develop a sustainable use of this species. ISSR and RAPD markers proved to be efficient for the determination of the genetic variability of this species, allowing the identification of all the populations and individuals. *C. spicata* populations were characterized as genetically structured groups. However, clusters within the species were not evident, and no relations were detected between geographic and genetic distances, or between populations of the two regions. Conversely, the analysis of essential oil composition allowed the populations in two chemotypes, characterized by high concentration of α -terpineol/limonene, and linalool, respectively. The populations of the southeast region belong to the linalool chemotype, and those from the northeast region to the α -terpineol/limonene chemotype. This geographical and chemical relation is indicative of different selection pressures in the two regions.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers de ISSR selecionados, suas sequências, números de bandas polimórficas e número total de bandas analisadas.....	31
Tabela 2 - Análise de ANOVA dos dados conjuntos ISSR-RAPD em <i>C. spicata</i>	40
Tabela 3 - Composição química percentual dos óleos essenciais de 10 populações de <i>C. spicata</i>	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de relevo do Rio Grande do Sul com a localização das populações amostradas.....	26
Figura 2. Perfil de ISSR obtido com primer (GA) ₈ T, em 10 populações de <i>C. Spicata</i>	32
Figura 3. Perfil de ISSR obtido com primer (CT) ₈ G, em 10 populações de <i>C. Spicata</i>	33
Figura 4. Dendograma (UPGMA) baseado na análise de marcadores ISSR em 10 populações de <i>C. spicata</i> , e representantes das espécies <i>C. galioides</i> , <i>C. menthoides</i> e <i>C. origanoides</i>	33
Figura 5. Análise de componentes principais em <i>C. spicata</i> baseada em marcadores ISSR.....	34
Figura 6. Perfil de RAPD obtido com primer (A) OPD-02 e (B) OPX-07, em 10 populações de <i>C. Spicata</i>	36
Figura 7. Dendograma (UPGMA) baseado na análise RAPD em 10 populações de <i>C. spicata</i> , e representantes das espécies <i>C. galioides</i> , <i>C. menthoides</i> e <i>C. origanoides</i>	37
Figura 8. Análise de componentes principais em <i>C. spicata</i> baseada em marcadores RAPD.....	38
Figura 9. Relação entre as distâncias obtidas com marcadores ISSR e RAPD. A linha central representa a regressão linear e as linhas laterais à margem de confiança de 95%.....	39
Figura 10. Dendograma (UPGMA) baseado na análise conjunta de marcadores ISSR e RAPD em 10 populações de <i>C. spicata</i> , e representantes das espécies <i>C. galioides</i> , <i>C. menthoides</i> e <i>C. origanoides</i>	41
Figura 11. Análise de componentes principais em <i>C. spicata</i> baseada nos dados conjuntos dos marcadores ISSR e RAPD.....	42

Figura 12. Perfis cromatográficos dos óleos essenciais obtidos por análise GC-MS nas amostras de Pântano Grande (A) e Vacaria (B), representando os dois quimiotipos.....	44
Figura 13. Dendograma baseado na composição química do óleo essencial das distintas populações d <i>C. spicata</i>	46
Figura 14. Distribuição das 10 populações de <i>Cunila spicata</i> com base nos três primeiros componentes principais.....	47
Figura 15. Dedograma baseado nas distância de Jaccard obtidas com base nos marcadores moleculares ISSR-RAPD.....	49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 O GÊNERO <i>CUNILA</i>	13
2.2 CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS E ETNOBOTÂNICAS DE <i>C. SPICATA</i>	14
2.3 ÓLEOS VOLÁTEIS DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>CUNILA</i>	15
2.4 MARCADORES MOLECULARES NA AVALIAÇÃO DE VARIABILIDADE GENÉTICA EM PLATAS.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	25
3.2 ANÁLISE DOS ÓLEOS VOLÁTEIS.....	26
3.3 ISOLAMENTO DE DNA.....	27
3.4 AMPLIFICAÇÃO E ANÁLISE DE RAPD (RANDOMLY AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA).....	27
3.5 AMPLIFICAÇÃO E ANÁLISE DE ISSR (INTER SIMPLE SEQUENCE REPEATS).....	28
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1 ANÁLISE DE VARIABILIDADE GENÉTICA EM <i>C. SPICATA</i> UTILIZANDO MARCADORES ISSR E RAPD.....	31
4.2 VARIABILIDADE NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS DE DISTINTAS POPULAÇÕES DE <i>C. SPICATA</i> E A SUA RELAÇÃO COM A VARIABILIDADE GENÉTICA.....	43
5 CONCLUSÕES.....	52
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é reconhecido internacionalmente como um centro de biodiversidade, especialmente no que diz respeito a plantas aromáticas e medicinais. A floresta amazônica e a mata atlântica são as duas regiões com maior número de espécies vegetais do país, e algumas das maiores reservas biológicas do mundo. A mata atlântica, em particular, tem sido muito afetada pelo homem, restando unicamente alguns focos da mata original, fato que por si só justifica o estudo da biodiversidade restante nesta região fitogeográfica.

A utilização de plantas medicinais como alternativa aos tratamentos convencionais, e como fontes de produtos de interesse para a indústria farmacêutica vem recebendo notoriedade crescente. O Brasil, devido a sua ampla biodiversidade, apresenta um grande potencial tanto na identificação de novas espécies vegetais de aplicação terapêutica, como na produção de fitofármacos.

A região serrana do Rio Grande do Sul apresenta particularidades climáticas que a tornam peculiar quando comparada com outras regiões de mata atlântica. Esta região se caracteriza por um clima temperado, com períodos de temperaturas baixas, solos argilosos, alta pluviosidade e umidade relativa do ar. Assim sendo, algumas espécies vegetais são características desta região.

Dentre as diversas plantas nativas da medicina popular da região sul do Brasil, sobressaem aquelas denominadas popularmente de poejo, que incluem diversas espécies do gênero *Cunila*, amplamente utilizadas no tratamento de diversas afecções, assim como aromatizantes em alimentos e perfumes.

A manutenção da biodiversidade como uma questão de soberania nacional e de ampliação dos recursos para fins farmacológicos ou industriais como um todo, tem sido reiteradamente apontada por diversos autores. Neste sentido, o levantamento de variabilidade química e genética em espécies nativas, como é o caso da *Cunila spicata*, apresenta relevância tanto no aspecto acadêmico como no

estudo de biodiversidade, distribuição, aspectos evolutivos e genéticos, mas também do ponto de vista aplicado já que esta planta tem sido considerada como de grande potencial.

O estudo da diversidade genética das populações selvagens ou domésticas, vem contribuindo para a elucidação e compreensão das possíveis formas de distribuição das espécies. Neste sentido, marcadores moleculares têm auxiliado no esclarecimento da diversidade genética tanto de plantas domesticadas para o cultivo agro-econômico, quanto para plantas nativas com potencial aromático e farmacológico.

Assim sendo os objetivos do presente trabalho foi analisar dez (10) populações de *Cunila spicata* representativas de duas áreas distintas do estado do Rio Grande do Sul, campos de cima da serra e depressão central, foram analisadas quanto a composição química de seus óleos essenciais e de sua variabilidade genética, estimada através de marcadores moleculares ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) e RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), tendo como objetivo a formação de um banco genético representativo da espécie, determinação da variabilidade genética intra e interpopulacional de *Cunila spicata* e avaliação de seu possível potencial farmacológico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O GÊNERO *CUNILA*

A família Lamiaceae é composta por cerca de 220 gêneros e aproximadamente 4000 espécies. Apresenta cinco áreas de maior diversidade morfológica divididas como, sul e leste do Mediterrâneo- Ásia Central; África (sul do Sahel e Madagascar); China; Austrália; América do Sul e América do Norte, incluindo o México. (HEDGRE, 1992).

Dentre os gêneros com maior representatividade na América, destacam-se *Hyptis*, *Ocimum*, *Salvia*, *Cunila*, entre outros.

O gênero *Cunila*, particularmente, é composto por 22 espécies as quais apresentam dois centros de distribuição, um situado no México, com 10 espécies, e outro ao sul da América do Sul, com 12 espécies (SIMÕES et al., 1994). As espécies representantes deste último centro são, *Cunila galioides*, *C. menthoides*, *C. menthiformis*, *C. platyphylla*, *C. spicata*, *C. fasciculata*, *C. microcephala*, *C. incana*, *C. incisa*, *C. angustifolia*, *C. tenuifolia* e *Cunila sp.*, são relatadas sugerindo estudos complementares para estas espécies (BORDINGNON et al., 1997).

Muitas espécies deste gênero recebem o nome popular de “poejo” (“poleo” no Uruguai, Argentina e México), com algumas variações dos nomes populares relacionados, geralmente, ao ambiente onde estão estabelecidas (poejo-do-banhado, poejo-do-brejo, poejo-do-campo) e/ou ao tamanho das folhas ou porte da planta (poejo-de-folha-grande, poejo-de-folha-pequena, poejinho) (BORDINGNON et al., 1997).

Epling (1936), com base no hábito e tipo de florescência, classificou as espécies sul americanas em três seções: *Incanae*, *Incisae* e *Spicatae*. A seção *Incanae* é representada por apenas uma espécie, *Cunila incana*, a qual caracteriza-se por apresentar flores de coloração amarelo-caramelo, solitárias ou em pares dispostas nas axilas das folhas, estas densamente pilosas com pêlos ramificados. A seção *Incasae* é constituída por duas espécies, *Cunila incisa* e *Cunila angustifolia*,

sendo caracterizadas como plantas arbustivas com címulas dispostas nas axilas das folhas com pedúnculos breves de 2-10 mm de comprimento. Entretanto, a seção *Spicatae* é a que apresenta o maior número de representantes, sendo elas, *Cunila menthoides*, *Cunila platyphylla*, *Cunila menthiformis*, *Cunila galioides*, *Cunila spicata*, *Cunila fasciculata* e *Cunila microcephala*. Esta última seção é caracterizada por apresentar plantas sub arbustivas ou herbáceas ambas perenes, com címulas sésseis ou curtamente pedunculadas formando capítulos globosos, ovais ou em forma de espiga na parte terminal dos ramos (BORDIGNON et al., 1997). Algumas espécies ainda encontram-se em processo de identificação motivo pelo qual não estão citadas acima.

A maior parte das espécies do gênero *Cunila* são utilizadas na medicina popular, principalmente no tratamento de afecções respiratórias, como gripe e tosse, embora algumas espécies não apresentem referências escritas de uso popular.

2.2 CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS E ETNOBOTÂNICAS DE *C. SPICATA*

Cunila spicata Benth. é uma das 12 espécies sulamericanas do gênero *Cunila*. Esta espécie pertencente à seção *spicata* junto com *C. menthoides*, *C. menthiformis*, *C. galioides*, *C. microcephala*, *C. platiphyla* e *C. fasciculata*, sendo vulgarmente conhecida como poejo do banhado ou simplesmente poejo, denominações que se confundem com várias das espécies anteriormente citadas.

As “cunilas” sulamericanas tem o seu centro de origem na região serrana do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Entretanto, *C. spicata* tem sido registrada de São Paulo até a Argentina e Uruguai (BORDIGNON et al., 1997). No Rio Grande do Sul a sua ocorrência foi registrada na região do alto-Uruguai, encosta superior e inferior do nordeste e planalto médio, campos de cima da serra e na depressão central (BORDIGNON et al., 1997; COELHO DE SOUZA, 1997).

Cunila spicata popularmente chamada de poejo ou poejo-do-banhado, caracteriza-se como uma espécie sub arbustiva, extremamente odorífera, cujas folhas medem em torno de 1,5cm de comprimento e 0,6cm de largura. Tanto as folhas quanto os caules apresentam-se cobertos por pêlos. Suas flores apresentam corola branca com pintas vinosas nos lobos do lábio inferior e encontram-se dispostas em espigas terminais com até 9 cm de

comprimento. A distribuição geográfica da espécie engloba quatro países, Paraguai, Argentina, norte do Uruguai, e Brasil, este último com referências de sua existência nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, porém com maior frequência nos estados do sul.

Esta espécie floresce e frutifica de setembro a dezembro, sendo a espécie mais bem adaptada a viver em locais encharcados, estando estabelecida em banhados e orlas de mata de galeria, dificilmente sendo encontrada em terrenos mais drenados (BORDIGNON et al., 1997).

É utilizada na medicina popular, particularmente como, béquica, peitoral e sudorífera (PIO CORREA, 1974; TOURSARKISSIAN, 1980). Porém em estudos realizados com seus extratos, foi constatado efeito protetor contra convulsões crônicas (COELHO DE SOUZA, 1997), além de atividades inibitórias da duplicação dos vírus Herpes Simplex Hominis tipo1 (HSV-1), Herpes Simplex Hominis tipo2 (HSV-2), Poliovírus tipo2 (PV) e Vírus da Estomatite Vesicular de Bovino (VSV) (SIMÕES, 1992). Em estudos complementares realizados por Simões et al., (1999_a), buscando elucidar as substâncias com atividades antiviral através de extratos hidrometanólicos de folhas, constatou-se atividade antiviral contra os vírus HSV-1, HSV-2, PV e VSV para a fração clorofórmica e contra os vírus HSV-1, HSV-2 e PV para a fração de acetato de etila. No entanto, as substâncias isoladas do extrato clorofórmico e testadas sobre os mesmos vírus não mostraram atividade alguma, considerando a concentração utilizada.

2.3 ÓLEOS VOLÁTEIS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *CUNILA*

Compostos orgânicos isolados de microrganismos e de plantas têm sido utilizados para a cura de diversas enfermidades. Tais compostos orgânicos provenientes de fontes naturais formam um grande grupo conhecido como metabólitos secundários (HERBERT, 1989).

As rotas bioquímicas das plantas estão divididas em metabolismo primário e secundário. No primeiro, são produzidas as substâncias essenciais para a sobrevivência das plantas. Açúcares, ácidos graxo, ácido mevalônico, aminoácidos, acetil-coenzima-A, nucleotídeos e seus polímeros derivados, entre outros compostos celulares que têm como funções principais as relacionadas com a vida e sobrevivência das espécies vegetais, fazem parte do metabolismo primário das

plantas (DI STASI, 1996; HERBERT, 1989). No metabolismo secundário, são sintetizadas e acumuladas substâncias ditas não essenciais para a sobrevivência da planta, porém, responsáveis pela adaptação desta ao meio em que vive (BATES, 1985). Dentre estas adaptações podemos citar: defesa contra patógenos, predadores, bruscas mudanças climáticas, inibição de germinação e crescimento de outros vegetais (substâncias alelopáticas), atração de agentes polinizadores e de dispersão de sementes (ROTGÉ, 1991), sendo, portanto, importantes fatores na capacidade de competição e sobrevivência das plantas.

Os metabólitos secundários podem ser extraídos em suficiente quantidade para que possam ser utilizados em sínteses químicas ou como novos materiais, para uso científico, tecnológico e aplicações comerciais. Estas substâncias naturais são utilizadas por um grande número de indústrias: farmacêutica (paclitaxel, efedrina, vincristina, vimblastina entre outros), alimentícia (flavorizante e corantes naturais), cosmética (cânfora, linalol), química, agroquímica (fungicida, inseticida) entre outras (BATES, 1985).

O metabolismo secundário possui sua origem nas notas metabólicas básicas da planta, originando uma grande variedade de compostos, os quais podem ser utilizados industrialmente (EVANS, 1991). Embora qualquer tecido ou célula vegetal tenha a capacidade de biossintetizar metabólitos secundários, este processo ocorre somente em alguns tecidos ou mesmo em células especiais, em função do grau de diferenciação e desenvolvimento dos mesmos. Em alguns casos a produção pode estar restrita a um estágio específico do desenvolvimento do vegetal ou a determinadas condições ecológicas ou ambientais (SANTOS, 2000).

