

## EFEITO DO GENÓTIPO NA PROPAGAÇÃO *in vitro* DE *Plantago sp.*

Vanessa Cristina Vanessa Cristina Stein

Bióloga, Doutoranda em Fisiologia Vegetal, Laboratório de Cultura de Tecidos em Plantas, Departamento de Biologia- DBI,  
Universidade Federal de Lavras – UFLA - E-mail: vanessastein@ig.com.br

Vera Lúcia Bobrowski

Eng. Agra, D. Sc. Profra. Adjunta, Instituto de Biologia, Departamento de Zoologia e Genética da Universidade Federal de Pelotas  
Email: vera.bobrowski@ufpel.edu.br

Daiane Peixoto Vargas

Bióloga, Doutoranda em Fisiologia Vegetal, Laboratório de Cultura de Tecidos em Plantas, Departamento de Biologia- DBI,  
Universidade Federal de Lavras - UFLA- Cxa. Postal 37 - 37200000 - Lavras – MG E-mail: dvbio@hotmail.com

Gustavo Heiden

Biólogo, UFPEL Universidade Federal de Lavras - UFLA- Cxa. Postal 37 - 37200000 - Lavras – MG Pelotas, RS. E-mail:  
gustavo.heiden@gmail.com

João Ricardo Vieira Iganci

Biólogo, Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Botânica, Escola Nacional de Botânica Tropical, Instituto de Pesquisas do  
Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.  
E-mail: joaoiganci@terra.com.br

**RESUMO** - O objetivo deste trabalho foi estabelecer padrões genotípicos para as espécies *Plantago australis* Lam., *Plantago brasiliensis* Sims. e *Plantago major* L. através de isoenzimas e avaliar o efeito do genótipo no estabelecimento *in vitro*. Para análise isoenzimática, sementes foram germinadas e as plântulas mantidas em meio MS por 120 dias, quando as folhas foram coletadas e submetidas as técnicas de eletroforese horizontal. Foram usados os sistemas enzimáticos: fostatase ácida (FAC), glutamato oxaloacetato (GOT), isocitrato desidrogenase (IDH) e 6-fosfogluconato desidrogenase (6-PGD). Para avaliar o efeito do BAP, as plântulas foram transferidos para MS suplementado com as concentrações de 0; 0,1; 0,2 e 0,3 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Dentre os sistemas testados para avaliar o polimosfismo isoenzimático os sistemas GOT (glutamato oxaloacetato transaminase) e 6-PGD (6- fosfoglutamato desidrogenase) evidenciam a variabilidade genética entre *P. australis* Lam., *P. major* L. e *P. brasiliensis*. As espécies de tansagem apresentaram respostas genotípicas diferenciadas às concentrações de BAP testadas.

**Palavras-chave:** micropropagação, *Plantago australis* Lam., *Plantago brasiliensis* Sims., *Plantago major* L.

## EFFECTO DEL GENOTIPO EN LA PROPAGACIÓN *in vitro* DE *Plantago sp.*

**RESUMEN** - El objetivo de este trabajo fue establecer patrones genotípicos para las especies *Plantago australis* Lam., *Plantago brasiliensis* Sims. y *Plantago major* L. a través de isoenzimas y evaluar el efecto del genotipo en el establecimiento *in vitro*. Para análisis isoenzimática, semillas fueron germinadas y las plântulas mantenidas en medio MS por 120 días, cuando las hojas fueron recolectadas y sometidas las técnicas de electroforesis horizontal. Fueron usados los sistemas enzimáticos: fostatase ácida (FAC), glutamato oxaloacetato (GOT), isocitrato desidrogenase (IDH) y 6-fosfogluconato desidrogenase (6-PGD). Para evaluar el efecto del BAP, las plântulas fueron transferidos hacia MS suplementado con las concentraciones de 0; 0,1; 0,2 y 0,3 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. De entre los sistemas probados para evaluar el polimosfismo isoenzimático los sistemas GOT (glutamato oxaloacetato transaminase) y 6-PGD (6- fosfoglutamato desidrogenase) evidenciam la variabilidad genética entre *P. australis* Lam., *P. major* L. y *P. brasiliensis*. Las especies de tansagem presentaron respuestas genotípicas diferenciadas a las concentraciones de BAP probadas.

**Palabras-llave:** micropropagação, *Plantago australis* Lam., *Plantago brasiliensis* Sims., *Plantago major* L.

## EFFECT OF THE GENOTYPE IN THE PROPAGATION *in vitro* OF *Plantago sp.*

**ABSTRACT** - This research aims to produce the isoenzyme profile and analyze of genotype effect for *in vitro* propagation of three species of tansagem: *Plantago australis* Lam., *Plantago brasiliensis* Sims. and *Plantago major* L.

