

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA E DA COMPOSIÇÃO
QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE POPULAÇÕES DE
Ocimum selloi BENTH.**

ROSELAINÉ FACANALI

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP - Câmpus
de Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia - Área de
Concentração em Horticultura.

BOTUCATU-SP
Janeiro – 2004

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA E DA COMPOSIÇÃO
QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE POPULAÇÕES DE
Ocimum selloi BENTH.**

ROSELAINÉ FACANALI

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Ortiz Mayo Marques

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos A. Colombo

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP - Câmpus
de Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia - Área de
Concentração em Horticultura.

BOTUCATU-SP
Janeiro – 2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E
TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO
UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

F137c Facanali, Roselaine, 1975-
Caracterização da diversidade genética e da composição química do óleo essencial de populações de *Ocimum selloi* Benth / Roselaine Facanali. -- Botucatu, [s.n.], 2004. xiii, 93 f. : il. color., tabs.

Dissertação(mestrado) -- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas.
Orientador: Marcia Ortiz Mayo Marques.
Co-orientador: Carlos Augusto Colombo.
Inclui bibliografia.

1. Óleo essencial. 2. Composição química. 3. Genética. 4. Plantas - Composição. I. Marques, Marcia Ortiz Mayo. II. Colombo, Carlos Augusto. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. IV. Título.

Palavras-chave: Alfavaquinha; Elixir paregórico.

*“Só uma coisa torna o sonho impossível.
O medo de realiza-lo.”*

(Paulo Coelho)

A Deus,

*Aquele que nunca vemos ou ouvimos, mas
Podemos senti-lo ao nosso lado,
Sempre nos guiando, nos mostrando a luz,
Nos dando força para seguir,
Nos enchendo de esperança,
Nos dando o dom da sabedoria,
nos mostrando que Obstáculos existem,
Por mais difícil que seja,
Mas que podemos vence-los.
Obrigado por mais esta etapa vencida!!!*

A meu grande Amor que Tanto Amo, Loriney C. Fuini,

“Que esteve sempre ao meu lado. Que nos momentos de solidão, foi minha presença, que nos momentos difíceis, foi à luz da minha vida. Você que quando tanto precisei, me deu a mão, e em cada lágrima de desespero, achando que acabaria desistindo, me incentivou a lutar e nunca desistir. Portanto, este momento feliz também é seu. Eu faria dele eterno, pois todo carinho, estímulo e amor foram às armas dessa vitória.”

Dedico.

Aos meus pais, Dourival e Marina, meus maiores exemplo de vida, por toda sua dedicação, compreensão e fé,

A meu irmão, Rodrigo e sua namorada Flávia. A minha irmã Débora, seu esposo Carlos, minhas sobrinhas Anne Caroline, Ana Luiza e Hayana pela confiança e incentivo,

A minha sogra Odete e meu sogro Lazaro e a minha cunhada Loreane pelo carinho,

Enfim a todas estas pessoas que tanto amo,

Ofereço.

Agradeço

*A Amiga e Orientadora,
Dra. Márcia Ortiz Mayo Marques,
Pela Confiança,
Apoio,
E incentivo,
Durante a realização deste trabalho,*

Meu Muito Obrigado !

AGRADECIMENTOS

- A Dra. Márcia Ortiz Mayo Marques, pela orientação e também pela dedicação, disponibilidade e apoio sincero, e mais propriamente, pela sua busca incansável do saber, do conhecer, atributos próprios de sua pessoa, que transformam esse trabalho numa fonte inigualável de aprendizados, contribuindo, e muito, para meu amadurecimento científico.
- Ao Dr. Carlos Augusto Colombo, do Centro de P&D de Recursos Genéticos Vegetais do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), pela co-orientação, sugestões e amizade, bem como pelo auxílio na caracterização molecular, na realização das análises e pela utilização de seu laboratório de Biologia Molecular.
- Ao Prof. Dr. Lin Chau Ming, do Departamento de Produção Vegetal – Horticultura da FCA/UNESP/Botucatu, pela amizade, pela disponibilidade em ajudar sempre, pela companhia e apoio nas viagens de coleta.
- Ao Dr. João Paulo Feijão Teixeira, do Centro de P&D de Recursos Genéticos Vegetais do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), pelas sugestões, pela disponibilidade, pelo apoio e amizade, e pelo auxílio na realização das análises estatísticas.
- Aos amigos do laboratório de Produtos Naturais, com os quais compartilhei cada etapa deste trabalho: Adalberto (“Beto”), Marilda, Solange, Regia, Cássia e Sueli.
- Aos amigos do laboratório de Genética Molecular: Paula, Rafaele, Marília, Mariana, Michele, Lara e Gustavo.

