

Avaliação da Diversidade Genética e Comparação com o Perfil Químico dos Óleos Essenciais em *Salvia* spp.

Lindomar Alberto Lerin¹, Jeferson Luis Cechet², Gabriele Gaiki³, Marcelo Malysz⁴, Morgana Carin Pierozan Maloz⁵, Altemir José Mossi⁶ e Rogério Luis Cansian⁷

Introdução

A sálvia pertence à família Lamiaceae, compreendendo cerca de 200 gêneros e 3.200 espécies distribuídas em todo o mundo [1]. De acordo com Serafini *et al.* [2], a família Lamiaceae inclui muitas plantas que produzem óleos essenciais como lavandas, mentas, alecrim, manjerição, dentre outras.

A qualidade dos fitoterápicos depende de muitos fatores entre eles o clima, solo, época de colheita da planta, cuidados no seu cultivo, além de suas características genéticas, para que a concentração do fitoterápico nos tecidos das plantas seja compatível com as exigências do mercado.

Para conhecermos melhor as características das plantas, precisamos conhecer seus princípios ativos e constituintes químicos, mas para isso, precisamos conhecer a variabilidade genética que é a fonte primária dos estudos genéticos.

O estudo da variabilidade genética é explorado na tentativa de se selecionar genótipos superiores. Estes dados são especialmente úteis quando associados a dados fenotípicos, tais como, resistência a doenças e pragas, qualidade e composição química, dentre outros.

Este trabalho teve como objetivo analisar a variabilidade genética usando marcadores RAPD de diferentes procedências de *Salvia officinalis* L. e de diferentes espécies de *Salvia* spp. e comparar com o perfil químico do óleo essencial obtido sobre as mesmas populações.

Material e métodos

No presente trabalho foram analisadas 16 populações de *Salvia*, cultivadas no Banco de Germoplasma da URI - Campus de Erechim (Tab. 1). Cada população foi representada por 10 plantas coletadas aleatoriamente para a formação de *bulks* representativos da população. As folhas coletadas foram imediatamente armazenadas em *freezer* à -80°C até a extração do DNA.

Para o isolamento de DNA total de cada planta foi utilizado o método descrito por Doyle e Doyle [3] modificado, a fim de otimizar o processo. Quantificação em espectrofotômetro UV a 260 nm e confirmação da

integridade e pureza em espectrofotômetro UV a 280 nm.

A amplificação foi realizada em termociclador (modelo PTC 100, MJ Research INC., Watertown, MA), utilizando a reação descrita por Williams *et al.* [4] e os *primers* (OPA-12, OPA-14, OPA-16, OPA-17, OPB-01, OPB-18, OPF-01, OPF-07, OPF-09, OPH-18, OPY-02, OPY-04, OPY-06, OPY-07, OPW-04, OPW-09, OPW-18) da Operon Technologies, avaliando-se a quantidade de bandas produzidas, a intensidade destas e o polimorfismo gerado pelas mesmas.

A separação eletroforética foi realizada em gel de agarose 1,4 % em cuba de eletroforese horizontal, com voltagem constante de 90 Volts. A coloração dos fragmentos realizada com brometo de etídio e a observação feita sob luz ultravioleta. Os géis foram fotografados pelo sistema fotográfico digital GEL-PRO (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

Na determinação da variabilidade genética, os dados formaram uma matriz que foi analisada com auxílio do programa computacional MVSP. O dendrograma de similaridade foi construído pelo algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages), utilizando-se o coeficiente de Jaccard. Os resultados genéticos foram avaliados considerando diferenças genéticas entre as 16 espécies de *Salvia* spp. e entre as *Salvia officinalis* e *Salvia* sp., e correlacionados com as diferenças químicas, analisadas por Maloz [5].

Resultados

Foram considerados para a análise 17 *primers*, onde foram observados 183 fragmentos na avaliação interespecífica com número médio de fragmentos por primer de 10,7, com polimorfismo de 91,2 %.

A similaridade (Coeficiente de Jaccard) entre as diferentes espécies de *Salvia* spp. estudadas variou entre 0,23 e 0,46 com média de 0,31.