For isoenzymatic analysis, the seeds were germinated in agar 1% and after maintained in MS medium for 120 days, when the leaves were collected and submitted to horizontal electrophoresis. For analysis, the enzymatic systems used were: acid phosphatase (FAC), oxalacetate glutamate (GOT), isocitrate desidrogenase (IDH) and 6-phosphogluconate (6-PGD). In order to evaluate the BAP effect in propagation the explants with 120 days, placed in MS medium supplemented with the followings concentrations of BAP 0; 0,1; 0,2 and 0,3. Among the systems tested to evaluate the isoenzymatic polymorphism, the systems GOT (oxalacetate glutamate transaminase) and 6-PGD (6-phosphoglutamate desidrogenase) evidenced the genetic variability among *P. australis* Lam., *P. major* L. and *P. brasiliensis* Sims. These species exhibited significant genotypic differences in response to BAP concentration tested.

**Key words:** micropropagation, *Plantago australis* Lam., *Plantago brasiliensis* Sims., *Plantago major* L.

## INTRODUÇÃO

Uma grande parte dos produtos farmacêuticos utilizados nos países ocidentais, cerca de mais de 40%, são derivados ou parcialmente derivados de fontes naturais (ROUT *et al.*, 2000). É bem provável que das 200.000 espécies vegetais que possam existir no Brasil, pelo menos a metade, pode ter alguma propriedade medicinal (MARTINS *et al.*, 2000). Dentre elas, podemos destacar as espécies do gênero *Plantago*, as quais são conhecidas popularmente como tansagem, transagem e transage.

Suas partes aéreas são utilizadas na medicina popular (MARTINS *et al.* 2000) e pesquisas comprovam que alguns compostos químicos isolados de *P. major* L. apresentaram atividade antiviral e *P. psyllium* é relatada como suplemento terapêutico para pacientes com diabetes tipo II, pois ajuda a diminuir os níveis de lipídeos e glicose (MORÁN, 1998).

A confiabilidade dos produtos fitoterápicos parte da certeza de que as espécies envolvidas estejam corretamente identificadas (MENTZ & BORDIGNON, 2003). Dentre os diferentes marcadores genéticos disponíveis na atualidade, as isoenzimas têm gerado uma gama enorme de informações práticas na identificação de espécies principalmente pela relativa simplicidade, rapidez e baixo custo das análises em relação aos outros marcadores (TEIXEIRA *et al.*, 2004).

As manifestações de isoenzimas ao longo do desenvolvimento das plantas relacionam-se com a ativação e inativação de genes que controlam ou modificam a síntese de enzimas (LANGE, 2001). As alterações na seqüência de DNA refletem-se diretamente em mudanças na composição dos aminoácidos e essas mudanças, manifestam-se através de diferentes mobilidades eletroforéticas que têm sido utilizadas como marcadores moleculares em estudos taxonômicos, genéticos, bioquímicos, fisiológicos, detecção de diferenças inter e intra específicas, entre outros (LANGE, 2001; ALFENAS, 1998).

O estudo da estrutura genética de populações naturais e a base genética das características de interesse farmacológico são imprescindíveis para o sucesso do melhoramento destas características e a utilização de plantas medicinais como recurso terapêutico ou para o desenvolvimento de novos medicamentos (NODARI & GUERRA, 2003).

Como isso a micropropagação de plantas aliada a análise isoenzimática pode contribuir no desenvolvimento de novas cultivares, na recuperação de substâncias farmacêuticas, na multiplicação segura de cultivares desejáveis e como auxiliar na salvaguarda do patrimônio genético de plantas ameaçadas pela exploração humana (SIMÕES, 1998) além de permitir estudos fisiológicos e bioquímicos *in vitro*.

Assim, a regeneração de plântulas *in vitro* através da cultura de brotos, freqüentemente utilizada pela obtenção de clones que mantêm todas as características da planta mãe, é uma técnica especialmente vantajosa para a obtenção de genótipos produtores de compostos medicinais (FRANÇA, 2003).

Atualmente são utilizados diversos meios nutritivos, porém os meios MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e B5 (GAMBORG, 1968) são os mais usados no cultivo *in vitro* da maioria das espécies. Entretanto, algumas modificações genótipo-específicas podem ser feitas, no chamado meio básico, com a intenção de aperfeiçoar metodologias para o melhor desenvolvimento da espécie estudada (CALDAS *et al.*, 1998; TEIXEIRA E TORRES, 1998; TORRES *et al.*, 1998).

