



ANÁLISE DE VARIABILIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DO GÊNERO *Mentha* COM MARCADORES ISSR

ELLEN GRIPPI¹; MARCO ANTÔNIO FERREIRA²; DIJALMA BARBOSA SILVA³; ROBERTO FONTES VIEIRA⁴; ZILNEIDE PEDROSA DE SOUZA AMARAL⁵; GLAUCIA SALLES CORTOPASSI BUSO⁶;

1.UNB, BRASILIA, DF, BRASIL; 2,3,4,5,6.EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, BRASILIA, DF, BRASIL;

glaucia.buso@embrapa.br

Resumo: *Mentha* é um gênero de plantas herbáceas que vem sendo inserido cada vez mais em pesquisas que visam obtenção de maiores informações e conservação dos recursos genéticos de suas espécies. A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) possui um Banco de Germoplasma de Menta, porém pouco se sabe a respeito de seu material. O conhecimento da variabilidade genética possibilita avanços nos estudos e pesquisas a respeito de diferentes espécies. Para este fim, foram utilizados marcadores moleculares ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), que são marcadores dominantes utilizados para amplificação de segmentos genômicos flanqueados por repetições. O objetivo deste trabalho foi obter e acrescentar informações a respeito de 82 indivíduos de diferentes espécies do gênero *Mentha*. Com base nas análises feitas, foi gerada uma matriz de presença e ausência a partir do programa NTSYS, o que possibilitou a análise de similaridade dos indivíduos testados. O dendrograma gerado mostrou a formação de dois grandes grupos, um de *M. piperita* e outro de *M. spicata*. Além disso, observou-se que a similaridade variou de 40 a 97%, sendo menor em 4 indivíduos, o que pode ser consequência de algum equívoco taxonômico. Dois indivíduos com 97% de similaridade, classificados como indivíduos diferentes, porém da mesma espécie (*M. suaveolens*), parecem ser amostras da mesma planta. O segundo grupo de maior similaridade (88%) é formado por dois acessos classificados como da espécie *M. gracilis* e outro da espécie *M. arvensis*, podendo-se dizer, com isso, que possivelmente há um equívoco quanto à classificação. O mesmo ocorreu com o terceiro grupo de maior similaridade (87%), do qual fazem parte um indivíduo classificado como *M. spicata* e outro como *M. aquatica*. A disponibilidade destes dados facilita o uso adequado deste germoplasma em programas de conservação e de melhoramento genético para o desenvolvimento de genótipos de interesse do agronegócio brasileiro.

Palavras-chave: caracterização de germoplasma, menta, marcadores moleculares

Introdução



A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) possui um Banco de Germoplasma de Menta, porém ainda existem poucos estudos que abordam este gênero no Brasil, faltando informações para a domesticação de espécies, desenvolvimento de novas variedades, caracterização, melhoramento e prospecção de genes. Hoje são conhecidas aproximadamente 50 espécies deste gênero, que são caracterizadas a partir de análises químicas, morfológicas e genéticas. A fim de obter informações precisas a respeito das espécies do gênero *Mentha*, foram utilizados marcadores moleculares ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), que são dominantes e produzem amplicons reproduzíveis de alta qualidade (Buso, *et al.*, 2008) e grande reprodutibilidade quando comparados a outros marcadores com base em PCR não específico como RAPD (Wolfe & Liston, 1998). O objetivo deste estudo foi caracterizar e revelar genotipicamente a similaridade entre acessos de *Mentha sp.* do Banco de Germoplasma da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), com o intuito de aumentar informações a respeito do germoplasma em questão.

Material e Métodos

O estudo foi feito a partir da extração de DNA de 82 acessos de *Mentha sp.* do Banco de Germoplasma da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia através do método CTAB 2%, com modificações. Após diluição das amostras de DNA para a concentração de 3,0 ng/ μ L, 48 primers foram testados, dos quais 10 foram selecionados, sendo 5 desenvolvidos para feijão (*Phaseolus vulgaris*) e 5 desenvolvidos para milho (*Zea mays*). A partir desta seleção, os 82 indivíduos foram analisados com os 10 primers em reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Esta reação foi feita com 3 μ L de DNA (3,0ng/ μ L), 3 μ L de primer a 0,9mM e uma mistura de 7 μ L de substâncias chamada mix. Este foi composto por 2,65 μ L de água Milli-Q autoclavada, 1,30 μ L de dNTP a 2,5mM, 1,30 μ L de BSA a 2,5mg/mL, 1,30 μ L de tampão IB 10x, 0,25 μ L de MgCl₂ (50mM) e 0,20 μ L de taq DNA polimerase, com um total de 13 μ L por reação. As reações de amplificação foram realizadas em termocicladores GeneAmp PCR system 9700 AB. Os produtos das reações foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 3,5%, corados com brometo de etídio e as bandas visualizadas em fotodocumentador. Cada imagem foi analisada quanto à presença (1) ou ausência (0) de banda em cada indivíduo. Os dados deram origem a uma matriz de similaridade obtida utilizando-se o coeficiente Jaccard do programa NTSYS pc 2.1. UPGMA do mesmo programa foi utilizada para gerar um dendrograma contendo os acessos de *Mentha sp.*



Os dados das análises dos 82 indivíduos com os 88 marcadores obtidos passaram pelo programa Bood versão 3.03, que tem a função de avaliar o grau de confiabilidade dos agrupamentos por meio do procedimento de bootstrap.

Resultados e Discussão

Dos 48 primers ISSR testados, 10 foram selecionados para avaliação e estudos de acessos do gênero *Mentha*, gerando 82 marcadores. Esses marcadores geraram um dendrograma visualizando a similaridade entre os acessos de menta (Figura 1). Observa-se nesta figura que os 4 últimos acessos não foram agrupados em nenhum grupo e apresentam baixo grau de similaridade em relação aos outros. Isto pode ter ocorrido devido à contaminação das amostras ou um possível equívoco quanto à classificação taxonômica.

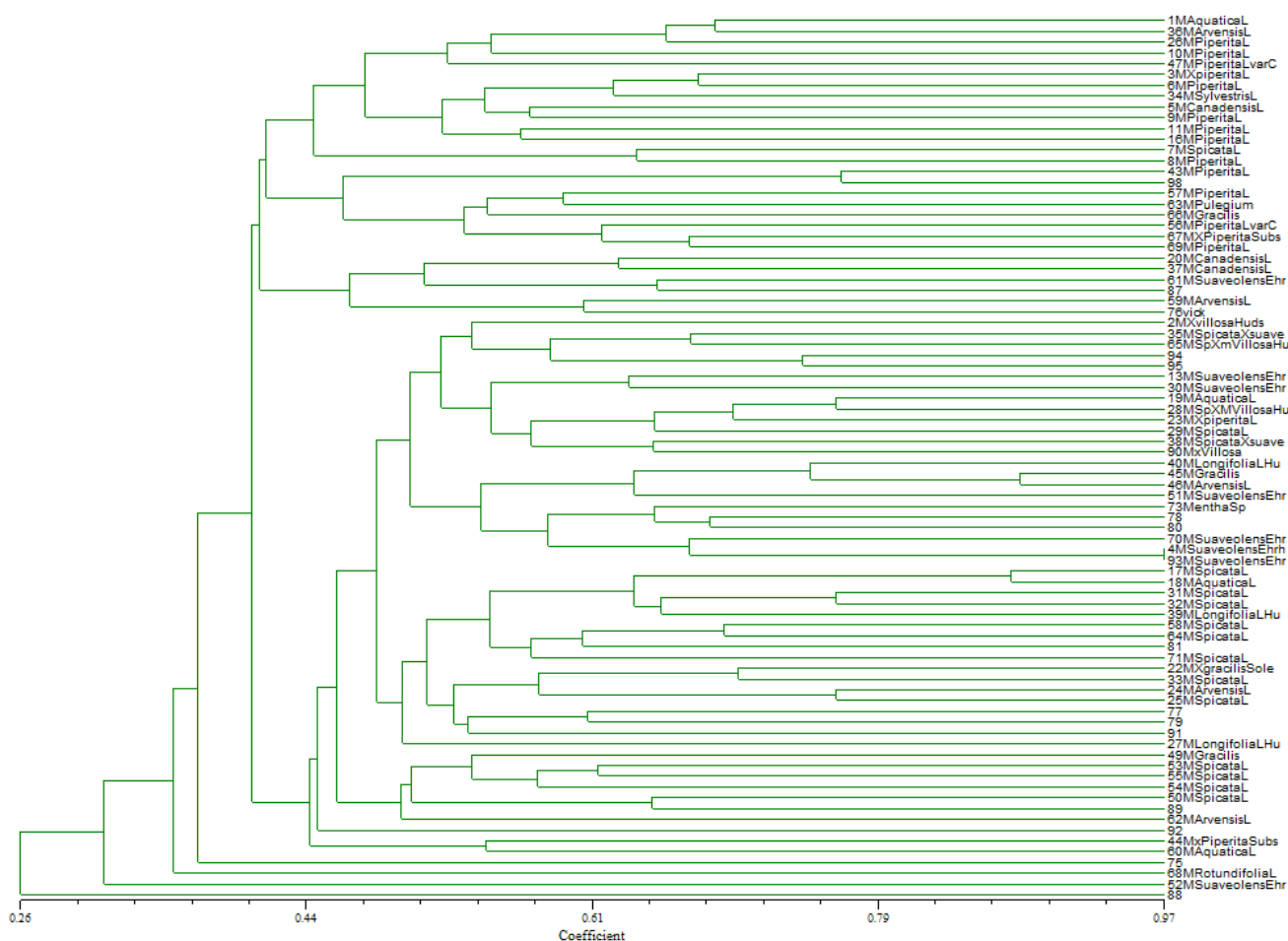


Figura 1. Dendrograma dos 82 indivíduos de *Mentha sp* gerado a partir do programa NTSYS.

Os dois indivíduos mais próximos apresentaram 97% de similaridade, estes estão classificados como dois indivíduos diferentes, porém da mesma espécie (*M. suaveolens*), sendo possível que ambos



sejam amostras da mesma planta. O segundo grupo de maior similaridade (88%) é formado por dois acessos classificados como da espécie *M. gracilis* e outro da espécie *M. arvensis*, podendo-se dizer, com isso, que possivelmente há um equívoco quanto à classificação. O mesmo ocorreu com o terceiro grupo de maior similaridade (87%), do qual fazem parte um indivíduo classificado como *M. spicata* e outro como *M. aquatica*. Os demais grupos provavelmente estão de acordo com a classificação inicial. O primeiro grande grupo formado, *M. piperita*, apresentou similaridade variando de 40 a 75%, enquanto o outro grande grupo, *M. spicata*, apresentou similaridade variando de 45 a 87%.

Dentre os 82 indivíduos analisados, 15 ainda não foram classificados. Com base nas análises do dendrograma é possível supor pelo agrupamento dos mesmos que, dentre os indivíduos não classificados, um é da espécie *M. piperita*, um é da espécie *M. suaveolens*, outro é da espécie *M. arvensis* e outro é da espécie *M. spicata*. Estes resultados deverão ser comparados com análises químicas dos compostos característicos de cada espécie.

Conclusões

Com o uso dos programas NTSYS e Bood, foi possível obter um dendrograma de análise de similaridades dos 82 indivíduos de *Mentha sp* e definir o grau de confiabilidade dos agrupamentos gerados. Com isso, foi observado grau de similaridade variando de 40 a 97%, de forma que dois grandes grupos se destacaram: grupo *M. piperita* e grupo *M. spicata*. Além disso, 4 indivíduos foram excluídos da matriz, apresentando a menor similaridade. A partir das análises e dos resultados obtidos, conclui-se que o uso de marcadores ISSR foi adequado para o estudo, pois possibilitou uma posterior análise de qualidade dos dados dos indivíduos de *Mentha sp*. A análise de variabilidade deste gênero acrescenta informações ao banco de dados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia a respeito destes 82 indivíduos, facilitando e possibilitando o desenvolvimento de outras pesquisas a respeito do gênero *Mentha*.

Referências Bibliográficas

BUSO, G.S.C.; CIAMPI, A.Y.; MELO, L.C.; AMARAL, Z.P.S.; MAZZUCATO, A. Análise da variabilidade genética de cultivares de feijoeiro comum com marcadores ISSR. Brasília; EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2008. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, n. 221, 2008.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.



GRISI, M. C. M.; SILVA, D. B.; ALVES, R. B. N.; GRACINDO, L. A. M. B.; VIEIRA, R. F. **Avaliação de genótipos de Menta (*Mentha spp*) nas condições do Distrito Federal, Brasil.** Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 33-39, 2006.

WOLFE, A.D.; LISTON, A. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; DOYLE, J.J. (Ed.). **Molecular systematics of plants II: DNA sequencing.** Boston: Kluwer, 1998. p.43-86.