



VARIABILIDADE GENÉTICA EM PLANTAS DO GÊNERO *Alternanthera*  
Forssk. (Amaranthaceae)

GENETIC VARIABILITY IN PLANTS OF THE GENUS *Alternanthera* Forssk.  
(Amaranthaceae)

Valmor João Bianchi<sup>1</sup>, Silvia Rubin<sup>2</sup>, Juliana de Magalhães Bandeira<sup>3</sup>, Elen Nunes Garcia<sup>4</sup>, José Antonio Peters<sup>5</sup>, Eugenia Jacira Bolacel Braga<sup>6</sup>

**RESUMO** - O gênero *Alternanthera* Forssk. é um importante representante da família Amaranthaceae e é popularmente conhecido por conter aminoácidos, flavonas glicosídeos, esteroides, saponinas, lipídios e vitaminas, os quais conferem às diversas espécies desse gênero, potencial uso medicinal. Devido às características genéticas próprias de cada genótipo, a mesma espécie pode apresentar indivíduos com diferenças morfológicas, assim como na sua constituição química. Assim, o estudo da variabilidade intra e interespecífica é importante para estabelecer uma relação genética inicial entre indivíduos para posteriores estudos das características fitoquímicas, visando identificar genótipos superiores que, independentemente de condições ambientais, apresentem um ganho em quantidade e qualidade do produto. O objetivo deste trabalho foi caracterizar molecularmente e avaliar a similaridade genética entre diferentes espécies do gênero *Alternanthera* [*A. philoxeroides* (Mart.) Griseb, *A. brasiliana* (L.) Kuntze, *A. dentata* (Moench) Stuchlik, *A. tenella* Colla e *A. sessilis* (L.) DC.], provenientes de diversas localidades, com marcadores moleculares RAPD. Dos 31 *primers* RAPD utilizados, todos apresentaram polimorfismos, mas somente o polimorfismo gerado com 14 *primers* foi considerado para o cálculo de similaridade genética. Dos 364 perfis eletroforéticos avaliados, 99% foram polimórficos. A similaridade genética estimada com base no coeficiente de Dice, variou de 0,06 entre os genótipos 6 (*A. philoxeroides*) e 10 (*A. sessilis*), porém foi de 1,00 entre os genótipos 3, 4 e 5 (*A. dentata*). A similaridade genética média entre os genótipos avaliados foi de 23% ( $r=0,99$ ). Pela análise do dendrograma de similaridade constatou-se a formação de seis subgrupos principais, os quais compreendem as espécies *A. dentata*, *A. philoxeroides*, *A. tenella*, *A. sessilis* e dois sub-grupos formados por acesso de *A. brasiliana*; provenientes de duas localidades distintas. Com base nos resultados conclui-se que a técnica de RAPD foi eficiente em revelar polimorfismo interespecífico e na caracterização eficaz dos acessos das diferentes espécies estudadas.

**Palavras-chave:** RAPD, plantas medicinais, similaridade genética.

**ABSTRACT** - The *Alternanthera* Forssk. is an important genus of the Amaranthaceae family and is popularly known to contain amino acids, flavones glycosides, steroid saponins, lipids and vitamins, which gives to various species of this genus, potential use as medicinal plants. Due to the specific genetic characteristics of each genotype, the same specie can provide

individuals with differences in morphology, as well as in their chemical constitution. Thus, the study of intra and interspecific variability is important to establish an initial genetic relationship between individuals for further study of phytochemical characteristics, to identify superior genotypes that regardless of environmental conditions, present a gain in quantity and quality of the product. The aim of this study was to characterize molecularly, with RAPD markers, and evaluate the genetic similarity between different species of the genus *Alternanthera* [*A. philoxeroides* (Mart.) Griseb., *A. brasiliiana* (L.) Kuntze, *A. dentata* (Moench) Stuchlik, *A. tenella* Colla and *A. sessilis* (L.) DC.] from various Brazilian places. Of the 31 RAPD primers assayed, all showed polymorphisms, but only the polymorphism generated with 14 primers were considered for the genetic similarity estimation. A total of 364 electrophoretic profiles were scored, and 99% were polymorphic. The genetic similarity estimated from the Dice coefficient varied from 0.06 between genotypes 6 (*A. philoxeroides*) and 10 (*A. sessilis*), but the similarity was 1.00 among genotypes 3, 4 and 5 (*A. dentata*). The average genetic similarity among the genotypes was 23% ( $r = 0.99$ ). Analyzing the similarity among genotypes in the dendrogram we found the formation of six major subgroups, which include the species *A. dentata*, *A. philoxeroides*, *A. tenella*, *A. sessilis*, and two subgroups composed by *A. brasiliiana* access comes from two different places. Based on the results we concluded that RAPD was efficient in revealing interspecific polymorphism and effective characterization of the accessions of different *Alternanthera* species.

**Keywords:** RAPD, medicinal plants, genetic similarity.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Alternanthera* pertence à família Amaranthaceae, compreendendo cerca de 170 gêneros e 2000 espécies, ocorrendo no Brasil 20 gêneros e 100 espécies (SOUZA; LORENZI, 2012). Dentre as espécies do gênero *Alternanthera* Forssk., as principais são *A. philoxeroides* (Mart.) Griseb., *A. brasiliiana* (L.) Kuntze, *A. tenella* Colla, *A. sessilis* (L.) DC. e *A. dentata* (Moench). (LORENZI; MATOS, 2002). *A. brasiliiana*, *A. tenella* e *A. philoxeroides* são descritas como herbáceas nativas, com ocorrência em todo o Brasil. Embora sejam consideradas indesejáveis em pastagens, culturas anuais e perenes, apresentam relevante importância como plantas medicinais, já comprovadas fitoquimicamente (LORENZI; MATOS, 2002), devido a presença de compostos biologicamente ativos como os triterpenoides, flavonoides, antraquinonas, cromoalcaloides, betaínas e betaciclinas, triterpenos e esteroides, com uma predominância de D7-esteroides como o principal metabólito secundário (SOUZA et al., 1998; SALVADOR; DIAS, 2004).

Mundialmente se tem constatado um aumento no consumo de fitoterápicos, com isso, os trabalhos na área de fitoquímica tem buscado intensivamente identificar moléculas produzidas por plantas, com atividade biológica, para uso no tratamento de inúmeras enfermidades (SALVADOR; DIAS, 2004).

. Nesse contexto, o Brasil é privilegiado pela grande biodiversidade de espécies vegetais que ocorrem ao longo de todo o seu território, que apresentam potencial de uso para extração de fitoterápicos (SOUZA et al., 2003). Devido a essa riqueza da flora Brasileira, o estudo da diversidade de gêneros e de espécies de uma determinada família de

plantas, ou mesmo da variabilidade intra e interpopulacional, é fundamental para identificar indivíduos ou populações de indivíduos com as melhores características de interesse, especialmente em se tratando de espécies com potencial para exploração econômica.

Considerando o uso de plantas para fins medicinais, a caracterização de linhagens, variedades ou quimiotipos tem grande importância, pois indivíduos de uma mesma população podem apresentar variabilidade no teor de metabólitos de interesse, devido à interação dos fatores genéticos e do ambiente (FRANÇA, 2004).

A caracterização da diversidade e variabilidade genética de populações de plantas com interesse medicinal, bem como a sua distribuição, é essencial para a conservação e uso de germoplasma, melhor compreensão de taxonomia, origem, evolução e seu nível de parentesco (RAO; HODGKIN, 2002). Entretanto, uma das principais limitações para a utilização de metabólitos de plantas como fonte de novos produtos farmacêuticos está relacionada à complexidade do processo de avaliação, identificação dos melhores acessos e por problemas relacionados à verdadeira identidade genética do material vegetal, causada por controvérsias de denominação, identificação e mistura varietal ou de acessos (NISBERT; MOORE, 1997).

A análise taxonômica, baseada principalmente nos caracteres morfológicos, é tradicional para a diferenciação e caracterização de plantas, entretanto, vários dos caracteres avaliados podem ser influenciados pelo ambiente, deixando dúvidas sobre a verdadeira identidade do material vegetal (BIANCHI; SANSAVINI; FACHINELLO, 2004).

A caracterização genética utilizando estratégias combinadas de análise resulta em maior eficácia para a elucidação da verdadeira identidade do material vegetal. Atualmente, os marcadores moleculares são ferramentas de grande auxílio e complementares na caracterização genética, pois são neutros, não sendo influenciados pelo ambiente (BIANCHI; SANSAVINI; FACHINELLO, 2004). Técnicas de marcadores moleculares baseadas na análise de ácidos nucléicos têm sido cada vez mais empregadas na caracterização de germoplasma vegetal, em auxílio aos estudos de evolução, taxonomia e de fingerprinting varietal para facilitar a diferenciação de genótipos, conservação e uso dos recursos genéticos de plantas (XU et al., 2002).

Dentre os marcadores moleculares baseados na análise direta do DNA, a técnica RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*) tem demonstrado ser efetiva na distinção de gêneros, espécies e cultivares (BANDEIRA et al., 2010). Embora seja um marcador dominante, tem como vantagens a rápida implementação em laboratório, não depende do conhecimento prévio do genoma da planta, gerando marcadores independentes de variações ambientais e, portanto, pode ser utilizado para análise de polimorfismo em

qualquer fase de desenvolvimento do material vegetal (RASUL et al., 2007). Marcadores do tipo RAPD também são usados para avaliar níveis de fluxo gênico entre espécies (ARNOLD et al., 1991) e a detecção da introgressão de genes em diversas plantas (CASTILLO et al., 1994).

Na literatura, existem algumas controvérsias sobre a existência de algumas espécies de *Alternanthera*, somado a isso, acessos disponíveis em diferentes locais apresentam problemas de identificação. Baseado no exposto, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar a ocorrência de variação intra e interespecífica de plantas do gênero *Alternanthera* provenientes de diferentes locais do Brasil, com utilização de marcadores do tipo RAPD em auxílio à análise taxonômica.

## MATERIAL E MÉTODOS

Na análise foram utilizadas plantas de três genótipos de *A. philoxeroides*, três de *A. dentata*, dois de *A. tenella*, um de *A. sessilis*, um de *A. brasiliana* e um de *Alternanthera* sp. (cuja identificação da espécie não estava definida). Os acessos estudados foram provenientes de diferentes localidades do Brasil, conforme descritos na Tabela 1.

**Tabela 1** – Acessos do gênero *Alternanthera* com suas respectivas denominações de espécie, coletadas em diferentes locais do Brasil, utilizadas na análise de similaridade genética

Genótipo	Espécie	Local de coleta	Município
G1	<i>A. brasiliana</i>	Fundação Zoobotânica	Porto Alegre, RS
G2	<i>Althernanthera</i> sp.	Praia de restinga	Palhoça, SC
G3	<i>A. dentata</i>	Farmácia Natureza	Florianópolis, SC
G4	<i>A. dentata</i>	Universidade de Joinville	Joinville, SC
G5	<i>A. dentata</i>	Universidade do Vale do Itajaí	Tubarão, SC
G6	<i>A. philoxeroides</i>	Praia do Cassino	Rio Grande, RS
G7	<i>A. philoxeroides</i>	Universidade Federal de Pelotas	Pelotas, RS
G8	<i>A. philoxeroides</i>	Universidade de Passo Fundo	Passo Fundo, RS
G9	<i>A. tenella</i>	Universidade de Passo Fundo	Passo Fundo, RS
G10	<i>A. sessilis</i>	Horto Municipal	Majé, RJ
G11	<i>A. tenella</i>	Horto Municipal	Majé, RJ

O DNA genômico foi extraído de aproximadamente 150 mg de folhas jovens completamente expandidas, utilizando-se o método CTAB 2% ( DOYLE; DOYLE, 1987). A quantificação do DNA foi por eletroforese em gel de agarose 0,8%, comparando a intensidade das bandas com marcador DNA  $\lambda$  Lambda/*Hind* III, e, posteriormente, diluído em água MilliQ para a concentração de 10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , para ser utilizado em reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para análise de RAPD.

Para a análise das diferentes espécies do gênero *Alternanthera*, foram empregados 31 *primers* decâmeros dos kits da Operon: OPA (01, 03, 04, 05, 07, 08), OPB (01, 04, 06, 10, 11, 18, 19, 20), OPAC19; OPF (07, 11), OPI07 e OPX (01, 04, 06, 07, 08, 09, 11, 13, 16, 18 e 20); e da British Columbia University – UBC (53 e 410).

As reações de amplificação foram conduzidas em um aparelho termociclador de marca MJ Research, Inc., modelo PTC-100, com o seguinte perfil térmico: o primeiro ciclo de 94°C por 2 min e 30 s, 36°C por 30 s e 72°C por 2 min; segundo ciclo repetido por 19 vezes, a 94°C por 20 s, 36°C por 15 s, 45°C por 15 s e 72°C por 2 min; o terceiro ciclo a 94°C por 30 s, 36°C por 15 s, 45°C por 45 s e 72°C por 2 min (repetido 18 vezes), e para finalizar um único ciclo de 72°C por 10 min.

As reações de PCRs foram realizadas em tubos de polipropileno de 0,2 mL contendo 2,5 µL de Tampão 10X (10mM Tris-HCl pH 9,5, 50 mM KCl), 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 180 µM de cada dNTP, 1,2 µM do *primer*, 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 20 ng de DNA genômico e água MilliQ esterilizada q.s.p. 25 µL. A reprodutibilidade dos produtos de amplificação foi testada por duas vezes utilizando DNA proveniente de duas extrações distintas para cada um dos genótipos analisados.

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5%, a 5 V cm<sup>-1</sup>, por cerca de 90 min. Após o gel foi imerso em solução de brometo de etídeo (5 µg mL<sup>-1</sup>) durante 30 min, seguido da visualização das bandas em luz UV e fotodocumentado com auxílio de um sistema de captura de imagens modelo E-BOX-100 – marca Vilber Lourmat.

Os fragmentos amplificados em cada perfil foram registrados e classificados como presentes (1) e ausentes (0), formando uma matriz de dados binários. A similaridade genética entre acessos foi estimada pelo coeficiente de Dice (NEI; LI, 1979). Com base na matriz de similaridade, a análise de agrupamento foi realizada pelo método das distâncias genéticas médias (UPGMA – Unweighted Pair-Group Method With Arithmetic Means) para posterior elaboração do dendrograma utilizando o software NTSYSpc versão 2.1 (ROHLF, 2000). Os dados de agrupamento foram utilizados para o cálculo de uma matriz cofenética, a fim de verificar a representatividade do dendrograma em relação aos dados de similaridade, medido pelo coeficiente de correlação “r”.

Para inferir a confiança de cada agrupamento representado no dendrograma, a análise de *Bootstrapping* foi realizada com 1.000 repetições, utilizando o software Winboot (YAP; NELSON, 1996).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

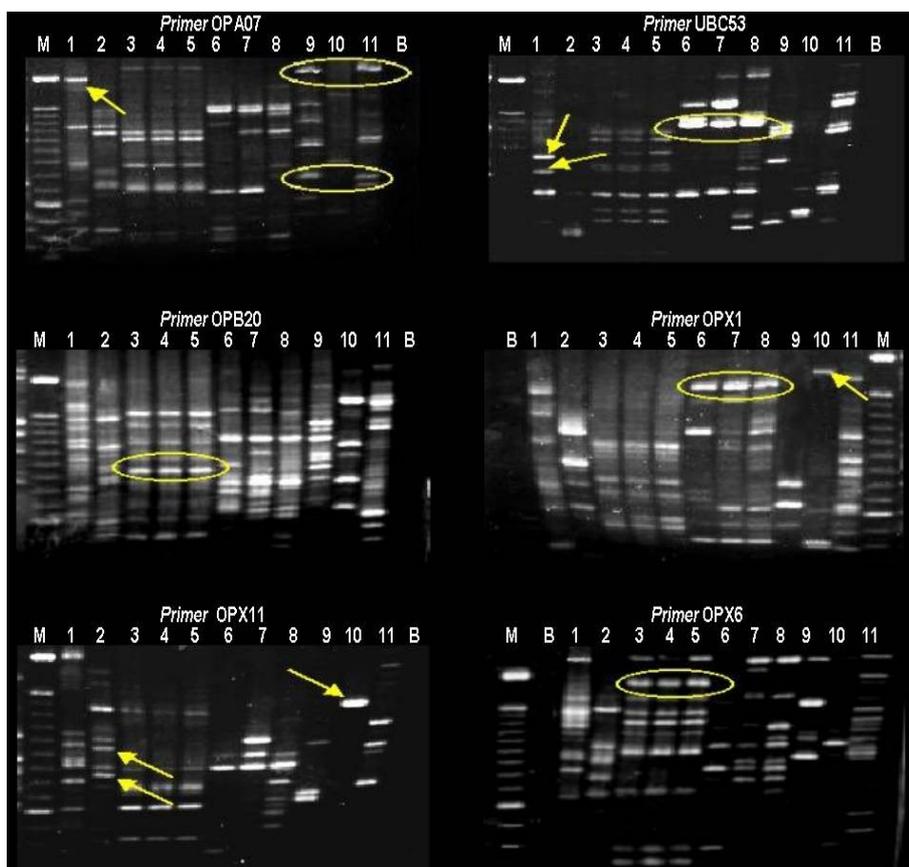
Dos 31 *primers* RAPD utilizados para a análise molecular, todos apresentaram polimorfismo, porém apenas os dados gerados por 14 deles foram considerados para o cálculo de similaridade genética entre os acessos (Tabela 2), por apresentarem maior nitidez, repetibilidade e número das bandas amplificadas e polimórficas.

**Tabela 2** - Dados de polimorfismos obtidos com 14 *primers* de RAPD empregados na análise molecular de 11 acessos de plantas do gênero *Alternanthera spp.*

<i>Primer</i>	Nº de fragmentos amplificados	Nº de bandas únicas	Nº de polimorfismos	Porcentagem de polimorfismo
OPA07	24	7	24	100%
UBC53	26	8	26	100%
OPI07	25	12	25	100%
UBC410	25	12	25	100%
OPA01	33	7	31	94%
OPB18	37	12	37	100%
OPB20	33	9	33	100%
OPB4	31	13	31	100%
OPA4	16	5	16	100%
OPB10	27	11	27	100%
OPX1	23	11	23	100%
OPX11	20	9	20	100%
OPX20	16	7	16	100%
OPX6	25	5	24	96%
Total	361	128	358	
Média	25,8	9,14	25,57	99%

Os 14 *primers* RAPD produziram um total de 361 fragmentos nos 11 genótipos analisados, destes, 358 (99,16%) foram polimórficos. O número de fragmentos amplificados com cada um dos *primers* variou de 16 (OPA4 e OPX20) a 37 (OPB18), com uma média de 25,57 polimorfismos, sendo considerado alto para apenas 11 acessos analisados (Tabela 2), o qual se deve principalmente ao fato da análise estar sendo conduzida com acessos de diferentes espécies, sendo um indicativo da existência de alta diversidade genética interespecífica dentro do gênero *Alternanthera*.

Dentre o conjunto de acessos analisados com cada *primer*, todos tiveram mais de uma banda amplificada por genótipo, exceto o acesso G10, que na reação com o *primer* UBC410, não apresentou amplificação. Dos 361 perfis eletroforéticos polimórficos produzidos, 128 bandas apresentaram-se como bandas únicas ou exclusivas para um determinado acesso, com uma média de 9,14 bandas únicas por acesso (Tabela 2). Alguns produtos da amplificação estão representados na Figura 1, onde se observa que as bandas variaram entre  $\pm 300$  a  $\pm 2.300$  pb, estando salientadas bandas únicas detectadas em cada espécie.



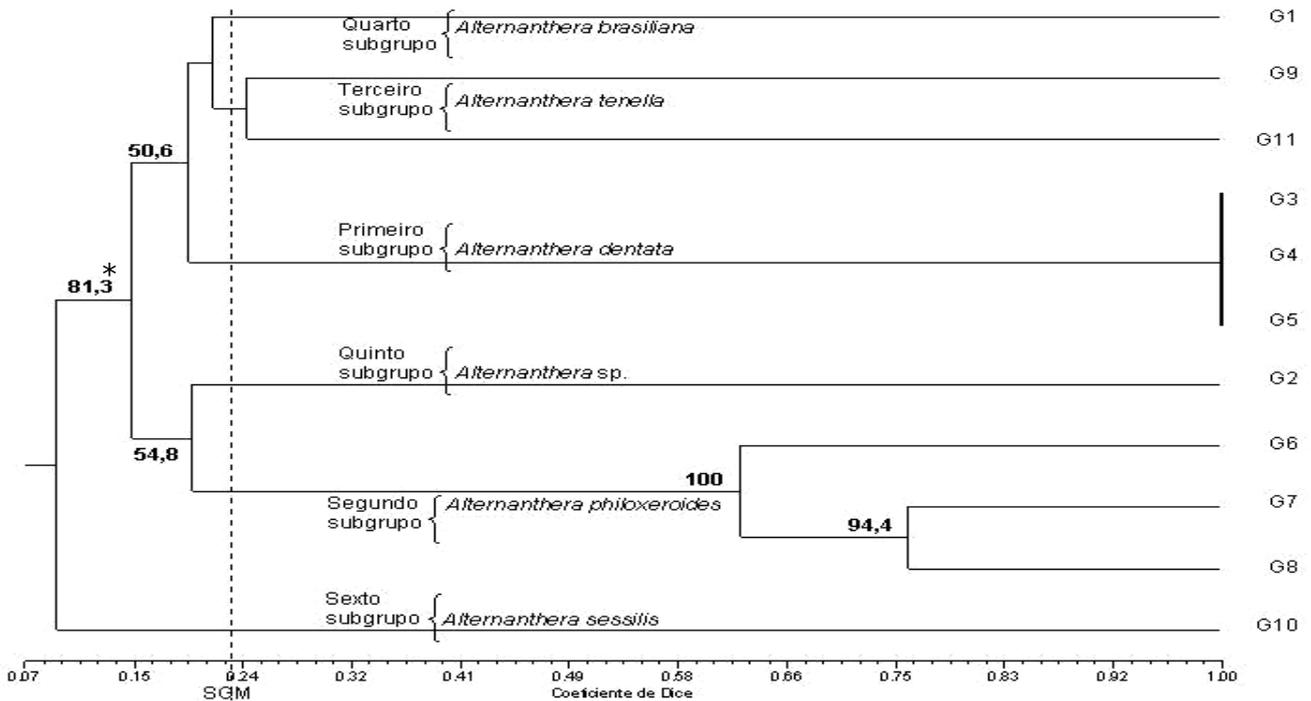
**Figura 1** – Perfil eletroforético de 11 acessos do gênero *Alternanthera* spp., gerados com marcadores RAPD. (B – prova em branco); M – marcador molecular DNA Ladder 100pb; G1- *Alternanthera brasiliensis*; G2- *Alternanthera* sp.; G3-G5- *A. dentata*; G6-G8- *A. phyloxeroides*; G9 e G11- *A. tenella*; G10- *A. sessilis*.

A similaridade genética estimada pelo coeficiente de Dice (NEI; LI, 1979) variou de 0,06 entre os acessos G9 e G10, até 1,00 entre G3, G4 e G5, que não apresentaram polimorfismo entre si (Tabela 3). O ponto médio de corte foi de 0,23, permitindo a identificação de seis subgrupos (Figura 2), a grande maioria deles, formado pelas respectivas espécies identificadas na análise taxonômica dos acessos.

**Tabela 3** - Valores de similaridade genética entre 11 acessos de *Alternanthera*, calculados com o coeficiente de Dice, a partir dos polimorfismos gerados por 14 primers RAPD

G1	1.00										
G2	0.17	1.00									
G3	0.20	0.13	1.00								
G4	0.20	0.13	1.00	1.00							
G5	0.20	0.13	1.00	1.00	1.00						
G6	0.14	0.15	0.10	0.10	0.10	1.00					
G7	0.19	0.23	0.13	0.13	0.13	0.68	1.00				
G8	0.21	0.21	0.19	0.19	0.19	0.57	0.76	1.00			
G9	0.24	0.17	0.18	0.18	0.18	0.11	0.16	0.21	1.00		
G10	0.13	0.13	0.07	0.07	0.07	0.06	0.08	0.10	0.06	1.00	

G11	0.19	0.19	0.22	0.21	0.21	0.13	0.15	0.16	0.24	0.16	1.00
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11



**Figura 2** - Dendrograma de similaridade genética obtido pelo método UPGMA com polimorfismos de 14 *primers* RAPD, analisando-se acessos do gênero *Alternanthera* provenientes de diferentes localidades do Brasil. \*Valores de *bootstrap*.

No dendrograma de similaridade, o primeiro subgrupo incluiu os genótipos G3, G4 e G5 com coeficiente de semelhança de 100%, representando *A. dentata*. Mesmo as coletas tendo sido realizadas em locais diferentes [Florianópolis/SC (G3), Joinville/SC (G4) e Tubarão/SC (G5)], não se verificaram variabilidade entre estes acessos, sendo um indicativo de que se trata de material propagado vegetativamente, ou seja, são clones.

Muito embora Lorenzi; Matos (2002) citem que *A. dentata* é também identificada como *A. brasiliana*, os dados obtidos nesse trabalho comprovaram que se trata de genótipos com perfil molecular diferente, e, portanto, existe esta variabilidade de espécies, o qual também foi comprovada pelas análises morfológicas e anatômicas conduzidos por Pereira et al. (2008).

O segundo subgrupo é formado pelos genótipos G6, G7, G8 que apresentaram similaridade genética variando de 0,57 entre G6 e G8 e de 0,76 entre G7 e G8, representando a espécie *A. philoxeroides*, que na análise de bootstrap obteve-se confiança no agrupamento superior a 94% (Figura 2), sendo possível a fácil diferenciação em relação aos acessos das demais espécies com os marcadores RAPD, conforme pode ser observado na Figura 1.

O terceiro subgrupo é representado pelos genótipos G9 e G11, identificados como *A. tenella*, cujos acessos foram coletados em Passo Fundo-RS e em um viveiro do município de Majé-RJ, respectivamente. Com base nos dados moleculares gerados pelos 14 *primers* de RAPD, constatou-se que dos 165 perfis amplificados entre esses dois genótipos, no geral, 20 (12%) foram comuns entre os mesmos. A baixa similaridade genética revelada entre os dois genótipos (0,24) pode ser atribuída ao fato de G9 tratar-se de um genótipo coletado em ambiente natural (silvestre), enquanto G11 é um genótipo que já vem passando por processo de cultivo, não se sabe bem há quanto tempo e, possivelmente, tenha passado por algum processo de seleção, justificando a variabilidade entre estes exemplares. Além disso, essa variabilidade genética pode estar relacionada às adaptações destas plantas a diferentes habitats de cultivo. Wu et al. (2005) estudando as relações genéticas de 70 acessos de *Houttuynia* Thunb., das províncias de Sichuan, Chongqing, Guizhou e de Jiangsu na China, verificaram pela análise de agrupamento, baseada em dados de marcadores RAPD e ISSR, que a variabilidade genética entre acessos provenientes de áreas montanhosas e da margem da Bacia de Sichuan foi mais abundante do que ao fundo da Bacia e seus altiplanos circunvizinhos ou colinas.

Na Figura 2 ainda é possível verificar que o acesso do quarto subgrupo (G1) apresenta um coeficiente de similaridade próximo a 21,5% em relação aos acessos do terceiro subgrupo (G9 e G11), permitindo inferir a existência de maior proximidade filogenética entre as espécies *A. brasiliiana* e *A. tenella*, em relação os genótipos de *A. brasiliiana* e *A. dentata*.

O quinto subgrupo inclui somente o acesso G2, que foi identificado como *Alternanthera* sp., no momento da coleta e mesmo após análise morfológica não se chegou a um consenso sobre a espécie que realmente pertence. Baseado nos dados moleculares, sugere-se que este acesso pertence à espécie *A. philoxeroides*, ou se trata de uma acesso de uma das espécies de *A. brasiliiana*, *A. dentata* ou *A. tenella*, uma vez que apresenta similaridade genética similar entre os acessos dessas referidas espécies.

O sexto subgrupo é constituído unicamente pelo genótipo G10, representante da espécie *A. sessilis*

(Figura 2), conhecida popularmente como violácea ou rubra, é uma planta invasiva de áreas agrícolas, nativa do Brasil. Nesta planta tem sido cientificamente comprovado a presença de componentes químicos como  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol. As folhas são usadas em doenças dos olhos, em cortes e feridas; antídoto para picada de cobra e picada de escorpião, em doenças de pele (JALALPURE et al., 2008) e também foi identificado poder antioxidante (SHYMALA et al., 2005). Além da análise de similaridade genética e de agrupamento, estimou-se o coeficiente de correlação ( $r=0,99$ ), utilizando 1.000 permutações,

demonstrando existir um alto grau de representatividade entre a matriz de similaridade e os dados do dendrograma.

Com os resultados obtidos no presente trabalho, verifica-se que é possível uma eficiente diferenciação de acessos intra e interespecíficos de plantas do gênero *Alternanthera*. Utilizando marcadores RAPD, Fico et al. (2003) conseguiram diferenciar acessos e estimar a diversidade genética entre *Aconitum vulparia* Rchb., *A. paniculatum* Lam., *A. napellus* ssp *tauricum* Wulfen (de duas localidades diferentes), e *A. napellus* ssp. *neomontanum* Wulfen, as quais são plantas com importantes propriedades medicinais, assim como *Alternanthera* spp. Na análise de 20 acessos de *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae), Pinheiro et al. (2003) estimaram a proporção da variabilidade genética entre três grupos de acessos, quanto à origem de coleta, demonstrando o eficiência de uso de marcadores RAPD em estudos de caracterização e estimativa de variabilidade genética intra e interespecífica de plantas.

Na análise da diversidade intraespecífica de acessos de melão amargo (*Momordica charantia* L.), uma Cucurbitaceae com consideráveis valores medicinais e nutricionais, Dey et al. (2006) registrou polimorfismo a partir de 36,5% dos 208 *primers* RAPD utilizados, o qual foi suficiente para estimar a distância genética entre acessos que foi de 0,07 a 0,5, sugerindo uma ampla base genética.

Resultados de agrupamento e similaridade genética, entre populações de uma mesma espécie, semelhantes aos obtidos neste trabalho para *A. philoxeroides* (G6, G7 e G8), também foram obtidos por Sarkhosh et al. (2006) em 24 genótipos de romã iraniano (*Punica granatum* L.), revelando uma similaridade genética média de 60% , dividindo os genótipos em quatro grupos distintos, com coeficiente de correlação de 90%. A ampla variabilidade genética entre plantas de uma mesma espécie também foi observada por Yu et al. (2003), na análise das relações e variações intraespecíficas de *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. ex Maxim.) Maxim. (*Acanthopanax senticosus* (Rupr. ex Maxim.) Harms). Com base nestes dados, comprova-se que estudos sobre a variabilidade genética de plantas com marcadores moleculares constituem importante ferramenta para auxiliar no conhecimento da estrutura das populações naturais, bem como, para identificar genótipos com as melhores características para formar bancos de germoplasma e representar ao máximo a variabilidade das espécies de interesse (FRANÇA, 2004).

Existe grande número de trabalhos na literatura que tratam da análise da diversidade genética de plantas com uso de marcadores moleculares, a exemplo dos trabalhos realizados usando a técnica RAPD em *Cymbopogon* spp., consideradas plantas aromáticas e medicinais (KHANUJA et al., 2005), em espécies do gênero *Cimicifuga* (XU et al., 2002) e

em *Chrysanthemum x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura, importante planta medicinal e ornamental (BHATTACHARYA et al., 2006; CHATTERJEE et al., 2006). Usando RFLP e RAPD, Watanabe et al. (1998) estudaram a diversidade genética entre plantas medicinais do gênero *Angelica* L.; com marcadores RAPD e ISSR, Dangi et al. (2004), estudaram a diversidade genética em espécies do gênero *Trigonella* L..

Estudos da variabilidade genética inter e intraespecífica são fonte para geração de dados e estimativas do potencial número de genes que devem ser considerados na formação de bancos de germoplasma para uso no melhoramento (NODARI; GUERRA, 2004), uma vez que a identificação de genótipos divergentes permitem enriquecer a variabilidade natural da espécie, para isso, a caracterização molecular de germoplasma pode fornecer dados úteis de forma rápida para auxiliar melhoristas ou evitar misturas de genótipos ou casos de sinonímia e homonímia (PINHEIRO et al., 2003, BIANCHI; SANSAVINI; FACHINELLO, 2004), selecionar genótipos com maiores possibilidades de adaptação a diferentes ambientes, além de possíveis variações na produção de metabólitos secundários, principalmente quando se trata de uma espécie com potencial medicinal/farmacêutico, como é o caso de *Alternanthera* spp.

## CONCLUSÕES

A análise com marcadores RAPD é eficiente em revelar polimorfismo interespecífico e permite a eficaz caracterização dos acessos das diferentes espécies de *Alternanthera* estudadas.

## AGRADECIMENTOS

A CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro e bolsa de estudo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNOLD, M.L, BUCKNER, C.M, ROBINSON, J.J. Pollen-mediated introgression and hybrid speciation in Louisiana irises. **Proceeding of National Academy Science USA**, v. 88, p. 1398–1402, 1991.
- BANDEIRA, J. de M.; BIANCHI, V.J.; RUBIN, S.; PETERS, J.A.; BRAGA, E.J.B. Genetic similarities among four species of the *Plectranthus* (L'Hér.) genus. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 32, n. 1, p. 43-48, 2010.
- BHATTACHARYA, A.; JAIME, A.; SILVA, T. da. Molecular systematics in *Chrysanthemum x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura. **Scientia Horticulturae**, v. 109, p 379–384, 2006.

BIANCHI, V.J.; SANSAVINI, S.; FACHINELLO, J.C. Microsatellite markers for identification of *Prunus* spp. rootstocks. **Scientia Agrícola**, v. 61, n.3, p. 303-306, 2004.

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

CHATTERJEE, J. et al. Molecular systematics in *Chrysanthemum x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura. **Scientia Horticulturae**, v. 110, p. 373–378, 2006.

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

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

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

FICO, G. et al. RAPD analysis and flavonoid composition of *Aconitum* as an aid for taxonomic discrimination Biochemical. **Systematics and Ecology**, v. 31, p. 293–301, 2003.

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

JALALPURE, S.S.; AGRAWAL, N.; PATIL, M.B.; CHIMKODE, R.; TRIPATHI, A. Antimicrobial and wound healing activities of leaves of *Alternanthera sessilis* L. **International Journal of Green Pharmacy**, v.2, p.141-144, 2008.

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

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

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

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

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

PEREIRA, D.F.; ZANON, R.B.; ZANETTI, G.D.; MANFRON. M.P.; ATHAYDE, M.L. Morfo-anatomia das Folhas de *Alternanthera brasiliana* e *Alternanthera dentata* (Amaranthaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**. v.27, p. 178-84, 2008.

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

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

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

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

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

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

SHYMALA, B.N.; GUPTA, S.; LAKSMI, A.J.; PRAKASH, J. Leafy vegetables extracts antioxidant activity and effect on storage stability of heated oils. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.6, p.239-245, 2005.

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

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

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas e nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**. 3ª edição, Nova Odessa, São Paulo, Instituto Plantarum. 2012. 768p.

WATANABE, A.; ARAKI, S.; KOBARI, S.; SUDO, H.; TSUCHIDA, T.; UNO, T.; KOSAKA, N.; SHIMOMURA, K.; YAMAZAKI, M.; SAITO, K. In vitro propagation, restriction fragment length

polymorphism, and random amplified polymorphic DNA analyses of *Angelica* plants. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 187–192, 1998.

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

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

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

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