Alguns tecidos demonstram dependência da presença de reguladores de crescimento exógeno no meio, enquanto outros produzem o que necessitam. As auxinas e as citocininas são as classes de reguladores mais utilizadas. Entre as diferentes citocininas existentes destaca-se o BAP (6-Benzil aminopurina), por induzir a formação de grande número de brotos e alta taxa de multiplicação em sistemas de micropropagação (CALDAS *et al.*, 1998; TEIXEIRA E TORRES, 1998, TORRES *et al.*, 1998).

Este trabalho teve como objetivo estabelecer padrões genotípicos para três espécies de *Plantago* através de isoenzimas e avaliar o efeito do genótipo no estabelecimento *in vitro* destas espécies.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção de padrão isoenzimático

Foram coletadas a campo sementes de *Plantago major* L., *Plantago australis* Lam. e *Plantago brasiliensis* Sims. As quais foram germinadas *in vitro*, para tanto, foram desinfestadas em álcool etílico 70% por 2 min e

hipoclorito 20% por 20 mim, inoculadas em tubos de ensaio contendo ágar 1% e após mantidas em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) por 120 dias., para obtenção de folhas.

Após 120 dias de cultivo *in vitro* as folhas foram coletadas e maceradas em tampão usado no gel, na proporção de 1:1, acrescido de 0,15% de 2-mercaptoetanol para a obtenção dos extratos. Logo após, o papel filtro (Whatmann 3MM), de 1,5 x 4mm, foi embebido nas amostras e aplicado no gel de poliacrilamida, sendo utilizadas 8 amostras de cada espécie.

Foi utilizada eletroforese horizontal para análise dos sistemas enzimáticos usados foram: fostatase ácida (FAC), glutamato oxaloacetato (GOT), isocitrato desidrogenase (IDH) e 6-fosfogluconato desidrogenase (6-PGD).

No sistema da fostatase ácida e glutamato oxaloacetato transaminase foi empregado o tampão descrito por SCANDALIOS (1969) e gel de poliacrilamida na concentração de 6% e para os sistemas isoenzimáticos da isocitrato desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase foi utilizado o sistema de tampão descritos por SHIELDS *et al.* (1983) e géis de poliacrilamida a 5%.

As migrações eletroforéticas foram efetuadas em câmara fria com temperatura de 4 e 6°C. A diferença de potencial foi mantida ao redor de 10 volts.cm<sup>-1</sup> até que o fronte, marcado pelo azul de bromofenol, atingisse 9 cm do ponto de aplicação.

Na revelação dos géis foram usados sistemas de coloração descritos por SCANDALIOS (1969) para FAC, VALLEJOS (1983) para IDH e 6-PGD e AYALA *et al.* (1972) para GOT.

As mobilidades relativas foram calculadas dividindo-se a medida de todas as bandas por uma, tomada como referência.

Para análise da estimativa de similaridade genética entre as espécies, foi usado o coeficiente de Jaccard, através do SIMQUAL (similaridade para dados qualitativos), e para a análise de agrupamento o UPGMA (método da media aritmética não ponderada), através do SHAN (agrupamento seqüencial, aglomerativo, hierárquico e exclusivo), conforme Sneath & Sokal, citados por CRISCI & ARMENGOL (1983), empregando-se o NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis for Personal Computers), v 1.7 (ROHLF, 1992).

### Efeito do genótipo no estabelecimento *in vitro* de *Plantago sp.*

Para o estabelecimento *in vitro* de *Plantago major* L., *Plantago australis* Lam. e *Plantago brasiliensis* Sims. foram utilizadas sementes coletadas a campo, desinfestadas em álcool etílico 70% por 2 mim e hipoclorito 20% por 20 mim, germinadas em tubos de ensaio contendo ágar 1% e após mantidas em meio MS.

Após 120 dias em meio mineral básico MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), os explantes germinados *in vitro* foram submetidos a meio MS com as concentrações 0; 0,1; 0,2 e 0,3 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Os meios de cultivos tiveram o pH ajustado para 5,8 utilizando NaOH 1N ou HCl 1N e autoclavados a 120°C e 1,5 atm. de pressão por 20 minutos.

Todos os procedimentos de inoculação dos explantes foram realizados em câmara asséptica de fluxo laminar horizontal. Após inoculação o material foi mantido em câmara de crescimento a 25 ± 1°C, fotoperíodo de 16h e 42 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> densidade de fluxo de fótons.

Os explantes foram avaliados aos 4, 14, 21 e 28 dias onde foram analisados a altura do explante, o número de folhas e a formação de brotos.