Dentre os metabólitos secundários, um dos grupos mais importantes de matérias-primas são os óleos essenciais ou essências. A ISSO (International Standard Organization) define óleos essenciais como produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste de vapor d'água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos. Algumas características físico-químicas podem ser consideradas: são geralmente líquidos, de aparência oleosa à temperatura ambiente, voláteis, solúveis em solventes orgânicos apolares e geralmente não são muito estáveis na presença de luz, calor, umidade e metais (SHREVE e BRINK, 1980; EVANS, 1991; COSTA, 1994).

Os óleos voláteis são produzidos principalmente em estruturas secretoras especializadas, tais como pêlos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (SIMÕES et al., 1999b).

As essências podem ter sua composição variada de acordo com a época de colheita, localização geográfica ou pelas características genéticas das plantas (COSTA, 1994). O próprio conteúdo dos óleos essenciais pode variar em seus diferentes estágios de desenvolvimento (BOURBOTT e LOOMIS, 1967; SHALABY e VERZAR-PETRI, 1978). Existem diferenças significativas na composição dos óleos essenciais de uma espécie para outra (HOLEMAN et al., 1984). Alguns compostos se apresentam repetidos em diferentes espécies (PUTIEVSKY et al., 1990; GUILLÉN et al., 1996). Diferenças significativas na composição dos óleos essenciais dentro de plantas de uma mesma espécie provindas de regiões geográficas distintas ou da mesma região geográfica têm sido frequentemente evidenciadas (GUILLÉN et al., 1996).

Grande variação na composição dos óleos é muito frequente em plantas da família Lamiaceae (GRANGER e PASSET, 1973; ADZET et al., 1977; DELLACASSA et al., 1999). A diferença observada na composição de óleos essenciais da mesma espécie a partir de origens geográficas diferentes é um fato a ser levado em consideração. As diferenças qualitativas encontradas são fundamentalmente de base genética (HAY e WATERMAN, 1993), enquanto que as variações quantitativas podem ser atribuídas a modificações ambientais (edafológicas e climáticas) e a sua interação com fatores genéticos (GRELLA e PICCI, 1988).

A composição química dos óleos essenciais é bastante variada, podendo apresentar hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, ácidos éteres, ésteres, lactonas, compostos nitrogenados e compostos sulfurados (SHREVE e BRINK, 1980).

Um grande número de compostos presentes nos óleos essenciais apresenta atividade biológica de interesse, tais como, ação antiinflamatória, pesticida, inseticida, anti-séptica, herbicida, antioxidante, entre outras atividades (Duke, 1994). Entre estes compostos, podemos citar como por exemplo o d-limoneno (anticancerígeno, herbicida, insetífugo e inseticida), o citral (anti-histamínico, bactericida, preventivo de câncer e herbicida), o 1,8-cineol (alelopático, anestésico, antibronquítico, anti-séptico, bactericida, expectorante, herbicida e insetífugo), o timol (anilhelmíntico, antiinflamatório, anti-séptico, bactericida, fungicida, larvicida e vermícida), e o linalol (anti-séptico, insetífugo e termitífugo).

Vários procedimentos podem ser empregados para a extração dos óleos essenciais, levando-se em consideração, a natureza da essência a se extrair. Os métodos mais utilizados para a obtenção dos óleos essenciais são: destilação a

vapor (hidrodestilação e destilação por arraste de vapor), *enfleurage*, expressão, extração com solventes voláteis e extração com fluido supercrítico. A composição química, bem como o rendimento de uma essência pode variar com o tempo de destilação, sendo que um tempo mínimo para cada espécie se faz necessário para que ocorra o completo isolamento dos compostos.

As plantas aromáticas e medicinais são importantes também na indústria de alimentos, não somente por seu uso como flavorizantes, mas por suas atividades antioxidantes (GUILLÉN et al., 1996). Vários flavonóides podem ser usados na produção de aromas e sabores de alimentos e bebidas de origem vegetal (DI STASI, 1996).

Os óleos essenciais estão presentes na maior parte das espécies vegetais, entretanto, algumas famílias se destacam pelo grande número de espécies com alta produção de óleos de composição e atividade biológica de interesse. As plantas da família Lamiaceae são consideradas fontes de inúmeros compostos químicos biologicamente ativos que lhes conferem atividades terapêuticas (SUR et al., 1991; COSTA, 1994; DI STASI, 1996). Dentro desta família encontram-se algumas das plantas condimentares, aromáticas e medicinais mais conhecidas e utilizadas, tais como: lavanda, sálvia, tomilho, alecrim, manjerição, orégano, manjerona, menta, entre outras.

As espécies do gênero *Cunila* são usadas na medicina popular como estimulantes, aromáticas, antiespasmódicas, antitérmicas, no tratamento de tosse crônicas e infecções respiratórias (SIMÕES et al., 1994).

A composição química dos extratos de *Cunila*, analisados por cromatografia gasosa (GC), espectrofotometria de massa (CG-MS) e espectroscopia ¹³C NMR, mostram grande variação inter e intraespecífica.

Em *C. microcephala* e *C. fasciculata*, o mentofurano é o composto majoritário com 82.3 a 85.1% e 71.6 a 76.4%, respectivamente. O mentofurano é um composto intermediário na via biossintética que leva a produção de mentenos e outros componentes de interesse, sendo conhecido como importante composto hepatotóxico, visto que dosagens diárias de 250mg/Kg em ratos uma vez ao dia durante três dias causaram hepatotoxicidade. Os resultados demonstraram aumento da atividade de glutamato piruvato transaminase no plasma, diminuição da atividade da glicose-6-fosfatase e aminopireno-N-demetilase, decréscimo nos níveis de atividade dos citocromos microssomais P-450 de fígados de ratos (MADYASTHA e RAJ, 1994).

Assim sendo, a ausência de mentofurano é de interesse sob o ponto de vista toxicológico.

Outros compostos encontrados em quantidades significativas nestas espécies têm sido o limoneno (2 a 4% em *C. microcephala* e 8.6% a 11.2% em *C. fasciculata*), e o betacariofileno (3.3 a 3.9% em *C. microcephala* e 3.5 a 4.2% em *C. fasciculata*) (BORDIGNON et al., 1997).

Estudos realizados por Bordignon et al., (1998b, 1999), mostram que os principais constituintes de *C. menthoides* são isomentona (88,8%), mentona (4,7%) e pulegona (1,8%), enquanto que em *C. angustifolia* são encontrados o sabineno (41,4%), gama-terpíneo (11,3%) e limoneno (9,5%).

Estudos preliminares desenvolvidos em duas populações de *C. galioides* mostram a existência de pelo menos dois quimiotipos dentro da espécie. Um quimiotipo é caracterizado pela presença de altas concentrações de citral, nas suas duas formas isoméricas (neral e geranial), enquanto que o outro se caracteriza pela presença de elevadas concentrações de ocimeno (BORDIGNON et al., 1997; FRACARO et al., 2002).

Ampla variação química, com a definição de pelo menos três quimiotipos, tem sido evidenciada numa espécie de *Cunila*, *C. galioides*. O estudo da variação química de distintas populações desta espécie mostrou a existência de um padrão espacial de distribuição dos quimiotipos, o que justifica a coleta de material em regiões diferentes para obtenção de um perfil válido quanto à composição química dos óleos essenciais de plantas nativas (ECHEVERRIGARAY et al., 2003).

Em *C. platyphyla* os compostos majoritários encontrados foram a pulegona (71,2%), limoneno (2,8%) e linalol (1,4%) (BORDIGNON et al., 1998a).

Uma análise realizada em material de *Cunila incisa* por bordignon et al., (1997) mostra a presença de uma ampla gama de compostos, tendo como majoritário o 1,8-cineol (50-60%). Este composto, como já anteriormente citado, possui atividade farmacêutica interessante. O fato de apresentar um composto majoritário na concentração acima citada permite a obtenção de um óleo essencial de alta pureza. Além do 1,8-cineol, o óleo essencial de *C. incisa* obtido por hidrodestilação contém: sabineno (7,2-8%), α -terpineol (4-6,8%), γ -terpineno (3,5-5%), terpineno-4-ol (3,8-4,5%), p-cimeno (3-4%), e linalol (2,2-4,5%).

Trabalho recente de avaliação da composição do óleo essencial de diversas populações de *C. incisa* (AGOSTINI, 2003) mostrou que nesta espécie, apesar de ocorrer ampla variação quantitativa, não é possível definir quimiotipos.

Ciccio e Poveda, (1999) investigaram o óleo essencial de *C. polyantha*, obtido através de destilação a vapor das partes aéreas das plantas, e encontraram como componentes químicos principais a mentona (63%), pulegona (14%), β -cariofileno (4.5%) e 3-octanilacetato (3%).

Dados fitoquímicos de extratos etanólicos de *C. spicata* mostram a presença de β -betulenal (MANNNS e HARTMANN, 1992), isorosiridol diacetato, hidroperoximonoterpenos, β -sitosterol, fitol, cadinol, linalol, dihidrocarveol, geraniol, e acetato de nerila (MANNNS, 1993).

Um trabalho recente de análise dos constituintes voláteis das partes aéreas de *C. spicata* extraídos através de arraste de vapor (VAN BAREN et al., 2001) mostrou a presença de cinquenta compostos representando 91,8% do óleo essencial total, consistindo principalmente de hidrocarbonetos monoterpênicos e seus derivados oxigenados. Os constituintes majoritários identificados foram limoneno (25,9%), geraniol acetato (21,8%) e linalol (21,2%).

Dados preliminares da composição química de óleos essenciais de duas populações de *C. spicata* coletadas na encosta superior do nordeste do RS e na serra do sudeste, mostram grande variabilidade quali-quantitativa, inclusive com diferenças com respeito aquela estudada por van Baren et al., (2001). A população coletada em Vila Oliva (região nordeste do RS) apresentou como componentes majoritários 1,8-cinelol (46,32%), α -terpineol (19,4%) e limoneno (11,25%), enquanto que a população coletada em Pântano Grande (região sudeste do RS) apresentou 1,8-cinelol (36,7%), linalol (29,2%) e α -terpineol (11%) (dados não publicados).

Derivados glucosídicos de monoterpênicos, incluídos linalol e 1,8-cincol tem sido descritos em *C. spicata* (MANNNS, 1993,1995).

2.4 MARCADORES MOLECULARES NA AVALIAÇÃO DE VARIABILIDADE GENÉTICA EM PLATAS

Nos últimos anos, marcadores moleculares de DNA têm sido utilizados na identificação de cultivares e na avaliação das relações genéticas entre germoplasmas de diversas espécies de plantas, proporcionando informação sobre as relações filogenéticas entre indivíduos e espécies, e contribuindo em estudos evolutivos e ecológicos (GEPTS, 1993; WEISING et al., 1995; HILLIS et al., 1996).

Marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente. Os diversos tipos de marcadores

moleculares disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada, pela habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, consistência e repetibilidade. Segundo Milach, (1998) a metodologia utilizada para identificar os tipos de marcadores moleculares divide-os em dois grupos: hibridização ou amplificação de DNA.

Marcadores de DNA, por acessarem diretamente o material genético, são livres de efeitos ambientais. Conseqüentemente, apresentam vantagens sobre marcadores morfológicos, pois para este tipo de marcador é preciso um grande esforço e planejamento devido ao grande número de cruzamentos necessários para uma maior capacidade discriminante e precisão da análise em virtude do limitado número de marcadores analisáveis por linhagem. Adicionalmente, marcadores moleculares podem detectar um alto grau de polimorfismo para cada loco em estudo, ao contrário do que comumente ocorre com marcadores morfológicos (FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1996).

Alguns marcadores moleculares apresentam-se como co-dominantes, ao passo que a grande maioria dos marcadores morfológicos caracteriza-se por ser dominante ou recessivo (TANKSLEY, 1983; BURR et al., 1983; STUBER, 1992). Outra vantagem de marcadores de DNA sobre marcadores morfológicos é que podem ser empregados em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, permitindo acelerar o processo de seleção e recombinação dos indivíduos.

Progressos substanciais estão sendo obtidos nos últimos anos para mapear, identificar e isolar muitos genes importantes de interesse agrícola, devido a utilização de marcadores moleculares, e em grande parte a melhoria das técnicas desenvolvidas para auxiliar na procura destes marcadores de interesse. Entre as técnicas que são particularmente promissoras estão, RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism; BOTSTEIN et al., 1980), AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism; VOS et al., 1995), RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA; WILLIAMS et al., 1990), Microsatélites (LITT e LUTTY, 1989) e PCR (Polymerase Chain Reaction) baseado em marcadores de DNA tais como SCARs (Sequence Characterized Amplified Regions) ou STS (Sequence Tagged Sites). Estas técnicas têm ajudado de forma direta na seleção de muitos caracteres de interesse, simultaneamente utilizando F2 e populações em retrocruzamento (Back-cross), em linhagens isogênicas próximas, duplos haplóides e em recombinantes de linhagens consanguíneas.

Em termos de análise filogenética, 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 (SWOFFORD et al., 1996).

Especificamente no que diz respeito a marcadores baseados em PCR (Polymerase Chain Reaction), um grande avanço foi obtido em 1990, com a utilização de iniciadores ou *primers* mais curtos que aqueles usados em PCR e com sequências arbitrárias, eliminando assim, a necessidade do conhecimento prévio da sequência alvo. Esta técnica foi desenvolvida por dois grupos de forma independente. Willians et al. (1990) patentearam a tecnologia com o nome mais conhecido, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Welsh e McClelland (1990) propuseram uma denominação mais apropriada AP-PCR (Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction) uma vez que os *primers* possuem sequências arbitrárias, mas a amplificação não ocorre ao acaso, e sim em locais específicos do genoma (FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1996).

PCR envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA-polimerase. A reação de PCR é baseada no anelamento de um par de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores (*primers*) do processo de polimerização e responsáveis pelo flaqueamento do DNA de fita dupla alvo da amplificação. Os *primers* de PCR são sintetizados artificialmente de maneira que sua sequência seja complementar às sequências específicas que flanqueiam a região alvo no DNA. Os ciclos envolvem três etapas: a) desnaturação da fita dupla através da elevação da temperatura (92° a 95°C); b) anelamento do *primer* a uma temperatura reduzida rapidamente (35° a 65°C, dependendo do tamanho e sequência do *primer*); c) extensão da fita de DNA a partir de cada terminação 3'. A temperatura sobe novamente até 72°C para que a enzima DNA polimerase atue. Esta extensão utiliza como molde a sequência alvo.

Este ciclo é repetido algumas dezenas de vezes, assim sendo, a amplificação segue uma progressão exponencial e após 20 ciclos tem-se até um milhão de vezes a quantidade inicial da sequência alvo.

Marcadores de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) têm se mostrado como ferramentas simples e úteis para a determinação de diferenças genéticas entre genótipos (WILLIAMS et al., 1990; RAGOT e HOISINGTON, 1993). Ainda mais, RAPD utiliza sequências de iniciação (*primers*) arbitrários que geram um grande número de marcadores multiloci, e que podem ser aplicados para analisar praticamente qualquer organismos, mesmo aqueles para os quais se dispõe de pouca ou nenhuma informação genética prévia, como é o caso de *C. spicata*.

