



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
CURSO DE AGRONOMIA

SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE *Mentha*
UTILIZANDO MARCADORES ISSR E RAPD

FELIPE MONT'ALVÃO CANELA

BRASÍLIA

2016

FELIPE MONT'ALVÃO CANELA

**SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE *Mentha* UTILIZANDO
MARCADORES ISSR E RAPD**

Monografia apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, como parte das exigências do curso de Graduação em Agronomia, para a obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Orientadora: **DR^a. TAISLENE BUTARELLO RODRIGUES DE MORAIS**

Co-orientadora: **DR^a GLÁUCIA SALLES CORTOPASSI BUSO**

**BRASÍLIA
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA

Canela, Felipe Mont'Alvão.

Similaridade genética entre acessos do *Mentha* utilizando marcadores ISSR e RAPD / Felipe Mont'Alvão Canela. Orientadora: Taislene Butarello Rodrigues de Moraes. Co-orientadora: Gláucia Salles Cortopassi Buso, Brasília, 2016.

Monografia – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2016 71 p.

1. Gênero *Mentha*. 2. Marcador Molecular. 3. ISSR e RAPD. 4. Coeficiente Similaridade.. I. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária / Universidade de Brasília. II. Título.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

CANELA, F.M. Similaridade genética entre acessos de *Mentha* utilizando marcadores ISSR e RAPD. 2016. 77p. Monografia (Curso de Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: FELIPE MONT'ALVÃO CANELA

TÍTULO DA MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE CURSO

GRAU: 3º ANO: 2016

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia de graduação e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia de graduação pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor.

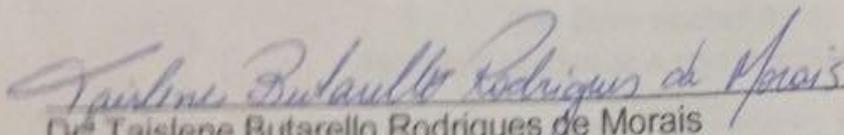
FELIPE MONT'ALVÃO CANELA

Similaridade genética entre acessos de *Mentha* utilizando marcadores ISSR e RAPD

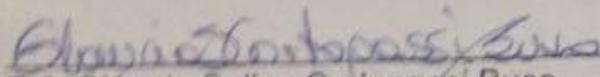
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, como parte das exigências do curso de Graduação em Agronomia, para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Aprovado em de de

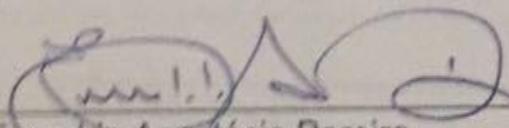
COMISSÃO EXAMINADORA



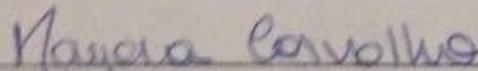
Dr^a Taislene Butarello Rodrigues de Moraes
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária Universidade de Brasília
Orientador



Dr^a Gláucia Salles Cortopassi Buso
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)
Co-orientador



Dr. Everaldo Anastácio Pereira
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - Universidade de Brasília
Examinador



Mestre Nayara Carvalho
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – Universidade de Brasília
Examinador

DEDICATÓRIA

Á Deus, meu companheiro SEMPRE.

Aos meus pais, minha admiração e meus exemplos para toda a vida.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”. (Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu companheiro SEMPRE.

Aos meus pais, minha admiração e meus exemplos para toda a vida.

À todos meus amigos que de alguma forma me ajudaram ou estiveram presentes na realização do trabalho.

À Universidade de Brasília (UnB), pelo apoio e oportunidade de aperfeiçoamento profissional.

À EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelo apoio e oportunidade de aperfeiçoamento profissional.

À Dr^a. Glaucia Buso por sempre me apoiar nos momentos de dificuldade, pelo aprendizado fornecido, companheirismo e pelas oportunidades.

Ao Dr. Everaldo Pereira pelo incentivo durante todo o curso, pela admiração como pessoa e seu conhecimento, como pelo grande companheiro que se tornou.

À Dr^a. Taislene Moraes pelo seu tempo disposto, apoio em todos os momentos, além do imenso aprendizado adquirido, tenho enorme gratidão como amiga.

Ao grande amigo Marcão, pelo companheirismo, entusiasmo e prontidão nos momentos de dúvida.

A mestranda Nayara pelo enorme aprendizado passado, pela companhia e amizade, e por ter paciência quase todos os dias comigo, tenho enorme gratidão como amiga.

Ao companheiro Paulo Henrique Santos Leite, que sempre me ajudou em todo processo, pela amizade verdadeira e por tornar meus dias no laboratório mais alegres.

A toda equipe do laboratório de genética vegetal, pelos ensinamentos, paciência e por sempre me auxiliar nas atividades.

Ao Dr. Roberto Fontes e Dijalma Barbosa, por fornecerem o material e sempre estarem dispostos a tirar dúvidas.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

- Tabela 1.** Denominação e nome científico das 82 acessos analisados, ao BAG-Menta da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, e seus respectivos meios de cultivos, telado e/ou in vitro.....42
- Tabela 2.** Iniciadores de ISSR utilizados nos 82 acessos de menta, seguidos da sequência e temperatura ideal de anelamento.....55
- Tabela 3.** Iniciadores de RAPD utilizados nos 82 acessos de menta, seguidos da sequência e temperatura ideal de anelamento.....55
- Tabela 4.** Análise dos iniciadores ISSR com base nos 82 acessos de Mentha, apresentando um total de locos amplificados, polimórficos e monomórficos, como também a variação do tamanho dos fragmentos amplificados.....56
- Tabela 5.** Análise dos iniciadores ISSR com base nos 82 acessos de Mentha, apresentando um total de locos amplificados, polimórficos e monomórficos, como também a variação do tamanho dos fragmentos amplificados.....57
- Figura 1.** Esquema das condições de amplificação do DNA, baseados em PCR e realizada em termocilador, referente a marcadores ISSR.....48
- Figura 2.** Esquema das condições de amplificação do DNA, baseados em PCR e realizada em termocilador, referente a marcadores RAPD.....53
- Figura 3.** Exemplo de quantificação do DNA em gel de agarose 1% de 26 acessos de Mentha, em conjunto com DNA lambda (200 e 400ng) como referência.....54
- Figura 4.** Exemplo de quantificação do DNA diluído de acessos de Mentha em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. Na primeira coluna está o lambda de 10 ng como referência.....55
- Figura 5.** Gel de agarose 1,5% representando a amplificação com o iniciador 3 ZM, por meio de PCR, dos 82 acessos, e ladder 1 kb como comparativo representado por (L).....56
- Figura 6.** Gel de agarose 1,5% representando a amplificação com o iniciador OPP15 por meio de PCR, dos 82 acessos, e ladder 1 kb como comparativo representado por (L).57
- Figura 7.** Curva representando os coeficientes de variação associados às estimativas de similaridade de Dice, pela análise de bootstrap com variação no número de marcadores.....61

Figura 8. Dendrograma gerado pelo (NTSYS) obtido pelo coeficiente de Sorencen-Dice, e pelo método de agrupamento UPGMA pelo método de agrupamento para os 82 acessos de espécies do gênero *Mentha*.....54

SUMÁRIO

Resumo	I
Abstract.....	II
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	18
2.1. Aspectos Gerais e Evolução de Espécies do Gênero <i>Mentha</i>	18
2.2. Importância Econômica.....	23
2.3. Espécies do Gênero <i>Mentha</i>	25
2.3.1. <i>Mentha piperita</i> L.....	25
2.3.2. <i>Mentha aquatica</i> L.....	26
2.3.3. <i>Mentha pulegium</i> L.....	26
2.3.4. <i>Mentha x piperita citrata</i> Ehrh.....	27
2.3.5. <i>Mentha spicata</i> L.....	28
2.3.6. <i>Mentha arvensis</i> L.....	29
2.3.7. <i>Mentha canadensis</i> L.....	29
2.3.8. <i>Mentha gracilis</i>	30
2.3.9. <i>Mentha suaveolens</i> Ehrh.....	31
2.3.10. <i>Mentha longifolia</i> Huds.....	31
2.3.11. <i>Mentha x villosa</i> Huds.....	31
2.4. Variabilidade Genética	32
2.5. Melhoramento Genético.....	34
2.6. Marcadores Moleculares.....	35
2.6.1. Marcador Molecular ISSR.....	37
2.6.2. Marcador Molecular RAPD.....	40
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1. Material Vegetal e Local do Experimento.....	41
3.2. Extração do gDNA Vegetal Total.....	44
3.3. Quantificação e Diluição de DNA.....	45
3.4. Reações e Amplificação da PCR.....	46
4. Análise Estatística.....	49
4.1. Análise de Agrupamento.....	51

4.2. Coeficiente de Correlação Cofenética.....	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
6. CONCLUSÕES.....	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

CANELA. F. M., **SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE *Mentha* UTILIZANDO MARCADORES ISSR E RAPD.** 2016.

Universidade de Brasília – UnB.

RESUMO

Utilizada nas indústrias farmacêutica, alimentícia e de cosméticos as espécies do gênero *Mentha* são cultivadas em várias regiões do Brasil, havendo um grande interesse econômico na produção de óleo essencial para o mercado interno e externo. A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia possui um Banco Ativo de Germoplasma de menta, porém o conhecimento e uso deste germoplasma é ainda incipiente e demanda esforço imediato para que possa ser eficientemente explorado, preservado e continuamente utilizado. Além disso, há um desafio quanto à classificação da *Mentha*, devido à alta incidência de hibridação interespecífica entre as espécies. Uma das alternativas para incrementar o conhecimento da variabilidade genética e melhor utilização da coleção de menta, é a análise dos acessos por meio de marcadores moleculares do tipo ISSR (Inter Simple Sequence repeats) e RAPD (Random Amplified Polimorfism DNA) que são dominantes, de alta reprodutibilidade e apresentam altos níveis de fragmentos polimórficos. O advento das técnicas moleculares permitiu a análise da variação dos organismos ao nível de DNA, observando diferenças nas sequências gênicas com uso de marcadores moleculares. Este estudo teve como objetivo avaliar a variabilidade genética interespecífica dos 82 acessos de menta do banco utilizando marcadores moleculares ISSR e RAPD. Utilizou-se 12 iniciadores polimórficos de ISSR e nove de RAPD na amplificação do DNA por meio de reações de PCR, e a separação dos fragmentos foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídio. A matriz obtida pela análise dos marcadores foi submetida a análises estatísticas, com uso do software NTSYS (versão 2.21m) utilizando o coeficiente de DICE para a similaridade entre os acessos, e para análise de agrupamento o método UPGMA. Foram obtidos 182 marcadores para os diferentes genótipos, resultando em um dendrograma onde se pode observar a formação de dois

principais grupos, com similaridade de 0.49 entre eles. O primeiro grupo dividiu-se em dois subgrupos com similaridade de 0.55. O primeiro subgrupo que constitui de 77 acessos, uma parte representou maior similaridade entre as espécies *M. suaveolens* Ehrh, *M. spicata* L., híbridos interespecíficos e diferentes espécies nomeadas *Mentha* sp, e outra parte pelas espécies *M. piperita* L., *M. arvensis* e *M. longifolia* Huds. O segundo subgrupo é representado principalmente pela *M. canadensis* L. O segundo grupo é formado apenas por um acesso de *Mentha* sp. Pode-se observar que o maior grau de similaridade ocorreu em dois acessos do híbrido *Mentha spicata* x *suaveolens*, com similaridade de 0.91. Dentre os acessos analisados 12 nomeados como *Mentha* sp agruparam-se junto a espécies conhecidas podendo sugerir a classificação dos mesmos. Conclui-se que o marcador utilizado pode ser útil para o melhor conhecimento dos acessos da coleção em conjunto com análises químicas e morfológicas, facilitando e possibilitando o desenvolvimento de outras pesquisas a respeito deste gênero. Os 21 iniciador usados foram eficientes para diferenciar os acessos de *Mentha*.

Palavras-chaves: Gênero *Mentha*, Marcador Molecular, ISSR e RAPD, Coeficiente similaridade,

ABSTRACT

Used in pharmaceuticals, food and cosmetics industries, species of genus *Mentha* are grown in several regions of Brazil, presenting wide production of essential oil to the import and export. The Embrapa Genetic Resources and Biotechnology has an active germplasm bank of mint, but the knowledge and use of this germoplasm is yet incipient and demand immediate effort to be efficiently exploited, preserved and continuously used. Furthermore there is a challenge to classify species of genus *Mentha*, due to high incidence of interspecific hybridization among the species. An alternative for increasing the knowledge of genetic variability and better use of mint collection, are analysis of accessions variability by ISSR and RAPD molecular markers that are ruling, high reproducibility and have high levels of polymorphic fragments. The advent of molecular techniques allowed the variation analysis of organisms at the level of DNA. The objective study like was to evaluate the interspecific genetic variability of 82 accessions of *Mentha* genus maintained in the *Mentha* Active Bank using ISSR and RAPD molecular markers. Twelve ISSR and 9 RAPD polymorphic primers were used in the amplification of DNA by PCR, and the separation of fragments was performed by agarose gel electrophoresis, colored with ethidium bromide. The matrix obtained by molecular analysis was submitted to software NTSYS (version 2.21m) using the Dice similarity coefficient, and to clustering analysis by UPGMA methods. One hundred and eight two markers were obtained for the 82 different genotypes, resulting in a dendrogram that showed the formation of two principal groups, with 0.49 of similarity between them. The first group was divided into two subgroups with 0.55 of similarity. The first subgroup was composed by 77 acesses, one grouping with greater similarity between species *M. suaveolens* Ehrh, *M. spicata* L, interspecific hybrids and different species named *Mentha* sp and other group with species *M. piperita* L., *M. arvensis* e *M. longifolia* Huds. The second subgroup is mainly represented by specie *M. canadensis* L. the second group is formed by only one access of *Menthe* sp. Can be observed that greater similarity occurred in two accesses of hybrid *Mentha spicata* x *suaveolens*, with 0.91 of similarity. Among the analyzed access, 12 named like *Menthe* sp. clustering together with known species that can be suggested a classification of them. Concluded that molecular markers used can be useful to better

knowledge of mint accesses together with chemical and morphological analysis, facilitating and enabling the development of research about this genus

Keywords: Genus *Mentha*, Molecular markers, ISSR, RAPD, Similarity coefficient.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos houve um aumento significativo de metodologias da genética molecular e suas aplicações, visando aumentar a eficiência da conservação e uso dos recursos genéticos vegetais. As metodologias para detectar e analisar a variabilidade genética em nível molecular oferecem informações adicionais relativas à conservação e ao uso de bancos de germoplasma.

O gênero *Mentha* consiste em plantas herbáceas, perenes e aromáticas cultivadas principalmente para a extração e uso de óleos essenciais, tanto para fins medicinais e alimentícios, como para produção de cosméticos. Cada vez mais o conhecimento tradicional a cerca do uso, composição e efeitos das plantas medicinais, assim como seu cultivo e manejo vêm sendo pesquisados para melhor atender uma crescente produção de substâncias de interesse às indústrias (EVANS, 2006).

Estudos realizados admitiram existência de cinco gêneros na família *lamiaceae*: *Audibertia*, *Eriodontes*, *Pulegium*, *Preslia* e *Mentha*. Por não existirem evidências de hibridação interespecífica nos quatro primeiros gêneros, não há dificuldade em sua identificação. O quinto gênero é constituído por cinco espécies: *M. suaveolens* Ehrh, *M. longifolia* L. Hudson, *M. spicata* L., *M. arvensis* L. e *M. aquatica* L., que apresentam diversas variações quanto ao número de cromossomos, ocorrendo altas taxas de hibridação interespecífica. As plantas desta seção apresentam rizoma vigoroso, autocompatibilidade e multiplicação garantida graças à ginodioiccia (GOBERT *et al.*, 2002).

O número de espécies que pertencem ao gênero *Mentha* tem sido objeto de especulação durante muitos anos, devido, sobretudo, a alta dificuldade de classificação, quanto à morfologia e à elevada variação na composição do óleo essencial.

Ocorre, no gênero, hibridação interespecífica com elevada frequência, tanto em populações silvestres como cultivadas. Apesar de a maioria dos híbridos ser estéril ou sub-fértil, estes encontram um meio de se perpetuar por meio da propagação vegetativa. Nas populações de híbridos em que

predominam os de tipo sub-fértil, esta situação é contornada através de cruzamentos com as outras espécies ou com as genitoras, fato que gera alta variação em termos de número de cromossomos (LORENZI & MATOS, 2002).

A correta classificação das espécies pertencentes ao gênero *Mentha* a partir de caracteres morfológicos é uma tarefa muito complexa, até mesmo para especialistas. Devido à alta semelhança entre as espécies, as mesmas podem ser confundidas e, se tratando de uso terapêutico, pode representar um tratamento menos eficaz, podendo ser prejudicial a saúde do consumidor.