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado com 4 repetições e um fatorial A x B x C (concentração x espécie x tempo). A análise da variação foi realizada utilizando-se o programa estatístico SANEST (ZONTA & MACHADO, 1984).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Obtenção de padrão isoenzimático

Os sistemas da fostatase ácida (FAC) e da isocitrato desidrogenase (IDH) por não apresentarem boa resolução foram desconsiderados da análise.

Nas três espécies de *Plantago sp.* analisados, foram observadas quatro bandas no sistema da GOT, com duas bandas em cada espécie. O sistema 6-fosfogluconato desidrogenase (6-PGD) apresentou seis bandas, com variações de duas a três bandas por espécies (Tab. 1). Com estes sistemas foram consideradas 10 bandas que permitiram a diferenciação das três espécies de *Plantago sp.* (Fig. 1).

Tabela 1. Padrões isoenzimáticos de glutamato oxaloacetato transaminase – GOT (A) e 6-fosfoglucomato desidrogenase – 6-PGD em folhas de três espécies de *Plantago sp.*

Enzima /Padrão	Espécies	Mobilidade Relativa
GOT/A	<i>P. australis</i> Lam	0,97; 1,20
GOT/B	<i>P. major</i> L.	1,00; 1,06
GOT/C	<i>P. brasiliensis</i> Sims	1,00; 1,20
6-PGD/A	<i>P. australis</i> Lam	1,03; 1,33
6-PGD/B	<i>P. major</i> L.	1,00; 1,20; 1,41
6-PGD/C	<i>P. brasiliensis</i> Sims	1,11; 1,41

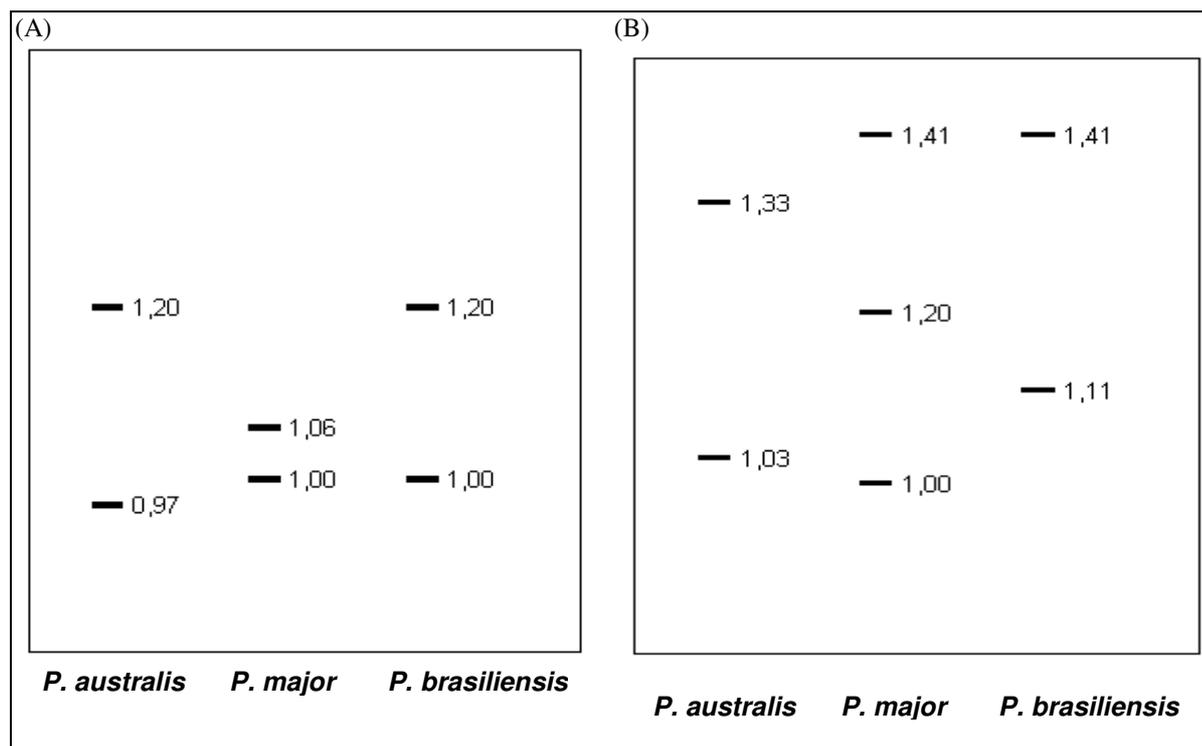


Figura 1. Padrões eletroforéticos de glutamato oxaloacetato transaminase – GOT (A) e 6-fosfoglucomato desidrogenase – 6-PGD (B) em folhas de três espécies de *Plantago sp.*

O coeficiente de similaridades calculado, com base na presença e ausência de bandas isoenzimáticas, em folhas de *Plantago sp.*, foram de 0,00 entre *P. australis* Lam. e *P. major* L., 0,14 entre *P. australis* Lam e *P. brasiliensis* Sims e 0,29 entre *P. major* L. e *P. brasiliensis* Sims (Tab. 2).