Na década de noventa uma série de outros marcadores foram desenvolvidos ou aperfeiçoados ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), é uma dentre muitas técnicas de *fingerprinting* baseada em PCR (Polymerase Chain Reaction) e é definida como um variante da reação da polimerase em cadeia que utiliza *primers* de sequência simples e repetitivas para amplificar regiões entre sequências alvo. Este método foi inicialmente desenvolvido em 1994 (GUPTA et al., 1994; ZIETKIEWICZ et al., 1994) e explora a abundância e a distribuição aleatória de SSRs (Simple Sequence Repeat) em genomas de plantas amplificando sequências de DNA contidas entre SSRs.

Dentro de marcadores ISSR, ocorrem variações nos métodos utilizados principalmente no que diz respeito ao tipo de *primer*, o qual pode ser 3'-ancorado para amplificar regiões entre dois SSRs com compatibilidade dos sítios dos *primers* (YANG et al., 1996). É possível a obtenção de perfis de bandas mais complexos utilizando *primer* 5'-ancorados que incorporados as regiões SSRs permitem a amplificação de produtos, e por combinação de *primers* 3' e 5' (ZIETKIEWICZ et al., 1994).

Marcadores moleculares baseados em PCR (RAPDs e ISSR) têm sido empregados com sucesso nas estimativas de variabilidade genética tanto intra quanto inter populacionais em espécies selvagens, mas principalmente em espécies cultivadas (LU et al., 1996; SANCHEZ de LA HOZ et al., 1996; NAGAOKA e OGIHARA, 1997; PARSON et al., 1997; KOJIMA et al., 1998; GHARIANI et al., 2003; MACIEL et al., 2001; FRACARO e ECHEVERRIGARAY, 2005).

Marcadores genéticos baseados em DNA estão sendo utilizados de modo crescente no desenvolvimento de lavouras, controle de qualidade na produção de sementes, determinação de variabilidade genética e identificação de variedades (SMITH et al., 2000). Dentre os diversos marcadores moleculares utilizados, os marcadores ISSR vêm se destacando e estão sendo amplamente utilizados como para detectar variabilidade genética em plantas (KARP et al., 1996). Em particular, esses marcadores podem ser altamente variáveis quando utilizados dentro da mesma espécie, apresentando algumas vantagens sobre marcadores RAPD, principalmente por possuírem um maior número de fragmentos polimórficos (NAGAOKA e OGIHARA, 1997; GODWIN et al., 1997; BORNET e BRANCHARD, 2001).

Liu e Wendel, (2001), sugeriram a utilização de um marcador genético mais eficiente para a avaliação da variação genética em cultivares de algodão. O estudo

utilizou *primers* ISSR que revelaram variações intra e interespecíficas confirmando as expectativas relacionadas ao uso deste marcador.

Nesta mesma linha de pesquisa, Yang et al., (1996) avaliaram diferentes populações de sorgo Chinês que apresentaram uma grande diversidade genética. A análise dos dados lhes permitiu concluir que a técnica utilizando marcadores ISSR é relativamente rápida, reprodutível e de baixo custo, gerando informações úteis e consistentes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Amostras de 10 populações foram coletadas em distintos locais do estado do Rio Grande do Sul, nos meses de Setembro a Novembro de 2003, período em que a planta encontra-se em floração. De cada população foram coletadas, de forma individual, 10 plantas as quais foram acondicionadas a -80°C e posteriormente utilizadas em estudos de diversidade genética. A distribuição das populações coletadas pode ser observada na figura 1.

Cada amostra foi separada da seguinte forma: (a) amostra de 100 a 150g de material aéreo para extração e análise de óleos essenciais; (b) amostra de 5g de material aéreo para extração de DNA e análise genética; (c) amostra para estaquia visando manutenção de banco "in vivo"; (d) amostra para preparação de excicata para depósito no Herbário do Museu de Ciências Naturais da UCS.

As amostras para extração de óleos foram separadas logo após a coleta ou mantidas congeladas a -80°C até a extração.

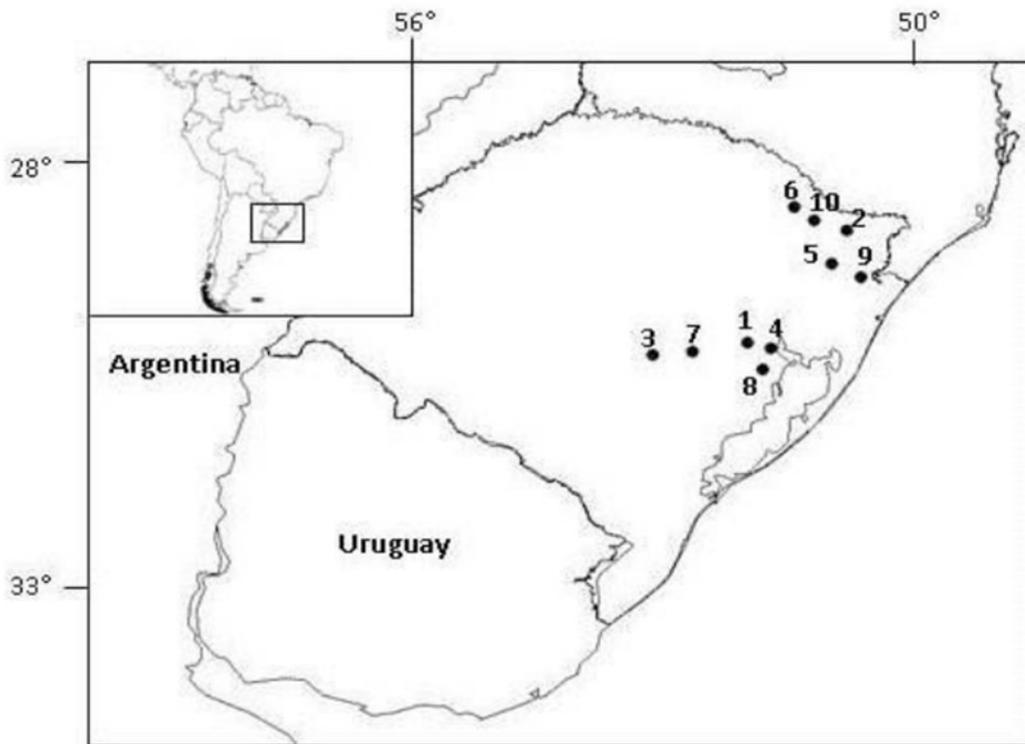


Figura 1. Mapa de relevo do Rio Grande do Sul com a localização das populações amostradas:
 1 – Bom Jesus, 2 – Vacaria, 3 – Muitos Capões, 4 – Tainhas, 5 – Lageado Grande, 6 – Guaíba, 7 – Arroio dos Ratos, 8- Pântano Grande, 9 – Sertão Santana, 10 – Cachoeira do Sul.

3.2 ANÁLISE DOS ÓLEOS VOLÁTEIS

As amostras foram secas com ar quente e posteriormente submetidas a hidrodestilação por 1 hora utilizando o aparelho Clevenger. O óleo obtido foi separado da água e seco com Na_2SO_4 anidro. A identificação química dos componentes do óleo das amostras foi realizada utilizando cromatógrafo gasoso HP 6890 juntamente com um detector seletivo de massa HP 5973 equipado com Chemstation e banco de dados Wiley 275. Foi utilizado também com uma coluna capilar de sílica fundida HP-Innowax (30m x 0.25 mm; 0.25 μm de espessura do filme).

As condições para a espectrometria de massas foram: coluna a temperatura de 40°C (8min), 40°-180°C (3°C/min), 180°-230°C (20°C/min); interface de 180°C; razão 1:100, gás de condução He (55,4KPa); fluxo de 1.0 mL/min; energia de ionização 70 eV; amplitude de massa 40-350; volume injetado 0.5 μL ; separação do solvente, 3,5min.

A análise GC foi realizada com cromatógrafo gasoso HP 6890 com detector FID utilizando coluna capilar de sílica fundida HP Innowax (30m x 0.25mm; 0.50 μm

de espessura de filme). As condições para a cromatografia foram: temperatura da coluna 40°C (8min); 40°-180°C (3°C/min); 180°-230°C (20°C/min); 230° (20min); temperatura da injetora 250°C; razão 1:50; detector da temperatura 250°C; gás de condução hidrogênio; fluxo de 1.0 mL/min; o volume injetado foi µL de uma amostra diluída na proporção de 1:10 em hexano. A destilação e a análise química foram realizadas em triplicata.

3.3 ISOLAMENTO DE DNA

Quantidades iguais (0.2g) de tecido foliar foram macerados em almofariz com nitrogênio líquido até a obtenção de pó fino. O DNA total foi extraído pelo método CTAB de Doyle e Doyle, (1987). O DNA presente nas amostras foi quantificado através de análise espectrofotométrica a 260 nm em espectrofotômetro Ultraspec 1000 (Pharmacia). A quantidade de DNA extraído foi verificada através da comparação de leituras espectrofotométricas a 260 e 280nm, através de visualização direta em géis de agarose 0,8% em tampão TBE.

3.4 AMPLIFICAÇÃO E ANÁLISE DE RAPD (RANDOMLY AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA)

As reações de amplificação foram realizadas em volume total de 25 µl. A mistura para PCR foi formada por: 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 3mM MgCl₂, 0.25% Triton-X-100, 1.25 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP, e dGTP), 30ng de primer decamérico, 60 a 80ng DNA genômico, e 1.5 unidades de Taq DNA polimerase (Gibco). As amplificações foram realizadas em termociclador (MJ Research, PTC 100). Os ciclos térmicos para amplificação foram: 94°C por 1 min seguido por 45 ciclos de 94°C (1min), 40°C (1min), e 72°C (2 min), e finalmente 72°C por 3 min. Um controle negativo com todos os componentes, mas sem DNA genômico foi incluído em cada amplificação.

Para amplificação ao acaso do DNA, foram selecionados, com base no número de fragmentos amplificados e reprodutividade dos perfis, 9 *primers* aleatórios de um total de 40 *primers* dos kits D e X da Operon Tevhnologies Inc., Alameda, CA, USA. Os *primers* utilizados para análise inter e intrapopulacionais e suas respectivas sequências (5'>3') foram: OPD-02

(GGACCCAACC), OPD-05 (TGAGCGGACA), OPD-06 (ACCTGAACGG), OPD-07 (TTGGCACGGG), OPD-11 (AGCGCCATTG), OPD-20 (ACCCGGTCAC), OPX-07 (GAGCGAGGCT), OPX-12 (TCGCCAGCCA), OPX-18 (GACACGGAGTG).

Os produtos de amplificação foram separados em géis de agarose 1,5% horizontais em tampão TBE (50mM Tris, 50mM ácido bórico, 2.5mM EDTA, pH 8.3) com corrente constante de 80V. Os géis foram corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta longa. O tamanho dos fragmentos amplificados foi determinado por comparação com um padrão de DNA de fago digerido com EcoRI and HindIII, com auxílio do programa computacional Labimage versão 2.7.

As amostras foram avaliadas quanto à presença (1) ou ausência (0) das bandas formando uma matriz binária. Somente bandas bem definidas e reproduzíveis foram consideradas para análise.

3.5 AMPLIFICAÇÃO E ANÁLISE DE ISSR (INTER SIMPLE SEQUENCE REPEATS)

As amostras foram extraídas de acordo com protocolo discriminado no item 3.3. As reações de amplificação foram realizadas em volume total de 25µl. A mistura para PCR-ISSR foi formada por: 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 3mM MgCl₂, 2% formamida, 0,75mM de CAD dNTP (dATP, dCTP, dTTP, e dGTP), 0,4mM de primer, 60ng DNA genômico, e 1.5 unidades de Taq DNA polimerase (Gibco).

As amplificações foram realizadas em termociclador (MJ Research, PTC 100). Os ciclos térmicos para amplificação constituíam-se de: 94°C por 5 min seguido por 40 ciclos de 94°C (1 min), temperatura de cada *primer* T_m °C (45 seg), e 72°C (2 min), e finalmente 72°C por 5 min. Um controle negativo com todos os componentes exceto DNA genômico foi incluído em cada amplificação. Os *primers* utilizados e suas respectivas sequências foram: (AC)₈T; (AG)₈YT; (GA)₈T; (CT)₈G; (GTGC)₄; (CT)₈A; (GA)₈YC; (CTC)₄RC; (GACA)₄; (AG)₈C; (AG)₈T; (AG)₈C; (AG)₈A; (AG)₈YC; (GT)₈A; (GT)₈T; (GATA)₄; (GA)₈C; (CA)₈G.

Os produtos de amplificação foram separados em géis de agarose 1,5% horizontais em tampão TBE (50mM Tris, 50mM ácido bórico, 2.5mM EDTA, pH 8.3) com corrente constante de 80V. Os géis foram corados com

brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta longa. O tamanho dos fragmentos amplificados foi determinado por comparação com um padrão de DNA de fago digerido com EcoRI e HindIII.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

No que diz respeito à composição de óleos essenciais, estatística descritiva, distância euclidianas, análise hierárquica de agrupamentos, e análise de componentes principais foram realizadas com os procedimentos apropriados de programa computacional SPSS versão 10.0.1.

Para evitar a dependência dos dados percentuais, as áreas dos picos dos compostos majoritários (aqueles que representam mais que 10% do total dos óleos voláteis em pelo menos uma amostra) foram padronizadas dentro de cada amostra através da divisão da área de cada pico (componente) pela média de todos componentes da amostra.

Dados oriundos das análises de RAPD e ISSR foram analisados com o auxílio dos programas SPSS versão 10.0.1, NTSYS (ROHLF, 1992), Winboot e GenAEx V.5 (PEAKALL e SMOUSE, 2001). Dependendo do caso os dados foram submetidos a análise de multivariada para cálculo de similaridade utilizando o coeficiente de Jaccard $[a/(a+b+c)]$, onde representa bandas presentes nas duas amostras, e b e c, representam bandas presentes em uma mostra e ausente na outra; análise de agrupamento através do algoritmo UPGMA (Unweighed Pair Group Method with Average values); análise de componentes principais; AMOVA; correlação de Pearson; correlação de Spearman; entre outras.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE DE VARIABILIDADE GENÉTICA EM *C. SPICATA* UTILIZANDO MARCADORES ISSR E RAPD

A estimativa da variabilidade genética intra e interpopulacional, particularmente relacionada a plantas aromáticas e medicinais é de fundamental importância tanto na conservação das bases genéticas de plantas nativas, como na formação de bancos de germoplasma e seu gerenciamento para fins de melhoramento genético visando a utilização sustentável dos recursos naturais disponíveis.

Neste estudo um total de dez populações de *Cunila Spicata* e outras três representantes do gênero, *Cunila galioides*, *Cunila menthoides*, *Cunila organoides*, consideradas grupos externos, foram analisadas utilizando marcadores moleculares ISSR e RAPD.

De um total de 20 primers de ISSR testados, nove foram selecionados com base no número de bandas e consistência dos segmentos amplificados ao longo de três repetições utilizando duas amostras de *C. spicata*. Os primers de ISSR selecionados com as suas respectivas temperaturas de anelamento e conteúdo de GC constam na Tabela 1.

