



# RELAÇÃO ENTRE VARIABILIDADE GENÉTICA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA EM DIFERENTES POPULAÇÕES DE *SALVIA* SPP.

L.R. Borges

G. Kubiak; L.A. Lerin; M.C.P. Maloz; G. Toniazzi; A.J. Mossi; R.L. Cansian

## INTRODUÇÃO

A conservação de fragmentos vegetais, principalmente em áreas de pequenas propriedades, depende entre vários fatores, da existência de alternativas economicamente viáveis ao cultivo de monoculturas que necessitam de grandes extensões para ter rentabilidade.

A sálvia pertence à família Lamiaceae, compreendendo cerca de 200 gêneros (sendo o gênero mais numeroso dentro da família Lamiaceae) e 3.200 espécies distribuídas em todo o mundo, estando o maior centro de dispersão localizado na região do Mediterrâneo e no Oriente Próximo (Joly, 1998; Velickovic *et al.*, 2002). De acordo com Serafini *et al.*, (2002), a família Lamiaceae inclui muitas plantas que produzem óleos essenciais como lavandas, mentas, tomilhos, alecrim, manjeriço, dentre outras. São em geral herbáceas ou arbustivas, com folhas opostas ou cruzadas, inteiras e em geral com cheiro intenso. Possuem flores pequenas ou grandes, em geral vistosas, reunidas em densas inflorescências quase sempre axilares, diclamídeas, hermafroditas, pentâmeras, fortemente zigomorfas, bilabiadas (Joly, 1998).

A sálvia pertence à família Lamiaceae, compreendendo cerca de 200 gêneros (sendo o gênero mais numeroso dentro da família Lamiaceae) e 3.200 espécies distribuídas em todo o mundo, estando o maior centro de dispersão localizado na região do Mediterrâneo e no Oriente Próximo (Joly, 1998; Velickovic *et al.*, 2002). De acordo com Serafini *et al.*, (2002), a família Lamiaceae inclui muitas plantas que produzem óleos essenciais como lavandas, mentas, tomilhos, alecrim, manjeriço, dentre outras. São em geral herbáceas ou arbustivas, com folhas opostas ou cruzadas, inteiras e em geral com cheiro intenso. Possuem flores pequenas ou grandes, em geral vistosas, reunidas em densas inflorescências quase sempre axilares, diclamídeas, hermafroditas, pentâmeras, fortemente zigomorfas, bilabiadas (Joly, 1998). Dentre as espécies de sálvia, a *Salvia officinalis* L., *S. lavandulifolia* Vahl. e *S. miltiorrhiza* Bunge, tem notáveis efeitos benéficos nas desordens de memória, depressão e isquemia cerebral, e seus estudos estão centrados na atividade do óleo essencial (Perry *et al.*, 003).

A qualidade dos fitoterápicos depende de muitos fatores

entre eles o clima, solo, altitude, 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 se conhecer melhor as características das plantas, principalmente as medicinais e aromáticas, precisa - se conhecer seus princípios ativos e constituintes químicos, mas para se chegar a este ponto, precisa - se conhecer a variabilidade genética que é a fonte primária dos estudos genéticos.

## OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é analisar a variabilidade genética usando marcadores RAPD de diferentes procedências de *Salvia officinalis* 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*, sendo 3 *Salvia officinalis* L., 1 *S. verbenaca* L., 1 *S. argentea* L., 1 *S. lavandulifolia* Vahl, 1 *S. pratensis* L., 1 *S. sclarea* L. e 8 *Salvia* sp. Cada população foi representada por 10 plantas coletadas aleatoriamente para a formação de Bulks representativos da população. As folhas coletadas foram imediatamente colocadas em nitrogênio líquido, e posteriormente, 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 (1988) modificado, a fim de otimizar o processo. Para amplificação, foi utilizada a reação descrita por Williams *et al.*, . (1991), com volume final de 25 µL: Tampão de reação, dNTPs, 0,2 mM de primer, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM de TRITON e 1,5 U de Taq DNA polimerase Gibco BRL (Life Technologies, São Paulo, Brasil) e aproximadamente 40 ng de DNA.

Foram utilizados os kits OPW, OPH, OPF, OPA, OPB e OPY da Operon Technologies, com 20 *primers* cada um,

visando identificar os que apresentam os melhores resultados em *Salvia* spp., avaliando - se a quantidade de bandas produzidas, a intensidade destas, a sua reprodutibilidade e o polimorfismo gerado pelas mesmas.

O processo de amplificação foi baseado na seguinte seqüência: 3 min a 92<sup>o</sup> C, 40 ciclos de 1 min a 92<sup>o</sup> C, 1 min a 35<sup>o</sup> C e 2 min a 72<sup>o</sup> C. Após, 3 min a 72<sup>o</sup> C e resfriamento a 4<sup>o</sup> C até a retirada das amostras.

A separação eletroforética foi realizada em gel de agarose 1,4 % em cuba de eletroforese horizontal. A corrida foi efetuada com voltagem constante de 90 Volts. A coloração dos fragmentos foi realizada com brometo de etídio e a observação feita sob luz ultravioleta.

Na determinação da variabilidade genética, os dados obtidos através da determinação da presença ou ausência de bandas formaram uma matriz que foi analisada com auxílio do programa computacional MVSP. O dendrograma de similaridade foi construído pelo algoritmo UPGMA, utilizando - se o coeficiente de Jaccard para cálculo de similaridade. 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 (2005).

## 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 outras espécies da mesma família. 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 66,4 %. 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 %).

Estudos com cultivares comerciais de *Ocimum basilicum* L. 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 (Losquiano, 2003).

A análise de RAPD foi eficiente na separação das diferentes espécies analisadas, com coeficiente de similaridade inferior a 0,50 entre as mesmas. Observou - 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 de *Salvia officinalis* de origem espanhola (S1) 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 realizado com as mesmas populações em *S. officinalis* e *Salvia* sp. (Maloz, 2005), 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.*, . (1999) estudando populações de *Salvia fruticosa* 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 Hu *et al.*, . (1991) e Cansian (1999), 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 foram confrontadas com as diferenças químicas nas espécies *S. officinalis* e *S. sclarea*, mostrando a mesma tendência de separação. A espécie *S. lavandulifolia*, 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*, *S. verbenaca* e *S. argentea* não foram analisadas quimicamente por Maloz (2005) sobre as mesmas populações, mas o perfil químico das mesmas também apresenta diferenças consistentes (Couladis *et al.*, ., 2001; Then *et al.*, ., 2003), correspondendo à análise genética.

## CONCLUSÃO

Com a análise dos resultados podemos concluir que a utilização da técnica de RAPD foi eficiente para separação das diferentes espécies analisadas. Observando - se também a formação de um agrupamento entre as populações caracterizadas como *S. officinalis* e *Salvia* sp., indicando a possibilidade de as espécies de sálvia não determinadas serem também *S. officinalis*.

Comparando - se os resultados da análise genética com a análise do perfil químico realizado com as mesmas populações em *S. officinalis* e *Salvia* sp., 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.

As diferenças genéticas das diferentes espécies quando confrontadas com as diferenças químicas nas espécies *S. officinalis* e *S. sclarea*, mostraram a mesma tendência de separação.

A espécie *S. lavandulifolia*, que apresenta um perfil químico mais próximo de *S. officinalis*, também se agrupou geneticamente mais próximo a esta do que as demais espécies.

## REFERÊNCIAS

Cansian, R.L. Análise de RAPD aplicada à identificação de cultivares e avaliação da variabilidade genética em *Brassica*. Dissertação de Mestrado, UCS. Caxias do Sul, RS. 1999, 86p.

Couladis, M.; Tzakou, O.; Stojanovic, D.; Mimica, D.N.; Jancic, R. The essential oil composition of *Salvia argentea* L. *Flavour and Fragrance Journal*, 16: 227 - 229, 2001.

Doyle, J.; Doyle, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Am J Bot.*, 75: 1238, 1988.

Hu, J.; Quiros, C.F. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Rep.* 10: 505 - 511, 1991.

Joly, A.B. *Introdução a Taxonomia Vegetal*. 12. ed. São Paulo: Nacional, 1998.

Losquiano, K.P. Estimativa da variabilidade genética em *Ocimum basilicum* L. através de marcadores RAPD. Trabalho de Graduação (Curso de Ciências Biológicas), UCS, Caxias do Sul, RS, 2003 28p.

Maloz, M.K.P. **Caracterização morfológica, avaliação agronômica, química e da atividade antimicrobiana**

**do óleo essencial de diferentes espécies exóticas do gênero *Salvia***. 2005. 84f. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, UCS, Caxias do Sul, RS, 2005.

Perry, N.S.L.; Bollen, C.; Perry, E.K.; Ballard, C. *Salvia* for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. **Pharmacology, biochemistry and behavior**, v. 75, p. 651-659, 2003.

Serafini, L.A.; Santos, A.C.A.; Touguinha, L.A.; Agostini, G.; Dalfovo, V. **Extrações e aplicações de óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002.

skoula, M.; hilali, I.; Makris, A.M. Evaluation of the genetic diversity of *Salvia fruticosa* Mill. Clones using RAPD markers and comparison with the essential oil profiles. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, n.6, p. 559-568, 1999.

Then, M.; Lemberkovics, E.; Marczal, G.; Szoke, E.; Mathe, I.; Blunden, G.; Kery, A. Proceeding of the international conference on medicinal and aromatic plants, Budapest, Hungary, 8 - 11. Part II. **Acta Horticulturae**, n. 597, p.143 - 148, 2003.

Velickovic, D.T. Randjelovic, N.V. Ristic. M.S.; Smelcerovic, A.A.; Velickovic, A.S. Chemical composition and antimicrobial action of the ethanol extracts of *S. pratensis* L. *S. glutinosa* L. *S. aethiopsis* L. **Journal Serbia Chemical Soc.**, v. 67, n. 10, p. 639-646, 2002.

Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A.; Tingey, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucl. Acids Res.**, v. 18, p. 6531-6535, 1991.