TABELA 2. Similaridade genética, estimada pelo coeficiente de Jaccard, entre três espécies de *Plantago L.*

Espécies	<i>P. australis</i> Lam	<i>P. major</i> L.	<i>P. brasiliensis</i> Sims
<i>P. australis</i> Lam	1,00		
<i>P. major</i> L.	0,00	1,00	
<i>P. brasiliensis</i> Sims	0,14	0,29	1,00

A análise de agrupamento, pelo método UPGMA, permitiu a classificação das três espécies em grupos diferentes (Fig. 2).

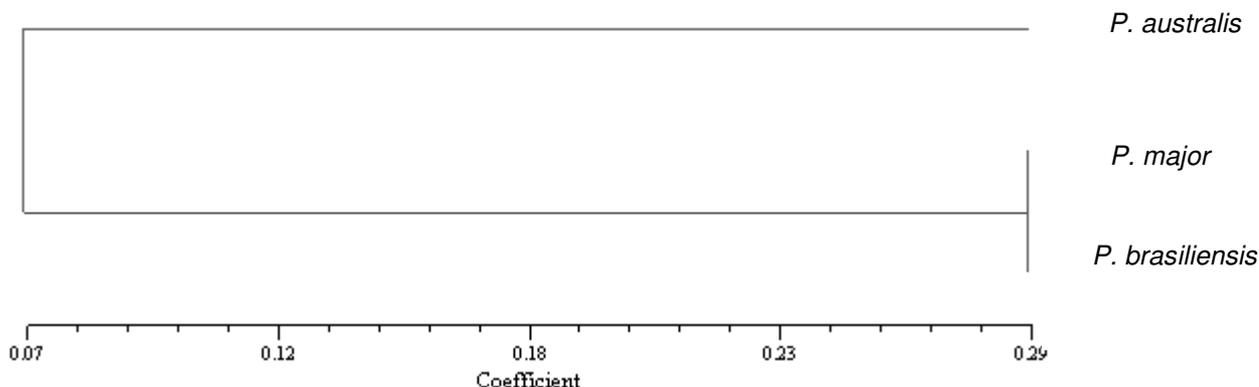


FIGURA 2. Dendrograma de três espécies de *Plantago* L., pelo método UPGA, baseado na análise de isoenzimática.

Os resultados demonstram que a técnica de eletroforese de isoenzimas pode ser usada para a distinção de espécies de tansagem, sendo necessária, no entanto, a utilização de diferentes sistemas isoenzimáticos.

Também com a utilização de padrões isoenzimáticos ALMEIDA & FIGUEIREDO-RIBEIRO (1986) observaram diferenças entre duas variedades botânicas de *Ocimum nudicaule* Benth. Os dados gerados confirmaram a existência das duas variedades, conforme havia proposto anteriormente através de caracterização química e morfológica, ou seja, var. anisifolia e var. nudicaule.

TEIXEIRA et al. (2004), também consideraram valiosos os estudos de caracterização de camu-camu, *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh-Myrtaceae, com dois sistemas enzimáticos (esterase e esterase-D).

SOUZA (2004) observou a diferenciação de três espécies de camomila: *Anthemis nobilis* L., *Matricaria chamomila* e *Matricaria recutita* L. utilizando sete padrões isoenzimáticos. Bem como, diferentes sistemas enzimáticos permitiram estabelecer padrões individuais em todos os acessos de *Polygonum* (erva-de-bicho), analisados por LOPES et al. (2003).

Assim, as isoenzimas tem sido de grande importância, auxiliando na identificação quimiotaxonômica de espécies, principalmente as medicinais.

#### Efeito do genótipo no estabelecimento *in vitro* de *Plantago* sp.

Para a variável altura de explante houve diferença estatisticamente significativa na interação entre dose utilizada e espécie e na interação espécie e tempo de cultivo *in vitro* ( $p < 0,01$ ). Através dos dados da Tabela 3 podemos analisar o efeito das diferentes concentrações de BAP utilizadas e as respostas dos explantes das espécies de tansagem quanto à altura de explante, onde para as três espécies o meio MS suplementado com  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP foi qualitativamente o melhor meio, porém não diferindo para *P. australis* Lam. do meio MS sem BAP, para *P. major* L. não diferiu estatisticamente do meio suplementado com  $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP e para *P. brasiliensis* Sims. não houve diferença entre os meios testados.