Em geral, as classificações de cada espécie deste gênero baseiam-se na morfologia das folhas, no florescimento e no hábito de crescimento. A forma das folhas, tamanho, nervuras e pecíolos variam bastante. O tamanho e as cores das folhas variam em tons de verde, assim como varia a sua pilosidade e formato do limbo foliar. A crisposidade e a rugosidade, bem como as variações são de fundamental importância para a taxonomia (GARLET, 2007).

Ocorrências regulares de hibridação interespecífica dentro do gênero resultaram em desafios taxonômicos, restando muito poucas publicações sobre taxonomia de espécies *Mentha*. Devido a dificuldades na identificação das espécies, conclui-se que a identificação pode ser otimizada por análise combinada de caracteres morfológicos, composição do óleo essencial e marcadores moleculares.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi explorar a variabilidade genética entre 82 acessos de espécies do gênero *Mentha*, com a utilização de marcadores moleculares RAPD e ISSR, com o intuito de auxiliar na classificação de espécies do Banco Ativo de Germoplasma, e a conservação deste para uso em programas de melhoramento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos gerais e evolução de espécies do gênero *Mentha*

As espécies do gênero *Mentha* pertencem à família *Lamiaceae*, nativa do Oriente Médio e chegaram à Europa através do norte da África, levada

pelos árabes. Introduzida nas Américas, é cultivada em regiões temperadas e subtropicais de clima ameno. A introdução da *Mentha* no Brasil foi feita pelos imigrantes japoneses que cultivavam em pequenas escalas, no interior de São Paulo no início do século XX (MAIA, 1998).

O Brasil foi o maior produtor do mundo desde a II Guerra Mundial até a década de 70, sendo o Estado do Paraná responsável por 95 % da produção, com registros de queda, após esgotamento da fertilidade natural do solo onde se implantou a cultura (PARANÁ, 1978).

O gênero *Mentha* é um dos mais complexos do reino vegetal devido aos inúmeros híbridos resultantes do cruzamento espontâneo das espécies, estando constituída por um grande número de espécies, variedades e híbridos que dificultam a sua classificação (BUNSAWAT, *et al.*, 2004).

A partir de 1974, ocorreu uma queda acentuada na produção de óleo bruto de menta, causada pela diminuição das áreas de plantio e pelo baixo nível tecnológico do agricultor brasileiro (BANDONI & CZEPAK, 2008). O advento do mentol sintético ajudou na queda dos preços, o que levou os agricultores a abandonar seu cultivo. Mesmo assim, a produção de mentol natural continua tendo vantagens sobre o sintético, devido à pureza e qualidade superiores. O mentol sintético é contaminado com moléculas tóxicas durante o processo de produção, tornando-o impróprio para uso em muitos produtos alimentícios e farmacêuticos (MAIA, 1998).

A propagação comercial de menta é assexuada em função da grande variabilidade genética das sementes devido à hibridização (LAWRENCE, 2007). No entanto pode-se propagar via sementes, e híbridos estéreis podem propagar por estaquia (JOLY, 1983).

Podem-se utilizar mudas provenientes de estolões ou brotações de campos de matrizes. O plantio por mudas oriundas de estaquia é usada no Brasil (PAULUS & PAULUS, 2007), implicando em custos adicionais relativos à depreciação das estruturas de propagação, mão de obra, substrato, irrigação e transplante, além de no mínimo 1 a 2 meses até que as mudas atinjam o tamanho mínimo para ir a campo. Na Índia são usados estolões conservados sob refrigeração do último cultivo, estolões de campos de matrizes e plantas de rebrota (KUMAR *et al.*, 2007). Plantios tradicionais usam estolões a 5 cm de

profundidade, de forma contínua (ponta com ponta), com espaçamento de 50 cm (PATRA *et al.*, 2000).

As mentas são plantas medicinais e aromáticas, com folhas e inflorescências ricas em óleos essenciais que é produzido e armazenado em tricomas glandulares peltados, os quais estão presentes principalmente em folhas e flores e em menores densidades nos caules, cuja composição química depende de fatores genéticos e ambientais (BANDONI & CZEPAK, 2008).

Estudos sobre a influência da época de colheita na quantidade e qualidade do óleo essencial são inúmeros e exigem avaliação regional em função da interação das condições ambientais locais com o metabolismo vegetal (MARTINS *et al.*, 1994).

Popularmente, as mentas são utilizadas para combater distúrbios estomacais, do aparelho respiratório e parasitas intestinais. Suas folhas podem ser utilizadas frescas, secas, na forma de chá, tintura ou como inalante.

Algumas espécies do gênero *Mentha* possuem várias propriedades medicinais, tais como antiespasmódicas, carminativas, tônicas e estimulantes relativamente notáveis. Por favorecerem a expectoração são indicadas contra catarros, tosses, asma e alivia cólicas de origem nervosa, bem como dores de cabeça e reumáticas; além de combater vermes intestinais, tais como giárdia, ameba e lombriga (CORREA JUNIOR *et al.*, 1994).

A menta é considerada como planta de crescimento rápido e fácil, com caules violáceos e ramificados, folhas opostas, serradas e cor variando entre verde-claro e verde-escuro, flores lilases ou azuladas dispostas em espigas terminais, e fruto do tipo aquênio (WATANABE *et al.*, 2006).

Carvalho & Espirito Santo (2007) caracterizaram morfológicamente amostras de hortelãzinho (*Mentha x villosa*) da coleção de menta da Universidade de Brasília. Foram descritos o comprimento e a largura do limbo foliar das folhas do quarto nó e do quinto nó de cada acesso (a partir do ápice da planta), bem como o comprimento do pecíolo. Também foi observada a presença ou ausência de antocianina. Com os dados foram calculados a área do limbo foliar e o índice de afilamento. Concluíram que as hortelãs apresentam variações morfológicas importantes quanto à área do limbo foliar, formato do limbo e tamanho de pecíolo dentro da mesma espécie.

Como resposta à demanda farmacêutica, a obtenção de princípios ativos vegetais está deixando de ser extrativista e assumindo caráter produtivo com sustentabilidade. Na busca por qualidade superior da matéria prima de origem vegetal, o cultivo sistemático aparece como uma saída promissora. A pesquisa agrônômica deve fornecer informações seguras tanto para o cultivo de plantas medicinais tradicionais, como de novas espécies (EVANS, 2009).

Segundo Gobert (2002), a hibridação nas mentas produz muitos morfotipos e quimiotipos, a taxonomia é complexa e é necessário distinguir e associar os morfotipos aos quimiotipos para facilitar a inserção do germoplasma no mercado de aromáticos. A descrição de morfotipos de *Mentha* é feita com base em características morfológicas: formato do limbo, tamanho do pecíolo, cor do talo, pilosidade, crisposidade, rugosidade e características das flores (estas nem sempre presentes).

Através de técnicas citogenéticas, busca-se informações diretamente relacionadas à ontogenia e filogenia dos seres vivos, usando como alvo principal os cromossomos, que constituem o próprio material genético em ação e transformação. Gobert (2002), na tentativa de estabelecer uma filogenia de cinco espécies e três híbridos do gênero *Mentha* reunidos em 62 acessos, provenientes de diferentes regiões geográficas, fizeram análises citogenéticas, moleculares e morfológicas e propuseram que no gênero *Mentha* o número básico de cromossomos seja, provavelmente, ($n=x=12$) e que, deste número, se originaram os diploides *M. suaveolens* e *M. longifolia* com ($2n=2x=24$) cromossomos. Estas duas espécies teriam sido as ancestrais das demais espécies com vários poliplóides (triploides, tetraploides, pentaploides, hexaploides e octoploides), por hibridação entre espécies ou por sucessivas poliploidizações.

A sistemática do gênero *Mentha* representa um desafio à taxonomia devido à alta incidência de poliploidia, variação no número base de cromossomos, morfologia variada, propagação vegetativa e hibridação interespecífica frequente (DORMAM *et al.*, 2003)

Santos (2004) realizou o primeiro estudo da morfologia de acessos de *Mentha x villosa* Huds coletados no Distrito Federal tendo enfatizado diferenças

na cor, rugosidade e pilosidade dos acessos, destacando suas características como descritores morfológicos fundamentais.

Gracindo *et al.* (2006) avaliaram e compararam genótipos de hortelã (*Mentha* sp.) nas condições do Distrito Federal. Vinte e um genótipos introduzidos a partir de coleção de Purdue University (USA) e um genótipo brasileiro foram analisados com base na porcentagem de conteúdo relativo de óleo volátil dos constituintes do óleo essencial. A produtividade das folhas variou entre 575 e 4.271 Kg/ha e conteúdo de óleo essencial de 0,47 a 4,17%. Os principais constituintes do óleo essencial detectados foram: 1,8-eucaliptol, carvona, limoneno, linalol, acetato de linalilo, mentol, acetato de metilo e óxido de piperitenona. Em alguns genótipos foram encontrados no óleo essencial, elevado teor de um componente específico, como o óxido de piperitona (79.0% em 4 CM - *M. suaveolens*), carvona (72,1% em 2 CM - *M x villosa* Huds; 70.9% em 29 CM - *M. spicata* L) e linalol (78,5% em 24 CM – *M. arvensis*). O genótipo 20 CM (*M. canadensis* L) apresentou o maior conteúdo de óleo essencial (4,17%) e mentol com rendimento (65%), mas apresentou baixa produtividade na região do Distrito Federal.

Os híbridos entre as espécies de *Mentha* são frequentes na natureza, e geralmente podem ser reconhecidos pela aparência intermediária e esterilidade, embora ocasionalmente possam ocorrer férteis (MARTINS *et al.*, 1994)

As espécies de *Mentha* são caracterizadas por apresentar caules ramificados; folhas opostas e serradas, flor com quatro estames, corola não distintamente labiada, sem o conjunto de caracteres, e a corola campanulada, com quatro lobos eretos e cálice campanulado, 5-lobado, dispostas em espigas terminais ou axilares, lilases ou azuladas (BARROSO, 1986)

Gobert *et al.* (2002) encontraram um espécime de *Mentha x villosa* no sudoeste da Inglaterra com notável semelhança a *M. suaveolens*. Existem relatos de métodos que utilizaram marcadores AFLP ("Amplified Fragment Length Polymorphism") permitindo distinguir claramente *M. spicata* de seus progenitores e acessos de *M. spicata* que estão mais perto de *M. suaveolens* ou *M. longifolia*. *M. spicata* frequentemente forma retrocruzamentos com seus progenitores diplóides, na verdade, híbridos como *M. x villosa* Hudson (*M.*

spicata x *M. suaveolens*) e *M. x villosa-nervata* Opiz (*M. spicata* x *M. longifolia*) são difíceis de distinguir de "típicos" *M. spicata*.

2.2. Importância econômica

O interesse pela cultura está relacionado, principalmente, a importância econômica do seu óleo essencial, sendo que este está entre os dez mais comercializados do mundo. A qualidade comercial do óleo essencial depende das proporções relativas de seus diferentes constituintes (BRUNETON, 1991).

As espécies mais utilizadas comercialmente são *Mentha x piperita* e *M. arvensis*, que têm o mentol como constituinte majoritário, produto de grande interesse econômico nas indústrias farmacêutica, alimentícia e de perfumaria (LORENZO *et al.*, 2002).

Os óleos essenciais das mentas são ricos em monoterpenos, como mentol, mentona, carvona e linalol, que constituem os principais componentes químicos de valor econômico. Esses óleos e seus constituintes são extensivamente aplicados nas indústrias de alimentos, medicamentos, cosméticos, fragrâncias e do tabaco (GARLET, 2007).

O linalol é utilizado na manufatura de ésteres, principalmente o acetato de linalila, sendo empregado na indústria de perfumaria e sabões e a carvona, que como o mentol, é usada na aromatização e no sabor de produtos alimentícios e farmacêuticos, na formulação de preparações bucais e pastas dentais (KLOCK & MUNIZ, 2005).

No Brasil os principais estados produtores de plantas medicinais são Paraná, São Paulo, Bahia, Maranhão, Amazonas, Pará e Mato Grosso. O Paraná sozinho é responsável pela movimentação anual de R\$ 25 milhões com um total de 40 mil toneladas produzidas em 3 mil hectares, e apresenta crescimento anual de 10% (SILVA, 2005).

O mercado brasileiro de fitomedicamentos atingiu, em 2001, cerca de US\$ 270 milhões, correspondendo a 5,9 % do mercado brasileiro de medicamentos. Nas últimas décadas houve um aumento no mercado de fitomedicamentos, principalmente em países industrializados, atingindo cerca

de US\$ 20 bilhões anuais. Os países europeus, asiáticos e os Estados Unidos são os principais consumidores deste setor (CALIXTO, 2003).

O mercado de ervas aromáticas, medicinais e condimentares vem crescendo rapidamente no Brasil. A indústria do tabaco é a principal consumidora do mentol em todo o mundo, em segundo lugar vem, a indústria de cosméticos, e em seguida os de alimentos (GONÇALVES, 2002).

No entanto, houve dois fatores que contribuíram para a diminuição da produção de menta, o advento do mentol sintético e a suscetibilidade das plantas à doença conhecida como "ferrugem da menta", causada pelo fungo *Puccinia menthae* (WATANABE *et al.*, 2006).

O Estado do Paraná iniciou a produção de *Mentha* em meados da década de 70, e neste período o Instituto Agrônomo de Campinas desenvolveu pelo programa de melhoramento genético a variedade IAC-701, na qual ocupou a maior área de cultivo quando o Brasil apresentou posição de destaque na produção de mentol (PASSOS, 1973).

O óleo de menta, na Índia e China, custa 10 dólares o litro; no Brasil varia de 10 a 30 dólares o litro, sendo geralmente comercializado por 50-60 dólares o litro. Os maiores produtores mundiais do óleo essencial são a Índia, China, Brasil, Japão, França e Estados Unidos, sendo a Índia responsável por contribuir com 70% do volume desta produção (SRIVASTAVA, 2002).

A produção mundial anual de óleos essenciais de espécies aromáticas é estimada entre 110 mil e 120 mil toneladas (KOTHARI, 2005). De acordo com o padrão de aceitação do produto, o teor de óleo essencial se situa entre 1,0 e 1,5%, com mais de 50% de mentol; deve ter no mínimo 1,0% de óleos etéreos; não pode haver pedaços de caule com diâmetro maior que 5,0 mm (CORREA JUNIOR *et al.*, 1994).

2.3. O Gênero *Mentha*

2.3.1. *Mentha piperita* L.

A *Mentha piperita* L, conhecida como hortelã, hortelã pimenta, menta e hortelã- apimentada. É uma espécie herbácea, perene, com talos eretos de até 80 cm, quadrangulares e muito ramificados. As folhas são opostas, pecioladas, lanceoladas e agudas, com bordos serrados, de cor verde escura na face superior e verde clara na inferior. As flores se encontram agrupadas e na cor púrpura. Os estolões, crescem abaixo e acima da superfície do solo em todas as direções. (LORENZI & MATOS, 2002).

Esta erva apresenta propriedades espasmolíticas, antivomitivas, carminativas, estomáticas e anti-helmínticas, por via oral e, antibacteriana, antifúngica e antiprurido, em uso tópico (GRUENWALD *et al.*, 2000).

O Brasil já foi o maior exportador mundial de óleo essencial de *M. piperita* L, entretanto passou à grande importador, devido ao baixo nível tecnológico de produção empregado na região sul do país onde era cultivada em larga escala (MATOS,1999).

A hortelã-pimenta é considerada atualmente um híbrido resultante do cruzamento entre *M. aquatica* e *M. spicata*. Suas folhas são geralmente verde-escuras e suas flores são rosadas ou púrpuras. É usada como condimento, aromatizante, como chá e no preparo de outras bebidas. Também é muito usada para fins medicinais e para a obtenção de óleos essenciais, principalmente de mentol (TODD & JOSEPHONS, 1996).

Como todo híbrido, raras vezes dá sementes e quando existem, tem um baixo poder germinativo e dão lugar a plantas de características diferentes. Somente em climas chuvosos e frios apresentam flores uma vez por ano. Tem crescimento rápido se expostas ao sol em canteiros de terra com bastante húmus (BUSTAMENTE, 1993).

2.3.2. *Mentha aquatica* L.

Conhecida como menta-aquática, hortelã-dos-ribeiros ou hortelã-da-água, como o nome indica, cresce naturalmente na beira de cursos de água, lagos, poças, brejos, etc. Atinge normalmente cerca de 90 cm, embora possa chegar a 1,5 m de altura. Suas flores são pequenas, rosadas ou lilases, e ficam densamente agrupadas. É usada geralmente para fins medicinais (CROTEAU, 2005).