O polimorfismo pode ser considerado alto quando comparado com outra espécie da mesma família. Em análises de variabilidade genética em 8 espécies de *Mentha* spp. foi

1. Lindomar Alberto Lerin é Bolsista de Iniciação Científica do Laboratório de Biotecnologia Vegetal – URI Campus de Erechim, Av 7 de Setembro, 1621, Caixa Postal 743, CEP: 99700-000. Erechim – RS, Brasil. E-mail: lindolerin@yahoo.com.br

2. Jeferson Luis Cechet é Bolsista de Iniciação Científica do Laboratório de Biotecnologia Vegetal – URI Campus de Erechim, Av 7 de Setembro, 1621, Caixa Postal 743, CEP: 99700-000. Erechim – RS, Brasil.

3. Gabriele Gaiki é Bolsista de Iniciação Científica do Laboratório de Biotecnologia Vegetal – URI Campus de Erechim, Av 7 de Setembro, 1621, Caixa Postal 743, CEP: 99700-000. Erechim – RS, Brasil.

4. Marcelo Malysz é Bolsista de Iniciação Científica do Laboratório de Biotecnologia Vegetal – URI Campus de Erechim, Av 7 de Setembro, 1621, Caixa Postal 743, CEP: 99700-000. Erechim – RS, Brasil.

5. Morgana Carin Pierozan Maloz é mestre em Biotecnologia pela Universidade de Caxias do Sul. Av 7 de Setembro, 1621, Caixa Postal 743, CEP: 99700-000. Erechim – RS, Brasil.

6. Altemir José Mossi é professor e pesquisador do Laboratório de Biotecnologia Vegetal – URI Campus de Erechim, Av 7 de Setembro, 1621, Caixa Postal 743, CEP: 99700-000. Erechim – RS, Brasil. E-mail: amossi@uri.com.br

7. Rogério Luis Cansian é professor e pesquisador do Laboratório de Biotecnologia Vegetal – URI Campus de Erechim, Av 7 de Setembro, 1621, Caixa Postal 743, CEP: 99700-000. Erechim – RS, Brasil. E-mail: cansian@uri.com.br

Anoio financeiro: FAPERGS e SC&T – RS.

encontrado um polimorfismo de 57,4 %, e similaridade de média de 0,68 (68 %) [6].

Na avaliação intraespecífica em *Salvia officinalis* e *Salvia* sp. foram observados 127 fragmentos e número médio de fragmentos por primer de 7,4, obtendo-se polimorfismo de 62,9 %. A similaridade (Coeficiente de Jaccard) entre as espécies de *Salvia officinalis* e *Salvia* sp. variou entre 0,49 e 0,91 com média de 0,70 (70 %).

As diferenças podem ser atribuídas às condições laboratoriais distintas, aos primers utilizados, mas principalmente ao rigor estabelecido na escolha dos fragmentos para análise no presente estudo.

Quando comparado o polimorfismo e a similaridade de *Salvia officinalis* e *Salvia* sp. encontrados neste trabalho com espécies da mesma família, podemos observar que o polimorfismo é menor aos encontrados por Martin & Bernejo [7] em *Rosmarinus tomentosus* Huber-Morath e Maire, que obtiveram um polimorfismo de 86 %. Mas é considerado alto quando comparado ao encontrado por Lerin *et al.* [6] que estudando 10 cultivares de *Ocimum basilicum* L., encontrou um polimorfismo interpopulacional de 26,1 % e obteve similaridade média de 0,9 (90 %). Ainda estudos com cultivares comerciais de *Ocimum basilicum* mostram uma alta similaridade em relação àquela encontrada em outras espécies do gênero, com pequenas diferenças quantitativas na concentração dos componentes majoritários do óleo essencial [8]. Analisando-se a **Fig. 1** pode-se observar que a análise de RAPD foi eficiente na separação das diferentes espécies analisadas, com coeficiente de similaridade inferior a 0,50 entre as mesmas. Observa-se também a formação de um agrupamento entre as populações caracterizadas como *S. officinalis* e *Salvia* sp., com similaridade superior a 0,70, indicando a possibilidade de as espécies de sálvia não determinadas serem também *S. officinalis*. Já a população S1 (*Salvia officinalis* de origem espanhola) apresentou menor similaridade genética em relação às demais populações de *S. officinalis* (0,52).

Comparando-se os resultados da análise genética com a análise do perfil químico (**Fig. 2**) realizado com as mesmas populações em *S. officinalis* e *Salvia* sp. [5], observa-se a mesma tendência de agrupamento, inclusive em relação aos subgrupos formados, mostrando que existe uma forte influência da base genética sobre a composição química, uma vez que todas foram cultivadas nas mesmas condições ambientais.

Skoula *et al.* [9] estudando populações de *Salvia fruticosa* Mill. constataram que a análise genética através de marcadores RAPD possibilitou a separação das populações em estudo e que o perfil genético correspondeu ao perfil químico. Mostraram também que em populações de regiões geográficas próximas a variabilidade genética é menor e com o distanciamento a tendência é aumentar as diferenças genéticas, porém mantendo o perfil químico do óleo.

Embora esta conclusão pareça explicar a alta diferença genética e baixa diferença no perfil químico encontrada na população S1 em relação às demais populações de *S. officinalis*, considera-se que seja insuficiente pois as demais populações de *S. officinalis*, embora comercializadas no Brasil, tem origem Européia e são importadas.

Uma possibilidade para este resultado é de que tenha ocorrido adaptações, intencionais ou naturais em relação às condições edafoclimáticas dos diferentes locais de cultivo, favorecendo alguns alelos em detrimento de outros de menor importância para a situação, porém sempre com seleção em relação ao perfil químico esperado para *S. officinalis*. Observações semelhantes foram feitas por Cansian [10], que observando grandes diferenças entre mesmos cultivares de *Brassica* sp. de diferentes procedências, atribuíram à necessidade de adaptação para cultivo em distintos locais ou em diferentes estações do ano, com flutuações climáticas importantes.

As diferenças genéticas das diferentes espécies (**Fig. 1**) foram confrontadas com as diferenças químicas (**Fig. 2**) nas espécies *S. officinalis* e *S. sclarea* L., mostrando a mesma tendência de separação. A espécie *S. lavandulifolia* Vahl, que apresenta um perfil químico mais próximo de *S. officinalis*, também se agrupou geneticamente mais próximo a esta do que as demais espécies.

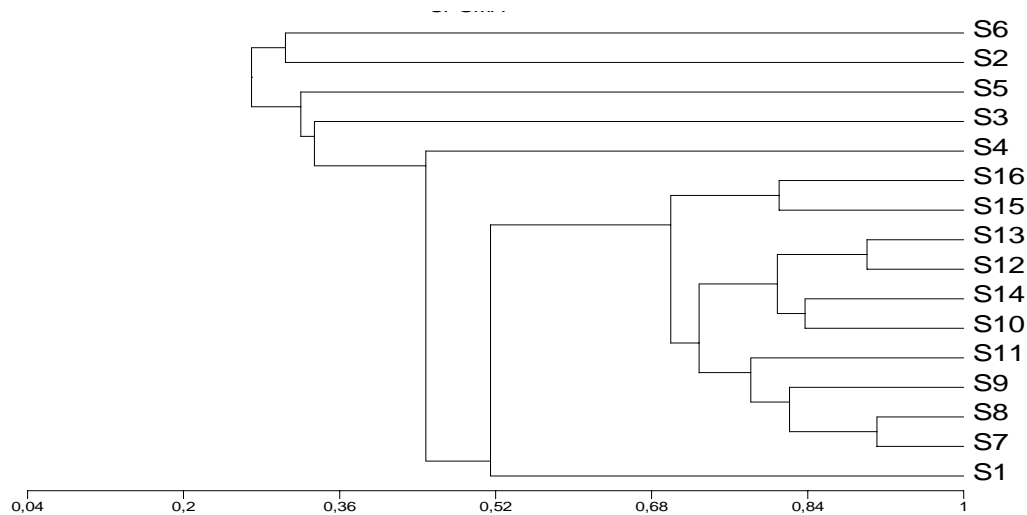
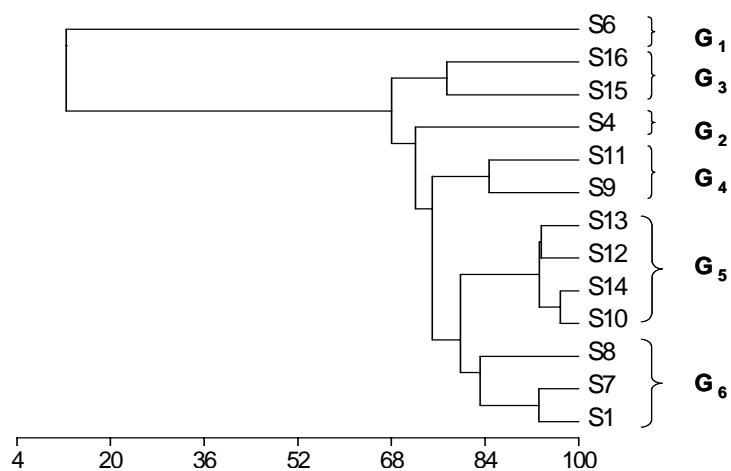
As espécies *S. pratensis* L., *S. verbenaca* L. e *S. argentea* L. não foram analisadas quimicamente por Maloz [5] sobre as mesmas populações, mas o perfil químico das mesmas também apresenta diferenças consistentes [11], correspondendo à análise genética (**Fig. 1**).