Resultados obtidos para a planta medicinal *Parthenium argentatum* Gray, (LOPES & TEIXEIRA, 2003) e para *A. nobilis* (BOSENBECKER, 2001) utilizando diferentes concentrações de BAP, sugerem que doses mais baixas deste regulador propiciaram maior altura de brotações, todavia neste trabalho com tansagem ficou evidenciado que essa resposta é espécie-específica.

Tabela 3. Efeito de diferentes concentrações de BAP sobre a altura (cm) e número médio de folhas produzidas por três espécies de tansagem *in vitro*.

BAP ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	Altura (cm)			Nº médio de folhas		
	<i>P. australis</i>	<i>P. major</i>	<i>P. brasiliensis</i>	<i>P. australis</i>	<i>P. major</i>	<i>P. brasiliensis</i>
0	3,39 aA	1,79 bcB	1,22 aB	1,69 aB	1,56 aB	8,69 aA
0,1	2,36 bA	1,26 cB	0,96 aB	1,75 aB	0,69 aB	5,25 bcA
0,2	3,86 aA	2,79 aB	1,41 aC	2,12 aB	1,57 aB	6,31 bA
0,3	2,57 bA	2,42 abA	1,21 aB	3,00 aA	0,69 aB	4,56 cA

Médias seguidas de letras distintas minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas diferem respectivamente entre si ao nível de 1% e 5% de significância pelo teste de Duncan.

Em capim elefante o uso de BAP teve efeito significativo sobre caráter altura das brotações, mostrando redução gradativa com a incorporação de doses crescentes de BAP no meio (KARASAWA, 2002), resultados diferentes dos obtidos neste trabalho, pois o aumento da concentração parece não ter um resultado efetivo no aumento de altura dos explantes.

Quando comparadas as três espécies no mesmo meio de cultivo quanto a altura da planta, podemos observar que *P. australis* foi melhor que as outras duas espécies em quase todas as concentrações de BAP testadas não diferindo apenas de *P. major* no meio contendo 0,3 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Este dado evidencia o efeito do genótipo, pois podemos visualizar no dendrograma apresentado na fig. 2 que estas *P. australis* é mais afastada geneticamente das outras duas espécies. Estas respostas diferenciadas entre genótipos foram relatadas por vários autores para diferentes espécies (LLORENTE E APÓSTOLO, 1998; VILA *et al.*, 2004; GEORGE, 2004; BHATIA *et al.*, 2005).

Podemos observar analisando a tabela 3 que houve diferença estatística na interação entre concentração de BAP e genótipos ( $p < 0,05$ ) bem como dentro do mesmo genótipo ( $p < 0,01$ ) quando avaliada o número médio de folhas por explante. Entre os diferentes genótipos a espécie *P. brasiliensis* foi a que produziu maior número de folhas diferindo das demais na maioria dos meios testados excetuando *P. australis* no meio com 3 mg.L<sup>-1</sup> de

BAP. Podemos observar também que o aumento da concentração de BAP no meio reduziu o número de folhas produzidas pela espécie *P. brasiliensis* diferindo das outras espécies.

Resultados obtidos para outras espécies medicinais (KADOTA *et al.*, 2001) indicaram que o meio MS sem reguladores de crescimento permitiu uma maior produção de massa fresca, resultados semelhantes aos demonstrados neste experimento para *P. brasiliensis* e *P. major*, onde podemos observar maior número de folhas no meio sem BAP indicando provavelmente maior massa fresca, pois não houve variação qualitativa no tamanho das folhas.

Não houve produção de brotos em nenhum dos meios utilizados, alguns autores relatam que o uso de BAP é essencial para a indução de brotações em macieira, porém nas concentrações utilizadas não houve formação de brotações nas três espécies de tansagem avaliadas (DUNSTAN *et al.*, 1985; PASQUAL & ISHIDA, 1992).

Quanto ao tempo de cultivo *in vitro*, não se observou diferença estatística entre as respostas das três espécies com relação ao número de folhas produzidas. Entretanto, para a variável analisada altura de explante, houve diferença estatística significativa ( $p < 0,01$ ) entre as espécies avaliadas (Tab. 4). Porém, como esperado, observou-se para ambas as variáveis um aumento progressivo dos sete até os 28 dias de avaliação.