Em conjunto, os nove primers utilizados na análise das populações geraram um total de 160 bandas, das quais 159 (99,3%) apresentaram polimorfismo quando incluídas as três espécies (*C. galioides*, *C. menthoides* e *C. organoides*) empregadas como grupos externos. Entretanto, quando foram consideradas apenas as populações de *Cunilaspicatao* número de fragmentos caiu para um total de 115 com uma média de 12,7 fragmentos por primer, e um nível de polimorfismo da ordem de 81,7%. Este nível de polimorfismo encontra-se dentro daquele previamente relatado para outras espécies da família Lamiaceae como, *Salvia fruticosa* (SKOULA et al., 1999), *Ocimumgratissimum* (VIEIRA et al., 2001), *Lavandulaangusifolia* (ECHEVERRIGARAY e AGOSTINI, 2000), *Thymusvulgaris* (ECHEVERRIGARAY et al., 2000), e inclusive outras representantes do

gênero *Cunila*, como *C. incisa* (AGOSTINI, 2003) e *C. galioides* (FRACARO e ECHEVERRIGARAY, 2005). Indica que esta espécie apresenta uma variabilidade genética comparável aquela de outros representantes da família.

Tabela 1 - Primers de ISR selecionados, suas sequências, números de bandas polimórficas e número total de bandas analisadas

Sequência Primer	Temperatura de anelamento (°C)		% de GC	Número de bandas amplificadas	
	Teórica	Otimizada		Total	Polimórficas
(AC) ₈ T	50	48	47,05	14	13
(AG) ₈ YT	54/52	50	44,44	18	18
(GA) ₈ T	50	50	47,05	15	15
(CA) ₈ T	50	50	47,05	27	27
(CT) ₈ G	52	48	52,84	8	8
(CTGC) ₄	56	54	75	26	26
(CT) ₈ A	50	48	47,05	13	13
(GA) ₈ YC	56/54	50	50	25	25
(CTC) ₄ RC	48/46	50	64,28	14	14
Total				160	159

Perfis representativos de ISSR são apresentados nas Figuras 2 e 3. Nestas figuras pode ser constatada a semelhança nos perfis das amostras de *C. spicata*, especialmente, entre os três representantes de cada população avaliada, e a marcante diferença dos perfis de *C. spicata* em relação às espécies utilizadas como grupos externos.

A análise conjunta dos 160 marcadores ISSR permitiu a identificação de todas as amostras avaliadas, confirmando a eficiência dos marcadores moleculares como sistema de identificação de espécies, populações e indivíduos em plantas, e em particular no gênero *Cunila* (AGOSTINI, 2003; FRACARO e ECHEVERRIGARAY, 2005).

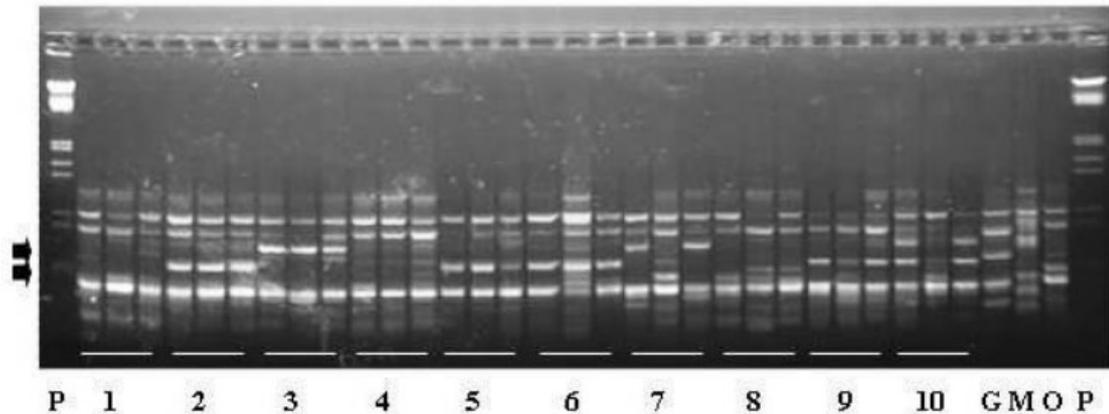


Figura 2. Perfil de ISSR obtido com primer (GA)8T, em 10 populações de *C. Spicata*. (AR-Arroio dos Ratos, BJ-Bom Jesus, CS-Cachoeira do Sul, GU-Guaiba, LG-Lageado Grande, MC-Muitos Capões, PG- Pântano Grande, SS-Sertão Santana, Ta-Tainhas e VA-Vacaria) e um representante de *C. galioides* (Cg), *C. origanoides* (Co) e *C. menthoides* (Cm). P-Fago lambda clivado com *EcoRI* e *HindIII*.

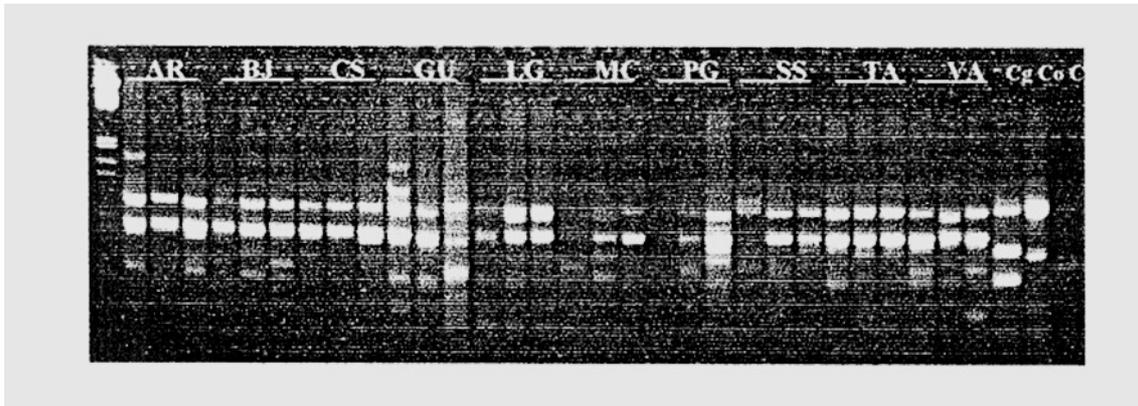


Figura 3. Perfil de ISSR obtido com primer (CT)8G, em 10 populações de *C. Spicata*. (AR-Arroio dos Ratos, BJ-Bom Jesus, CS-Cachoeira do Sul, GU-Guaiba, LG-Lageado Grande, MC-Muitos Capões, PG- Pântano Grande, SS-Sertão Santana, Ta-Tainhas e VA-Vacaria) e um representante de *C. galioides* (Cg), *C. origanoides* (Co) e *C. menthoides* (Cm). P-Fago lambda clivado com *EcoRI* e *HindIII*.

A presença e ausência de segmentos amplificados em cada amostra foram utilizadas para a construção de uma matriz binária com base na qual foi estimada a similaridade genética (coeficiente de Jaccard) entre os materiais. A menor similaridade ou maior distância foi constatada entre a amostra 2 da população Lageado Grande de *C. spicata* e a amostra de *C. menthoides* (0,08), enquanto que a maior similaridade entre as quatro espécies foi obtida entre a amostra 3, da população de Vacaria (*C. spicata*) e a amostra de *C. galioides* (0,381). Como esperado, a maior similaridade genética foi constatada entre representantes de uma mesma população, no caso amostras da população de Cachoeira do Sul (0,8852).

Uma comparação das médias das similaridades genéticas mostrou que dentro de *C. spicata* a similaridade intrapopulacional (0,8125) foi maior que a

interpopulacional (0,5447), indicando que as populações desta espécie se caracterizam como grupos genéticos distintos.

A análise de agrupamento (Figura 4), evidenciou a formação de três grupos, um formado pelas dez populações de *Cunila spicata*, um segundo, formado pela amostra de *Cunila galioides* e um terceiro grupo formado pelas amostras de *Cunila menthoides* e *Cunila origanoides*. Como mostram os elevados valores obtidos pela análise de permutações, as populações de *C. spicata* caracterizam-se como grupos geneticamente estruturados. Entretanto, com exceção da população de Arroio dos Ratos, não foi possível a formação de agrupamentos entre populações desta espécie.

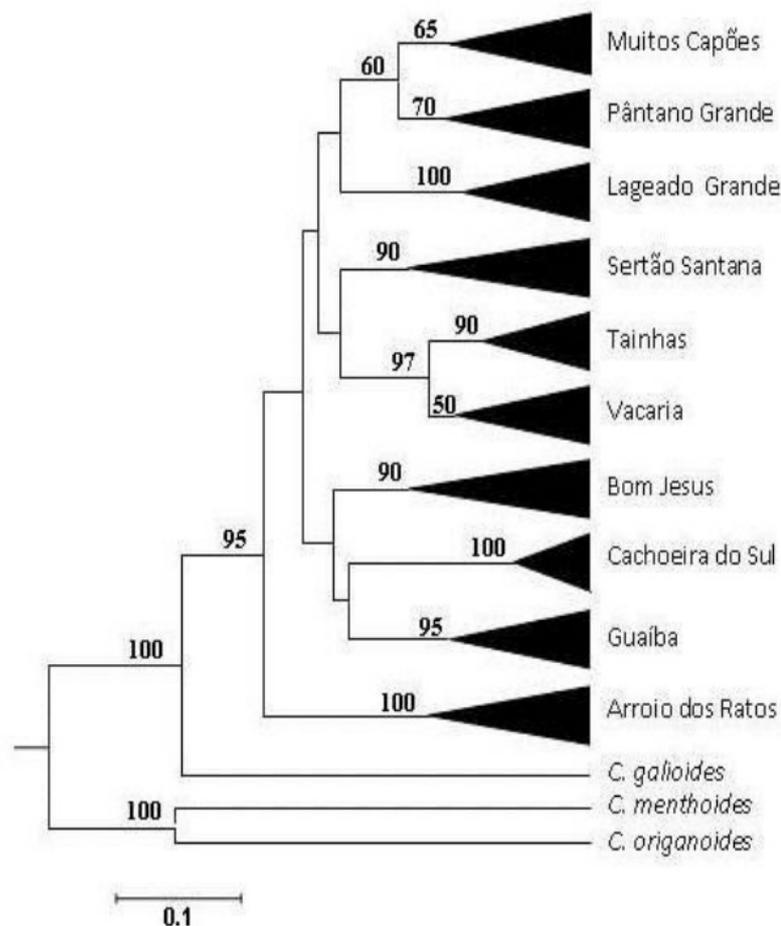


Figura 4. Dendrograma (UPGMA) baseado na análise de marcadores ISSR em 10 populações de *C. spicata*, e representantes das espécies *C. galioides*, *C. menthoides* e *C. origanoides*.

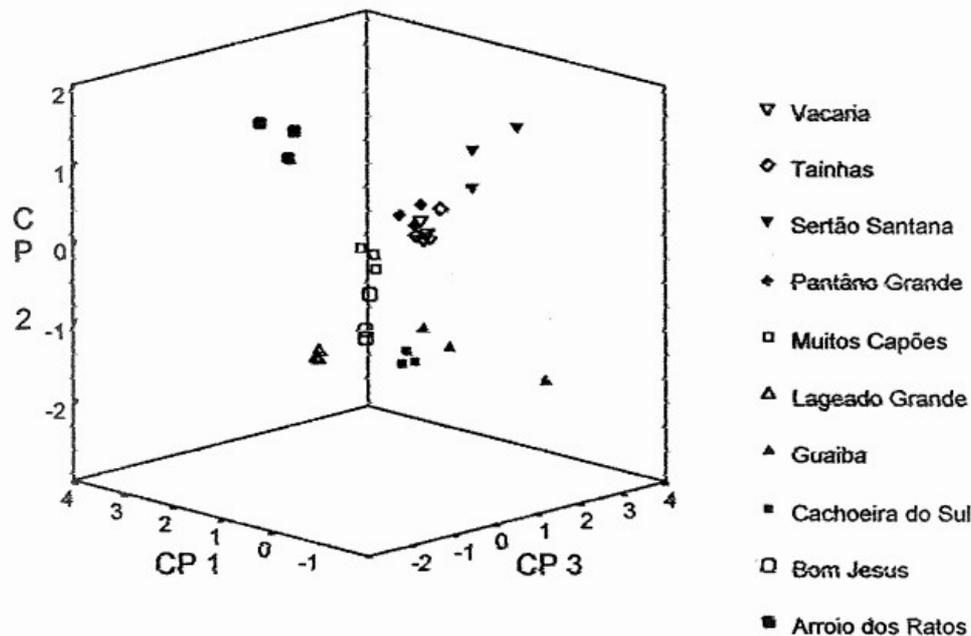


Figura 5. Análise de componentes principais em *C. spicata* baseada em marcadores ISSR.

A análise de componentes principais (Figura 5) permite observar graficamente que as populações de *C. spicata* coletadas na região correspondente à depressão central e serra do sudeste não se diferenciam geneticamente daquelas coletadas na região nordeste do Rio Grande do Sul.

Nas análises de RAPD foram utilizadas nove primers decaméricos selecionados dos 40 primers que compõem os kits D e X da OperonTechn. Assim como no caso dos marcadores de ISSR, a seleção dos primers foi realizada utilizando duas amostras de *C. spicata* e baseada no número de bandas e a reprodutibilidade das bandas em três ampliações independentes. Utilizando os nove primers selecionados foram obtidos 112 produtos de amplificação, variando entre 250 e 1800pb. O número de bandas por primer variou entre 9 para o primer OPD20 e 15 para OPX7 e OPD11, com uma média de 12,44 bandas.

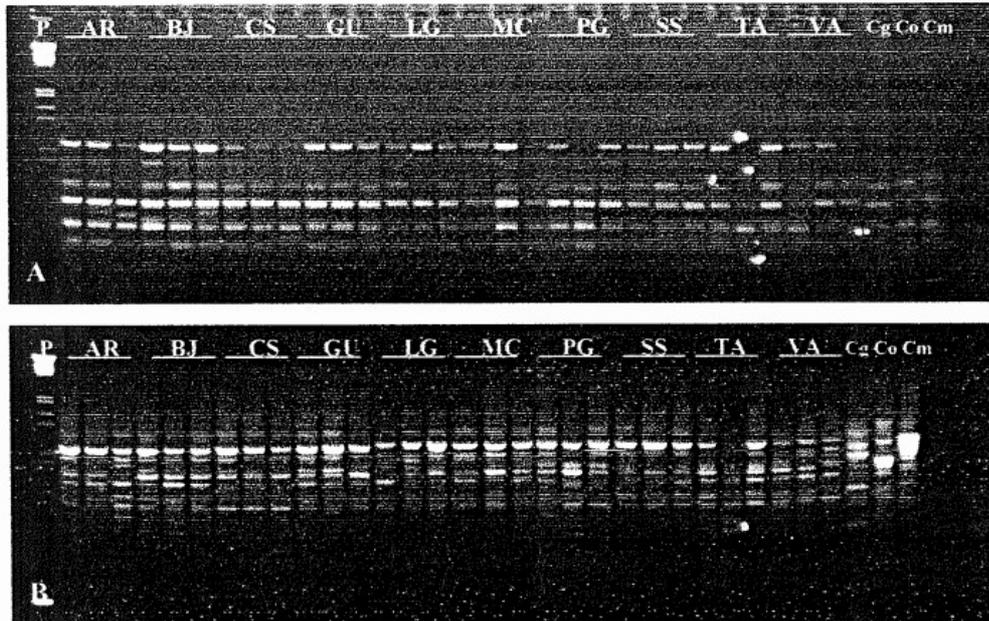


Figura 6. Perfil de RAPD obtido com primer (A)OPD-02 e (B)OPX-07, em 10 populações de *C. Spicata*. (AR-Arroio dos Ratos, BJ-Bom Jesus, CS-Cachoeira do Sul, GU-Guaiba, LG-Lageado Grande, MC-Muitos Capões, PG- Pântano Grande, SS-Sertão Santana, Ta-Tainhas e VA-Vacaria) e um representante de *C. galioides* (Cg), *C. organoides* (Co) e *C. menthoides* (Cm). P-Fago lambda clivado com *EcoRI* e *HindIII*.

Considerando todas as amostras, incluídas as espécies utilizadas como grupos externos, a percentagem de bandas polimórficas foi de 88,4%, valor semelhante aquele obtido com os marcadores ISSR. Já considerado apenas *C. spicata*, o número de produtos amplificados foi de 79, sendo que destes 43 ou 54,4% foram polimórficos.

A análise conjunta dos 112 marcadores RAPD permitiu a identificação de todos os materiais avaliados, inclusive os indivíduos de uma mesma população. Como pode ser observado na Figura 6, as amostras pertencentes à mesma população e a mesma espécie (*C. spicata*) apresentam maior número de bandas em comum do que quando comparadas espécies distintas.

Os 112 marcadores RAPD foram utilizados para o cálculo de similaridade genética com base nos coeficientes de Jaccard, como esperado, a maior similaridade (0,947) foi observada entre duas amostras de uma população (Cachoeira do Sul), e a menor similaridade (0,273) entre amostras de espécies diferentes (amostra 2 de Lageado Grande de *C.spicata* e amostra de *C.menthoides*).

Assim como observado com os marcadores ISSR, a similaridade média intrapopulacional (0,882) foi maior que a interpopulacional (0,762), confirmado, apesar dos valores serem mais próximos, que as populações de

C. spicata se caracterizam como unidades genéticas estruturadas. Da mesma forma, a similaridade média entre *C. spicata* e *C. galioides* foi maior (0,540) do que entre *C. spicata* e as outras duas espécies utilizadas como grupos externos, *C. origanoides* (0,309) e *C. menthoides* (0,305).

Análise de agrupamentos utilizando o algoritmo UPGMA permitiu a formação de um dendograma apresentado na Figura 7. Assim como previamente observado com os marcadores ISSR, neste dendograma podem ser facilmente identificados três grupos sendo um formado por todas as populações de *C. spicata*, outro pelo representante de *C. galioides*, e o terceiro pelos representantes de *C. origanoides* e *C. menthoides*. A diferença dos dados obtidos com ISSR, no caso de RAPD, apesar das amostras de cada população estarem agrupadas, os valores de permutações não foram elevados, com exceção da população de Bom Jesus.

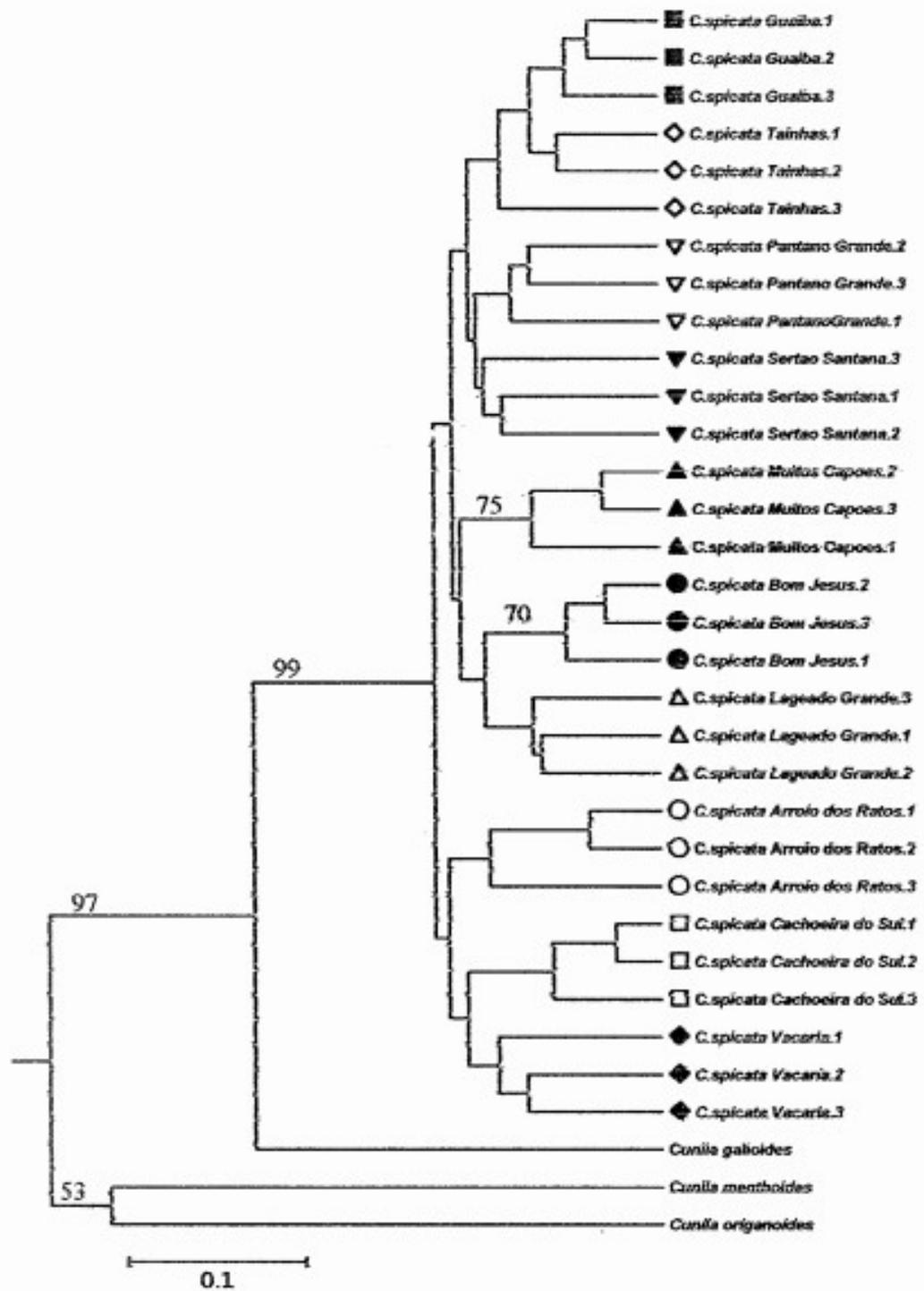


Figura 7. Dendrograma (UPGMA) baseado na análise RAPD em 10 populações de *C. spicata*, e representantes das espécies *C. galioides*, *C. menthoides* e *C. organoides*.

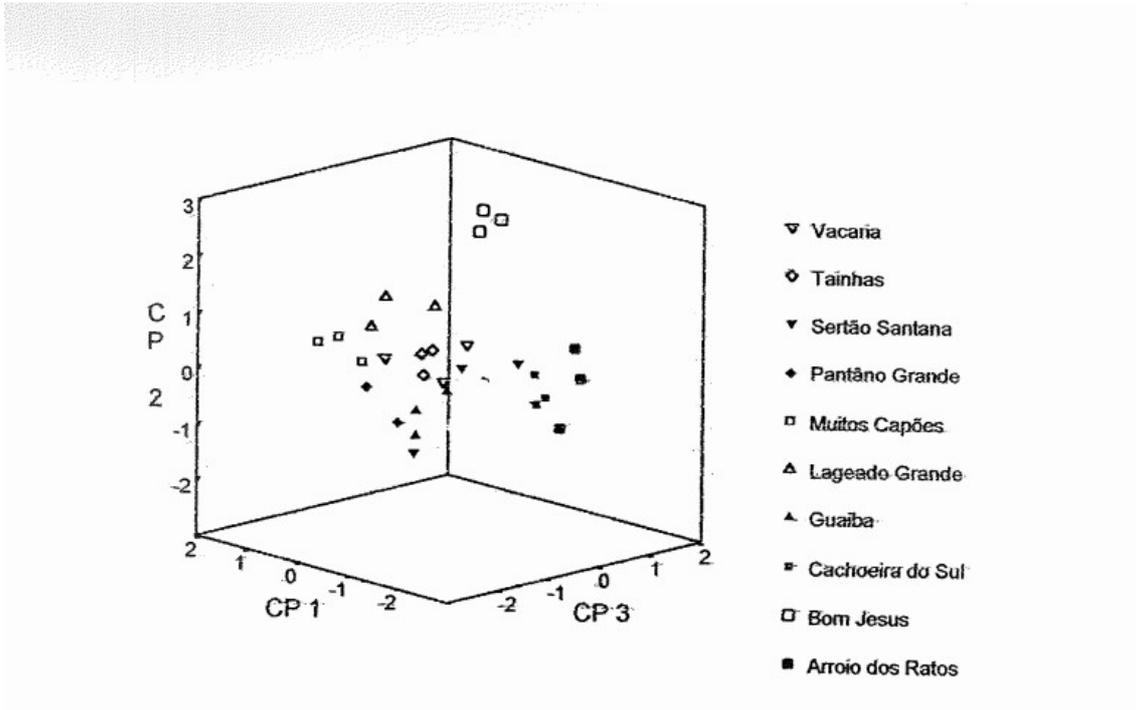


Figura 8. Análise de componentes principais em *C. spicata* baseada em marcadores RAPD.

Como pode ser observado na Figura 8, as populações coletadas na região sul e nordeste do Rio Grande do Sul não se diferenciam de forma evidente. Resultado semelhante foi observado com o uso de marcadores ISSR.

Tratando-se de dois marcadores moleculares, foi avaliada a relação entre as distâncias obtidas com marcadores de ISSR e RAPD. Análise de correlação de Pearson apresentou valor de 0,862, altamente significativo. A relação entre as distâncias obtidas pelos dois métodos encontra-se representadas na Figura 9. Com base neste resultado foi realizada a análise conjunta dos dados de ambos marcadores para melhor determinação da variabilidade genética.

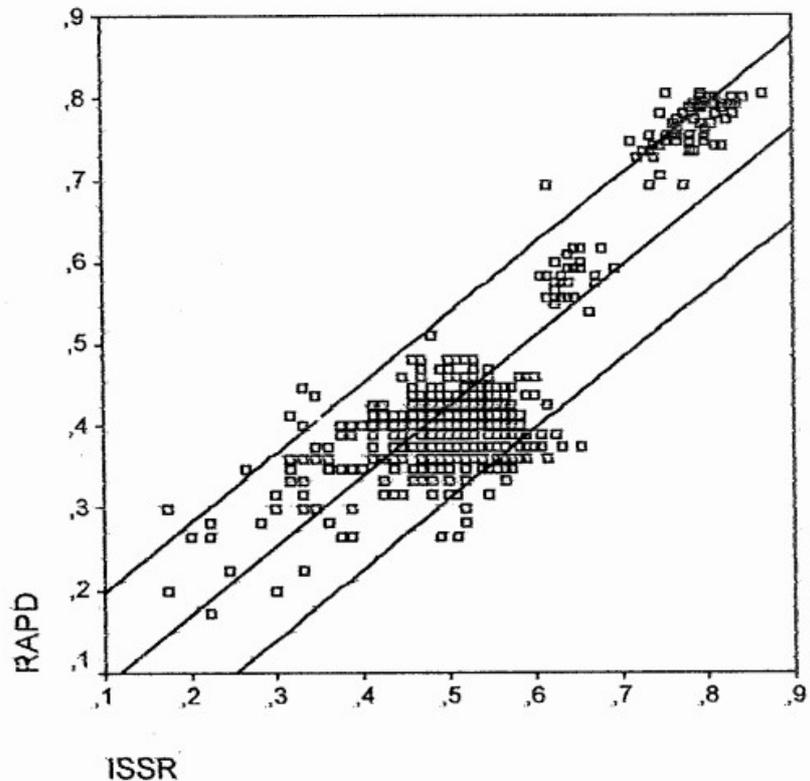


Figura 9. Relação entre as distâncias obtidas com marcadores ISSR e RAPD. A linha central representa a regressão linear e as linhas laterais à margem de confiança de 95%.

Assim como tinha sido evidenciado com cada um dos marcadores individualmente, a análise ANOVA dos dados conjuntos ISSR-RAPD em *C. spicata* mostrou que a variabilidade interpopulacional é significativamente maior do que a variabilidade intrapopulacional (Tabela 2). Tal resultado indica que as populações de *C. spicata* podem ser consideradas como conjuntos genéticos estruturados, com baixo fluxo gênico mesmo entre populações relativamente próximas. Resultados semelhantes foram observados em outras espécies nativas do Rio Grande do Sul e pertencentes ao mesmo gênero, *C. galioides* (FRACARO e ECHEVERRIGARAY, 2005) e *C. incisa* (AGOSTINI, 2003).

Tabela 2 - Análise de AMOVA dos dados conjuntos ISSR-RAPD em *C. spicata*.

	GL	SQ	QM	Est. Var.	Stat	Valor	Prob
Entre Regiões	1	6,689	6,689	0,099	PhiRT	0,031	0,050
Entre populações	8	41,640	5,205	1,036	PhiPR	0,331	0,010
Dentro de populações	20	41,959	2,098	2,098	PhiPT	0,351	0,010

Análise de agrupamento pelo método UPGMA considerando o conjunto dos dados dos dois marcadores utilizados (Figura 10), assim como ocorreu com os marcadores individuais, permitiu separar claramente três grupos: 1 - formado pelas 10 populações de *C. spicata*, 2 - formado pelo representante de *C. galioides*, e 3 - formado pelos representantes de *C. organoides* e *C. menthoides*.

As três espécies sul-americanas do gênero (*C. spicata*, *C. galioides* e *C. methoides*) pertencem à seção botânica “spicatae”. Já *C. organoides* originária da América do Norte, não está em principio enquadrada nesta seção. Os dados moleculares levantados, apesar de não conclusivos devido ao pequeno número de amostras por espécie e a ausência de outras espécies do gênero, indicam que *C. organoides* e *C. menthoides* formam um grupo. Tal agrupamento é evidenciado também pela comparação de características morfológicas.

No que diz respeito às populações de *C. spicata*, o dendograma da Figura 10 confirma a estruturação genética das populações mostra a ausência de agrupamentos definidos entre populações, mesmo nas duas regiões geográficas avaliadas. O único agrupamento estatisticamente significativo ocorreu entre as populações de Tainhas e de Vacaria, ambas pertencentes a região nordeste do Rio Grande do Sul.

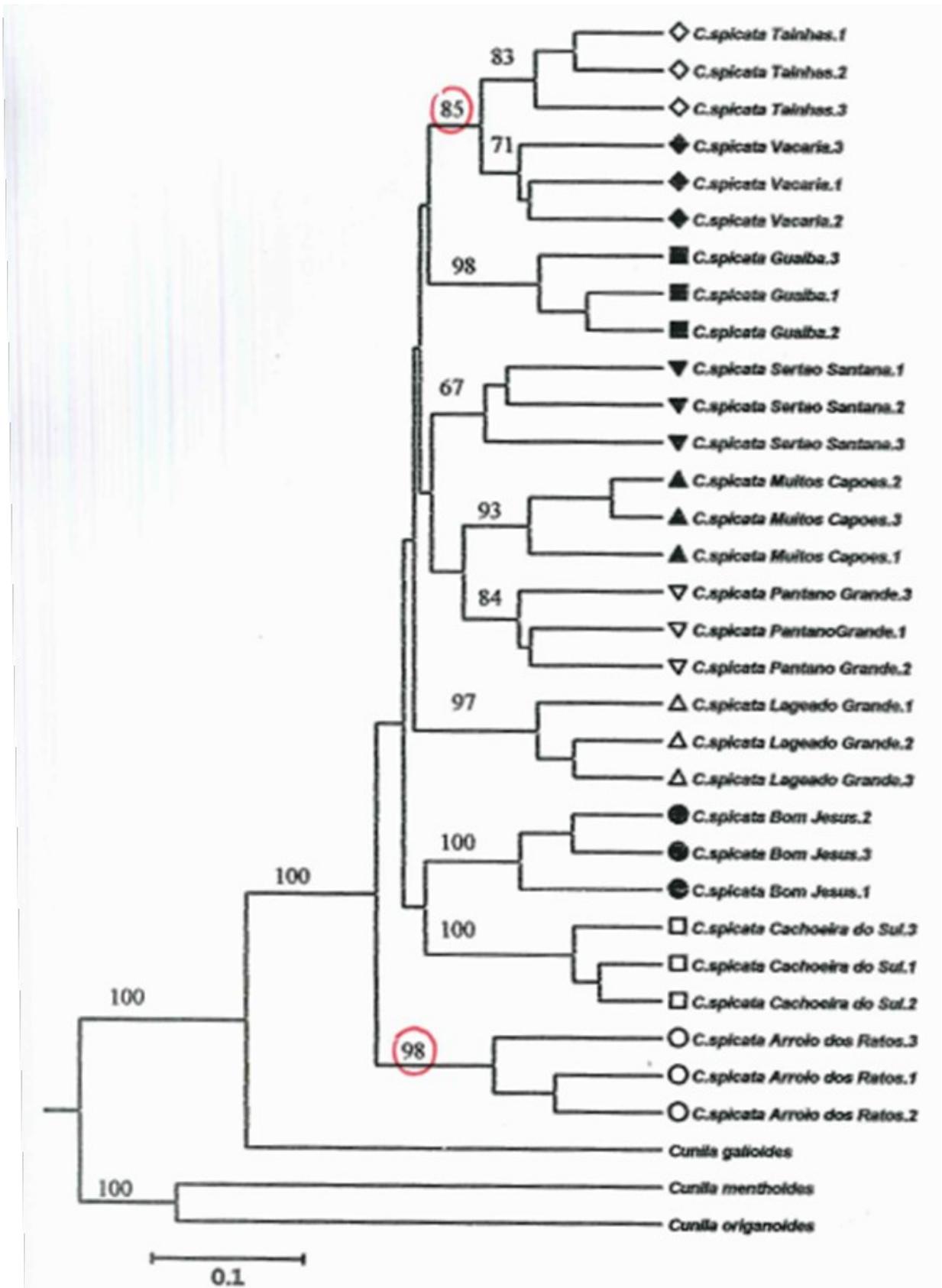


Figura 10. Dendrograma (UPGMA) baseado na análise conjunta de marcadores ISSR e RAPD em 10 populações de *C. spicata*, e representantes das espécies *C. galioides*, *C. menthoides* e *C. origanoides*.

Já a análise de componentes principais, apesar de representar unicamente 45% da variância total, mostra uma tendência de agrupamento entre as populações da região nordeste do Rio Grande do Sul. Esta tendência também foi detectada pela análise de ANOVA (Tabela 2), mas não é evidenciada na análise de agrupamento (Figura 10).

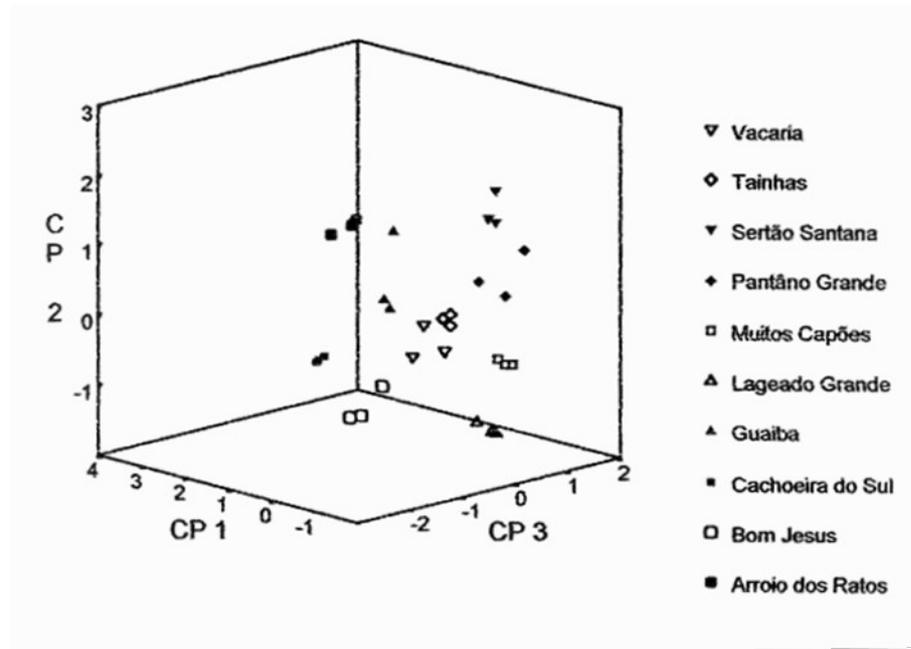


Figura 11. Análise de componentes principais em *C. spicata* baseada nos dados conjuntos dos marcadores ISSR e RAPD.

Os agrupamentos obtidos sugerem que as populações de *C. spicata* estavam previamente estabelecidas e com o passar do tempo, em virtude do crescente desenvolvimento e ação antrópica, tenham ocorrido formação de ilhas, as quais não possuem idade suficiente para que ocorra regionalização, tempo este que parece permitir apenas a caracterização das populações. No entanto, estudos com maior representatividade dentro das populações relacionadas às taxas de migração e distribuição alélica se fazem necessários para corroborar tais resultados.

4.2 VARIABILIDADE NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS DE DISTINTAS POPULAÇÕES DE *C. SPICATA* E A SUA RELAÇÃO COM A VARIABILIDADE GENÉTICA

C. spicata assim como a maior parte das espécies da família Lamiaceae apresentam elevado conteúdo de terpenóides. Estes compostos possuem importantes papel adaptativo com atividades inseticidas, bactericidas e fungicidas, atuando, também, como atrativos para polinizadores específicos, o que representa uma participação essencial no processo reprodutivo desses vegetais (COLE, 1992). Assim, sendo, o estudo de óleos essenciais se reveste de importância tanto do ponto de vista ecológico, como da sua aplicação para fins de produção de medicamentos e cosméticos.

Óleos essenciais de 10 populações de *C. spicata*, extraídos por hidrodestilação foram analisados por cromatografia gasosa com detector de massas (GC-MS) para identificação dos compostos presentes, e quantificados por cromatografia gasosa (GC), levaram a identificação de 22 compostos como pode ser visualizado na Figura 12 e Tabela 3. Destes compostos, o 1,8-cinzeol e o linalol podem ser considerados como compostos majoritários na maioria das populações avaliadas de *C. spicata* com uma média de 29,21% e 21,28%, respectivamente. O composto que apresentou maior concentração nas amostras analisadas foi o 1,8-cinzeol, na população de Lageado Grande como pode ser visto na Tabela 2.

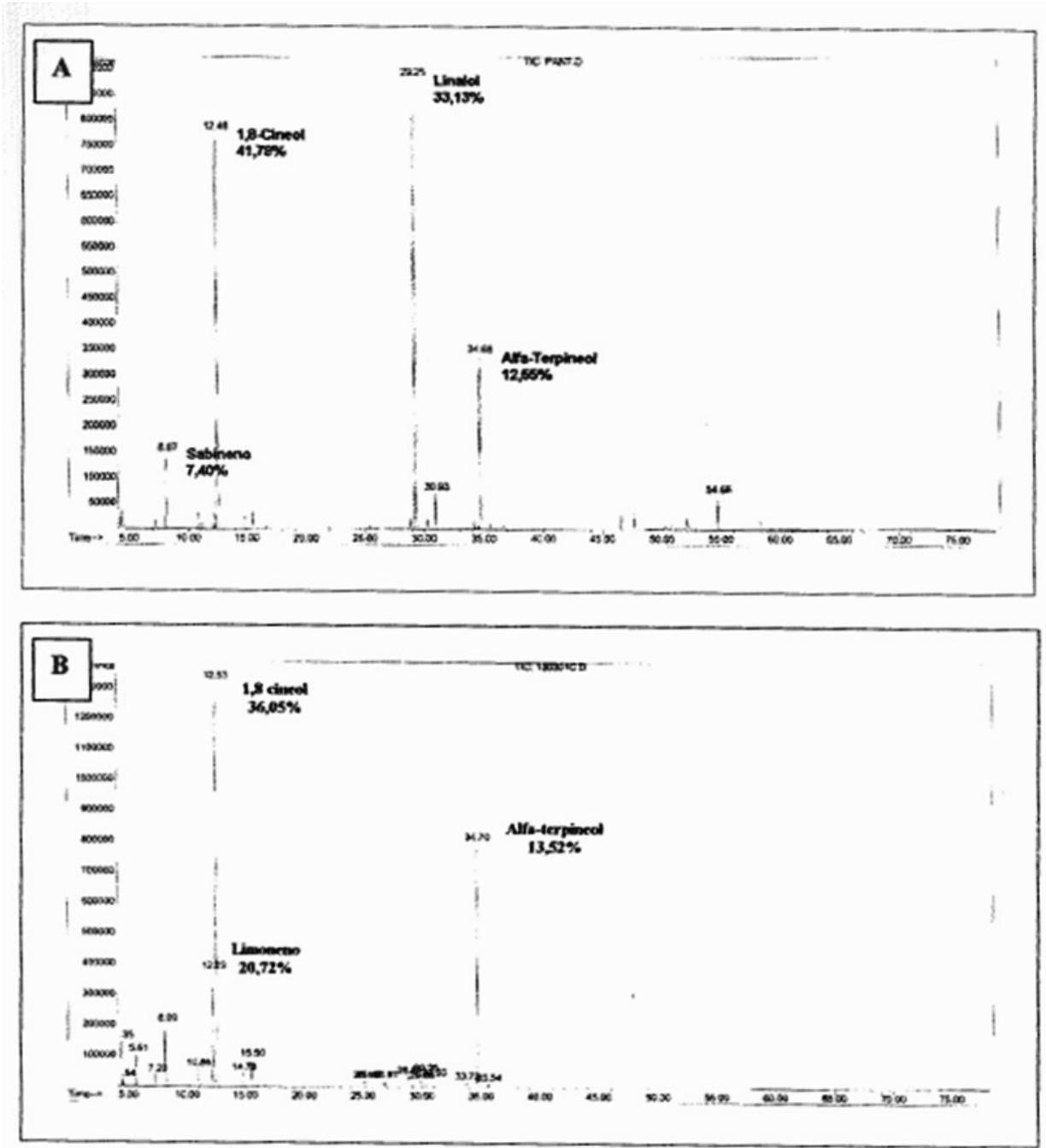


Figura 12. Perfis cromatográficos dos óleos essenciais obtidos por análise GC-MS nas amostras de Pântano Grande (A) e Vacaria (B), representando os dois quimiotipos.

O composto majoritário 1,8-cineol variou entre 56,71% (Lageado Grande) e 6,39% (Muitos Capões). Já o linalol e o limoneno apresentaram-se em concentrações mais elevadas nas populações de Sertão Santana (linalol- 51,78%) e Tainhas (limoneno- 24,47%, estando ausentes em outras

populações como Vacaria e Pântano Grande, respectivamente. Além destas, variações quantitativas importantes foram detectadas em vários compostos minoritários.

Os dados obtidos para algumas das populações estão dentro daqueles apresentados por van Baren et al., (2001), no que diz respeito à concentração de limoneno e linalol. Entretanto, nenhuma das amostras analisadas apresentou geranil acetato, e em compensação, a maior parte das amostras exibiu altas concentrações de 1,8-cineol.

Tabela 3 – Composição química percentual dos óleos essenciais de 10 populações de *C. spicata*

	Arroio dos	Bom Jesus	SulCachoeira	Guaíba	IndelLageado	CapõesMuitos	IndePântano	AntanaSertão	Tainhas	Vacaria
α-pineno	1,57	2,51	1,11	1,19	3,35	1,26	1,31	1,23	0,99	3,39
α-tujeno	0,00	0,29	0,00	0,00	0,56	0,42	0,00	0,25	0,00	0,48
canfeno	0,00	0,57	0,00	0,00	1,04	0,00	0,00	0,00	0,00	4,81
β-pineno	1,23	1,09	0,94	0,90	1,86	0,78	0,84	0,84	1,17	1,48
sabineno	5,47	7,34	5,43	4,78	6,56	2,11	6,49	8,01	4,77	4,44
mirceneno	1,12	1,21	1,11	1,23	1,94	1,24	1,21	0,71	0,99	1,07
α-fenantreno	0,00	0,99	0,00	0,29	0,76	1,80	1,00	0,29	0,00	0,20
limoneno	0,89	8,19	0,78	1,70	8,70	4,33	1,24	0,57	24,47	20,72
1,8 – cineol	38,26	14,80	35,41	34,9	56,71	6,39	36,7	23,64	9,22	36,05
				1			5			
γ-terpineno	0,50	2,15	0,00	0,52	2,38	3,14	0,97	0,56	1,56	0,97
p-cimeno	1,00	1,87	0,41	0,66	1,76	0,33	0,00	0,92	2,88	2,67
terpinoleno	0,00	0,34	0,00	0,00	0,41	0,63	0,00	0,00	0,38	0,27
t-sabinenohidrato	0,00	0,97	0,28	2,16	0,46	9,12	0,00	0,85	0,28	0,17
c-sabinenohidrato	0,00	5,27	0,00	0,22	0,00	1,75	0,00	0,14	0,42	0,00
linalol	41,49	20,73	34,96	30,8	1,31	0,35	29,2	51,78	2,10	0,00
				7			0			
acetato bornilo	0,00	1,34	0,00	0,00	0,89	0,00	0,00	0,73	0,00	3,19
Terpineno-4-ol	0,63	3,87	0,32	4,29	2,19	16,22	0,00	1,22	1,25	1,06
Não identificado	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	15,53	0,00	0,00	0,00	0,00
Germacreno	0,00	0,00	0,00	0,00	0,26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
α-terpineol	3,69	3,39	6,72	0,72	5,89	5,35	11,03	0,75	28,77	13,52
Acetato de Geranila	0,29	9,86	0,99	4,62	0,32	2,31	0,00	0,72	1,01	0,00
Acetato de nerila	0,61	3,08	4,87	4,67	0,65	19,16	0,00	0,46	1,17	0,00
	96,75	89,86	93,33	93,7	98,00	92,22	89,0	93,67	81,43	94,49
				3			4			

O perfil de constituintes químicos tem sido utilizado para confirmar a presença de raças geográficas, especialmente em amostras comerciais, para detectar hibridização entre populações naturais, e para caracterizar espécies. Assim sendo, para avaliar a relação entre as populações quanto a composição de óleos essenciais, plantas individuais das 10 populações foram extraídas e seus óleos submetidos a GC sendo a superfície dos picos estandardizadas e utilizadas no cálculo de distância Euclidianas médias. Estas distâncias foram utilizadas para a construção de um dendograma com base no algoritmo UPGMA apresentado na Figura 13.

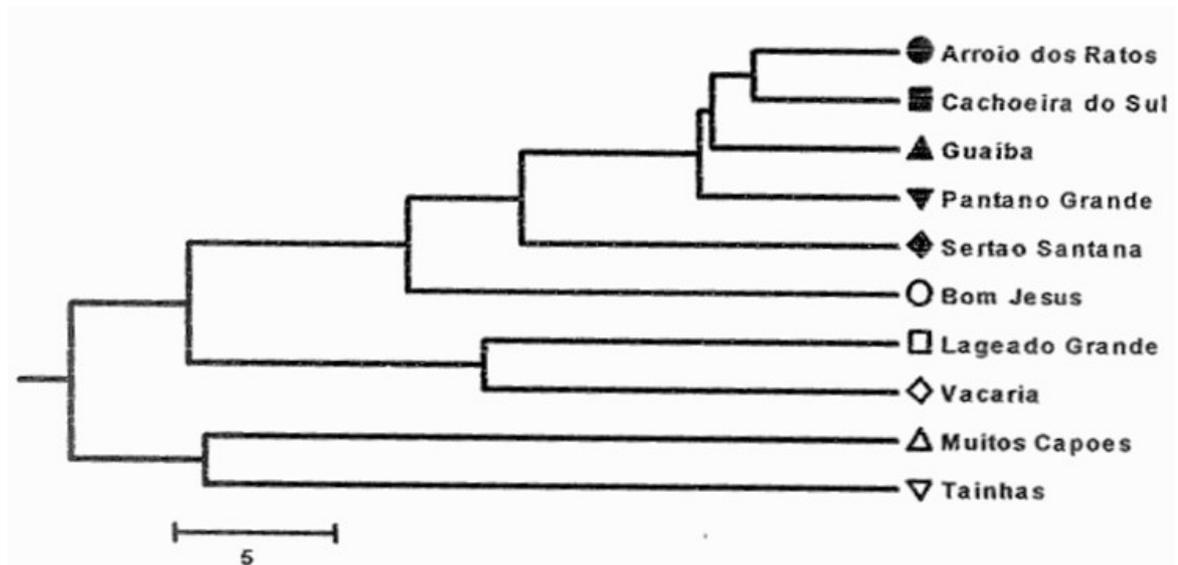


Figura 13. Dendograma baseado na composição química do óleo essencial das distintas populações de *C. spicata*

Como pode ser observado na Figura 13, as populações de *C. spicata* agruparam-se em 5 grupos quanto à composição química de seus óleos essenciais. O primeiro grupo foi formado por quatro populações (Arroio dos Ratos, Cachoeira do Sul, Guaíba e Pantano Grande), o segundo pela população de Sertão Santana, o terceiro pela população de Bom Jesus, o

quarto pelas populações de Lageado Grande e Vacaria, e o quinto pelas populações de Muitos Capões e Tainhas.

Considerando o dendograma como um todo, pode ser observada uma tendência de separação das populações pela região geográfica de origem. Tal separação foi estatisticamente confirmada pelo teste de Mantel.

O gráfico de dispersão (Figura 14) baseado nos três primeiros componentes principais que representam 74,23% da variância total, confirmando a separação das populações de *C. spicata* em dois grupos correspondentes as duas regiões amostradas.

Os componentes mais importantes para a discriminação foram o canfeno, terpinoleno, limoneno, α -terpineol e o linalol.

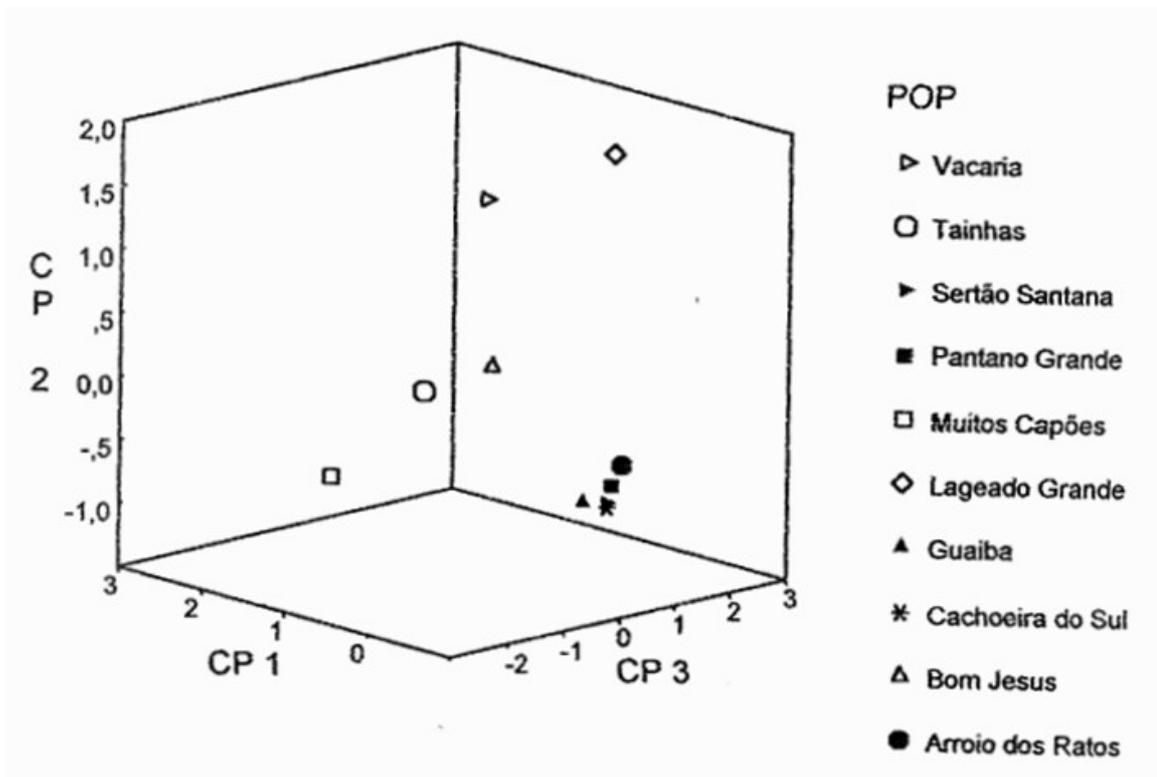


Figura 14. Distribuição das 10 populações de *Cunila spicata* com base nos três primeiros componentes principais

O primeiro grupo foi composto por cinco populações coletadas nas localidades de Muitos Capões, Vacaria, Bom Jesus, Tainhas e Lageado Grande, as quais caracterizaram-se pela baixa concentração de linalol, com exceção de Bom Jesus, fato esse que pode ser explicado por essa cidade se localizar no possível centro de dispersão da espécie, este fator pode ter como consequência uma maior variação na composição dos óleos das populações desta região. Esse grupo apresentou, também, uma maior concentração de α -terpineol e limoneno.

O segundo grupo foi composto por cinco populações coletadas nas localidades de Guaíba, Sertão Santana, Arroio dos Ratos, Pântano Grande e Cachoeira do Sul, apresentando uma alta concentração de linalol e baixas concentrações de limoneno e α -terpineol, sendo que um fator determinante para a separação desses grupos foi a completa ausência de canfeno e terpinoleno.

Além dos compostos citados, uma variação importante foi observada, também no outro componente majoritário, 1,8-cineol. Entretanto, as variações neste componente não apresentaram relação com os grupos formados.

Esses resultados sugerem a existência de quimiotipos distintos nestas duas regiões, um caracterizado pela elevada concentração de limoneno e α -terpineol, e uma baixa concentração de linalol (Figura 12 B), eo outro caracterizado pela baixa concentração de limoneno e α -terpineol, e uma alta concentração de linalol (Figura 12 A), além da ausência de canfeno e terpinoleno.

Em muitas plantas aromáticas e medicinais, tem-se descrito variações intraespecíficas na composição dos óleos essenciais, incluindo algumas espécies da família Lamiaceae, tais como *Thymus vulgaris* (GRANGER E PASSET, 1973), *Rosmarinus officinalis* (DELLACASA et al., 2001), *Salvia fruticosa* (SKOULA et al.,1999), *Ocimum gratissimum* (VIEIRA et al., 2001) entre outras.

Dentro do gênero *Cunila*, Bordignon et al., (1999) identificaram dois quimiotipos em *C. angustifolia*, um com alta concentração de sabineno (41,2%) e outro com oxido trans-piperitona (42,4%) como constituinte principal. Já em *Cunila galioides* Benth foram detectados três quimiotipos, o

primeiro com alta concentração de citral, com duas formas isoméricas: neral (28%) e geraniale (40,5%). O segundo com alta concentração de ocineno (33,05%) e o último com alta concentração de derivados de menteno (40,29%), (ECHEVERRIGARAY et al., 2001).

De acordo com Grella e Picci (1998), e Croteau e Gershenzon (1994) diferenças qualitativas, como existência de quimiotipos, são fundamentalmente de base genética, enquanto que variações quantitativas, como as observadas em *C.spicata*, podem ser atribuídas a fatores genéticos, fisiológicos e ambientais (edafológicos e climáticos).

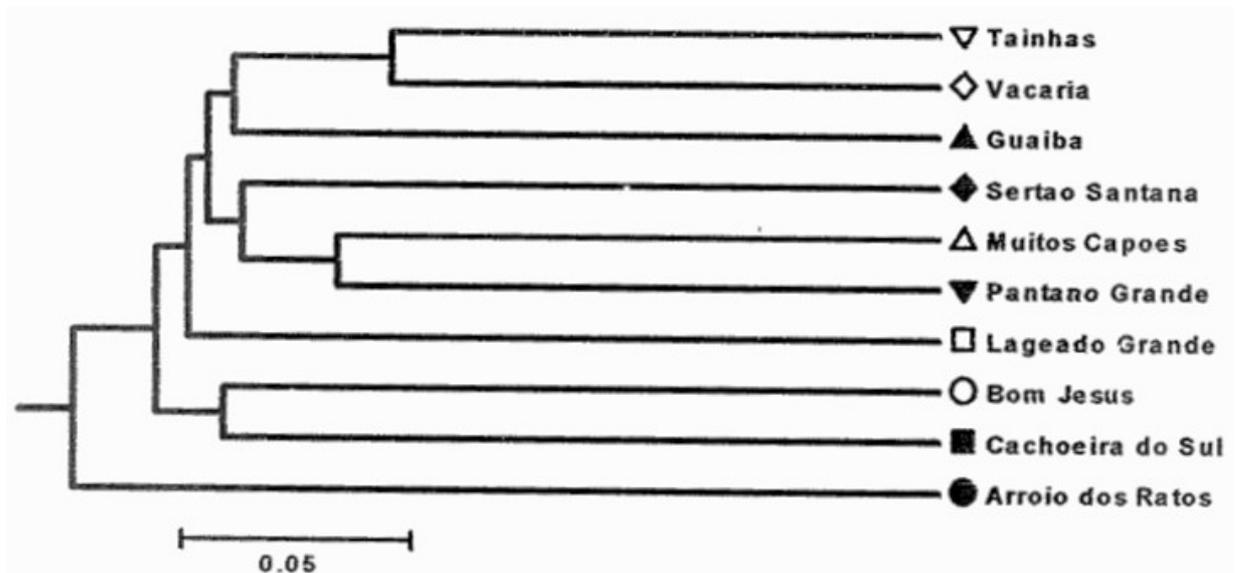


Figura 15. Dendrograma baseado na distância de Jaccard obtidas com base nos marcadores moleculares ISSR-RAPD

Uma comparação visual dos dendogramas apresentados nas Figuras 13 e 15, referentes às análises de agrupamentos baseadas na composição de óleos essenciais e em marcadores ISSR-RAPD, permite verificar que os agrupamentos são distintos, refletindo ausência de correlação entre as distâncias obtidas pela análise química e genética. Tal ausência de correlação foi confirmada por teste de Pearson.

Cabe lembrar, que apesar da capacidade discriminante na análise de óleos essenciais entre acessos, o uso de metabólicos secundários como marcadores intraespecíficos na avaliação de relações filogenéticas deve ser tomado com cautela, já que é influenciado por diversos fatores ambientais e experimentais, e apresenta efeito de pressão de seleção, de tal forma que

nem sempre reflete variações significativas ao nível do genoma. (VIEIRA et al., 2001).

A ausência de correlação entre as distâncias calculadas com base na composição química dos óleos essenciais e as distâncias genéticas baseadas em marcadores ISSR-RAPD, aponta no sentido de forte efeito de seleção para uma composição de óleo essencial específica na região sul, já que as populações das duas regiões apresentam uma base genética comum sem efeito de deriva (confirmado pela semelhança entre as médias de diversidade nas duas regiões amostradas), e a variabilidade química é significativamente maior na região nordeste do Rio Grande do Sul. Neste sentido, cabe lembrar que os óleos essenciais de plantas, apesar de não essenciais para a sobrevivência do organismo, participam em diversos processos biológicos atuando como antimicrobianos, inibindo a ação de predadores, estimulando e direcionando os polinizadores, fatores estes que podem influenciar nas frequências alélicas das populações levando à predominância de determinados quimiotipos em regiões distintas.

O maior desafio da conservação é a preservação da variabilidade genética para garantir os processos evolutivos (SOULÉ e SIMBERLOFF, 1986), já que em ambientes fragmentados há tendência à redução da variabilidade genética intrapopulacional resultante de baixa frequência de trocas gênicas interpopulacional, e conseqüentemente, aumento da vulnerabilidade genética das populações (DUBASH e FENSTER, 2000; OOSTERMEIJER et al., 2003).

Como um todo os resultados obtidos no presente trabalho mostram que as populações de *C. spicata* apresentam-se como entidades geneticamente distintas ou estruturadas com baixa relação geográfica, mas com quimiotipos distintos por região. As características agropastoris da região de ocorrência atual, aliadas à susceptibilidade demonstrada pela ausência desta planta na região das missões, aponta no sentido da necessidade de construção e manutenção de bancos de germoplasma “ex situ” e “in situ”. No caso de conservação “in situ”, a dinâmica e biologia das populações de *C. spicata* e a variabilidade genética da espécie permitem sugerir a formação de microreservas, ou áreas protegidas de pequena escala (1 a 2 ha), estratégia utilizada por Laguna et al., (1998) em plantas endêmicas, raras ou ameaçadas. Estas pequenas áreas apresentam vantagens em termos legais

e de manejo, complementando eventualmente áreas maiores de proteção a nível regional.

No que diz respeito a manutenção de bancos “ex situ”, visando conservação e utilização para programas de domesticação e melhoramento, a estrutura das populações de *C.spicata*, a ausência de agrupamentos genéticos, e a presença de quimiotipos indicam a possibilidade de formação de populações mistas representativas de cada quimiotipo. Tais populações permitiriam a manutenção da variabilidade genética, mantendo a individualidade química, e simplificando o gerenciamento e multiplicação do banco. Por outro lado, a tal estratégia de conservação implica na manutenção de populações numerosas e no monitoramento constante da variabilidade genética das populações.

5 CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos no presente trabalho podemos concluir que:

1. Os marcadores ISSR e RAPD geram resultados altamente correlacionados, o que permite a análise conjunta dos dados para obtenção de uma estimativa de variabilidade genética mais precisa.
2. Tanto marcadores ISSR como RAPD apresentam alta capacidade de discriminação permitindo a identificação inequívoca de todos os indivíduos analisados.
3. Os marcadores moleculares ISSR, RAPD e a análise conjunta de ambos permitem separar as amostras em três grupos formados: 1- pelas populações de *C. spicata*, 2- o representante de *C. galioides*, e 3- os representantes de *C. origanoides* e *C. menthoides*.
4. Os marcadores moleculares mostram que as populações de *C. spicata* são geneticamente estruturadas, mas representam um “pool” gênico único, não sendo possível a separação de grupos geneticamente distintos.
5. As populações avaliadas de *C. spicata* apresentam variações qualitativas e quantitativas no que diz respeito à composição dos seus óleos essenciais, sendo possível caracterizar dois quimiotipos: 1- com alta concentração de α -terpineol e limoneno e baixa concentração de linalol, e 2- com alta concentração de linalol e baixas concentrações de α -terpineol e limoneno.
6. As populações da região sul foram caracterizadas como pertencentes ao quimiotipo linalol, enquanto que as populações da região nordeste foram do quimiotipo α -terpineol – limoneno. Indicando relação entre composição química dos óleos e a origem geográfica.
7. Não foi evidenciada correlação entre as distâncias genéticas e químicas, indicando que a relação entre a composição química dos óleos e a origem geográfica está associada a pressão de seleção.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adzet, T., Granger, R., Passet, J., & San Martin, R. (1977). Le polymorphisme chimique dans le genre *Thymus*: sa signification taxonomique. *Biochemical Systematics and Ecology*, 5(4), 269-272.
- Agostini, G. (2003). Micropropagação, variabilidade química e genética em *Cunila incisa* Benth. Dissertação de mestrado. Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, RS. 72p.
- Bates, D. M. (1985). Plant utilization: patterns and prospects. *Economic Botany*, 39(3), 241-265.
- Bordignon, S. A., Schenkel, E. P., & Spitzer, V. (1997). The essential oil composition of *Cunila microcephala* and *Cunila fasciculata*. *Phytochemistry*, 44(7), 1283-1286.
- Bordignon, S. A., Schenkel, E. P., & Spitzer, V. (1998). The Essential Oil Composition of *Cunila platyphylla* Epling (Lamiaceae). *Acta Furm. Botlaeretlse*, 17(2), 143-146.
- Bordignon, S. A., Schenkel, E. P., & Spitzer, V. (1998). Essential Oil of *Cunila menthoides* Benthham (Lamiaceae). *Journal of Essential Oil Research*, 10(3), 317-320.
- Bordignon, S. A., Schenkel, E. P., & Spitzer, V. (1999). The essential oil composition of *Cunila angustifolia* (Lamiaceae). *Journal of Essential Oil Research*, 11(2), 145-148.
- Bornet, B., & Branchard, M. (2001). Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant molecular biology reporter*, 19(3), 209-215.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*, 32(3), 314-331.
- Burr, B., Evola, S., Burr, F., & Beckmann, J. (1983). The application of restriction fragment length polymorphism to plant breeding *Genetic engineering* (pp. 45-59): Springer.
- Ciccio, J. F., & Poveda, L. J. (1999). Volatile constituents of *Cunila polyantha* (Lamiaceae) from Costa Rica. A rich source of menthone. *Revista de biología tropical*, 47(3), 377-379.
- Coelho de Souza, G. (1997). Estudo Etnobotânico da Família Lamiaceae no Rio Grande do Sul, com ênfase na busca de espécies com propriedades anticonvulsivantes. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 167p.
- Cole, M. (1992). The significance of the terpenoids in the Labiatae. *Advances in labiate science*. Kew: Royal Botanic Gardens, Kew, 315-324.
- CORREA, P. (1974). M. Dicionário das plantas úteis e das exóticas cultivadas: Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal.
- Costa, A. (1994). *Farmacognosia*. 5 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1031p.
- Croteau, R., & Gershenzon, J. (1994). Genetic control of monoterpene biosynthesis in mints (*Mentha*: Lamiaceae) *Genetic engineering of plant secondary metabolism* (pp. 193-229): Springer.

- Dellacassa, E., Lorenzo, D., Moyna, P., Frizzo, C. D., Serafini, L. A., & Dugo, P. (1999). *Rosmarinus officinalis* L.(Labiatae) essential oils from the South of Brazil and Uruguay. *Journal of Essential Oil Research*, 11(1), 27-30.
- Di Stasi, L. C. (1996). *Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar*. Ed. da Universidade Estadual Paulista.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem bull*, 19, 11-15.
- Dudash, M., & Fenster, C. B. (2000). Inbreeding and outbreeding depression in fragmented populations. *CONSERVATION BIOLOGY SERIES-CAMBRIDGE-*, 35-54.
- Duke, J. (1994). *Biologically-active compounds in important spices*: Amsterdam: Elsevier Science BV.
- Echeverrigaray, S., Agostini, G., Atti-Serfini, L., Paroul, N., Pauletti, G., & Atti dos Santos, A. (2001). Correlation between the chemical and genetic relationships among commercial thyme cultivars. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(9), 4220-4223.
- Echeverrigaray, S., Fracaro, F., dos Santos, A. C. A., Paroul, N., Wasum, R., & Serafini, L. A. (2003). Essential oil composition of south Brazilian populations of *Cunila galioides* and its relation with the geographic distribution. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31(5), 467-475.
- Epling, C. (1936). Synopsis of the South American Labiatae. *Reportarium Specierum Nobarum regni Vegetalibus*. Beihefte II., 85, 97-192.
- Evans, W. C. (1991). *Farmacognosia: Interamericana-Mc Graw-Hill*, 13° ed, México.
- Ferreira, M., & Grattapaglia, D. (1996). Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. *Embrapa-Cenargem 2°ed.*, 11-53.
- Fracaro, F., Serafini, L. A., Santos, A. C. A. d., Paroul, N., Echeverrigaray, S., & Wasum, R. (2002). Analysis of the Essential Oil Composition of *Cunila galioides* Benth. *Journal of Essential Oil Research*, 14(5), 336-338.
- Fracaro, F., Zacaria, J., & Echeverrigaray, S. (2005). RAPD based genetic relationships between populations of three chemotypes of *Cunila galioides* Benth. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33(4), 409-417.
- Gepts, P. (1993). The use of molecular and biochemical markers in crop evolution studies *Evolutionary biology* (pp. 51-94): Springer.
- Ghariani, S., Trifi-Farah, N., Chakroun, M., Marghali, S., & Marrakchi, M. (2003). Genetic diversity in Tunisian perennial ryegrass revealed by ISSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50(8), 809-815.
- Godwin, I. D., Aitken, E. A., & Smith, L. W. (1997). Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis*, 18(9), 1524-1528.
- Granger, R., & Passet, J. (1973). *Thymus vulgaris* spontane de France: Races chimiques et chemotaxonomie. *Phytochemistry*, 12(7), 1683-1691.
- Grella, G., & Picci, V. (1988). Variazioni stagionali dell 'olio essenziale di *Salvia officinalis*. *Fitoterapia*, 59(2), 97-102.
- Guillén, M. D., & Cabo, N. (1996). Characterisation of the essential oils of some cultivated aromatic plants of industrial interest. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70(3), 359-363.
- Gupta, M., Chyi, Y.-S., Romero-Severson, J., & Owen, J. (1994). Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and applied genetics*, 89(7-8), 998-1006.
- Hay, R. K., & Waterman, P. G. (1993). *Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production*: Longman Scientific & Technical.

- Hedge, I. C. (1992). A global survey of the biogeography of the Labiatae. *Advances in labiate science*. Kew: Royal Botanic Gardens, Kew, 7-17.
- Herbert, R. B. (1989). *The biosynthesis of secondary metabolites* 2ed. London New York: Chapman & Hall.
- Hillis, D., Mable, B., & Moritz, C. (1996). Applications of molecular systematics: the state of the field and a look to the future. In D. Hillis, C. Moritz & B. Mable (Eds.), *Molecular systematics* (pp. 515-544). Sinauer Ass. Inc Sunderland MA.
- Holeman, M., Berrada, M., Bellakhdar, J., Hidrissi, A., & Pinel, R. (1984). Etude chimique comparative des huiles essentielles de *Salvia officinalis*, *S. aucheri*, *S. verbenaca*, *S. phlomoides*, *S. argenta*. *Fitoterapic*, 55, 38-42.
- Hoz, M. S. d. I., Davila, J., Loarce, Y., & Ferrer, E. (1996). Simple sequence repeat primers used in polymerase chain reaction amplifications to study genetic diversity in barley. *Genome*, 39(1), 112-117.
- Karp, A., Seberg, O., & Buiatti, M. (1996). Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. *Annals of Botany*, 78(2), 143-149.
- Kojima, T., Nagaoka, T., Noda, K., & Ogihara, Y. (1998). Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers. *Theoretical and applied genetics*, 96(1), 37-45.
- Laguna, L., Crespo, M. B., Lopez, S., Febregat, C., Serra, L., & al., e. (1998). *Flora endémica, rara o amenazada de la Comunidad Valenciana: Generalitat Valenciana, Conselleria de Medio Ambiete*.
- Litt, M., & Luty, J. A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American journal of human genetics*, 44(3), 398-401.
- Liu, B., & Wendel, J. F. (2001). Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. *Molecular Ecology Notes*, 1(3), 205-208.
- Lu, J., Knox, M., Ambrose, M., Brown, J., & Ellis, T. (1996). Comparative analysis of genetic diversity in pea assessed by RFLP-and PCR-based methods. *Theoretical and applied genetics*, 93(7), 1103-1111.
- Maciel, F., Gerald, L., & Echeverrigaray, S. (2001). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers variability among cultivars and landraces of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) of south-Brazil. *Euphytica*, 120(2), 257-263.
- Madyastha, K. M., & Raj, C. P. (1994). Effects of menthofuran, a monoterpene furan on rat liver microsomal enzymes, in vivo. *Toxicology*, 89(2), 119-125.
- Manns, D. (1993). New monoterpenes from *Cunila spicata*. *Planta medica*, 59(02), 171-173.
- Manns, D. (1995). Linalool and cineole type glucosides from *Cunila spicata*. *Phytochemistry*, 39(5), 1115-1118.
- Manns, D., & Hartmann, R. (1992). The constitution and configuration of Isocaryophyllen-13-al. *Planta medica*, 58(05), 442-444.
- Manns, D., & Hartmann, R. (1994). Monoterpene glucosides from *Cunila spicata*. *Planta medica*, 60(05), 467-469.
- MILACH, S. (1998). Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In S. MILACH (Ed.), *Marcadores moleculares em plantas* (pp. 17-28). Porto Alegre: UFRGS.
- Nagaoka, T., & Ogihara, Y. (1997). Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and applied genetics*, 94(5), 597-602.

- Oliveira Simoes, C. M., Auler Mentz, L., Schenkel, E. P., Irgang, B. E., & Stehmann, J. R. (1986). *Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: Brasil. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Oostermeijer, J., Luijten, S., & Den Nijs, J. (2003). Integrating demographic and genetic approaches in plant conservation. *Biological conservation*, 113(3), 389-398.
- Parsons, B. J., Newbury, H. J., Jackson, M. T., & Ford-Lloyd, B. V. (1997). Contrasting genetic diversity relationships are revealed in rice (*Oryza sativa* L.) using different marker types. *Molecular Breeding*, 3(2), 115-125.
- Peakall, R., & Smouse, P. (2001). *GenAlEx V5: Genetic Analysis in Excel*. Population genetic software for teaching and research [Internet]. [cited 2005 August]. Canberra, Australia: Australian National University.
- Putievsky, E., Ravid, U., Diwan-Rinzler, N., & Zohary, D. (1990). Genetic affinities and essential oil composition of *Salvia officinalis* L., *S. fruticosa* Mill., *S. tomentosa* Mill. and their hybrids. *Flavour and fragrance journal*, 5(2), 121-123.
- Ragot, M., & Hoisington, D. (1993). Molecular markers for plant breeding: comparisons of RFLP and RAPD genotyping costs. *Theoretical and applied genetics*, 86(8), 975-984.
- Rohlf, F. J. (1992). *NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system*. New York: Exeter Software.
- Rotgé, M. P. (1991). Cultivos de células y tejidos vegetales para la obtención de productos naturales (2ª Parte). *Fruticultura profesional*(42), 81-87.
- Santos, R. J. (2000). Metabolismo básico e origem dos metabolitos secundários. In C. M. O. e. Simões (Ed.), *Farmacognosia* (pp. 323-354). Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Shalaby, A., & Verzar-Petri, G. (1977). Essential oil production and formation of its constituents during ontogeny in *Achillea millefolium* L. ssp. *Collina* Becker. Paper presented at the I International Symposium on Spices and Medicinal plants 73.
- Shreve, R. N., & Brink, J. A. (1980). *Perfumes, aromatizantes e aditivos alimentares* *Indústrias de Processo Químicos* (pp. 396-413): Guanabara Dois.
- Simões, C., Falkenberg, M., Mentz, L. A., Schenkel, E., Amoros, M., & Girre, L. (1999). Antiviral activity of south Brazilian medicinal plant extracts. *Phytomedicine*, 6(3), 205-214.
- Simões, C., Schenkel, E., Gosnmann, G., Mello, J., Mentz, L., & Petrovick, P. (1999). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Editora da UFRGS.
- Simões, C. M. O. (1992). Etude de l'activite antivirale et des relations structure-activite de substances d'origine naturelle: plantes utilisees en medecine traditionnelle au sud du bresil, sapogenines et saponosides triterpeniques. *Université de Rennes 1*.
- Skoula, M., El Hilali, I., & Makris, A. M. (1999). Evaluation of the genetic diversity of *Salvia fruticosa* Mill. clones using RAPD markers and comparison with the essential oil profiles. *Biochemical Systematics and Ecology*, 27(6), 559-568.
- Smith, J., Kresovich, S., Hopkins, M., Mitchell, S., Dean, R., Woodman, W., Porter, K. (2000). Genetic diversity among elite sorghum inbred lines assessed with simple sequence repeats. *Crop Science*, 40(1), 226-232.
- Soule, M. E., & Simberloff, D. (1986). What do genetics and ecology tell us about the design of nature reserves? *Biological conservation*, 35(1), 19-40.

- Stuber, C. W. (1992). Biochemical and molecular markers in plant breeding. *Plant Breed. Rev*, 9, 37-61.
- Sur, S., Tuljupa, F., & Sur, L. (1991). Gas chromatographic determination of monoterpenes in essential oil medicinal plants. *Journal of Chromatography A*, 542, 451-458.
- Swofford, D. L., Olsen, G. J., Waddell, P. J., & Hillis, D. M. (1996). Phylogenetic inference. In D. M. Hillis, C. Moritz & B. K. Mable (Eds.), *Molecular systematics* (pp. 665p.).
- Tanksley, S. D. (1983). Molecular markers in plant breeding. *Plant molecular biology reporter*, 1(1), 3-8.
- Toursarkissian, M. (1980). *Plantas medicinales de la Argentina: sus nombres botanicos, vulgares usos y distribucion geografica*. Buenos Aires: Hemisferio Sur.
- van Baren, C. M., Muschiatti, L. V., Leo Lira, P. D., Coussio, J. D., & Bandoni, A. L. (2001). Volatile Constituents from Aerial Parts of *Cunila spicata*. *Journal of Essential Oil Research*, 13(5), 351-353.
- Vieira, R. F., Grayer, R. J., Paton, A., & Simon, J. E. (2001). Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29(3), 287-304.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., . . . Kuiper, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research*, 23(21), 4407-4414.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., & Meyer, W. (1995). *DNA Fingerprinting in Plants and Fungi*. CRC, Press. Boca Raton, USA.
- Welsh, J., & McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic acids research*, 18(24), 7213-7218.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*, 18(22), 6531-6535.
- Yang, W., de Oliveira, A. C., Godwin, I., Schertz, K., & Bennetzen, J. L. (1996). Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in Chinese sorghums. *Crop Science*, 36(6), 1669-1676.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20(2), 176-183.