A espécie pode ser útil na redução de contaminantes da água, principalmente de microrganismos. Citada por Todd & Josephons (1996), essa espécie produz compostos ou antibióticos que podem reduzir alguns patógenos humanos presentes na água. O interesse nessa espécie também está relacionado à importância econômica de seu óleo essencial, que encontra aplicações em indústrias de perfumaria, cosmética, higiene pessoal, produtos medicinais, entre outras (CALIXTO, 2003).

2.3.3. *Mentha pulegium* L.

A *M. pulegium* é conhecida popularmente como poejo. Pode atingir até 50 cm de altura, crescendo em locais úmidos ou encharcados, e na beira de cursos de água. Possui folhas pequenas e flores rosadas junto ao caule, logo acima das folhas. É usada como planta medicinal, condimento, aromatizante, como chá e no preparo de outras bebidas. Também é utilizada para repelir insetos (seu nome “pulegium” veio de seu uso como repelente de pulgas antes do surgimento dos inseticidas modernos) (LORENZI & MATTOS, 2002). Em aromaterapia são atribuídas ao óleo essencial desta planta propriedades mucolítica, anticatarral, tônica e estimulante, hipertensiva e cardiotônica, carminativa, estimulante hepatobiliar e emenagoga, com indicações para tratamento de bronquite catarral crônica, bronquite asmática, coqueluche, leucorréia e dismenorreia (MITCHEL & FARRYS, 1996).

Os resultados de estudos químico e farmacológico relataram a presença de até 2% de óleo essencial, cujo principal componente é a pulegona, substância responsável pelo seu cheiro e por suas ações tóxicas,

acompanhada de mentona e isomentona, bem como de flavonóides, especialmente diosmina e hesperidina (LORENZI & MATTOS, 2002).

2.3.4. *Mentha x piperita citrata* Ehrh

A *Mentha x piperita citrata* Ehrh, conhecida popularmente como alevante (Bahia) ou Bergamota (Recife), é chamada também de hortelã – pimenta, menta - inglesa e hortelã das cozinhas. É uma planta aromática, marcante pelo aroma cítrico que exala, mas ainda pelo efeito visual da planta de tonalidade arroxeadada. A espécie é imprescindível a quem se empenhe em construir um jardim aromático (LORENZI & MATTOS, 2002).

Apresenta folhas normais, nem jaspeadas nem rugosas apresentando odor característico de limão. Pecíolo de mais de 4 mm de comprimento, limbo foliar lanceolado, umas 2 ou 1,5 vezes mais comprido que largo, verticilos florais na ponta dos ramos formando uma espiga ou capítulo terminal (PAGE & STEARN, 1985). É uma erva perene, ereta de aproximadamente 30 cm de altura, (ou ereta ou semi ereta), com ramos cor verde escura a roxa-púrpura. Folhas elípticas acuminadas, denteadas, pubescentes e muito aromatizadas. De origem europeia, foi trazida no período da colonização sendo muito cultivada como planta medicinal em todo Brasil (LORENZI & MATTOS, 2002).

2.3.5. *Mentha spicata* L.

Segundo Gobert *et al.* (2002), *M. spicata* é o híbrido entre *M. suaveolens* e *M. longifolia* Huds. A *M. spicata* tem a maioria de seus indivíduos pilosos, como seus pais diploides e pode conter outros terpenos que são comumente encontrados em seus progenitores diploides. Quando melhorado pelo homem como planta aromática, a *M. spicata* tornou-se glabra com um odor característico devido à carvona e menthona como terpenos prevalentes.

De acordo com Lebeau (1974), devido a grande variabilidade foi essencial distinguir duas subespécies de *M. spicata*, *M. spicata* subsp. *spicata* e *M. spicata* subsp. *glabrata*, com e sem tricomas não secretores,

respectivamente, pelas seguintes razões: (1) a presença ou ausência de tricomas não secretores levou a um aspecto diferente, (2) grande diferença de perfume e (3) diferença de habitats (HARLEY & BRIGHTON, 1977).

A *M. spicata* propaga-se quase que inteiramente por via vegetativa. Lebeau (1974) e Harley & Brighton (1977) descrevem alguns indivíduos de *M. spicata* que são próximos na aparência das espécies de suas progenitoras diploides. Eles observaram que *M. spicata* segrega caracteres dos pais em sua descendência por autopolinização, que eram impossíveis de distinguir de híbridos que ela forma frequentemente com *M. suaveolens* ou *M. longifolia*. São ocorrentes alguns casos, tais plantas de *M. spicata* pilosas foram confundidas com *M. longifolia*.

Page & Stearn (1985) assim descrevem: “*M. spicata* conhecida também como menta de jardim é a menta mais conhecida e a que mais se cultiva em geral para utilização na cozinha, ainda quando parece não existir no estado silvestre, mas que se torna silvestre a partir do cultivo existente. Cresce até uns 30-45 cm de altura. Possui folhas lanceoladas, quase sem pecíolo e de uma cor verde brilhante e as flores são lilases, dispostas em espiga terminal”.

2.3.6. *Mentha arvensis* L.

É conhecida como hortelã-japonesa tendo como centro de origem o sul da China. É uma planta herbácea, estolonífera, semi-perene, de caule quadrangular, ramificado, podendo atingir até 90 cm de altura. Suas folhas são grandes, opostas, ovaladas e largas, pubescentes, com limbo mais ou menos plano e bordas serradas. A inflorescência é uma espiga terminal e de flores violáceas. Seu sistema radicular é formado por numerosos “rizomas” que se espalham pela camada superficial do solo, emitindo raízes e novos rizomas, dos quais brotam novas plantas. Esses rizomas são quadrangulares, vigorosos e frágeis. Por meio dessa abundante perfilhação, a planta, em pouco tempo, passa a ocupar vasta área de terreno ao seu redor. Essas características fazem com que a hortelã seja altamente exigente em relação às questões de solo e clima (MAY *et al.*, 2007).

No Brasil, para a espécie *M. arvensis* L., a principal cultivar utilizada é a IAC -701, descrita por Lima & Mollan (1952), derivada de valioso clone criado pelo IAC e a mais recomendada para a exploração industrial (BRILHO, 1963).

O clone 701 destacou-se pela rusticidade, resistência à seca, ao acamamento e adaptação as condições da Região Sul e Sudeste. Era pouco suscetível ao ataque da ferrugem, embora não lhe fosse imune; as pequenas pústulas que se formavam sobre as folhas não chegavam a crestá-las e destruí-las, como acontecia à menta original. A planta possuía boa capacidade de perfilhamento, formando grandes touceiras, providas de volumosa massa de rizomas. As touceiras emitiam hastes fortes e eretas, bem providas de folhas, oval-acuminadas, de margens serrilhadas, bastante pilosas, avermelhadas, exalando odor mentolado, ativo e agradável. As plantas floresciam uniformemente, em períodos definidos, indicativos da oportunidade das colheitas (SANTOS, 1965).

2.3.7. *Mentha canadensis* L.

A espécie *M. canadensis* L., é uma planta subtropical, frequentemente citada por alguns autores como duas variedades, *Mentha arvensis glabrata fernald* (em referência às plantas norte-americanas) e *Mentha arvensis piperascens malinv* (referente às plantas da Ásia Oriental) (GRUENWALD *et al.*, 2000).

Vem sendo cultivada na Índia, China, Vietnã e Brasil por ser a única fonte viável de cristais de mentol. Segundo Tucker & Naczi, (2007) esta é a denominação taxonômica correta para a menta de mentol “cornmint” e não suas sinônimas *M. arvensis* L., *M. arvensis f. piperascens Malnvi.ex Holmes*. Esta menta é principal fonte de mentol há mais de 100 anos, com teores entre 68 e 80%. As características de *Mentha canadensis* que a diferenciam de *M. arvensis* são as folhas lineares a oblanceoladas, decrescendo de tamanho no ápice do caule com inflorescência e o odor e sabor mentolado que são fortes em toda a planta (TURCKER & NACZI, 2007).

2.3.8. *Mentha gracilis* Sole

Comumente conhecido como “gingermint”, destaca-se entre as espécies devido às suas propriedades medicinais associadas com a presença de carvona, linalol e limoneno. Atua principalmente como antipirético, carminativo e anti-sépticos.

O cruzamento entre *M. arvensis* ($2n = 72$) e *M. spicata* ($2n = 48$) levou a *M. x gracilis*. De acordo com as contagens de números de cromossomos de Harley & Brighton (1977), *M. x gracilis* é uma pentaplóide ($2n=5x=60$). Assim, *M. arvensis* contribui com três dos cinco genomas de híbridos, e parece altamente provável, pois *M. x gracilis* lembra *M. arvensis*, explicando por que ela está intimamente relacionada com *M. arvensis*.

2.3.9. *Mentha suaveolens* Ehrh.

É uma espécie vigorosa e vivaz conhecida também como menta aromática ou *M. rotundifolia* L., nome mais conhecido para seus híbridos com *M. longifolia*. Seu talo, ramoso é densamente piloso. Alcança 60 cm de altura. Suas folhas são lanuginosas e com rugosidades, mais arredondadas e sésseis, com espigas terminais de flores lilases. Seu aroma é uma combinação do odor de maçãs maduras e o da verdadeira menta. Nas hortas encontra-se na forma variegada e tem as folhas manchadas de branco cremosas ou totalmente brancas, o que a torna ornamental. Prefere solos areno-argilosos (PAGE & STEARN .1985).

2.3.10. *Mentha longifolia* L.

Espécie nativa da Europa, Ásia central e ocidental (desde o este de Nepal até o extremo mais ocidental da China) e África do norte e meridional (não tropical). Conhecida como menta-silvestre. Atinge de 40 cm a 1,2 m, As folhas são oblongo elípticas a lanceoladas, 5 a 10 cm de comprimento e 1,5 a 3 cm de largura, numa camada fina densamente tomentoso. As flores têm 3 a 5 mm de comprimento, lilás, roxo ou branco, produzido em ramificações aglomeradas e densas no ápice; floração ocorre no fim do verão. Suas flores podem ser roxas, brancas ou lilases. É utilizada para fins medicinais e muito raramente como condimento (PAGE & STEARN, 1985).

2.3.11. *Mentha x villosa* Huds.

Conhecida popularmente como hortelã-rasteira, hortelã-de-panela, hortelã-miúda, hortelã-de-tempero ou hortelã-de-cheiro (CARRICONDE *et al.*, 1996). *Mentha x villosa* Huds é um híbrido de *M. spicata* com *M. suaveolens*. Como *M. spicata* provavelmente se originou de um cruzamento entre *M. longifolia* e *M. suaveolens*, *M x villosa*, é um híbrido de um duplo retrocruzamento que às vezes confere a *M x villosa* características que tornam difícil distingui-la de *M. spicata*. (CARRICONDE *et al.*, 1996).

Esta erva aromática é uma planta rasteira que forma touceiras, tem folhas opostas, simples, dentadas, impirapinadas, crespas, de base redonda e formato oblongo a oval, nervuras proeminentes na face abaxial, de tamanho variável de 2 a 5 cm. Suas flores são branco violáceo, contido em pequenos glomérulos terminais, porém Matos (1999) relata que a planta só floresce quando cultivada em serras úmidas.

De algumas espécies se extrai o mentol e o óxido de piperitenona. A *Mentha x villosa* notabilizou-se como a menta protozoicida em virtude da presença de óxido de piperitenona em seu óleo essencial, especialmente nos acessos ativos (MATOS, 1999).

No aspecto fitossanitário, um ensaio realizado na Universidade de Brasília permitiu detectar diferenças de suscetibilidade ao nematóide

Meloidogyne javanica entre procedências de *Mentha x villosa* (BUSTAMENTE, 1993).

As folhas ovais, curtamente pecioladas apresentam aroma forte e característico. As eventuais flores ficam dispostas em espigas curtas e terminais. Possui grande importância medicinal e social por sua ação contra microparasitas intestinais (LORENZI & MATTOS, 2002).

2.4. Variabilidade genética

Segundo Allard (1970), a variabilidade genética disponível nas espécies é reconhecidamente ampla, tanto entre quanto dentro das populações, e cada espécie pode apresentar milhares de variantes, portanto é razoável admitir que uma coleção de germoplasma, por menor que seja, é apenas uma pequena amostra da variabilidade total.

A conservação *ex situ* de recursos genéticos é feita em bancos e coleções de germoplasma, onde são armazenados os acessos para manutenção da variabilidade genética visando a sua utilização (IBPGR, 1993). O germoplasma disponível em coleções ou bancos, geralmente, é submetido a uma sequência de trabalhos que exigem procedimentos adequados a sua caracterização e avaliação (CRONQUIST, 1988).

A variabilidade genética pode exercer um papel decisivo na sobrevivência das espécies, principalmente quando ocorrem alterações no ambiente determinando o sucesso na restauração ecológica (HEDGE, 1992). Desta forma, a caracterização da diversidade genética proporciona o melhor conhecimento do germoplasma disponível, além de ser essencial para as etapas posteriores de desenvolvimento de materiais de elite e para o desenvolvimento de estratégias de conservação da espécie (LORENZO *et al.*, 2002).

A divergência genética pode ser definida como a amplitude de variação genética existente para uma determinada espécie. Portanto, é necessário um conhecimento detalhado da constituição e diversidade genética das espécies para uma obtenção eficiente do material genético a ser utilizado em programas de melhoramento, visto que, sem o conhecimento da variabilidade e da sua

interação com o ambiente, torna-se difícil a obtenção de genótipos superiores (MILACH, 1998).

A obtenção de genótipos superiores pode ser baseada em caracteres agronômicos ou moleculares, permitindo, desta forma, um estudo da divergência genética (ADJUTO, 2008).

Cruzamentos entre espécies geneticamente divergentes proporcionam uma variabilidade genética entre progênies bem maior do que as obtidas em cruzamentos entre plantas com maior grau de parentesco e, com isso, aumentam as oportunidades do melhorista obter progênies superiores (MESSMER *et al.*, 1993).

O desenvolvimento e aplicação de tecnologias baseadas em marcadores moleculares fornecem ferramentas únicas, capazes de revelar polimorfismos ao nível da sequência do DNA, suficientes para discriminar a variação genética entre indivíduos (KRESOVICH, *et al.*, 1995).

Nos últimos anos, novas técnicas, que auxiliam na avaliação das relações genéticas entre genótipos foram desenvolvidas, acompanhando o rápido e constante avanço na área da genética molecular. Com os avanços de técnicas modernas de biologia molecular, surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente ao nível de DNA (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Com o surgimento da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – “Polymerase Chain Reaction”) (MULLIS & FALOONA, 1987), aliou-se o poder da informação gerada por iniciadores moleculares e a rapidez da técnica baseada em ciclos contínuos de desnaturação e amplificação das fitas de DNA, mediados pela enzima DNA polimerase em pontos específicos do genoma, determinados pelo pareamento de iniciadores ou “*primers*” (de tamanhos variados) específicos ou não de sequências complementares a este ponto (GUPTA *et al.*, 2008)

A variabilidade genética está atrelada aos processos ecológicos que conferem as plantas a necessidade de adaptação aos diferentes locais onde estas ocorrem. Portanto, a manutenção dos bancos de germoplasma e a conservação de seus acessos são fundamentais para o melhoramento genético, uma vez que são fontes de variabilidade. Ainda, mediante

caracterização dos genótipos é possível à identificação de genes envolvidos em características morfológicas de interesse como, aumento de produção, qualidade, coloração, adaptação a várias condições edafoclimáticas e, conseqüentemente a expansão do mercado (GONÇALVES *et al.*, 2008).

2.5. Melhoramento Genético

A pesquisa em recursos genéticos e melhoramento vegetal é uma das atividades mais relevantes para o país, tendo produzido resultados que contribuíram significativamente para os principais ganhos qualitativos e quantitativos alcançados pela agricultura brasileira nos últimos anos (MILACH, 1998).

O processo de melhoramento genético de *Mentha* é altamente dependente da amplitude da base genética disponível, que por sua vez é influenciada pelo acervo de recursos úteis disponíveis, na forma de materiais coletados e caracterizados, mantidos nos bancos de germoplasma, que são a base para o desenvolvimento de cultivares e preservação da espécie (FERREIRA, 2008). O melhoramento de plantas medicinais tem por objetivo melhorar o teor e a composição de princípios ativos por métodos clássicos e modernos.

A regulação da produção de óleo essencial em espécies aromáticas não só depende do estado metabólico da planta, mas também está relacionada a fatores ambientais que interagem com as características genéticas, influenciando na fisiologia e possibilitando que dois indivíduos idênticos crescendo em ambientes diferentes produzam metabólitos secundários de acordo com as condições a que estão expostos (CASTRO, 2004).

Para Ferreira & Grattapaglia (1998), a propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação devido ao tamanho dos propágulos utilizados, é a técnica de maior aplicabilidade da cultura de tecidos e aquela de maior impacto, uma vez que proporciona obtenção de um grande número de plantas com elevado nível qualitativo sendo apropriado para clonar indivíduos melhorados produzindo progênes homogêneas, além de ser uma alternativa

que possibilita a conservação do material genético e favorece o melhoramento da espécie.

A seleção interespecífica e intraespecífica entre espécies, e dentro da espécie, visando ao aumento da produção de óleo essencial é uma ferramenta eficiente para os produtores de menta. Estratégias para aumentar a produção de óleo essencial das flores e folhas de espécies de menta podem ser aperfeiçoadas pela compreensão de como caracteres fenotípicos e fenológicos interagem entre si, afetando a produção de óleo essencial. A síntese e a composição dos óleos essenciais, em diversas plantas aromáticas, são influenciadas pelo genótipo, o estágio de desenvolvimento da planta e as condições ambientais (MAROTTI *et al.*, 1994).

Por melhoramento genético de plantas medicinais subentende-se interagir os genótipos da espécie em estudo a fim de obter, em mesmo local de cultivo, aumento de massa seca e/ou fresca ou, ainda, aumento do teor de princípios ativos em determinado órgão vegetal; de modo que estas características sejam mantidas na geração seguinte, permitindo obter ganhos adicionais nas gerações subsequentes (PAGE & STEARN.1985)

No melhoramento busca-se com a reprodução sexuada a variabilidade genética, que é explorada na tentativa de se selecionar genótipos superiores em detrimento dos inferiores. Para fixação dos genótipos desejáveis, usa-se a reprodução assexuada, no intuito de se evitar a perda dos caracteres desejados, caso fossem sexualmente propagados; portanto, ambos os modos de reprodução têm sua devida importância para o melhoramento de plantas (VENCOVSKY, 2003).

2.6. Marcadores moleculares

A identificação do DNA como sendo o material genético das células, possibilitou estudos mais aplicados ao seu funcionamento. Muitos resultados foram obtidos com a técnica de duplicação de DNA *in vitro*, em especial a técnica de PCR, que permitiu a duplicação do DNA em uma reação em cadeia (RAMALHO, 2008).

O advento das técnicas moleculares permitiu a análise da variação dos organismos ao nível de DNA, observando diferenças nas sequências gênicas com uso de marcadores moleculares (ZUCCHI, 2002). Os marcadores moleculares são pontos de referência nos cromossomos, definidos como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso (isoenzimas), de um segmento específico de DNA ou RNA, que podem ser regiões expressas ou não do genoma (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Sendo assim, os marcadores de DNA são eficientes ferramentas na caracterização da diversidade genética em plantas, permitindo a identificação de variedades morfologicamente indistinguíveis.

O desenvolvimento dos marcadores isoenzimáticos, deu início à tecnologia dos marcadores moleculares, levando ao crescimento do número de marcadores, disponibilizando a técnica para todas as espécies de plantas. (ALFENAS, 1998; BORÉM & CAIXETA, 2006; FALEIRO, 2007).

De acordo com Milach (1998), os marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, os de hibridação e os de amplificação do DNA. Entre os marcadores baseados em hibridação estão o RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”), e os minissatélites ou VNTR (“Variable Number of Tandem Repeats”). Já os baseados em amplificação do DNA incluem marcadores do tipo RAPD (“Random amplified of polymorphic DNA”), ISSR (“Inter Simple Sequence Repeat), SCAR (“Sequence Charecterized Amplified Regions”), STS (“Sequence Tagged Sites”), microssatélites ou SSR (“Single Sequence Repeats”), AFLPs (“Amplified Fragment Length Polymorphism”) e SNP (“Single Nucleotide Polymorphism”), entre outros.

O potencial de uso dos marcadores moleculares no melhoramento de plantas é bastante amplo, destacando-se a identificação, discriminação dos genótipos à quantificação da variabilidade genética ao nível de sequências de nucleotídeos no DNA e sua correlação a expressão fenotípica. Além da identificação da origem parental, proteção de cultivares, certificação de pureza genética, monitoramento de cruzamentos, caracterização de germoplasma, distância genética, construção de mapas genéticos e auxílio na seleção (GUIMARÃES & MOREIRA, 1999).

O emprego de marcadores moleculares no estudo da biotecnologia e do DNA recombinante propiciou um avanço muito significativo para a agricultura. A partir do momento que se pode estudar e melhorar as cultivares não apenas no aspecto fenotípico, mas também em questão do seu genótipo, o conhecimento da estrutura genotípica possibilitou estudos mais acurados juntamente com o melhoramento de espécies tradicionais, possibilitando desenvolver plantas cada vez mais adaptadas as diferentes regiões. Testes de identidade com marcadores de DNA são utilizados regularmente para registro de classificação de espécies em bancos de germoplasma. (RAMALHO & FURTINI, 2009).

Marcadores moleculares de DNA têm sido utilizados para estudo da diversidade genética entre e dentro de populações, para marcação de genes de resistência a doenças, insetos e pragas, avaliação e, melhoramento de genitores, introgressão gênica e seleção assistida por marcadores. Também são amplamente empregados no desenvolvimento de mapas genéticos, determinação de grupos heteróticos e associação com regiões genômicas que afetam heterose além de reconstituição de pedigrees (MILACH, 1998).

Segundo o estudo de Gobert *et al* (2006), foi comparado a diferença entre acessos de *Mentha* por meio de marcadores AFLP e ISSR, na qual obteve-se um dendrograma que pode discriminar por meio de grupos e subgrupos os diferentes acessos. Foram apresentados 74 marcadores com 88% de locos polimórficos. No dendrograma foi observado a formação de 2 principais grupos, com 0.7 de similaridade pelo coeficiente de Nei & Li (1979) e o método de agrupamento pelo UPGMA.. O primeiro grupo representado pela *M. suaveolens* L., *M. spicata* L., *M. longifolia* L.Huds. No grupo (II) estão as *M. arvensis* L., *M. aquatica* L., *M. piperita* L.

2.6.1. Marcador molecular ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)

Os ISSR foram desenvolvidos por Zietkiewicz, Rafalski & Labuda (1994) com base nos marcadores microssatélites que são sequências pequenas de nucleotídeos – uma a seis bases – repetidas em *tandem* (FALEIRO, 2007).

O ISSR possibilita a determinação da diversidade inter e intraespecífica, análises da identidade genética de uma espécie, confecção de mapas

genéticos, estudos filogenéticos, além de caracterização e avaliação de germoplasma (ZIETKIEWICZ *et al.*, 1994). Nesta técnica, vários locos são gerados simultaneamente, detectando-se presença ou ausência de fragmentos de tamanho particular, o que possibilita o alto polimorfismo gerado. Este método possui alta reprodutibilidade, grande flexibilidade, não requer informações prévias das sequências de DNA para a construção do iniciador e utiliza de pequenas quantidades de DNA (KUMAR *et al.*, 2007).

A técnica envolve a amplificação de DNA por PCR, usando um único iniciador semi-arbitrário composto de uma sequência com padrões microssatélites, podendo ser não ancorado ou mais comumente, ancorada na região 3' ou 5', incluindo um a quatro nucleotídeos arbitrários ou degenerados. Estes marcadores são abundantes ao longo do genoma de eucariontes e evoluem rapidamente (GUPTA *et al.* 2008).

Os ISSR são considerados semi-arbitrários e de alta reprodutibilidade devido ao tamanho do iniciador e a necessidade de temperatura elevada para o anelamento. Revela polimorfismos intraespecíficos, segregados de acordo com as leis mendelianas (FALEIRO, 2007)

Os marcadores moleculares ISSR produzem fragmentos de DNA de 100 a 3000 pb. Comportam-se como dominantes, e o produto da amplificação não é conhecido, ou seja, são marcadores randômicos, assim como os RAPD. Apesar de ambos marcadores não diferenciarem indivíduos heterozigotos dos homozigotos, no entanto, há a vantagem de analisar locos múltiplos em uma única reação. Os alelos polimórficos ocorrem sempre que em um genoma esteja faltando à sequência repetida ou exibem uma deleção ou inserção que modifica a distância entre as repetições. Também, ocorre devido a diferenças no comprimento do microssatélite, principalmente nos iniciadores ancorados na posição 5' do DNA (GOULÃO & OLIVEIRA, 2001). As repetições de microssatélite utilizada como iniciadores podem ser di-nucleotídeos, tri-nucleotídeos, tetra-nucleotídeos ou penta-nucleotídeos (ZIETKIEWICZ *et al.*, 1994). As sequências de repetições e de nucleotídeos ancorados são selecionadas aleatoriamente.

A taxa evolutiva de mudança dentro de microssatélites é consideravelmente mais elevada do que a maioria dos outros tipos de DNA,

assim a probabilidade de polimorfismo nestas sequências é maior. A fonte de variabilidade nos ISSR pode ser atribuída ao deslizamento da DNA polimerase durante a replicação do DNA e falha em reparar erros no pareamento das bases nitrogenadas (AGA, 2005).

Os iniciadores desenvolvidos para ISSR podem ser degenerados – $(CA)_n TY$; $(CA)_n RG$, onde Y representa uma base pirimidina, C ou T, e R uma base purina, G ou A; ou podem ser uma sequência do próprio motivo $(CA)_n$ com número variado de repetições. A sequência amplificada por eles, por meio de reação de PCR, é resultante das regiões existentes entre dois locos SSR, gerando um sistema de marcação multilocos útil para análise de diversidade (ZIETKIEWICZ *et al.*, 1994; GODWIN *et al.*, 1997).

A adição de nucleotídeos ancorados nas extremidades 5' e 3' é usada para prevenir o deslizamento da polimerase durante a amplificação via PCR, tornando o anelamento entre o iniciador e a extremidade do microssatélite, mais específica e reprodutível (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

É um método simples e rápido que une as vantagens dos SSRs, o polimorfismo dos marcadores AFLP e a universalidade do RAPD, além de serem utilizados com sucesso no estudo da diversidade genética, diminuindo custo, tempo e trabalho devido ao alto conteúdo informativo (LIU & WENDEL, 2001).

Os ISSR têm ampla aplicabilidade na caracterização farmacognóstica de plantas medicinais, sendo úteis na correlação do genótipo com o quimiotipo. O uso desses marcadores apresenta importância significativa na identificação de genótipos promissores, para uma produção padronizada das plantas medicinais (KURANE *et al.*, 2009).

Marcadores ISSR são recomendados para análises de espécies relacionadas evolutivamente, obtendo-se resultados confiáveis, devido sua abundância e dispersão no genoma, constituído de locos polimórficos em quantidades satisfatórias e por apresentarem rapidez em seus resultados com custos razoavelmente menores em comparação aos outros marcadores (RODRIGUES, 2010).

Esses marcadores de DNA podem contribuir em programas de melhoramento vegetal para seleção de genótipos a serem utilizados

futuramente como genitores de novas cultivares, pois apresentam entre os mais utilizados atualmente para várias espécies de plantas. Também são aplicados em estudos de diversidade genética, “fingerprinting” e seleção assistida (COSTA *et al.*, 2010).

2.6.2. Marcador Molecular RAPD (Random Amplified of Polymorphic DNA).

A técnica de RAPD utiliza apenas um iniciador curto (dez nucleotídeos) que, devido ao seu pequeno tamanho, pode parear em diversos pontos do genoma (WILLIAMS *et al.*, 1990).

Caso duas cópias desse iniciador se liguem às fitas opostas do DNA a uma distância entre 200 e cerca de 4.000 pares de nucleotídeos, pela reação de PCR, a região flanqueada pelos iniciadores pode ser amplificada. Portanto, é uma técnica que não exige o conhecimento prévio da sequência que está sendo amplificada. Logo, um mesmo conjunto de iniciadores pode ser usado para amplificar o DNA dos mais diversos tipos de organismos. Há empresas que comercializam kits de iniciadores contendo mais de 1.000 diferentes tipos de sequência (ALZATE-MARIN *et al.*, 2005).

Apesar de todas essas vantagens, o RAPD apresenta uma desvantagem que limita, até certo ponto, o seu uso generalizado. A baixa temperatura necessária para a ligação do iniciador ao molde torna o processo bastante dependente das condições de amplificação. Portanto, modificações no termociclador utilizado, na DNA polimerase e em outros reagentes da mistura de reação podem alterar o padrão de amplificação (ALZATE-MARIN *et al.*, 2005).

Para contornar essa limitação, marcadores RAPD podem ser transformados em marcadores SCAR (“Sequence Characterized Amplified Regions”). Para tanto, a banda de DNA correspondente ao marcador RAPD é clonada, sequenciada e dois iniciadores mais longos que o original são sintetizados e utilizados para amplificar o mesmo marcador, só que agora

numa temperatura de anelamento mais elevada. Nessa condição, o processo de amplificação é mais estável e reproduzível (PARAN e MICHELMORE, 1993).

O polimorfismo evidenciado pelo RAPD é detectado em função de mutações no(s) sítio(s) de ligação do iniciador, que impedem o seu pareamento e a conseqüente amplificação, ou devido à ocorrência de deleções ou inserções na região compreendida entre os dois sítios, que alteram o tamanho do segmento amplificado. Como, na maioria das vezes, essas mutações impedem a amplificação do segmento de interesse, diz-se que a herança do RAPD é dominante, pois apenas duas classes fenotípicas serão detectadas, presença ou ausência da banda de DNA (HOFFMAM & BARROSO, 2006). Assim, a detecção dos segmentos RAPD não tem sensibilidade quantitativa suficiente para discriminar os alelos de um indivíduo homocigoto (AA) de um heterocigoto (Aa) (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

A interpretação dos resultados é dada pela diferença eletroforética das bandas, onde bandas posicionadas em locais distintos representam número dispar de pares de bases. A segregação dos marcadores é dependente de polimorfismo, portanto quanto mais alto grau de polimorfismo dos marcadores moleculares melhor a sua eficiência, refletindo em mais bandas que variam quanto à posição, por isso são ditas bandas polimórficas (HOFFMAM & BARROSO, 2006).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal e Local do Experimento

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. O material vegetal obtido foi proveniente do Banco Ativo de Germoplasma de Menta (BAG-Menta), e consistiu de 82 acessos representando as espécies do gênero *Mentha* (Tabela 1), sendo 67 obtidos por meio de cultivo *in vitro*, e 15 mantidos *in vivo* no telado.

CÓDIGO DOS ACESSOS	DENOMINAÇÃO	NOME CIENTÍFICO	IN VITRO	TELADO
CM 1	Lime Mint	<i>Mentha aquatica L.</i>	X	
CM 2	Apple Mint	<i>Mentha x villosa Huds.</i>	X	
CM 3	Chocolate Mint	<i>Mentha x piperita L.</i>	X	
CM 4	Pineapple Mint	<i>Mentha suaveolens Ehrh.- variegada</i>	X	
CM 5	Chinese Mint	<i>Mentha canadensis L.</i>	X	
CM 6	Chewing Gum Mint	<i>Mentha piperita L.</i>	X	
CM 7	Grapefruit Mint	<i>Mentha spicata L.</i>	X	
CM 8	Eua de Cologne	<i>Mentha piperita L.</i>	X	
CM 9	Variegated Peppermint	<i>Mentha piperita L.</i>	X	
CM 10	Hillary's Sweet Lemon Mint	<i>Mentha piperita L.</i>	X	
CM 11	Green Curly Mint	<i>Mentha piperita L.</i>	X	
CM 13	Orange Mint	<i>Mentha suaveolens Ehrh.</i>	X	
CM 16	Persian Mint Field	<i>Mentha piperita L.</i>	X	
CM 17	Menthol Mint gh	<i>Mentha spicata L.</i>	X	
CM 18	Commom Mint gh	<i>Mentha aquatica L.</i>	X	
CM 19	Lavander Mint	<i>Mentha aquatica L.</i>	X	
CM 20	Japanese Field Mint	<i>Mentha canadensis L.</i>	X	
CM 21	Kabek	<i>Mentha longifolia L.</i>	X	
CM 23	Peppermint	<i>Mentha x piperita L.</i>	X	
CM 24	Ginger Mint	<i>Mentha arvensis L.</i>	X	
CM 25	Large Leaf Spearmint	<i>Mentha spicata L.</i>	X	
CM 26	Banana Mint	<i>Mentha piperita L.</i>	X	
CM 27	Himalayan Silver Mint	<i>Mentha longifolia (L.) Huds.</i>	X	
CM 28	Egyptian Mint	<i>Mentha x Villosa Huds.</i>	X	
CM 29	Hortelã Caseira	<i>Mentha spicata L.</i>	X	
CM 30	Menta do Uruguai	<i>Mentha suaveolens Ehrh.</i>	X	
CM 31	Emater1 - UnB	<i>Mentha spicata L.</i>	X	
CM 32	Ciudad De Leste	<i>Mentha spicata L.</i>	X	
CM 33	UnB1	<i>Mentha spicata L.</i>	X	
CM 34	Emater 2	<i>Mentha sylvestris L.</i>	X	
CM 35	Dourados 1	<i>Mentha spicata x Suaveolens</i>	X	
CM 36	Dourados 2	<i>Mentha arvensis L.</i>	X	
CM 37	Emater 3	<i>Mentha canadensis L.</i>	X	
CM 38	Kibe	<i>Mentha spicata x suaveolens</i>	X	
CM 39	Piperita Negra	<i>Mentha longifolia (L.) Huds.</i>	X	
CM 40	Hortelã Branca	<i>Mentha longifolia (L.) Huds.</i>	X	