**Tabela 4.** Comparação das três espécies de tansagem quanto à altura atingida pelo explante *in vitro* durante o período de avaliação.

Tempo	Altura (cm)		
	<i>P. australis</i> Lam.	<i>P. major</i> L.	<i>P. brasiliensis</i> Sims
7	0,59 c A	0,45 c A	0,59 b A
14	2,49 b A	1,36 b B	1,24 ab B
21	4,23 a A	2,90 a B	1,41 a C
28	4,86 a A	3,57 a B	1,56 a C

Médias seguidas de letras distintas minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas diferem entre si ao nível de 1% de significância pelo teste de Duncan.

Podemos visualizar na tabela 4 o efeito do genótipo em relação a altura de plantas *in vitro* conforme o tempo em cultivo, a resposta de *P. australis* foi maior que as outras duas espécies a partir de 15 dias em cultivo, sendo que *P. brasiliensis* e *P. major* mostram estas diferenças entre si a partir da avaliação aos 21 dias. Respostas genótipo específicas são descritas por vários autores, onde LLORENTE E APÓSTOLO (1998) recomendam a necessidade de otimização individualizada de meios de propagação *in vitro* para cada genótipo testado.

## CONCLUSÃO

O polimorfismo isoenzimático de GOT (glutamato oxaloacetato transaminase) e 6-PGD (6-fosfoglutamato desidrogenase) evidenciam a variabilidade genética entre *P. australis* Lam., *P. major* L. e *P. brasiliensis*.

Houve efeito do genótipo na resposta das três espécies estudadas ao meio de cultura e as concentrações de BAP utilizadas.

## AGRADECIMENTO

Os funcionários do Laboratório de Marcadores Moleculares da Embrapa Clima Temperado-CPACT, Pelotas/RS.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS A.C., PETERS I., BRUCE, W. PASSADOR, G.C. 1998. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos.** Viçosa. UFV. 574p.

ALMEIDA, V.P.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. 1986. Análise enzimática e quimiotaxonomia de duas variedades de *Ocimum nucicaule* Benth. (Labiata). **Revista Brasileira de Botânica.** Vol. 9(1).

AYALA, F.J.; POWELL, J.R.; TRACEY, M.L.; MOURÃO, C.A.; PÉREZ-SALAS, S. 1972. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. IV genic variation in natural populations of *Drosophila willistoni*. **Genetics**, Madison. Vol.70. p.113-139

BHATIA, P., ASHWATH, N., MIDMORE, D. J. 2005. Effects of genotype, explant orientation, and wounding on shoot regeneration in tomato. **In Vitro Cell Development Biology - Plant**, vol. 41, pp. 457-464,

BOSENBECKER, V. K. 2001. Efeito dos reguladores de crescimento na micropropagação e organogênese em camomila romana (*Anthemis nobilis* L.). **Dissertação de Mestrado em Fisiologia Vegetal**, UFPel, Pelotas.. 98f.

CALDAS, L.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. 1998. Meios nutritivos In: **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas.** TORRES, A.C. et al. (eds). Brasília: Embrapa, Vol. II, p. 87-132.

CRISCI, J.V.; ARMENGOL, M.F.L. 1983. **Introducción a la teoria y practica de la taxonomia numérica.** Washington. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, p. 132.

DUNSTAN, D.I.; TURNER, K.E.; LAZAROFF, W.R. 1985. Propagation in vitro of apple rootstock M.4: effect of phytohormones on shoot quality. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.4, p.55-60.

FRANÇA; A. 2003. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento** / organizado por Cláudia Maria de Oliveira Simões...[et al.]. – 5.ed. ver. ampl.- Porto Alegre/Florianópolis : Editora UFRGS / Editora da UFSC, p. 125

GAMBORG, O. L. 1968. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. **Exp. Cell. Res.**, v. 50, p. 151-158.

GEORGE, M. W. 2004. Micropropagation of *Lewisia cotyledon* using Axillary Buds from Flower Peduncles. **Native Plants Journal** ,v.5, n. 1, Spring, p. 75-80.

KADOTA, M., IMIZU, K.; HIRANO, T. 2001. Double-phase in vitro culture using sorbitol increases shoot proliferation and reduces hyperhydricity in Japanese pear. **Scientia Horticulture**, v. 89, p. 271-215.

KARASAWA, M.M.G.; PINTO, J.E.B.P; PINTO, J.C.; PEREIRA, A.V. 2002. Proliferação De Capim-Elefante Em Diferentes Concentrações De Regulador De Crescimento E Consistências Do Meio De Cultura. **Ciênc. agrotec.**, Lavras. V.26, n.6, p.1243-1251, nov./dez..