Referências

- [1] JOLY, A.B. 1998. *Introdução a Taxonomia Vegetal*. 12. ed. São Paulo: Nacional.
- [2] SERAFINI, L.A.; SANTOS, A.C.A.; TOUGUINHA, L.A.; AGOSTINI, G.; DALFOVO, V. 2002. *Extrações e aplicações de óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais*. Caxias do Sul: EDUCS.
- [3] DOYLE, J.; DOYLE, J.L. 1988. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Am J Bot.*, 75: 1238.
- [4] WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. 1991. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.*, 18: 6531 – 6535.
- [5] MALOZ, M.K.P. 2005. *Caracterização morfológica, avaliação agrônômica, química e da atividade antimicrobiana do óleo essencial de diferentes espécies exóticas do gênero Salvia*. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS.
- [6] LERIN, L.A.; GALLIANO, D.; CARVALHO, A.Z.; MICHELIN, S.; PAULETTI, G.F.; ROTA, L.; MOSSI, A.J.; LEONTIEV-ORLOV, O.; CANSIAN, R.L. 2005. Análise da variabilidade genética em diferentes cultivares de *Ocimum basilicum* L. e *Mentha* spp. usando marcadores RAPD. *Revista Perspectiva*, 105: 17 – 24.
- [7] MARTIN, J.P.; BERNEJO, J.E.H. 2000. Genetic variation in the endemic and endangered *Rosmarinus tomentosus* Huber-Morath e Maire (Labiatae) using RAPD markers (Random Amplified Polymorphic DNA). *Heredity*, 85(5): 434 – 43.
- [8] LOSQUIANO, K.P. 2003. *Estimativa da variabilidade genética em Ocimum basilicum L. através de marcadores RAPD*. Trabalho de Graduação, Universidade de Caxias do Sul Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS.
- [9] SKOULA, M.; 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.
- [10] CANSIAN, R.L., 1999. *Análise de RAPD aplicada à identificação de cultivares e avaliação da variabilidade genética em Brassica*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, RS.
- [11] THEN, M.; LEMBERKOVICS, E.; MARCZAL, G.; SZOKE, E.; MATHE, I.; BLUNDEN, G.; KERY, A. 2003. Proceeding of the international conference on medicinal and aromatic plants, Budapest, Hungary. *Acta Horticulturae*, 597: 143-148.

Tabela 1: Descrição das espécies e origem do material biológico.

Populações	Cód.igo	Origem
<i>S. officinalis</i> L.	S1	Espanha
<i>S. verbenaca</i> L.	S2	Espanha
<i>S. argentea</i> L.	S3	Espanha
<i>S.lavandulifolia</i> Vahl	S4	Espanha
<i>S. pratensis</i> L.	S5	Espanha
<i>S. sclarea</i> L.	S6	Espanha
<i>S. officinalis</i> L.	S7	Brasil / Caxias do Sul
<i>S. officinalis</i> L.	S8	Brasil / Caxias do Sul
<i>Salvia</i> sp.	S9	Brasil / Caxias do Sul
<i>Salvia</i> sp.	S10	Brasil / Caxias do Sul
<i>Salvia</i> sp.	S11	Brasil / Caxias do Sul
<i>Salvia</i> sp.	S12	Brasil / Campestre da Serra
<i>Salvia</i> sp.	S13	Brasil / Caxias do Sul
<i>Salvia</i> sp.	S14	Brasil / Campestre da Serra
<i>Salvia</i> sp.	S15	Brasil / Erechim
<i>Sálvia</i> sp.	S16	Brasil / Erechim

**Figura 1:** Dendrograma baseado na análise de agrupamento (UPGMA) de estimativa de similaridade genética (coeficiente de Jaccard) por RAPD em populações de *Salvia* spp..**Figura 2:** Dendrograma gerado a partir dos compostos químicos obtidos por Maloz [5].