CÓDIGO DOS ACESSOS	DENOMINAÇÃO	NOME CIENTÍFICO	IN VITRO	TELADO
CM 41	Hortelã vilosa 400	<i>Mentha suaveolens Ehrh.</i>	X	
CM 43	Hortelã 560	<i>Mentha piperita L.</i>	X	
CM 44	Hortelã 489	<i>Mentha x piperita subsp.Citrata Ehrh.</i>	X	
CM 46	Hortelã 403	<i>Mentha arvensis L.</i>	X	
CM 47	Hortelã 1802	<i>Mentha piperita L. Var. Citrata</i>	X	
CM 49	IAC 1	<i>Mentha gracilis</i>	X	
CM 50	IAC 2	<i>Mentha spicata L.</i>	X	
CM 51	IAC 3	<i>Mentha suaveolens Ehrh.x spicata</i>	X	
CM 52	IAC 4	<i>Mentha suaveolens Ehrh.x spicata</i>	X	
CM 53	IAC 5	<i>Mentha spicata L.</i>	X	
CM 54	IAC 6	<i>Mentha spicata L.</i>	X	
CM 55	IAC 7	<i>Mentha spicata L.</i>	X	
CM 56	IAC 8	<i>Mentha piperita L. Var. Citrata</i>	X	
CM 57	IAC 9	<i>Mentha piperita L.</i>	X	
CM 58	Hortelã Feltrini	<i>Mentha spicata L.</i>	X	
CM 59	IAC 701	<i>Mentha arvensis L.</i>	X	
CM 60	K 78195	<i>Mentha aquatica L.</i>	X	
CM 61	K 69652	<i>Mentha suaveolens Ehrh.</i>	X	
CM 62	Hocaido	<i>Mentha arvensis L.</i>	X	
CM 63	Poejo botucatu	<i>Mentha pulegium</i>	X	
CM 64	Hortelã Botucatu	<i>Mentha spicata L.</i>	X	
CM 65	UFC 1	<i>Mentha sp.x M. Villosa Huds.</i>	X	
CM 66	UFC 2	<i>Mentha gracilis</i>	X	
CM 67	UFC 3	<i>Mentha x piperita subsp.Citrata Ehrh.</i>	X	
CM 68	UFC 4	<i>Mentha rotundifolia (L.) Huds.</i>	X	
CM 69	UFC 5	<i>Mentha piperita L.</i>	X	
CM 70	Campos Altos - MG 1	<i>Mentha suaveolens Ehrh.</i>	X	
CM 71	Campos Altos - MG 2	<i>Mentha spicata L.</i>	X	
CM 72	Campos Altos - MG 3	<i>Mentha spicata L.</i>	X	
CM 73	Campos Altos - MG 4	<i>Mentha sp</i>	X	X
CM 74	Medeiros 1	<i>Mentha sp (vick)</i>	X	
CM 75	Medeiros 2	<i>Mentha sp</i>		X
CM 77	Porteirinha	<i>Mentha sp</i>		X
CM 78	Porteirinha	<i>Mentha sp</i>		X
CM 79	Porteirinha	<i>Mentha sp</i>	X	
CM 80	Porteirinha	<i>Mentha sp</i>		X
CM 81	Porteirinha - Poejo	<i>Mentha sp</i>		X
CM 87	Bahia	<i>Mentha arvensis L.</i>		X
CM 89	Bahia	<i>Mentha spicata L.</i>		X

CÓDIGO DOS ACESSOS	DENOMINAÇÃO	NOME CIENTÍFICO	IN VITRO	TELADO
CM 90	Fortaleza UFC	<i>Mentha x villosa Huds.</i>		X
CM 91	Mato Grosso	<i>Mentha sp</i>		X
CM 92	Mato Grosso	<i>Mentha sp</i>		X
CM 98	Brasília - UnB	<i>Mentha suaveolens Ehrh.- variegada</i>		X
CM 100	Emater - GO	<i>Mentha piperita L.</i>		X
CM 102	Emater - GO	<i>Mentha sp (vick)</i>		X
CM 103	Emater - GO	<i>Mentha sp</i>		X

Tabela 1. Denominação e nome científico das 82 espécies analisadas, ao BAG-Menta da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, e seus respectivos meios de cultivos, telado e/ou *in vitro*.

3.2. Extração do DNA genômico vegetal.

Um DNA puro e de boa qualidade é pré-requisito para qualquer análise molecular. Porém, os protocolos convencionais de extração de DNA não são necessariamente reprodutíveis para todas as espécies, sendo necessário realizar algumas adaptações e padronizações. Além disso, o protocolo ideal deve ser aquele que possibilite rapidez, eficiência, baixo custo e que preferencialmente não necessite a utilização de produtos tóxicos, como fenol.

O DNA genômico foi extraído através do protocolo de extração CTAB 2% (Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide), proposto por MURRAY & THOMPSON (1980) e adaptado por BUSO (2005). A extração é composta de diversas etapas. Primeiramente pesou-se aproximadamente 200 mg de folhas jovens dos 82 acessos de menta. Posteriormente foi feita uma maceração mecânica com a utilização de “beads” de cerâmica, pelo equipamento “fest prep” durante 35 segundos, com intuito de quebrar as paredes da célula vegetal e permitir o acesso ao material genético. Foi adicionado 700 µL de tampão de extração CTAB 2% (2% de CTAB, EDTA 20 mM, NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM pH 8.0 e 2 µl de β- mercaptoetanol por mililitro do tampão, adicionado imediatamente antes do uso). A solução foi

homogeneizada em vortex por 10 segundos e incubada a 65 °C por 45 minutos em banho-maria sendo posteriormente centrifugada a 10.000 rpm por 6 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo eppendorf.

Posteriormente, adicionou-se 600 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) à solução, a qual foi homogeneizada em vortex por 10 segundos. As fases foram separadas por centrifugação à velocidade de 15.000 rpm, durante 5 minutos, dispondo-se a fase superior em novo tubo. Nessa etapa, a fase orgânica (inferior) contendo parede celular, celulose, lipídeos, proteínas e polissacarídeos foram separados da fase aquosa (superior) contendo DNA e RNA. Adicionou-se 2/3 do volume de isopropanol gelado (-20 °C), as amostras foram suavemente misturadas e mantidas a -20 °C por 30 minutos. Foi realizada nova centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos, para formação do “pellet” de DNA, que foi então lavado duas vezes com 1 ml de etanol 70% e uma vez com 1 ml de etanol absoluto. Após a secagem por aproximadamente 12 horas, o “pellet” foi ressuspensão em 100 µL de Tampão TE, contendo 10 µg/mL de RNase, e incubado a 37 °C por 30 minutos para a digestão do RNA e purificação do DNA, sendo armazenado a -20 °C.

Todos os acessos foram extraídos em triplicata, na qual garante uma boa quantidade de DNA para realização do trabalho, totalizando 246 amostras de DNA concentrado.

3.3. Quantificação e diluição do DNA

Na verificação da quantidade, qualidade, ausência de RNA e outras impurezas na amplificação do material genético extraído, foi realizada uma quantificação por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídeo, que age como um corante que se intercala nas moléculas dos ácidos nucleicos sendo que a luz ultravioleta induz sua fluorescência. Para isso utilizou-se 3 µl de DNA, juntamente com 3 µl de TAMPÃO 3X (Sacarose - 8,0g, Azul de bromofenol 0,02g, TE – pH 8,0,- 20 ml) totalizando 6 µl de solução para cada amostra aplicada no gel. A eletroforese foi conduzida em tampão TBE 1x [100 ml de TBE 10x (Tris base 0,89 M, ácido bórico 0,89 M,

EDTA 20 mM pH 8,0 e 900 ml de água ultrapura), a 90 V e 60 mA, durante 10 min.

A diluição do DNA foi realizada com a utilização de água Milli-Q, seguindo à fórmula: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$. Onde: C1 é a concentração de DNA estimada no gel de agarose; V1 é o volume de água a ser adicionado para concentração de trabalho (3 ng/μL); C2 representa a concentração de DNA para trabalho (3 ng/μL); V2 é o volume estipulado de DNA para trabalho (200μL).

O DNA diluído foi quantificado novamente usando o lambda de referência, com concentração de 10 ng/μL. A quantificação foi realizada em eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. Segundo BUSO *et al.*, 2009, para as espécies de *Mentha* a concentração ideal de DNA para amplificação dos marcadores ISSR e RAPD, está em torno de 3 ng/μL. A visualização das bandas decorrentes da quantificação foi feita por meio da leitura da intensidade de fluorescência do brometo de etídeo sob luz ultravioleta (UV) em transluminador e fotografada em fotodocumentador.

3.4. Reações e amplificação da PCR

Para amplificação do DNA e conseqüente o estudo da similaridade genética entre os acessos de *Mentha*, foram utilizados dois tipos de marcadores: ISSR e RAPD.

A elaboração de *primers* (ou iniciadores) para alguns marcadores depende do conhecimento prévio das sequências de nucleotídeos que fazem parte do DNA de interesse. Para a criação, é necessário à clonagem e o sequenciamento da região, só assim é possível identificar e sintetizar o iniciador. Atualmente, alguns marcadores são baseados em iniciadores com sequências aleatórias, o que popularizou as análises genéticas, pois, nesses casos, não é necessário conhecer previamente as sequências das espécies alvos dos estudos genéticos em marcadores dominantes, no caso do ISSR e RAPD (BUSO *et al.*, 2009).

Para a realização das reações de PCR, com marcadores ISSR, foi usado o mix ajustado (BUSO *et al.*, 2009): 3 µL de DNA, 2,59 µL de água ultrapura estéril (Milli-Q); 1,30 µL de dNTP a 2,5 µM (são desoxinucleotídeos trifosfato livres utilizados como percussores da síntese de DNA); 1,30 µL de BSA (Bovine Serum Albumin) a 2,5 ng/mL (agindo como estabilizador da taq DNA polimerase); 1,30 µL de tampão 10x “Buffer” contendo 100 µM Tris-HCl pH 8,3; 500 µM KCl (esta solução contém íons diversos (Na⁺, Cl⁻, k⁺, entre outros) que otimizam as condições de amplificação; 0,25 µL de MgCl₂ 50 mM (utilizado como cofator enzimático da taq polimerase); e 0,26 µL de taq DNA polimerase quatroG (4G) a 5,0 U/µL (enzima que sintetiza o DNA, responsável pela fase de extensão da PCR); e 3 µL do *primer* (iniciador), totalizando um volume de 13 µL.

Para a realização das reações de PCR, com marcadores RAPD, foi usado o mix (BUSO *et al.*, 2009) : 3 µL de DNA, 4,67 µL de água ultrapura estéril (Milli-Q); 1,04 µL de dNTP a 2,5 µM ; 1,04 µL de BSA a 2,5 ng/mL; 1,30 µL de tampão 10x “Buffer” contendo 100 µM Tris-HCl pH 8,3; 500 µM KCl ; 0,25 µL de MgCl₂ 50 mM; e 0,20 µL de Taq DNA polimerase a 5,0 U/µL; e 3 µL do *primer* (iniciador).

As reações de PCR foram submetidas às condições de amplificação de DNA, utilizando termociclador Veriti® 96-Well (Applied Biosystems, San Jose, CA, USA.). As reações de PCR constituíram de três etapas: 1) Desnaturação da fita dupla do DNA. 2) anelamento, dos iniciadores com hibridação de suas sequências complementares no DNA molde desnaturado. 3) Extensão: a DNA polimerase, na presença íons Mg²⁺ e dNTPs sintetiza uma nova fita de DNA a partir da extremidade 3' do iniciador que se encontra hibridizado à fita de DNA molde.

- Condições de amplificação:

- Para Marcadores ISSR:

Primeiramente um ciclo inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 45 segundos a 95°C, 1 minuto na temperatura de anelamento (56°C

estabelecida para todos os iniciadores) e 1 minuto e meio a 72°C, seguidos de um ciclo final de 7 minutos a 72°C.

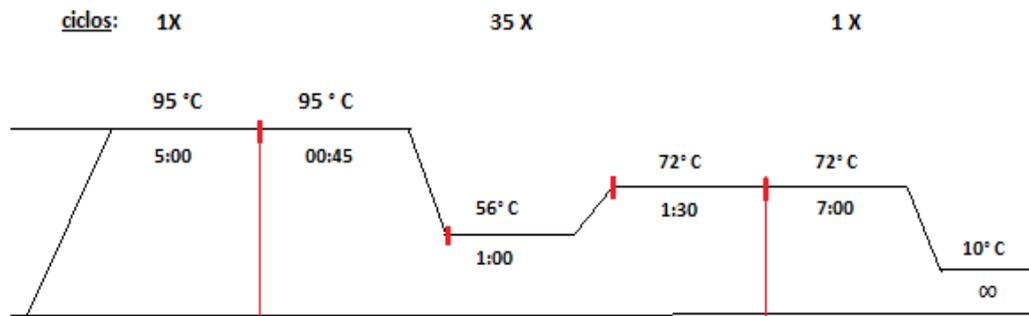


Figura 1: Esquema das condições de amplificação do DNA, baseados em PCR e realizada em termocilador, referente a marcadores ISSR.

- Para Marcadores RAPD:

Primeiramente, um ciclo inicial de 5 minutos a 92°C, seguido de 40 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 92°C, 1 minuto na temperatura de anelamento 35°C, e 2 minutos de extensão a 72°C, seguidos de um ciclo final de 10 minutos a 72°C.

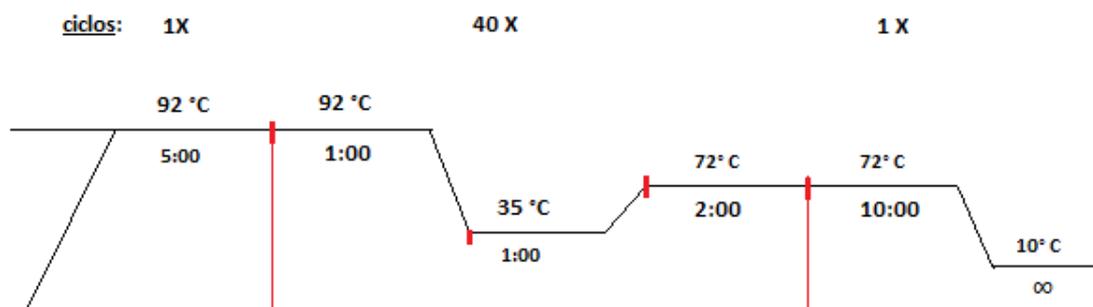


Figura 2. Esquema das condições de amplificação do DNA, baseados em PCR e realizada em termocilador, referente a marcadores RAPD.

A separação dos fragmentos de DNA gerados pelos diferentes tipos de marcadores, a partir da reação de PCR foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5%, horizontal, corado com brometo de etídio, e submerso em solução tampão TBE 1x (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM). A separação dessas moléculas se deu em função de suas cargas elétricas, de seus pesos moleculares e de suas conformações. A eletroforese ocorreu por, aproximadamente 2 horas, a 160 volts. Os géis foram submetidos ao fotodocumentador e fotografados sob luz ultravioleta. A avaliação da amplificação do DNA foi comparada com um marcador de peso molecular *Ladder* 1kb plus (Invitrogen) a partir do tamanho dos fragmentos em pares de base.

4. Análise Estatística

A análise dos marcadores polimórficos utilizando marcadores ISSR e RAPD foi feita em conjunto, a partir de uma matriz binária com os dados codificados em presença (1) ou ausência (0) de bandas. Foi gerada uma matriz de similaridade genética baseada no coeficiente de Sorensen Dice. Foi utilizado o software NTSYS – PC 2.21m (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) (ROHLF, 2000).

Optou-se pelo uso deste coeficiente, pois além de suas propriedades matemáticas, possibilita evidenciar diferenças intraespecíficas e desconsidera a ausência conjunta de bandas como sinônimo de similaridade genética (GONÇALVES *et al.*,2008).

A escolha do coeficiente a ser utilizado deve ser criteriosa, dependendo, inclusive, da espécie que se está estudando. Segundo Kosman & Leonard (2005), a escolha do coeficiente mais apropriado depende do tipo de marcador utilizado e do nível de ploidia do organismo em estudo. Aqueles coeficientes que não consideram o índice $d(0,0)$ como Jaccard e Sorensen-Dice são preferidos, já que não se sabe a natureza da ausência da banda. O coeficiente de Jaccard tem sido largamente utilizado em estudos de biologia, para populações dentro de uma espécie, onde as concordâncias são frequentes. O coeficiente de Sorensen-Dice é adequado para comparar itens

muito diversos, onde a probabilidade de detecção dos índices a (presença comum de uma mesma banda) é menor.

Com o auxílio do software Dboot v.1.1 (Coelho, 2001) foram determinados os coeficientes de variância das similaridades genéticas, e uma análise de bootstrap foi realizada usando um número de marcadores crescentes, com 1000 amostragens ao acaso. Essa análise foi utilizada para verificar se o grau de confiabilidade do número de marcadores foi suficiente, ou se seria necessário aumentá-lo. Além disso, foi realizada uma análise de bootstrap pelo programa Bood v.3.0 com 1000 amostragens ao acaso, para verificar a consistência dos ramos no dendrograma (COELHO, 2000).

Após a exclusão dos marcadores monomórficos estimou-se a similaridade genética entre os acessos de menta. A semelhança genética entre pares foi estimada, com base na matriz binária gerada, de acordo com o coeficiente Sorensen-Dice (SNEATH & SOKAL, 1973). A similaridade do coeficiente Dice é definida segundo a expressão $S_{ij} = 2a / (2a + b + c)$, onde S_{ij} corresponde à similaridade entre indivíduos i e j , a é o número de bandas em comum, b é o número de bandas presentes em i e ausentes em j , c é o número de bandas presentes em j e ausentes em i , ou seja, a similaridade é definida como o dobro das bandas em comum sobre o número total de bandas amplificadas nos dois indivíduos. Esta abordagem parece ser a mais apropriada para características genéticas, pois só considera os indivíduos geneticamente semelhantes somente quando possuem uma banda em comum, a ausência de uma banda em comum não significa uma semelhança em termos genéticos (DIAS, 1998).

Estes dados, denominados dados binários, foram analisados utilizando-se coeficientes de similaridade, dois a dois, para o cálculo das distâncias genéticas. Os coeficientes de similaridade são específicos para variáveis binárias, e são utilizados em estudos de divergência genética baseados em marcadores moleculares dominantes (MEYER, 2004).

A análise da distância genética entre os acessos é feita a partir da matriz da distância euclidiana, e o método de agrupamento UPGMA (“Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages”) gerado pelo programa

estatístico (NTSYS) com intuito de obter o coeficiente de correlação cofenética (CCC) e analisar o grau de consistência dos ramos obtidos do agrupamento.

4.1. Análise de Agrupamento

Após o cálculo da matriz com as distâncias genéticas entre as espécies, procedeu-se o agrupamento destes. Para tanto, utilizou-se de metodologias de agrupamento. O objetivo destes métodos foi juntar aqueles itens com maior proximidade em grupos, resultando em um dendrograma de similaridade, que permite uma visualização mais fácil e rápida dos resultados (DIAS, 1998).

Os métodos de agrupamento podem ser divididos em dois grupos, hierárquicos e não hierárquicos, sendo o primeiro grupo mais utilizado para análise de divergência genética de espécies vegetais. Dentre os métodos não hierárquicos, destacam-se os métodos de partição e os métodos de otimização (MEYER, 2004).

O agrupamento pelo método UPGMA foi realizado a partir dos dados da matriz gerada neste estudo pelo coeficiente de Dice. No método UPGMA, a distribuição dos indivíduos no dendrograma não segue um critério de formação de grupos, uma vez que o principal aspecto deste método consiste nas ramificações que são obtidas.

Os indivíduos são agrupados aos pares, utilizando-se médias aritméticas da similaridade. O dendrograma prioriza os genótipos com maior similaridade, e as distâncias entre um indivíduo e um grupo formado pelos indivíduos i e j são calculadas por $d(ij)k = (dik + dj)k / 2$, sendo $d(ij)k$ a distância média entre o grupo ij e o indivíduo k ; dik a distância entre os indivíduos i e k ; e djk a distância entre os indivíduos j e k (GONÇALVES *et al.*, 2008)

Nos métodos de agrupamento hierárquicos, os genótipos foram agrupados de forma sucessiva, com base em suas distâncias mínimas, máximas ou pela média aritmética não ponderada entre os pares de genótipos, em que para cada grupo formado foi necessário reconstruir uma nova matriz de similaridade, até a formação de um único grupo.

A análise de agrupamento tem por finalidade reunir, por algum critério de classificação, os progenitores em vários grupos, de tal forma que exista homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre grupos. Além disso, objetiva dividir um grupo original de observações em vários grupos, segundo algum critério de similaridade ou dissimilaridade (MOHAMMADI & PRASANNA, 2003)

A escolha dos métodos de agrupamento também deve ser criteriosa. Os diferentes métodos podem produzir diferentes resultados aos mesmos dados. Dudley (1994) afirma que o método UPGMA, para melhoramento genético, é superior às metodologias do vizinho mais próximo e do vizinho mais distante. Ao se avaliar os métodos de agrupamento, devem-se levar em conta dois aspectos: a estabilidade do agrupamento formado e o grau de concordância entre o dendrograma e a matriz das distâncias. A primeira refere-se à possibilidade de se separar os dados em subgrupos e analisá-los separadamente, resultando no mesmo agrupamento quando analisado conjuntamente ou ainda a não distorção do agrupamento ao se excluir algum dado. O grau de concordância entre a matriz e o dendrograma é dado pelo coeficiente de correlação cofenética, calculado através da correlação entre a matriz inicial e a matriz dos valores cofenéticos entre as espécies.

O ponto de corte foi feito com base na estimativa da similaridade genética média $sgm = \sum sg_{ij} / N$, em que, sg_{ij} corresponde à similaridade genética entre cada par de indivíduos e N é o número de pares obtidos (SILVA, *et al.* 2013).

4.2. Correlação Cofenética

A correlação cofenética mede o grau de ajuste entre a matriz de similaridade original (Matriz S) e a matriz resultante da simplificação proporcionada pelo método de agrupamento (Matriz C). No caso, C é aquela obtida após a construção do dendrograma. Tal correlação foi calculada usando (BUSSAB *et al.*, 1990).

Nota-se que essa correlação equivale a matriz de similaridade original e aquela obtida após a construção do dendrograma. Assim, quanto mais próximo

de um, menor será a distorção provocada pelo agrupamento dos indivíduos com o método UPGMA.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se que o DNA genômico extraído das folhas pelo método CTAB 2%, proposto Murray & Thompson (1980) e adaptado por Buso (2005), apresentou alta qualidade e quantidade de DNA para realização da PCR nos diferentes tipos de marcadores, suficientes para execução de todo trabalho. Para maior precisão quanto à concentração obtida de DNA representado na figura 1, utilizou-se um comparativo com DNA de fago lambda nas concentrações de 200 e 400 ng. As amostras obtidas apresentaram em média concentração de 350 ng/ μ L.

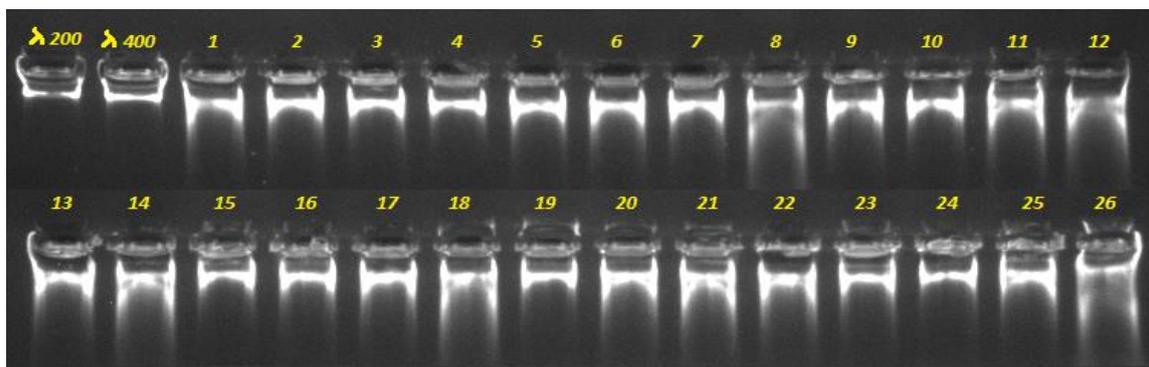


Figura 3. Exemplo de quantificação do DNA em gel de agarose 1% de 26 acessos de *Mentha*, em conjunto com DNA lambda (200 e 400ng) como referência.

Após averiguar a concentração e qualidade do material, foi feita uma diluição do DNA concentrado apresentado na figura 2, onde todos os acessos foram padronizados para uma concentração de 3 ng/ μ L. Utilizou-se um comparativo com DNA de fago lambda na concentração de 10 ng. Para a melhor qualidade de amplificação dos marcadores ISSR e RAPD, a concentração ideal de DNA para os 82 acessos é aproximadamente 3 ng/ μ L (BUSO, 2005; FALEIRO 2007 & KUMAR *et al.*,2007)

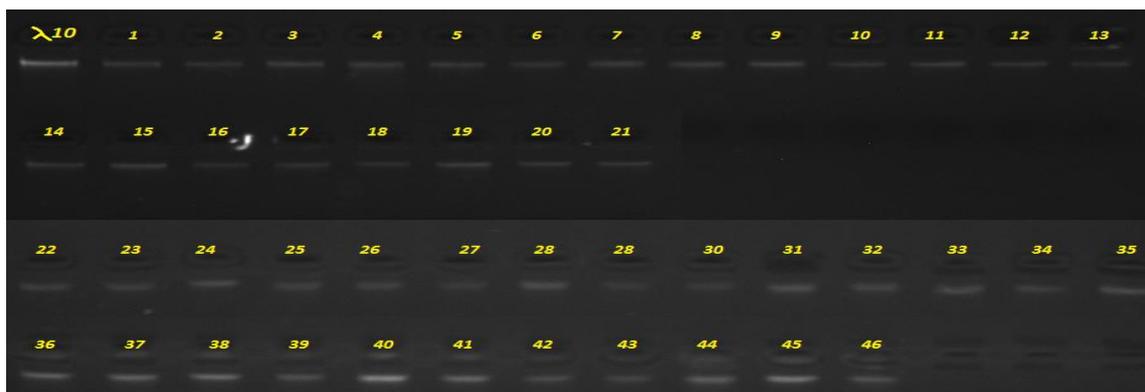


Figura 4. Exemplo de quantificação do DNA diluído de acessos de *Mentha* em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. Na primeira coluna está o lambda de 10 ng como referência.

Para a seleção dos iniciadores ISSR e RAPD foi realizado a amplificação dos oito acessos: CM6, CM7, CM9, CM10, CM13, CM 17, CM 25, CM 41. Foram testados 46 iniciadores ISSR, destes 12 apresentaram locos polimórficos nítidos que facilitaram a análise (tabela 3). Quanto aos marcadores RAPD, foram testados 35 iniciadores dos quais nove obtiveram fragmentos polimórficos amplificados (tabela 2).

Tabela 2. Iniciadores de ISSR utilizados nos 82 acessos de menta, seguidos da sequência e temperatura ideal de anelamento.

Iniciadores	Sequência nucleotídeos	Anelamento
3 ZM	5'-CACACACACACACAAT-3'	56°C
8 ZM	5'-CACACACACACACAATCC-3'	56°C
32 ZM	5'-AGCAGCAGCAGC-3'	56°C
38 ZM	5'-AGCAGCAGCAGCAT-3'	56°C
39 ZM	5'-AGCAGCAGCAGCAC-3'	56°C
60 ZM	5'-GCCACGCTGCTGCTGCTGCTGCT-3'	56°C
7 OS	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGYG-3'	56°C
8 OS	5'-CACACACACACACACARY-3'	56°C
9 OS	5'-ACACACACACACACACYA-3'	56°C
10 OS	5' AGAGAGAGAGAGAGAGYT-3'	56°C
1 PV	5'-GACACACAGACARG-3'	56°C
4 PV	5'-YRGACAGACAGACA-3'	56°C

*Y= (C ou T); R= (G ou A).

Tabela 3. Iniciadores de RAPD utilizados nos 82 acessos de menta, seguidos da sequência e temperatura ideal de anelamento.

Iniciadores	Sequência nucleotídeos	Anelamento
AI5	5'-GTCGTAGCGG-3'	36 °C
OPP15	5'-GGAAGCCAAC-3'	36 °C
F9	5'-CCAAGCTTCC-3'	36 °C
F10	5'-GGAAGCTTGG-3'	36 °C
C4	5'-CCGCATCTAC-3'	36 °C
C8	5'-TGGACCGGTG-3'	36 °C
F8	5'-TCGAGGCCCC-3'	36 °C
F16	5'-GGAGTACTGG-3'	36 °C
F6	5'-GGGAATTCGG-3'	36 °C

Nas figuras 5 e 6 são apresentados os perfis gerados pelos iniciadores 3 ZM e OPP15, derivados dos marcadores ISSR e RAPD, respectivamente. Evidenciando o grande polimorfismo evidenciado por ambas as técnicas. A partir da tabela 3 os iniciadores ISSR utilizados amplificaram um total de 116 marcadores polimórficos, e para os de RAPD na tabela 4, obteve-se 66, resultando em um total de 182 marcadores, com uma média próxima de nove marcadores por *primer*. Em geral ambos os marcadores amplificaram locos entre 200 pb e 3.000 pb, e pode evidenciar também uma semelhança quanto aos locos polimórficos, apresentando 86% para ISSR e 88% para RAPD.

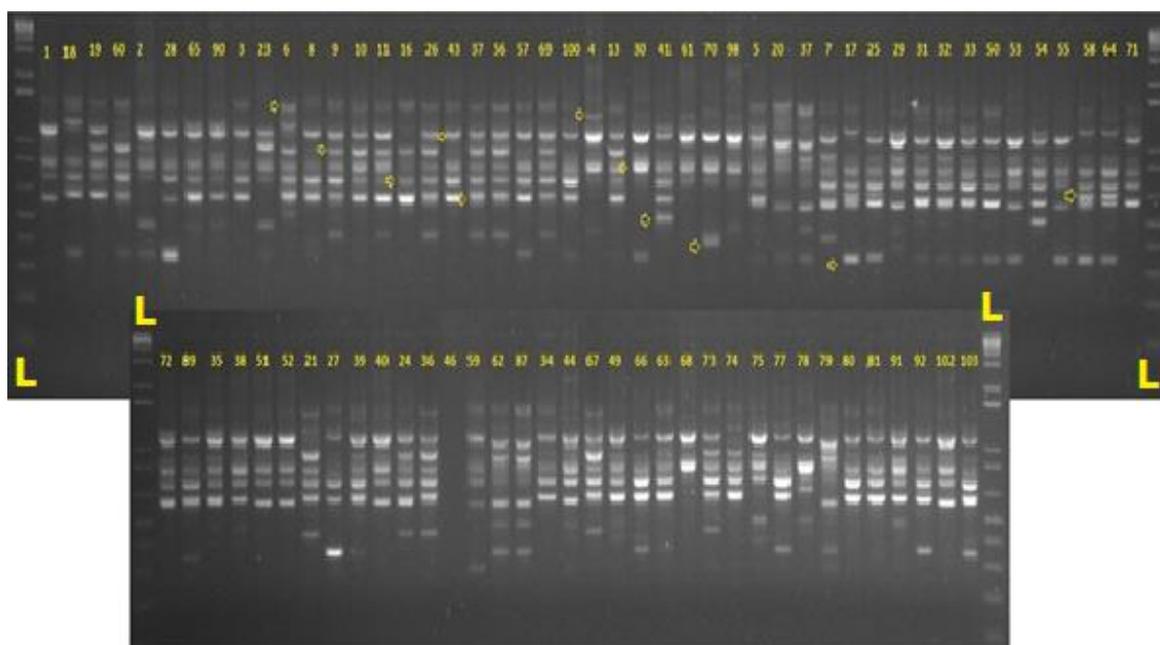


Figura 5. Gel de agarose 1,5% representando a amplificação com o iniciador 3 ZM, por meio de PCR, dos 82 acessos, e ladder 1 kb como comparativo representado por (L).

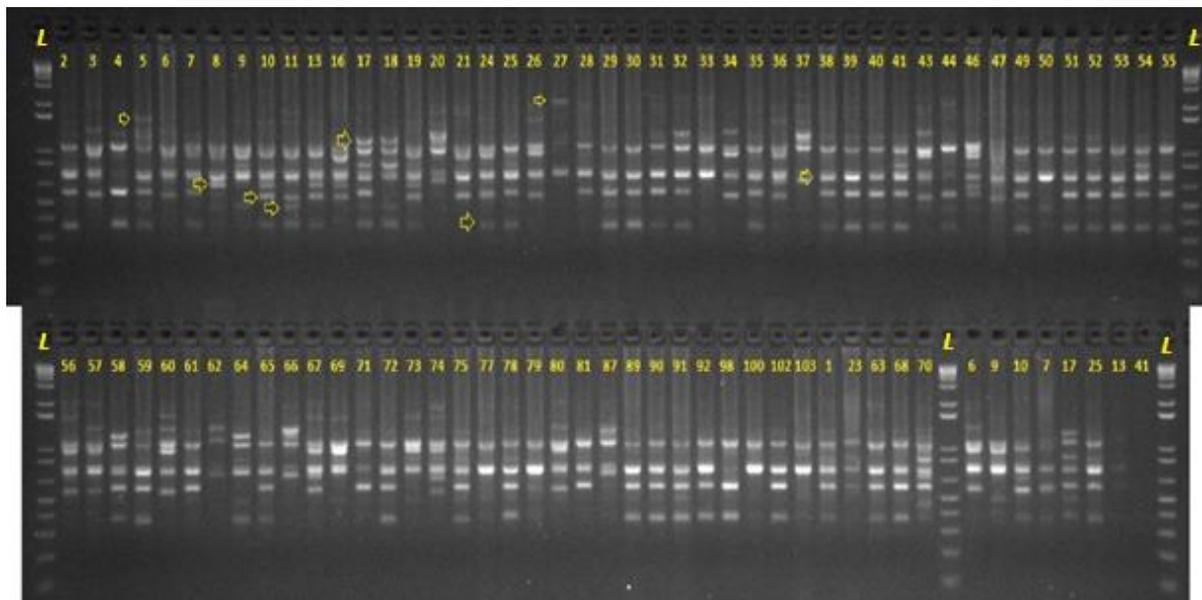


Figura 6. Gel de agarose 1,5% representando a amplificação com o primer OPP15 por meio de PCR, dos 82 acessos, e ladder 1 kb como comparativo representado por (L).

Tabela 4. Análise dos iniciadores ISSR com base nos 82 acessos de *Mentha*, apresentando um total de locos amplificados, polimórficos e monomórficos, como também a variação do tamanho dos fragmentos amplificados.

niciador	Tamanho das bandas (pb)	bandas polimórficas	bandas monomórficas	bandas amplificadas
3 ZM	300-2100	10	3	13
8 ZM	400-2000	10	2	12
32 ZM	250-1650	9	3	12
38 ZM	300-1700	9	2	11
39 ZM	400-2000	9	1	10
60 ZM	400-1500	9	2	11
7 OS	200-2000	13	1	14
8 OS	350-2000	10	0	10
9 OS	200-1650	9	2	11
10 OS	200-1650	9	1	10
1 PV	250-3000	9	0	9
4 PV	300-2100	10	2	12
Média	280-1945	9.6	1.58	11,25
Total		116	19	135

Tabela 5. Análise dos iniciadores RAPD com base nos 82 acessos de *Mentha*, apresentando um total de locos amplificados, polimórficos e monomórficos, como também a variação do tamanho dos fragmentos amplificados.

Iniciador	Tamanho das bandas (pb)	bandas polimórficas	bandas monomórficas	bandas amplificadas
AI5	200-1900	6	2	8
OPP15	350-2100	8	0	8
F9	200-2000	7	2	9
F10	250-2000	8	0	8
C4	400-2100	8	2	10
C8	350-1700	8	0	8
F8	350-2000	7	2	9
F16	400-2000	7	1	8
F6	500-2000	7	0	7
Média	327-1996	7.3	1	8.33
Total		66	9	75

A partir da análise da distância entre a matriz de similaridade e o método de agrupamento, foi obtido um índice de correlação cofenética ($r=0,75$), valor alto e adequado, uma vez que de acordo com Vaz Patto *et al.* (2004), $r > 0,56$ é considerado ideal, refletindo uma boa concordância entre a matriz de distância original e o método de agrupamento UPGMA, estabelecendo então, uma ótima consistência nos ramos obtidos pelo dendrograma.

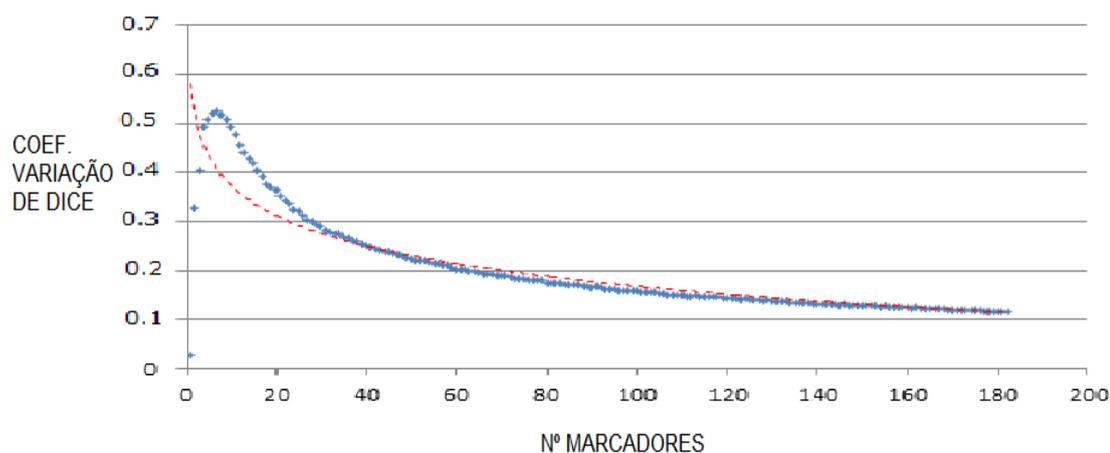


Figura 7. Curva representando os coeficientes de variação associados às estimativas de similaridade de Dice, pela análise de bootstrap com variação no número de marcadores.

A partir dos dados da figura 7 representando os erros associados às estimativas de similaridades genéticas, por meio do procedimento bootstrap com número variável de marcadores, concluiu-se que os 182 marcadores ISSR e RAPD foram suficientes para determinar confiabilidade da análise. De acordo com os dados apresentados na figura 7, houve uma relação direta entre o número de marcadores e a magnitude de correlação dos valores de matriz de similaridade de Dice, evidenciando, como esperado, que a magnitude do coeficiente de variação diminui conforme o aumento do número de marcadores avaliados.

Após verificar que a quantidade de marcadores e a correlação cofenética foram adequadas para realizar a análise, e ter uma consistência quanto aos agrupamentos obtidos, foi formado um dendrograma, onde se podem analisar as similaridades entre as espécies em questão.

Pôde-se observar no dendrograma gerado (Figura 8) a formação de dois principais grupos com 0.49 de similaridade entre eles. O primeiro grupo representa 77 acessos, e este se dividiu em dois subgrupos (1.1 e 1.2), com similaridade de 0.55. O subgrupo 1.1 dividiu-se em (1.1.1 e 1.1.2) onde apresentou maior similaridade entre os acessos *M. suaveolens* Ehrh e *M. x villosa* Huds no primeiro.

No subgrupo (1.1.2) foi observada similaridade entre os grupos pertencentes a *M. spicata* L, *M.aquatica* L. *M.pulegium* e híbridos de *spicata x suaveolens*.

O subgrupo (1.2) é representado principalmente pela *M.piperita*, *M. arvensis* e *M.longifolia* Huds, na qual estas apresentaram maior semelhança no agrupamento.

No segundo grupo (2) constitui de 4 acessos, agrupando as espécies *M. canadensis* L e *M. gracilis*. Quanto ao acesso CM79 – *Mentha* sp, se diferenciou dos demais acessos, não agrupando a nenhum, no entanto, sugere-se fazer uma análise morfológica para averiguar o motivo da mesma se destoar tanto.

Pôde-se observar também que o maior grau de similaridade ocorreu em dois acessos (CM51 e CM52) dos híbridos *M. spicata* x *suaveolens*, com similaridade de 0.91. Com base nos pares de grupos obtidos, estimou a similaridade genética média no dendrograma de 0.70. Dentre todos os acessos analisados, 12 nomeados como *Mentha* sp, agruparam-se junto a espécies conhecidas, podendo sugerir ou auxiliar a classificação das mesmas.

Os acessos CM75, CM91 e CM78 agruparam-se junto às espécies de *M. villosa* Huds., com similaridade de 0.58, entretanto, pode haver um equívoco quanto a classificação dos dois acessos CM3 e CM23 de *M.piperita* L, na qual não se agruparam junto aos demais acessos de *M.piperita* L, podendo então sugerir sua classificação como *M. suaveolens* Ehrh.

Os acessos CM77, CM103, CM81, CM92, CM102 agruparam-se junto às espécies de *M.aquatica* L e *M. pulegium*, com uma similaridade de 0.65. Os acessos CM34 e CM80 tiveram maior proximidade com espécies de *M. suaveolens* Ehrh, já quanto aos acessos CM73 e CM74 pode-se observar uma similaridade de 0.67 para espécie *M.longifolia* Huds.

Os acessos CM44 e CM67 representando o híbrido *M. x piperita* subsp *citrata* Ehrh demonstraram uma grande dissimilaridade em seu agrupamento, os dois acessos deveriam estar no mesmo grupo, sendo que um se agrupou com espécies de *M. longifolia* Huds e outra com híbridos de *spicata* x *suaveolens*, podendo então sugerir uma nova classificação.

De acordo com Carridonde (1996) a *M. spicata* L é um híbrido entre *M.longifolia* com *M. suaveolens* Ehrh, e, de acordo com o dendrograma pode ser observado uma maior similaridade da *M. suaveolens* Ehrh com a *M.spicata* L, entretanto, em relação a *M.longifolia*, houve pouca similaridade.

É citada também por Carricone (1996), a *M. villosa* Huds como sendo um híbrido oriundo do cruzamento entre *M.spicata* com *M. suaveolens* Ehrh, e observou-se no dendrograma, similaridade no

agrupamento entre *M. villosa* Huds com *M. suaveolens* espécies (1.1.1), podendo afirmar uma possível relação como parentais.

O acesso CM68 é citado por alguns autores como *M. rotundifolia* L, e de acordo com Page & Stearn (1985), este é uma sinonímia da espécie *M. suaveolens*, e este fato pode ser confirmado, pois no dendrograma este acesso se agrupou junto às espécies conhecidas de *M. suaveolens* Ehrh.

Quanto aos dois acessos CM66 e CM49 de *M. gracilis*, se agruparam a diferentes espécies e híbridos, o CM 66 se agrupou junto a *M. canadensis* (2), podendo sugerir que a *M. gracilis* é classificada como *M. canadensis*. O acesso CM 49 agrupou junto aos híbridos de *spicata* x *suaveolens* (1.1.2), como a *M. gracilis* é um híbrido de *M. spicata* com *M. arvensis*, segundo Harley & Brighton (1977) explica que a *M. gracilis* está intimamente relacionada e parecida com a *M. arvensis*, por a *M. arvensis* contribuir com três dos cinco genomas de híbridos. No entanto, de acordo com o dendrograma pode ser observado uma maior similaridade com o a *M. spicata*, e não com *M. arvensis*.

Segundo o dendrograma obtido por Gobert *et al* (2006), utilizando marcadores ISSR e AFLP em diferentes acessos de menta, apresentou maior similaridade no agrupamento entre as *M. suaveolens*, *M. spicata* e *M. longifolia*, contudo, em comparação ao dendrograma gerado a partir do marcadores ISSR e RAPD, observa-se que também apresentou similaridade entre a *M. suaveolens* e *M. spicata*, entretanto não houve agrupamento com a *M. longifolia*. Quanto aos acessos de *M. arvensis*, agruparam junto com a *M. piperita* e *M. aquatica*, no qual corrobora com o dendrograma dos ISSR e RAPD, que também apresentaram similaridade no agrupamento entre *M. piperita* e *M. arvensis*, contudo, a *M. aquatica* não se agrupou junto as *M. piperita* e *M. arvensis*.

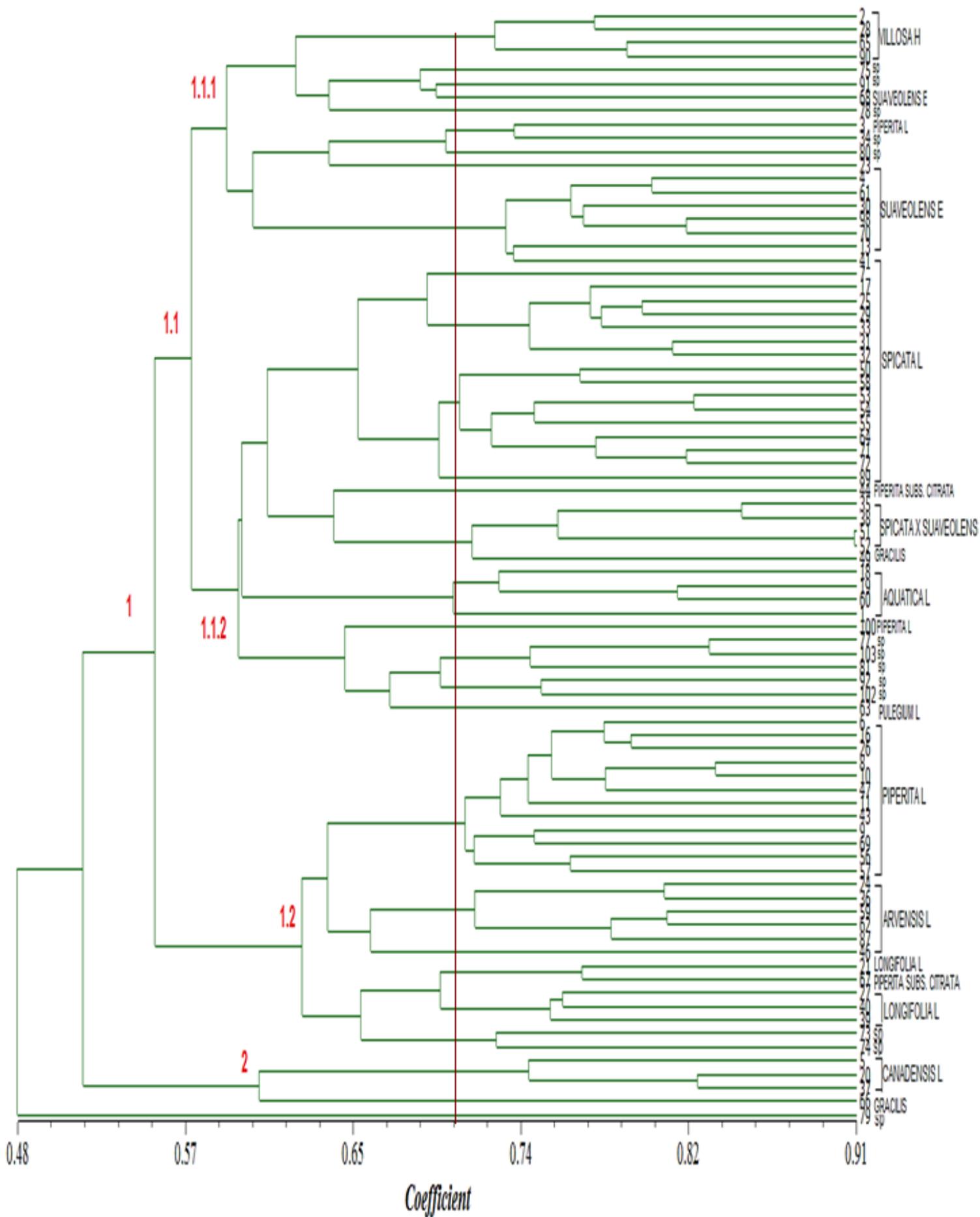


Figura 8. Dendrograma gerado pelo (NTSYS) obtido pelo coeficiente de Sorencen-Dice, e pelo método de agrupamento UPGMA pelo método de agrupamento para os 82 acessos de espécies do gênero *Mentha*.

6. CONCLUSÕES

A técnica de extração de DNA testada nesse trabalho (protocolo de extração) forneceu material com qualidade e quantidade suficientes para gerar produtos amplificados de ISSR e RAPD, certificando o método.

Os 182 locos amplificados pelos marcadores ISSR e RAPD, mostraram-se eficientes para detectar polimorfismo entre acessos de *Mentha* e possibilitou uma distinção mais precisa dentro desses grupos formados e entre eles.

O arranjo da distribuição dos acessos em função da similaridade genética possibilita maior conhecimento quanto à classificação, podendo auxiliar em programas de melhoramento genético nesta espécie.

Os 82 acessos que constituem a coleção de menta representam, portanto, grande fonte de variabilidade entre os diferentes genótipos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADJUTO, E. N. P.. **Caracterização morfológica e do óleo essencial de seis acessos de hortelãzinho (*Mentha* spp).** Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – FAV-Universidade de Brasília, 2008. 93 fl.

AGA, E. **Molecular Genetic Diversity Study of Forest Coffee Tree [*Coffea arabica* L.] Populations in Ethiopia: Implications for Conservation and Breeding.** Tese de doutorado - Swedish University of Agricultural Sciences, Suécia, 2005.

ARAS, S.; DURAN A.; YENILMEZ, G. **Isolation of DNA for RAPD analysis from dry leaf material of some *Hesperis L.* specimens.** Plant Molecular Biology Reporter 21: 420-461, 2006.

ALLARD, R. W. Population structure and sampling methods. In: FRANKEL, O. H.; BENETT, E. **Genetic resources in plants- their exploration and conservation.** Orford, UK; Blackwell, 1970. p. 97-107.

ALZATE-MARIN, A.L.; CERVIGNI, G.D.L.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. **Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja.** Fitopatologia Brasileira, p.333-342, 2005.

BANDONI, A.L.; CZEPAK, M.P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: seu aproveitamento para a produção de aromas e sabores.** Vitória: EDUFES, 2008. p.623.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia.** Zaragoza/ESP: Editorial Acriba, 1991. p.594

BRILHO, R. C. **Viveiro de mudas de hortelã.** Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, SP, p.6, 1963.

BUSO, G. S. C.; BRONDANI, R. V.; AMARAL, Z. P. de S.; REIS, A. M. M.; FERREIRA, M. E. **Desenvolvimento de primers ssr para análise genética de pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) utilizando biblioteca genômica enriquecida.** Brasília, DF, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2009. 27p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Boletim de Pesquisa, 15).

BUSO, G.S.C. **Marcadores Moleculares e Análise Filogenética.** In: **Marcadores moleculares e análise filogenética e Utilização de DNA na análise filogenética.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. p. 7-10.

BUSSAB, W. O.; MIAZAKI, E. S. ; ANDRADE, D. F. **Introdução a análise de agrupamentos**. IME-USP, 1990. 150p.

BUSTAMENTE, M. F. L. **Plantas medicinales y aromaticas: estudio, cultivo y processado**. Madrid: Mundi-Prensa, 1993. 200 p.

BUNSAWAT, J., N. ELLIOTT, K. HERTWECK, E. SPROLES, AND L. A. ALICE. Phylogenetics of *Mentha* (Lamiaceae): **Evidence from chloroplast DNA sequences**. *Systematic Botany* v.29:p. 959-964. 2004.

CALIXTO, J. B. **Biodiversidade como fonte de medicamentos, Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3 - São Paulo, 2003.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B. de; BRITO, G. G. de; SAKIYAMA, N. S. **Tipos de marcadores moleculares**. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Ed.). *Marcadores moleculares*. Viçosa: UFV, 2006. p.374.

CARRICONDE ET AL. **Plantas medicinais e plantas alimentares**, Olinda : Centro nordestino de medicina popular, v.1, 153p. 1996.

CARVALHO, A. & ESPIRITO-SANTO, A.F. **Caracterização morfológica de acessos de *Mentha x villosa huds.*** Universidade de Brasília.Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Engenharia Agrônômica) - 2007. 20p.

CASTRO, H. G. **Divergência genética entre acessos de menta avaliada por características botânico agrônômicas, moleculares e fitoquímicas**. *Revista Ceres*, v. 51, n. 294, p. 227-241, 2004.

COELHO, A. S. G. 2000. Dboot - **Avaliação dos erros associados a estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap com variável de marcadores**. Goiânia: Laboratório de Genética Vegetal, Instituto de Ciências Biológicas, UFG.

CORRÊA JUNIOR, C; LIN CHAU MING & SCHEFFER, M.C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2ª ed. Jaboticabal/SP: FUNEP, 1994. 162 p.

CROTEAU,R.- **Menthol biosynthesis and molecular genetics**. *Naturwissenschaften*, v.92, n.12, p. 562-77, 2005.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. 2. ed. New York: New York Botanical Garden, 1988. 555 p.

CRUZ, C.D. Programa genes – versão Windows: **aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 2006.

COSTA, J.L.; OLIVEIRA, E.J.; JESUS, O.N.; OLIVEIRA, G.A.F.; NEVES, C.G. **Marcadores moleculares como ferramenta para estruturação da diversidade genética em 12 genótipos de maracujazeiro.** Jornada Científica – Embrapa Mandioca e Fruticultura. 2010.

SILVA, K.J.D.; SOUZA, M.B.; SANTOS, M.F.; PIRES, C.J.; **Variabilidade genética de feijão-caupi de porte ereto por meio de marcadores.** Recife: II Congresso Nacional de Feijão-Caupi, 2013.

DIAS, L.A.S. Análises multidimensionais. In: ALFENAS, L.C. (Ed.). **Eletofórese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos.** Viçosa: Editora UFV, 1998. p.405-75.

DORMAM, H. J. D.; KOSAR, M.; KAHLOS, K., HOLM, Y.; HILTUNEN, R. **Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from Mentha species, Hybrids, Varieties, and Cultivars.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton, v. 51, n. 16, p. 4563- 4569, June 2003.

DUDLEY, J.W. **Comparison of genetic distance estimators using molecular marker data.** In: Simposium analysis of molecular marker data, 1994.

EVANS, W.C. **Trease and Evans Pharmacognosy.** 16.ed. New York: Elsevier, 2009. p.81-132

FALEIRO, F.G. **Marcadores genético-moleculares aplicados aos programas de conservação e uso de recursos genéticos.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. p.99-102.

FERREIRA, C P. **Caracterização química e morfológica de genótipos de *Mentha spp.*** 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)-Universidade de Brasília, Brasília, 2008. p.97.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 3ª ed,1998. 220p.

GARLET, T. M. B. **Produtividade, teor e composição do óleo essencial de espécies de *Mentha L.* (Lamiaceae) cultivados em hidroponia em variação de potássio.** 2007. 112 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – UFSM, Santa Maria.

GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C.M. **Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus x domestica Borkh.*) using microsatellite (SSR and ISSR) markers.** Euphytica, v. 122, p. 81-89. 2001

GODWIN, I.D., AITKEN E.A.B.; Smith, L.W. **Application of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics**. Electrophoresis v. 18, p. 1524–1528, 1997.

GONÇALVES LSA; RODRIGUES R; SUDRÉ CP; BENTO CS; MOULIN MM; ARAÚJO ML; DAHER RF; PEREIRA TNS; PEREIRA MG. **Divergência genética em tomate estimada por marcadores RAPD em comparação com descritores multicategóricos**. Horticultura Brasileira. Vol 26, pag. 364-370. 2008.

GOBERT, V. MOJA S., COLSON M. & TABERLET P. **Hybridization in the section *Mentha* (Lamiaceae) inferred from AFLP markers**. American Journal of Botany, v.89 p.2017-2023. 2002.

GOBERT, V. MOJA, S. TABERLET, P. & WINK M. **Heterogeneity of Three Molecular Data Partition Phylogenies of Mints Related to *M. × piperita* (*Mentha*; Lamiaceae)**. Plant biology 8. p.470- 485. 2006

GRUENWALD, J.; BRENDLER, T.; JAENICKKE, C. (Eds). **Physicians desk references (PDR) for herbal medicines**. New Jersey: Med. Econ. Co., 2000. P

GONÇALVES, S. **Ervas com cheiro de sucesso**. Globo Rural n.204, Rio de Janeiro: Globo, 2002.

GRACINDO, L. A. M. B.; GRISI, M. C. M. ; SILVA, D. B. ; ALVES, R. B. N. ; BIZZO, H. R.; VIEIRA, R. F. **Chemical characterization of mint (*Mentha spp.*) germplasm at Federal District, Brazil**. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.8, n.esp., p.5-9, 2006

GUIMARÃES, C. T.; MOREIRA, M. A. 1999. **Genética Molecular aplicada ao melhoramento de plantas**. In: BORÉM, A. Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: UFV, p.715-740.

HARLEY R. M.; BRIGHTON C. A. **Chromosome numbers in the genus *Mentha L.*** Botanical Journal of the Linnean Society v. 74:p. 71-96.1977

HEDGE, I. C. A global survey of the biogeography of the Labiatae. Ln: HARLEY, R. M.; REYMONDS, T. (Ed.). **Advance in labiatae science**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1992. p. 7-17

HOFFMAN, L.V.; BARROSO, P.A.V. **Marcadores moleculares como ferramentas para estudos de genética de plantas**. EMBRAPA Algodão. Documentos, 147, 35p. Campina Grande-PB, 2006.

IBPGR (INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES). **Genetics resources of Capsicum, a global plan and action**. Rome, IBPGR, 1983. 49p.

JOLY, A.B. Botânica: **introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Nacional, 1983. p.583-586.

KLOCK, U.; MUNIZ, G .I. B. **Propriedades e potencialidades da produção de óleos essenciais de espécies florestais**. Disponível em: <http://www.oficinadaservas.com.br/estoleos4.htm>. Acesso em janeiro de 2016.

KOTHARI, R. **The indian essential oil industry**. *Perfumer and Flavorist*, Wheaton, v.30, n.1, p. 46-50, Jan. 2005.

KOSMAN E.; LEONARD, J. Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationship between individuals for haploid, diploid, and polyploidy species. **Molecular Ecology**, v.14, p.415-24, 2005

KRESOVICH, S.; SZEWC-MCFADDEN, A. K.; BLICK, S. **Abundance and characterization of simple sequence repeats (SSRs) isolated from a size-fractionated genomic library of Brassica napus L. (rapeseed)**. *Theoretical and Applied Genetics*, Heidelberg, v. 91, n. 2, p. 206-211, 1995.

KUMAR, S.S.; SHASHI PANDEY-RAI, S.; RAI, S.K. **The cultivation of mints in India**. In: LAWRENCE, B.M. *Mint: the genus Mentha*. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2007. p.137-61.

KURANE, J.; SHINDE, V.; HARSULKAR, A. **Application of ISSR marker in harmacognosy: Current update**. *Pharmacognosy Review*. v. 3, n. 6, p. 216-228, 2009.

LAWRENCE B. M. **A study of the monoterpene interrelationships in the genus Mentha with special reference to the origin of pulegone and menthofuran**. Ph.D. dissertation. Groningen University, Groningen, Netherlands.1978

LEBEAU J. **Nouvelles mises au point dans le genre Mentha**. *Natura Mosana* v.27: p.109-141.1974

LIMA, A. R. & MOLLAN, T. R. M. **Nova variedade de *Mentha arvensis* L.** *Bragantia*, Campinas, SP, v.12, p.1-12, 1952.

LORENZI H. & MATOS, **Plantas Medicinais no Brasil Nativas e Exóticas**. Nova Odessa/SP, Instituto Plantarum p.211, 2002.

LORENZO, D.; PAZ, D.; DELLACASSA, E.; DAVIES, P.; VILA, R.; CANIGUERAL, S. Essential oil of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguai. **Brazilian Archives of Biology Technology** v. 45, n. 4, p. 519-524, 2002.

LIU, B.; WENDEL, J. F. **Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton**. *Molecular Ecology Notes*, v.1, p.205-208, 2001.

MAIA, N.B. **Produção e qualidade do óleo essencial de duas espécies de menta cultivadas em soluções nutritivas**. Piracicaba: ESALQ. 1998.105p. (tese doutorado).

MARTINS ER; CASTRO DM; CASTELLANI DC; DIAS JE. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV - Imprensa Universitária. 220 p. 1994.

MAROTTI, M.; PICCAGLIA, R.; GIOVANELLI, E.; DEANS, S. G.; EAGLESHAM, E. **Effects of planting time and mineral fertilization on peppermint (*Mentha x piperita* L.) essential oil composition and its biological activity**. *Journal of Flavour and Fragrance*, Glasgow, v. 9, n. 3, p. 125-129, 1994.

MATOS, F. J. A. **The essential oil mentha x villosa Huds**. From northeastern Brazil. Universidade federal do Ceará, Laboratório de Produtos Naturais, Fortaleza CE. 1999)

MAY, A.; MORAES, A, R, A. de; BOVI, O. A.; MAIA, N. B.; PINHEIRO, M. Q. ***Mentha arvensis* L. Infobibos**, 2007. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2007_1/menta/index.htm>. Acesso em: Dez 2015.

MEYER, A.S. **Comparison of similarity coefficients used for cluster analysis with dominant markers in maize (*Zea mays* L.)**. *Genetics and Molecular Biology*, v.27, n.1, p.83-91, 2004.

MESSMER, M. M.; MELCHINGER, A. E.; HERRMANN, R. G.; JURGEN, B. Relationships among early European maize inbreds, II: **comparison of pedigree and RFLP data**. *Crop Science*, Madison, v. 33, n. 5, p. 944-950, 1993.

MILACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre, 1998. p.141.

MITCHELL, A. R.; FARRIS, N. A. Peppermint response to nitrogen fertilizer in arid climate. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 19, n. 6, p. 955-967, 1996

MOHAMMADI, S.A.; PRASANNA, B.M. **Analysis of genetic diversity in crop plants – Salient statistical tools and considerations**. *Crop Science*, v.43, n.4, p.1235-48, 2003.

MORTON J. K. **The chromosome numbers of the British *Menthae***. *Watsonia* v.3: p. 244-252.1956

MULLIS, K.; FALOONA, F. **Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction**. *Methods in Enzymology*, San Diego, v. 155, n. 3, p. 335- 350, 1987.

PAGE, M.; STEARN, W. T. **Hierbas para cocinar**. *Manuales Jardim Blume*. The Royal Horticultural Society. 1985. 61 p.

PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. **Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce**. *Theoretical and Applied Genetics*, 85:985-993, 1993.

PARANÁ – Secretaria de Estado da Agricultura. **Aspecto da cultura de menta no Paraná**. Curitiba/PR: Departamento de Economia Rural, 1978. 39 p

PATRA, D.D.; ANWAR, M.; CHAND, S. **Integrated nutrient management and waste recycling for restoring soil fertility and productivity in Japanese mint and mustard sequence in Uttar Padesh, India**. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v.80, p.267-75, 2000.

PASSOS, S. M. G. - **Principais culturas**, vol 2. 2ª ed. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1973.

PAULUS, D.; PAULUS, E. **Efeito de substratos agrícolas na produção de mudas de hortelã propagadas por estaquia**. *Horticultura Brasileira*, v.25, p.594-7, 2007

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B. dos; PINTO, C.A.B.P. **Genética na Agropecuária**, Lavras. Ed UFLA., 2008, 464 p

RAMALHO, M.A.P.; FURTINI, I.V. **Técnicas biotecnológicas aplicadas ao melhoramento vegetal: alcance e limites**. *Revista Ceres*, n. 56, v. 4, pag. 473-479. 2009.

RODRIGUES, J.F. **Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccínea* Lindl. e *C. Mantiqueirae* (Flowie) Van der Berg (Orchidaceae) baseada em marcadores moleculares ISSR**. Dissertação de Mestrado, 81p. ESALQ/USP. Piracicaba, 2010

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system**. *Verion 2.1*, 2000,. New York: Exeter Software. p.38.

RUTTLE, M. L. **Cytological and embryological studies of the genus *Mentha***. v.44: p.428-468, 1931.

SANTOS, S. R. **Menta**. *Agricultura*, Brasil-Oeste, 1965, 4 p.

SANTOS A.R.A. **Estudo da variação morfológica da hortelã-miúda (*Mentha x villosa* H.) comercializada no DF**. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Engenharia Agrônômica) - Universidade de Brasília. 2004. 17 p

SILVA, A. C. P. **Estudo da variação morfológica da hortelã miúda (*Mentha x villosa*, H.) comercializada no Distrito Federal**. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília. Monografia de Graduação em Engenharia Agrônômica. 2005. 23 p.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W.H. Freeman, 1973. 573p.

SRIVASTAVA, R.K et al. **Characeristics of the flavor and fragrance industry. Perfumer and flavorist**, v.30, p. 24-34, 2005.

TODD, J.; JOSEPHSON, B. **The design of living technologies for waste treatment**. *Ecological Engineering*, Amsterdam, v.6, n.1-3, p.109-136, 1996.

TUCKER, A. O & R. F. C. Naczi. 2007. ***Mentha*: An overview of its classification and relationships**. In: B.M. Lawrence, ed., *Mint: The Genus Mentha*. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 1-39.

Vaz patto MC, Satovic Z, Pêgo S, Fevereiro P (2004) Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germplasm using microsatellite markers. *Euphytica* 137: 63-67

VENCOSCVSKY, R.; **Tamanho efetivo populacional na coleta e preservação de germoplasma de espécies alógamas**. Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, Piracicaba, SP, nº 43, 2003. p.1912-1921.

WATANABE, C. H.; NOSSE, T. M.; GARCIA, C. A.; PINHEIRO POUH, N. **Extração do óleo essencial de menta (*Mentha arvensis* L.) por destilação por arraste a vapor e extração com etanol**, *Revista BRAS. PI. MED*, 8(4), p. 76-86, 2006.

WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, F.G. **DNA Polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers**. *Nucleic Acids Research*, v.18, p.6531-6535, 1990.

ZIETKIEWICZ., E.; RAFALSKI., A.; LABUDA., D. **Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-Anchored polymerase chain reaction amplification**. *Genomics* 20:176-183. 1994.

ZUCCHI, M.I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR.** 2002. 130f. Tese (Doutorado em agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.