- As amigas Marelisa, Janice e ao amigo Adalberto (“Beto”), pela disponibilidade em ajudar sempre, pela companhia e apoio nas viagens de coleta.
- Aos funcionários do Departamento de Horticultura da FCA/UNESP/Botucatu, pela colaboração e atenção.
- A todos que por um ou vários momentos contribuíram para esta caminhada.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XII
1. RESUMO.....	1
2. SUMMARY.....	3
3. INTRODUÇÃO.....	5
3.1. Objetivos.....	8
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	9
4.1. O gênero <i>Ocimum</i> e a espécie <i>Ocimum selloi</i> Benth.....	11
4.2. Recursos genéticos de plantas medicinais.....	14
4.3. Marcadores moleculares – RAPD.....	19
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
5.1. Coleta do material vegetal.....	23
5.2. Caracterização molecular.....	28
5.2.1. Extração do DNA.....	28
5.2.2. Análise do DNA em gel de agarose.....	29
5.2.3. Polimorfismo de fragmentos de DNA amplificado ao acaso (RAPD).....	30
5.2.4. Análise da distância genética obtida por RAPD.....	31
5.3. Caracterização da composição química dos óleos essenciais.....	32
5.3.1. Extração dos óleos essenciais.....	32

5.3.2. Análise da composição química dos óleos essenciais.....	33
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
6.1. Caracterização do solo das regiões de coleta.....	34
6.2. Composição química dos óleos essenciais.....	36
6.3. Caracterização molecular – RAPD.....	54
6.4. Estudo da diversidade genética dentro e entre populações.....	64
6.5. Considerações finais.....	66
7. CONCLUSÕES.....	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
APÊNDICE.....	85

LISTA DE QUADROS

Quadro	Página
1 Análise dos solos coletados em Iporanga/SP, Adrianópolis/PR e Piquete/SP nas profundidades de 0 a 20 cm. Botucatu – SP, 2004.....	35
2 Análise de variância (% media) dos solos das três diferentes localidades analisados quimicamente. Botucatu – SP, 2004.....	35
3 Composição química (% proporcional relativa) do óleo essencial de 20 acessos de <i>Ocimum selloi</i> Benth., provenientes de Iporanga/SP. Botucatu – SP, 2004.....	37
4 Composição química (% proporcional relativa) do óleo essencial de 20 acessos de <i>Ocimum selloi</i> Benth., provenientes de Adrianópolis/PR. Botucatu – SP, 2004.....	39
5 Composição química (% proporcional relativa) do óleo essencial de 20 acessos de <i>Ocimum selloi</i> Benth., provenientes de Piquete/SP. Botucatu – SP, 2004.....	41
6 Análise de variância (% media) dos compostos majoritários do óleo essencial das três populações de <i>Ocimum selloi</i> Benth. Botucatu – SP, 2004.....	43

7	Compostos majoritários (% da proporção relativa) do óleo essencial de 20 acessos de <i>Ocimum selloi</i> Benth., provenientes de Iporanga/SP. Botucatu – SP, 2004.....	48
8	Compostos majoritários (% da proporção relativa) do óleo essencial de 20 acessos de <i>Ocimum selloi</i> Benth., provenientes de Adrianópolis/PR. Botucatu – SP, 2004.....	49
9	Compostos majoritários (% da proporção relativa) do óleo essencial de 20 acessos de <i>Ocimum selloi</i> Benth., provenientes de Piquete/SP. Botucatu – SP, 2004.....	50
10	Número total de bandas e de bandas polimórficas produzidas por diferentes <i>primers</i> em reações de RAPD para três populações de <i>Ocimum selloi</i> Benth. Botucatu – SP, 2004.....	55
11	Valores do índice de similaridade genética de <i>Dice</i> (máximo, mínimo e médio) encontrado dentro e entre comparações dos 60 acessos de <i>Ocimum selloi</i> Benth. provenientes de três diferentes regiões (Adrianópolis/PR, Iporanga/SP e Piquete/SP) baseados em 175 marcadores RAPD. Botucatu – SP, 2004.....	57
12	Matriz de similaridade genética (<i>Dice</i>) obtida a partir de 175 marcadores RAPD para os 60 acessos de <i>Ocimum selloi</i> Benth. provenientes de três localidades. Botucatu - SP, 2004.....	61
13	Diversidade genética entre e dentro de populações de <i>Ocimum selloi</i> Benth. calculada pelo Índice de Shannon (H_o). Botucatu – SP. 2004.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Mapa dos estados de São Paulo e Paraná indicando os locais de coleta dos acessos de <i>Ocimum selloi</i> Benth. Botucatu – SP, 2004.....	26
2	Fotos de acessos de <i>Ocimum selloi</i> Benth. Botucatu – SP, 2004.....	27
3	Análise de componentes principais (ACP) aplicados à composição química do óleo essencial para os onze componentes majoritários dos 60 acessos de <i>Ocimum selloi</i> Benth. Botucatu – SP, 2004.....	51
4	Círculo de correlação de variáveis (CPA) aplicados à composição química do óleo essencial para os onze componentes majoritários dos 60 acessos de <i>Ocimum selloi</i> Benth. