

Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão

SOUZA, D.C.L.¹

¹Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Rua José Barbosa de Barros, 1780, Caixa Postal 237, CEP 18610-307, Botucatu, SP, Brasil. Autor para correspondência: danillacristina@ig.com.br.

RESUMO: Os estudos que visam à caracterização e conservação de germoplasma de espécies de plantas medicinais e aromáticas vêm crescendo de forma expressiva frente ao potencial econômico dessas espécies. Para tanto, diferentes marcadores moleculares estão disponíveis no mercado, e a seleção de um ou mais marcadores requer o conhecimento de suas propriedades e aplicações. Este trabalho tem por objetivo apresentar uma revisão bibliográfica sobre as principais técnicas moleculares utilizadas nesses estudos.

Palavras-chave: biotecnologia, marcadores moleculares, recursos genéticos vegetais.

ABSTRACT: Molecular techniques for characterization and conservation of medicinal and aromatic plants: a review. The studies which aim on the characterization and conservation of the germplasm from medicinal and aromatic plant species have been frequent, due to the economic potential of these species. Therefore, different molecular markers are available in the market, and the selection of one or more markers requires knowledge of their properties and applications. This work aims to present a literature review about the main molecular techniques used in these studies.

Keywords: biotechnology, molecular markers, plant genetic resource.

INTRODUÇÃO

As plantas produzem uma série de substâncias químicas no seu metabolismo. Algumas destas substâncias, conhecidas como princípios ativos, são capazes de provocar respostas biológicas, quando introduzidas no organismo animal, inclusive no homem. Tais princípios ativos possuem aplicação nas indústrias de cosméticos, farmacêuticas e de outros tipos de produtos (Sousa et al., 1991; Boscolo & Valle, 2008).

A utilização de plantas medicinais e aromáticas pela população mundial é crescente, e os princípios ativos, responsáveis por essa larga utilização, representam o ponto de partida para a síntese de produtos químicos e farmacêuticos que movimentam milhões de dólares por ano (Schocken, 2007; Johnson, 2012). Por outro lado, esse interesse pelas propriedades químicas dos vegetais, tanto pelas comunidades tradicionais quanto pelas indústrias que realizam a prospecção de novos produtos, gera uma intensa procura aos recursos naturais, o que tem causado sérios danos à diversidade genética de algumas espécies, por

promover perda da base genética e colocar em risco de extinção várias delas antes mesmo de serem conhecidas.

Atualmente, os estudos que visam à caracterização e conservação de germoplasma de espécies de plantas medicinais e aromáticas vêm crescendo de forma expressiva frente ao potencial econômico dessas espécies. A caracterização de germoplasma é uma importante atividade para subsidiar a utilização dos recursos naturais, pois possibilita que novos materiais de interesse sejam incluídos em programas de melhoramento genético e serve como base para o delineamento de estratégias de conservação. Diferentes métodos são utilizados na caracterização de recursos genéticos, entre eles estão avaliações de características morfológicas e moleculares.

No campo, as características morfológicas são utilizadas normalmente para descrever e discriminar variedades de plantas (Anti, 2000), podendo servir para auxiliar a escolha de indivíduos com potencial para diversas finalidades. No entanto,

essas características podem ser avaliadas de forma subjetiva e ainda sofrer influências ambientais positivas ou negativas, impossibilitando a detecção de polimorfismo de modo confiável entre espécies, variedades e indivíduos. Além disso, devido à ampla gama de espécies medicinais e aromáticas, é reduzido o número de descritores morfológicos, especialmente para aquelas que não são cultivadas comercialmente.

Com os avanços da biotecnologia, o advento dos marcadores moleculares possibilitou a discriminação genotípica de forma hábil, pois permite o estudo da variação genética em nível de DNA. Os primeiros marcadores moleculares foram os isoenzimáticos, e, a partir do desenvolvimento da técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR – *Polymerase Chain Reaction*), foi possível o surgimento de diversas classes como AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SSR (*Simple Sequence Repeats*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), entre outros (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Além de possibilitar a caracterização de germoplasma, os marcadores moleculares podem ser utilizados como ferramenta para estudos de diversidade genética entre indivíduos, dentro e entre populações ou espécies relacionadas (Souza et al., 2008), assim como para análise de filogenias, impressão digital de DNA, detecção de ligação gênica com caracteres mono e poligênicos, identificação de variedades, introgressão gênica, seleção indireta de caracteres agrônômicos, dentre outros. A eficácia dos diferentes marcadores é confirmada com a vasta utilização dessas técnicas nos estudos de conservação genética e no melhoramento de plantas.

É considerado marcador molecular qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA que corresponde a regiões expressas ou não do genoma (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Estes últimos são estáveis e detectáveis em todos os tecidos, independentemente da diferenciação ou do estágio de desenvolvimento do organismo, e não sofrem influência do ambiente e dos efeitos pleiotrópicos (múltiplos efeitos resultantes de um único gene) e epistáticos (interações gênicas) (Joshi et al., 2004; Agarwal et al., 2008).

Há diversos tipos de marcadores moleculares e a seleção de um ou mais marcadores requer o conhecimento de suas propriedades e aplicações (Semagn et al., 2006).

Principais tecnologias para caracterização molecular em plantas medicinais

e aromáticas

Marcadores isoenzimáticos

Isoenzimas são formas diferentes de uma mesma enzima que apresentam afinidade por um mesmo substrato, ou seja, desempenham a mesma atividade catalítica, mas podem ter diferentes propriedades cinéticas e ser separadas por processos bioquímicos (Ferreira & Grattapaglia, 1998). A análise das mobilidades eletroforéticas das enzimas produzidas permite a caracterização genotípica de cada indivíduo, bem como as distribuições gênicas em populações e espécies (Póvoa, 2002).

As isoenzimas podem ser observadas na maior parte dos tecidos e são consideradas marcadores neutros de herança co-dominante. Somado a isso, o trabalho com isoenzimas dispensa conhecimento prévio sobre o genoma da espécie a ser estudada (Robinson, 1998) e pode ser obtido a baixo custo, em relação aos demais marcadores. A principal limitação do seu uso consiste da necessidade de se conhecer os sistemas enzimáticos mais discriminantes em cada espécie ou grupo de espécies. Uma vez conhecidos, torna-se relativamente simples e rápida (Martins et al., 2007).

Em espécies vegetais, estas técnicas têm sido utilizadas na investigação dos padrões de variabilidade e estrutura genética de populações naturais (Gois et al., 2009; Takrouni et al., 2012) e dos sistemas de cruzamentos (Gusson et al., 2006), e na caracterização de espécies (Ali et al., 2012; 2013) e híbridos (Lebeda et al., 2012). As técnicas isoenzimáticas têm sido também importantes como auxiliar na identificação quimiotaxonômica de espécies medicinais e aromáticas (Lopes et al., 2003), bem como em análises de correlação entre os perfis genético e químico dessas espécies (Ali et al., 2013).

Como o conhecimento sobre o sistema reprodutivo e a taxa de cruzamento de uma população é um instrumento de valor para o manejo de uma espécie, Oliveira et al. (2002) utilizaram a técnica de eletroforese de isoenzimas em 400 progênies de uma população natural de *Copaifera langsdorffii* Desf (copaíba), localizada no Estado de Minas Gerais, e com a análise dos perfis isoenzimáticos foi possível verificar que a espécie apresenta reprodução mista, predominantemente alógama. Localizadas também no Estado de Minas Gerais, quatro populações naturais de *Caryocar brasiliense* (pequi), espécie arbórea amplamente distribuída no Cerrado brasileiro, mas em perigo de extinção, foram estudadas por Melo Jr et al. (2012), que não observaram evidências de endogamia dentro de fragmentos. Por outro lado, nenhuma população mostrou-se em equilíbrio, indicando gargalos genéticos recentes.

Para a análise de variação entre populações de *Ocimum sanctum* (manjeriço santo), situadas em diferentes localidades da Índia, Johnson (2012) observou perfis exclusivos de bandas de isoesterase, isoperoxidase, fosfatase ácida e fosfatase alcalina nessas populações, as quais representam a impressão digital de planta medicinal importante, útil na diferenciação das espécies. Em estudo de identificação e caracterização de híbridos de *Ocimum selloi* Benth (elixir-paregórico), oriundos do cruzamento de dois acessos do Banco de Germoplasma de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Viçosa, Amaral et al. (2007) utilizaram marcadores isoenzimáticos, os quais mostraram-se úteis para demonstrar a ocorrência de hibridação. Chaurasiya et al. (2009), estudando a aglomeração metabólica de uma coleção núcleo de *Withania somnifera* (ginseng indiano), utilizaram marcadores isoenzimáticos e RAPD para comparação com o perfil químico e, apesar de terem encontrado maior polimorfismo genético com os marcadores RAPD, os isoenzimáticos foram os que permitiram melhor discriminação na formação de grupos associados ao perfil químico.

Apesar de existirem técnicas utilizadas em estimativas de diversidade genética mais atuais, sendo estas, até mesmo, mais eficientes na obtenção de polimorfismo genético, as isoenzimas ainda são bastante empregadas em análises genéticas que não requeiram amostragem ampla do genoma.

Marcadores RAPD

O método que envolve a detecção de Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*) é utilizado na caracterização de genótipos em várias espécies de plantas medicinais e aromáticas.

A técnica de RAPD consiste na amplificação de DNA genômico em PCR. Utilizando sequências curtas e arbitrárias de 10 nucleotídeos (*primers* decâmeros), permitem obter polimorfismos traduzidos por produtos de reação específicos, devido ao rearranjo ou deleção de bases na zona de ligação aos *primers* (Schlötterer, 2004; Agarwal et al., 2008). A separação dos produtos de amplificação de uma reação RAPD é feita, em sua maioria, por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio, que se intercala com as cadeias de DNA e permite visualização sobre luz ultravioleta (Semagn et al., 2006).

Entre as vantagens frequentemente citadas para a técnica, pode-se destacar: simplicidade, rapidez, baixo custo, demanda de quantidades mínimas de DNA para realização das análises, possibilidade de estudo de espécies com pouco ou nenhum polimorfismo em locos isoenzimáticos.

Por utilizar *primers* de sequência arbitrária, os marcadores RAPD permitem a realização de análises genéticas sem a necessidade de conhecimento prévio sobre o DNA da espécie a ser estudada (Lacerda et al., 2002).

Entretanto, os marcadores RAPD também apresentam limitações, destacando-se o baixo conteúdo de informação genética por loco. Apenas um alelo é detectado, o segmento que é amplificado, enquanto que as demais variações alélicas são classificadas conjuntamente como alelo nulo (Ferreira & Grattapaglia, 1998). A dominância neste caso não se refere à interação genética entre alelos de um mesmo loco e sim à interpretação relativa entre fenótipo e genótipo (Ciampi et al., 2007).

Nos estudos de genética e conservação de espécies medicinais e aromáticas, diversos trabalhos têm utilizado a técnica de RAPD, com diferentes finalidades. Trindade & Chaves (2005) a utilizaram com o intuito de analisar a estrutura genética de 13 populações de *Eugenia dysenterica* DC (cagaiteira), localizadas no estado de Goiás, e observaram que a estrutura genética foi significativa entre as populações e que há correlação fenotípica, genética e geográfica entre elas.

Em estudo de avaliação da diversidade genética e comparação com o perfil químico dos óleos essenciais em 16 populações de *Salvia* spp., Lerin et al. (2007) encontraram alta variabilidade genética dentro delas e correlação positiva entre o perfil genético e químico. Visando quantificar a variabilidade genética entre e dentro de populações de *Lychnophora ericoides* Martius (arnica), que apresentam diferenças morfológicas e de aroma devido à presença de óleos essenciais, Melo et al. (2009), utilizaram marcadores RAPD, os quais demonstraram baixa dissimilaridade entre as populações estudadas, embora os dados tenham sido capazes de distingui-las, com maior proximidade genética entre populações com característica aromática.

Com o objetivo de avaliar o impacto da distância genética entre genitores sobre a taxa de cruzamento de acessos de *Andrographis paniculata* Nees., da Malásia, um importante fitoquímico anticâncer, Valdiani et al. (2014) utilizaram marcadores agro-morfológicos e RAPD. Por meio destes últimos, notou-se que mesmo um pequeno aumento na distância genética entre dois pais pode causar um declínio na sua taxa de cruzamento, ao contrário, dos agro-morfológicos que obtiveram comportamento neutro para este parâmetro. Os autores concluíram que, apesar da baixa diversidade genética observada entre os acessos estudados, uma pré-seleção de pais geneticamente adjacentes nesta população, utilizando marcadores RAPD, seria útil para aumentar a taxa de frutificação.

A diversidade genética dentro e entre de sete populações naturais tunisinas de *Hypericum humifusum* L. (hipericão-rasteiro), de diferentes regiões geográficas e bioclimáticas, foi avaliada por Afef et al. (2012), utilizando 11 locos isoenzimáticos e 8 *primers* RAPD. Os agrupamentos de populações, gerados por meio de dendrogramas baseados nos dois métodos, não refletiram padrões geográficos ou bioclimáticos espaciais, indicando adaptação específica das populações aos ambientes locais. O dendrograma obtido a partir de dados combinados resultou agrupamentos populacionais semelhantes ao obtido com marcadores RAPD, sugerindo maior precisão dos mesmos.

Marcadores AFLP

Os marcadores gerados pela análise de Polimorfismos de Comprimento de Fragmento Amplificado (AFLP – *Amplified Fragment Length Polymorphism*), descrita por Vos et al. (1995), associam os polimorfismos gerados por digestão, por meio de enzimas de restrição, com a capacidade de detecção da técnica de PCR, combinando os princípios dos marcadores RAPD e RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

As etapas de obtenção desses marcadores envolvem a extração do DNA genômico da planta, que é clivado por dois tipos de endonucleases de restrição (corte raro e corte frequente), originando um número elevado de fragmentos não detectados em eletroforese, em função da alta concentração. Pequenas sequências de DNA (adaptadores) são acopladas às extremidades desses fragmentos de restrição, as quais se anelam com *primers* específicos, durante a PCR (pré-amplificação e amplificação seletiva). Os fragmentos gerados são então separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante e visualizados por autoradiografia, corados com prata ou fluorescência (Vos et al., 1995).

As principais vantagens da técnica de AFLP são a detecção de altos índices de polimorfismos, sem a necessidade do conhecimento prévio de dados de sequência de DNA para construção dos *primers* utilizados (Faleiro et al., 2001), geração de grande número de locos e cobertura ampla do genoma (Lopes et al., 2002); e apresenta como desvantagem a herança dominante (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Estas características tornam o método AFLP adequado para a caracterização da variabilidade genética, obtenção de impressões digitais de DNA (Azhaguvel et al., 2006; Meudt & Clarke, 2007) e construção de mapas genéticos (Pauquet et al., 2001).

Ao avaliar a diversidade genética entre e dentro de espécies medicinais aromáticas do

gênero *Achillea*, por meio de marcadores AFLP, Rahimmalek et al. (2009) encontraram alto nível de variação genética entre os genótipos, diretamente correlacionado com a distância genética dos mesmos. Utilizando os mesmos marcadores, Freitas et al. (2005) estudaram a variabilidade genética intrapopulacional em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (aroeira), e observaram altos níveis de divergência genética entre progênies, inferindo em desvios de cruzamentos aleatórios e na possibilidade da população de origem das sementes estar geneticamente estruturada. Wickert et al. (2007), com o objetivo de caracterizar a diversidade genética em três genótipos de *Prunus mume* Sieb. et Zucc. (umezeiro), verificaram que os marcadores moleculares AFLP são passíveis de serem utilizados na discriminação dos genótipos estudados.

Oito populações naturais de *Palicourea rigida* Kunth (douradinha), espécie endêmica do Cerrado brasileiro e em risco de extinção, foram avaliadas quanto à diversidade e estrutura genética, e associação da produção de extrato medicinal com suas características genéticas, por meio de marcadores moleculares AFLP, que forneceram informações relevantes para conservação desta valiosa planta medicinal (Silva et al., 2013). Para avaliar a variabilidade molecular, relação genética e estrutura populacional de 89 porta-enxertos promissores do gênero *Prunus* e pais relacionados, do Irã, Zeinalabedini et al. (2014) observaram que a classificação desses indivíduos com base em locos SSR parece estar mais de acordo com os seus dados genealógicos do que com a técnica AFLP, sugerindo que os marcadores SSR podem ser mais informativos em estudos de diversidade genética. Por outro lado, os marcadores AFLP foram mais capazes de analisar a estrutura das populações de *Prunus* que os SSR. O conjunto de locos SSR e AFLP utilizados neste estudo são métodos potenciais para conduzir estudos de diversidade e estrutura genética em porta-enxertos de *Prunus* e suas espécies parentais.

Marcadores SSR ou microssatélites

Os marcadores microssatélites, também conhecidos como SSR (*Simple Sequence Repeats*), são compostos de sequências simples repetidas de dois a cinco nucleotídeos em *tandem* na sequência de DNA, tais como (CA)_n, (AGAT)_n e (ATT)_n. O polimorfismo nestes locos é resultado de variações do número de repetições das sequências de nucleotídeos (Akkaya et al., 1992).

Esses marcadores são obtidos pela amplificação dos microssatélites via PCR, com o uso de *primers* específicos (desenvolvidos para a espécie a ser analisada, mas que podem ser transferíveis para espécies correlacionadas)

para as regiões do DNA que flanqueiam os microssatélites. Os *primers* são desenhados a partir do sequenciamento de fragmentos de DNA, obtidos de bibliotecas genômicas, onde os microssatélites foram previamente localizados. A separação dos produtos de amplificação se dá por meio da técnica de eletroforese em géis de poliacrilamida ou agarose e visualização do polimorfismo por auto-radiografia, coloração com prata ou fluorescência (géis de poliacrilamida) ou por coloração com brometo de etídio sobre luz ultravioleta (Faleiro et al., 2003), e por meio do sequenciamento de DNA (Zeinalabedini et al.; 2014).

A grande limitação da tecnologia está no seu desenvolvimento, pois envolve um processo demorado, trabalhoso e com alto custo, devido à necessidade de construção de bibliotecas genômicas e *screening* de milhares de clones com sondas apropriadas (Kölliker et al., 2001). No entanto, os marcadores microssatélites são uma ferramenta adequada e importante em genética vegetal, por serem abundantes e uniformemente distribuídos por todo genoma, gerarem alto polimorfismo, serem reprodutíveis, requererem pequena quantidade de DNA e possuírem herança codominante e natureza multialélica (Oliveira et al., 2006; Oliveira & Silva, 2008).

Além de úteis para construção de mapas genéticos (Gupta & Varshney, 2000), SSRs têm sido utilizados para estudar diversidade de populações naturais (Barroso et al., 2010) e de espécies cultivadas (Almeida et al., 2009a), permitindo analisar desde indivíduos até espécies proximamente relacionadas, devido ao fato de que as sequências de DNA que flanqueiam os microssatélites, são geralmente conservadas dentro de uma mesma espécie ou entre espécies de gêneros correlatos, o que permite o desenho de *primers* para amplificações específicas desses locos (Oliveira et al., 2006)

Zhao et al. (2010) avaliaram a diversidade genética e estrutura populacional de 139 acessos chineses de *Lycium*, por meio de marcadores microssatélites, e encontraram alta diversidade genética, com elevada frequência de alelos raros por loco, e conformação de três sub-populações, sendo estes resultados úteis para futura identificação de alelos importantes, mapeamento genético, clonagem de gene, conservação de germoplasma e melhoramento genético da espécie em questão.

Ao analisar a diversidade genética de três populações de *Lychnophora pinaster* (arnica-mineira), no Estado de Minas Gerais, Haber et al. (2009) observaram uma porcentagem de endogamia, com alta taxa de cruzamento, sugerindo um sistema de reprodução misto, com tendência a alogamia, e maior parte da variabilidade dentro das

populações. Utilizando a mesma técnica, Almeida et al. (2009b), objetivando caracterizar a estrutura genética de 38 genótipos de diferentes municípios da Bahia, observaram elevada frequência de alelos exclusivos e, apesar disso, maior parte da diversidade estava dentro das populações, não ocorrendo estruturação das mesmas.

Na caracterização de genótipos de mirtilo (*Vaccinium* spp), Silva et al. (2008), utilizaram as técnicas RAPD e SSR, sendo esta última mais eficaz na discriminação dos genótipos analisados, devido à maior detecção de polimorfismo genético entre eles.

Marcadores ISSR

Os marcadores moleculares ISSR (Inter Simple Sequence Repeat – Inter Repetições de Sequência Simples) foram desenvolvidos a partir da necessidade de explorar repetições de microssatélites sem a necessidade do conhecimento prévio do sequenciamento do DNA da espécie-alvo (Zietkiewicz et al., 1994).

O método de ISSR tem sido amplamente utilizado por ser uma técnica simples, rápida, eficiente, possuir alta reprodutibilidade e gerar altos índices de polimorfismo (Reddy et al., 2002). É facilmente detectado usando poucos equipamentos e fornece grande número de dados por um custo razoável para o pesquisador (Wolfe, 2005). Possuem a desvantagem de serem marcadores dominantes (Zietkiewicz et al., 1994).

O ISSR é considerado um marcador semi-arbitrário, baseado no princípio da técnica de PCR, que envolve amplificações de segmentos de DNA, em presença de *primers* complementares (Liu & Wendel, 2001; Souza et al., 2005). Os *primers* ISSR são mais robustos que os *primers* RAPD, pois apresentam maior superfície de ancoragem e possuem maiores temperaturas de anelamento, aumentando a reprodutibilidade dos produtos (Tsumura et al., 1996). A alta reprodutibilidade dessa técnica foi comprovada por Qiu et al. (2009) ao utilizá-la para autenticação de ervas medicinais chinesas.

Essa técnica é eficaz nas análises de diversidade genética, em estudos de impressão digital do DNA, seleção assistida por marcadores, filogenia e mapeamento genético (Rakoczy-Trojanowska & Bolobok, 2004; Liu et al., 2008). Sun et al. (2010) empregaram marcadores ISSR para analisar a variação genética dentro e entre populações de *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. (Northern wu-wei-zi - fruto dos cinco sabores) e de *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils. (Southern wu-wei-zi), plantas da medicina chinesa tradicional, possibilitando inferir sobre os eventos históricos e avaliar sua utilização como marcadores na diferenciação das duas espécies, que revelou altos

níveis de diversidade genética e diferenciação genética significativa entre as mesmas.

Avaliando as técnicas moleculares aplicadas ao gênero *Hypericum*, Costa (2010) encontrou alto polimorfismo genético, utilizando marcadores ISSR, e boa correlação genética e micromorfológica entre cinco espécies do gênero. Assim como Hu et al. (2010), em estudo de diversidade genética entre 13 populações selvagens de *Rheum tanguticum* (ruibarbo-palmado) da China, também observaram alto polimorfismo e relativa diferenciação entre as populações, com associação das distâncias genética e geográfica.

A variabilidade genética e química de quatro populações de *Hesperozygis ringens* Benth (espanta-pulga) foi analisada por Fracaro (2006), por meio de marcadores RAPD e ISSR, que observou padrões semelhantes de variabilidade entre as populações com os dois marcadores e ainda foi estabelecida uma significativa correlação genética, química e geográfica entre elas. Já Wu et al. (2010), estudando a diversidade genética entre e dentro de 16 populações de *Pogostemon cablin* (patchouli) da China, por meio de marcadores ISSR, detectaram alto percentual polimórfico, indicando alto nível de diversidade genética, com valores superiores aos encontrados com os marcadores RAPD em estudos realizados por outros autores nas mesmas populações.

Marcadores SCAR

Para aumentar a confiabilidade dos marcadores RAPD e convertê-los em marcadores co-dominantes, Paran & Michelmore (1993) desenvolveram os marcadores SCAR (Sequence Characterized Amplified Region - Região Amplificada de Sequência Caracterizada), que são altamente específicos (Nietsche et al., 2000).

Esses marcadores são derivados de marcas RAPD pelo desenvolvimento de *primers* mais longos, com consequente aumento da temperatura de anelamento nas reações de PCR. Após a seleção da marca RAPD, o fragmento é clonado e sequenciado, e é sintetizado um par de *primers* de aproximadamente 24 pares de bases. Esses *primers* SCAR são utilizados para amplificar as regiões específicas do DNA genômico (Zaccaro et al., 2007). O polimorfismo pode ser detectado diretamente pela presença ou ausência da banda ou por meio de clivagem das bandas monomórficas com enzimas de restrição, em ambos os casos, após migração por eletroforese em substrato específico (agarose ou poliacrilamida) (Paran & Michelmore, 1993).

Marcadores SCAR foram desenvolvidos para autenticação de várias plantas medicinais e aromáticas que são facilmente adulteradas (Kiran et

al., 2010). Estudos foram realizados com espécies do gênero *Phyllanthus* (Dnyaneshwar et al., 2006; Theerakulpisut et al., 2008), *Artemisia* (Lee et al., 2006) e *Echinacea* (Adinolfi et al., 2007), e com as espécies *Angelica decursiva*, *Peucedanum praeruptorum* e *Anthriscus sylvestris* (Choo et al., 2009), *Atractylodes japonica* (Huh & Bang, 2006), *Panax japonicas* (Choi et al., 2008), *Cnidium officinale*, *Ligusticum chuanxiong* e *Angelica polymorpha* (Lee et al., 2010), *Ophiopogon japonicus* e *Liriope platyphylla* (Li & Park, 2012), entre outras, o que aumenta a aplicação industrial das técnicas moleculares (Dnyaneshwar et al., 2006).

CONCLUSÃO

Os diversos tipos de marcadores moleculares empregados em estudos de caracterização, tanto para aplicações filogenéticas e evolutivas, quanto para fins práticos de conservação genética de espécies medicinais e aromáticas, fornecem informações relevantes à pesquisa científica. Para uma determinada análise genética, basicamente, podem ser utilizadas as diferentes técnicas aqui apresentadas (com exceção dos marcadores SCAR que são específicos para autenticação de espécies medicinais e aromáticas). A escolha de uma ou mais técnicas moleculares dependerá do objetivo da análise e da estrutura física e financeira disponível para realização do estudo.

REFERÊNCIAS

- ADINOLFI, B. et al. Sequence characterized amplified region (SCAR) analysis on DNA from three medicinal *Echinacea* species. **Fitoterapia**, v.78, n.1, p.43-5, 2007.
- AFFEF, B. et al. Genetic structure of natural Tunisian *Hypericum humifusum* L. (Hypericaceae) populations as assessed by allozymes and RAPDs. **Industrial Crops and Products**, v.35, n.1, p.217-23, 2012.
- AGARWAL, M. et al. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, v.27, n.4, p.617-31, 2008.
- AKKAYA, M.S. et al. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, v.132, n.4, p.113-39, 1992.
- ALI, I.B.E.H. et al. Genetic diversity, population structure and relationships of Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. and *Thymus capitatus* Hoffm. et Link. assessed by isozymes. **Industrial Crops and Products**, v.36, n.1, p.149-63, 2012.
- ALI, I.B.E.H. et al. A combined approach using allozymes and volatiles for the characterization of Tunisian *Thymbra capitata* (L.) Cav. (Lamiaceae). **Industrial Crops and Products**, v.43, p.477-83, 2013.
- ALMEIDA, V.C. et al. In situ and genetic characterization of *Gossypium barbadense* L. from the States of Para and Amapa, Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.7, p. 719-25, 2009a.
- ALMEIDA, V.C. et al. Estrutura genética de *Gossypium*

- barbadense* no estado da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 7., 2009, Foz do Iguaçu. Sustentabilidade da cotonicultura brasileira e expansão dos mercados: **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2009b. p.215-20.
- AMARAL, C.L.F.; CASALI, V.W.D.; BRASILEIRO, B.P. Produção de híbridos em alfavaca (*Ocimum selloi* benth): uma planta aromática, condimentar e medicinal. **Diálogos e Ciências**, ano 5, n.11, p.1-7, 2007. Disponível em: <http://www.ftc.br/dialogos>. Acesso em: 3 abr. 2013.
- ANTI, A.B. Caracterização de germoplasma de soja e de feijão através de eletroforese de isoenzimas da semente. **Bragantia**, v.59, n.2, p.139-42, 2000.
- AZHAGUVEL, P. et al. High-resolution linkage mapping for the non-brittle rachis locus *btr1* in cultivated × wild barley (*Hordeum vulgare*). **Plant Science**, v.170, n.6, p.1087–94, 2006.
- BARROSO, P.A.V. et al. In situ conservation and genetic diversity of three populations of *Gossypium mustelinum* Miers (ex Watt). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 57, n.3, p.343- 9, 2010.
- BOSCOLO, O.H.; VALLE, L.deS. Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. **Iheringia**, Sér. Bot., v.63, n.2, p.263-77, 2008.
- CHAURASIYA, N.D. et al. Metabolic clustering of a core collection of Indian ginseng *Withania somnifera* Dunal through DNA, isoenzyme, polypeptide and withanolide profile diversity. **Fitoterapia**, v.80, n.8, p.496–505, 2009.
- CHOI, Y.E. et al. Development of species specific AFLP-derived SCAR marker for authentication of *Panax japonicus* c. a. meye R. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.31, n.1, p.135–8, 2008.
- CHOO, B.K. et al. Development of SCAR markers for the discrimination of three species of medicinal plants, *Angelica decursiva* (*Peucedanum decursivum*), *Peucedanum praeruptorum* and *Anthriscus sylvestris*, based on the internal transcribed spacer (ITS) sequence and random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.32, n.1, p.24-30, 2009.
- CIAMPI, A.Y. et al. Análise genética em populações de *Trithrinax brasiliensis* Mart. utilizando marcadores moleculares RAPD. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, n.1, p.558-60, 2007.
- COSTA, S.R.de A.G.da. **Técnicas de estudo micromorfológico e molecular aplicadas ao gênero *Hypericum***. 2010. 76p. Dissertação (Mestrado – Área de Concentração em Proteção de Plantas), Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- DNYANESHWAR, W. et al. Development and application of RAPD-SCAR marker for identification of *Phyllanthus emblica* L. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.29, n.11, p.2313–6, 2006.
- FALEIRO, F.G. et al. Caracterização de variedades clonais de *Theobroma cacao* L. com base em marcadores RAPD, AFLP e microssatélites. **Agrotropica**, v.13, n.2, p.79-86, 2001.
- FALEIRO, F.G. et al. Uso de marcadores moleculares RAPD e microssatélites visando a confirmação da fecundação cruzada entre *Theobroma cacao* e *Theobroma grandiflorum*. **Agrotropica**, v.15, n.1, p.41-6, 2003.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília: Embrapa/Cenargen, 1998. 220p.
- FRACARO, F. **Ecologia molecular, variabilidade genética, química e cultivo in vitro de *Hesperozygis ringens* Benth.** 2006. 89p.Tese (Doutorado - Área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais). Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.
- FREITAS, M.L.M. et al. Variabilidade genética intrapopulacional em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. por marcador AFLP. **Scientia Forestalis**, n.68, p.21-8, 2005.
- GOIS, I.B. et al. Variabilidade genética de *Spondias lutea* L. em uma população do Baixo São Francisco sergipano, por meio de isoenzimas. **Scientia Forestalis**, v.37, n.81, p 55-60, 2009.
- GUPTA, P.K.; VARSHNEY, R.K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica**, v.113, n.3, p.163-85, 2000.
- GUSSON, E. et. Sistema de reprodução em populações de *Eschweilera ovata* (cambess.) miers. **Revista Árvore**, v.30, n.4, p.491-502, 2006.
- HABER, L.H. et al. Development and characterization of microsatellite markers for *Lychnophora pinaster*: a study for the conservation of a native medicinal plant. **Molecular Ecology Resources**, v.9, n.3, p.811–4, 2009.
- HU, Y. et al. Genetic diversity of wild populations of *Rheum tanguticum* endemic to China as revealed by ISSR analysis. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.38, n.3, p.264–74, 2010.
- HUH, M.K.; BANG, K.H. Identification of *Atractylodes japonica* and *A. macrocephala* by RAPD analysis and SCAR markers. **Silvae Genetica**, v.55, n.3, p.101–5, 2006.
- JOHNSON, M. Studies on intra-specific variation in a multipotent medicinal plant *Ocimum sanctum* Linn. using isozymes. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.2, n.1, p.S21-S26, 2012.
- JOSHI, K. et al. Molecular markers in herbal drug technology. **Current Science**, v.87, n.2, p.159-65, 2004.
- KIRAN, U. et al. SCAR markers: A potential tool for authentication of herbal drugs. **Fitoterapia**, v.81, n.8, p.969–76, 2010.
- KÖLLIKER, R. et al. Development and characterisation of simple sequence repeat (SSR) markers for white clover (*Trifolium repens* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.102, n.2-3, p.416-24, 2001.
- LACERDA, D.R. et al. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. **Lundiana**, v.3, n.2, p.87-92, 2002.
- LEE, M.Y. et al. Development of SCAR marker for discrimination of *Artemisia princeps* and *A. argyi* from other *Artemisia* Herbs. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.29, n.4, p.629–30, 2006.
- LEE S, H. et al. Inter-genomic relationships among three medicinal herbs: *Cnidium officinale*, *Ligusticum chuanxiong* and *Angelica polymorpha*. **Genes & Genomics**, v.32, n.1, p.95-101, 2010.
- LEBEDA, A. et al. Genetic polymorphism in *Lactuca aculeata* populations and occurrence of natural putative hybrids between *L. aculeata* and *L. serriola*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.42, p.113-

- 23, 2012.
- LERIN, L.A. et al. Avaliação da diversidade genética e comparação com o perfil químico dos óleos essenciais em *Salvia* spp. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.1, p.369-71, 2007.
- LI, G.; PARK, Y.-J. SCAR markers for discriminating species of two genera of medicinal plants, *Liriope* and *Ophiopogon*. **Genetics and Molecular Research**, v.11, n.3, p.2987-96, 2012.
- LIU, B.; WENDEL, J.F. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. **Molecular Ecology Notes**, v.1, p.205-8, 2001.
- LIU, L.W. et al. DNA fingerprinting and genetic diversity analysis of late-bolting radish cultivars with RAPD, ISSR and SRAP markers. **Scientia Horticulturae**, v.116, n.3, p.240-7, 2008.
- LOPES, M.S. et al. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.5, n.29, p.56-60, 2002.
- LOPES, R.C. et al. Caracterização isoenzimática de oito acessos de Erva-de-bicho. **Horticultura Brasileira**, v.21, n.3, p.433-7, 2003.
- MARTINS, C.C. et al. Isoenzimas na diferenciação de sementes de três espécies do gênero *Euterpe*. **Revista Árvore**, v.31, n.1 p.51-7, 2007.
- MELO JR., A.F. et al. Spatial genetic structure in natural populations of *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae) in the North of Minas Gerais, Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.43, p.205-9, 2012.
- MELO, L.Q. et al. Análise da variabilidade genética de *arnica* (*Lychnophora ericoides* Less. - Asteraceae) usando marcadores RAPDs. **Acta Botanica Brasilica**, v.23, n.1, p.259-66, 2009.
- MEUDT, H.M.; CLARKE, A.C. Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analysis and advances. **Trends in Plant Science**, v.12, n.3, 106-17, 2007.
- NIETSCH, S. et al. RAPD and SCAR markers linked to gene conferring resistance to angular leaf spot in common bean. **Journal Phytopathology**, v.148, n.117, p.117-21, 2000.
- OLIVEIRA, A.F. et al. Taxa de cruzamento e sistema reprodutivo de uma população natural de *Copaifera langsdorffii* Desf. na região de Lavras (MG) por meio de isoenzimas. **Revista Brasileira de Botânica**, v.25, n.3, p.331-8, 2002.
- OLIVEIRA, M.S.P.; SILVA, K.J.D. Diferenciação genética entre procedências de açaizeiro por marcadores moleculares RAPD e SSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.2, p.438-3, 2008.
- OLIVEIRA, E.J. et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n.2, p.294-307, 2006.
- PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR of the manuscript based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, v.85, n.8, p.985-93, 1993.
- PAUQUET, J. et al. Establishment of a local map of AFLP markers around the powdery mildew resistance gene *Run1* in grapevine and assessment of their usefulness for marker assisted selection. **Theoretical and Applied Genetics**, v.103, n.8, p.1201-10, 2001.
- PÓVOA, J.S.R. **Distribuição da variação genética de *Cedrella fissilis* Vell., em fragmentos florestais, no sul de Minas Gerais, por meio de isoenzimas**. 2002, 95p. Dissertação (Mestrado - Área de concentração em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- QIU, Y.X. et al. Molecular phylogeography of East Asian *Kirengeshoma* in relation to Quaternary climate change and land-bridge configurations. **New Phytologist**, v.183, n.2, p.480-95, 2009.
- RAHIMMALEK, M. et al. Assessment of genetic diversity among and within *Achillea* species using amplified fragment length polymorphism (AFLP). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.37, n.4, p.354-61, 2009.
- RAKOCZY-TROJANOWSKA, M.; BOLIBOK, H. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. **Celular & Molecular Biology Letters**, v.9, n.2, p.221-38, 2004.
- REDDY, M.P. et al. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v.128, n.1, p.9-17, 2002.
- ROBINSON, I.P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A.C. (Ed.). **Eletrforese de isoenzimas e proteínas afins**. Viçosa: UFV, 1998. p.328-67.
- SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? **Genetics**, v.5, n.1, p.63-9, 2004.
- SCHOCKEN, N.R.L. **Obtenção de quimiotipos híbridos de *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown**. 2007. 82 f. Dissertação (Mestrado - Área de concentração em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia), Instituto Agrônomo, Campinas.
- SEMAGN, K. et al. An overview of molecular markers methods for plants. **African Journal of Biotechnology**, v.5, n.25, p.2540-68, 2006.
- SILVA, M.S. et al. Association of loganin contents with the genetic characterization of natural populations of *Palicourea rigida* Kunth determined by AFLP molecular markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.51, p.189-94, 2013.
- SILVA, S.D.dos A. et al. Caracterização de genótipos de mirtilo utilizando marcadores moleculares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.1, p.180-4, 2008.
- SOUZA, M.P.; MATOS, M.E.O.; MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A. **Constituintes Químicos Ativos de Plantas Medicinais Brasileiras** (Ed.). Fortaleza: UFC, 1991. 416p.
- SOUZA, G.A.de. et al. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.7, p.843-49, 2008.
- SOUZA, V.Q. et al. Dissimilaridade genética em mutantes de aveia tolerantes e sensíveis a ácidos orgânicos. **Bragantia**, v.64, n.4, p.569-75, 2005.
- SUN, Y. et al. Population genetic differentiation of *Schisandra chinensis* and *Schisandra sphenanthera* as revealed by ISSR analysis. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.38, n.3, p.257-63, 2010.
- TAKROUNI, M.M. et al. Genetic variability of Tunisian wild strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) populations interfered from isozyme markers. **Scientia Horticulturae**, v.146, p.92-8, 2012.

- THEERAKULPISUT, P. et al. Development of species-specific SCAR markers for identification of three medicinal species of *Phyllanthus*. **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.46, n.4, p.614–21, 2008.
- TSUMURA, Y. et al. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, n.1, p.40-5, 1996.
- TRINDADE, M.G.; CHAVES, L.J. Genetic structure of natural *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae) populations in northeastern Goiás, Brazil, accessed by morphological traits and RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, n.3, p.407-13, 2005.
- VALDIANI, A. et al. Morpho-molecular analysis as a prognostic model for repulsive feedback of the medicinal plant "*Andrographis paniculata*" to allogamy. **Gene**, v.542, n.2, p.156-67, 2014.
- VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23, n.21, p.4407-14, 1995.
- WICKERT, E. et al. Marcadores fAFLP na caracterização de três genótipos de umezeiro selecionados como porta-enxertos para pessegueiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.12, p.1741-46, 2007.
- WOLFE, A. D. ISSR techniques for evolutionary biology. **Methods Enzymology**, v.395, p. 134-44, 2005.
- WU, Y-G. et al. Genetic diversity analysis among and within populations of *Pogostemon cablin* from China with ISSR and SRAP markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.38, n.1, p.63–72, 2010.
- ZACCARO, R.P. et al. Utilização de marcador molecular SCAR na identificação de *Fusarium subglutinans*, agente causal da malformação da mangueira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.29, n.3, p.563-70, 2007.
- ZHAO, W-G. et al. Molecular genetic diversity and population structure in *Lycium* accessions using SSR markers. **Comptes Rendus Biologies**, v.333, n.11-12, p.793-800, 2010.
- ZEINALABEDINI, M. et al. Molecular variability and genetic relationship and structure of Iranian Prunus rootstocks revealed by SSR and AFLP markers. **Scientia Horticulturae**, v.172, p.258-64, 2014.
- ZIETKIEWICZ, E. et al. Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v.20, n.2, p176-83, 1994.