LANGE, O. 2001. Caracterização isoenzimática de oito espécies do Gênero *Trifolium* L., ocorrentes no Rio Grande do SUL. **Dissertação de mestrado.** UFRGS. Porto Alegre.

LLORENTE, B. E.; APOSTOLO, N. M. 1998. Effect of different growth regulators and genotype on in vitro propagation of jojoba, **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 26, p. 55-62.

LOPES, G. E. M.; TEIXEIRA, S. L. 2003. Multiplicação *in vitro* de Guayule (*Parthenium argentatum* Gray). **IX Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal.** Atibaia/SP. v 15.

LOPES, R.C.; CASALI, V.W.D.; BARBOSA, L.C.A.; CECON, P.R. 2003. Caracterização isoenzimática de oito acessos de Erva-de-bicho. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 3, p. 433-437, julho-setembro.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. 2000. **Plantas Mediciniais.** Viçosa. Ed da UFV.

MENTZ, A.L.; BORDIGNON, S.A. de L. 2003. Nomenclatura botânica, classificação e identificação de plantas medicinais. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento** / organizado por Cláudia Maria de Oliveira Simões...[et al.]. – 5.ed. ver. ampl.- Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS / Editora da UFSC. p. 99.

MORÁN, R.M.; ROMERO, F.G.; BURCIAGA, G.L. 1998. Lipid- And Glucose Efficacy Of *Plantago psyllium* In Type II Diabetes . **Journal of diabetes and its complications.** Vol. 12, Issue 5, set p. 273-278.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plantarum**, Vol 15:. p. 473-479
- NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. 2003. Aspectos Genéticos e Moleculares da Produção Vegetal. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento** / organizado por Cláudia Maria de Oliveira Simões...[et al.]. – 5.ed. ver.ampl.- Porto Alegre/Florianópolis : Editora UFRGS / Editora da UFSC, p. 65
- PASQUAL, M.; ISHIDA, J.S. 1992. Efeito de reguladores de crescimento na proliferação in vitro de brotos do porta-enxerto de macieira MI-793. **Revista Ceres**, v.39, n.233, .584-590,
- ROHLF, F.J. 1992. **NTSYS- pc numerical taxonomy and multivariate anaysis system**. Versão 1.7. New York Exeter software. 236 p.
- ROUT, G. R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. 2000. In vitro manipulation and propagation of medicinal plants, **Biotechnology Advances**, v. 18, p.91-120.
- SCANDALIOS, J. G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. **Biochemical genetics**, New York, v. 3, p.37-79, 1969.
- SHIELDS, C. R.; ORTON, T. J.; STUBBER, C. W. 1983. An outline of general resource needs and procedures for the eletrophoretic separation of active enzymes from plant tissue. In: TANKSLEY, S. D. ORTON, T. J., eds. **Isozyme in plant genetics and breeding**. Amsterdam: Elsevier, Part A. p.443-68.
- SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STECHMANN, J. R. 1998. Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: UFRGS, 173p.
- SOUZA, J.A. 2004. Cultivo in vitro e caracterização isoenzimática de espécies de camomila. Pelotas. 48f. Dissertação de Mestrado (Fisiologia Vegetal), IB,UFPel,
- TEIXEIRA ,S.L.; TORRES, A.C., 1998. Organização de laboratório de cultura de tecidos de plantas. In: **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. TORRES, A.C. et al. (eds). Brasília: Embrapa, Vol. II, . p.71-86.
- TEIXEIRA, A. S.; CHAVES, L.DA S.; YUYAMA, K. 2004. Esterases no exame da estrutura populacional de Camu-camu (*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh-Myrtaceae), **Acta Amazonica**, Manaus, v. 34 (1) 89 – 96,
- TORRES, A.C.; TEIXEIRA, S.L.; POZZER, L. 1998. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus In: **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. TORRES, A.C. et al. (eds). Brasília: Embrapa, Vol. II, . p.133-146.
- VALLEJOS, C. E. 1983. Enzyme activity staining. In: TANKSLEY, S. D. ORTON, T. J., eds. **Isozyme in plant genetics and breeding**. Amsterdam: Elsevier, Part A. p.469-515.
- VILA, S.K.; REY, H.Y.;MROGINSKI, L. 2004. A Influence of genotype and explant source on indirect organogenesis by in vitro culture of leaves of *Melia azedarach* L. **BIOCELL**, Argentina, v. 28, n. 1, p. 35-41.
- ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. 1984. SANEST – Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores. Registrado na secretaria especial de informática sob nº 066060-categoria A. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas,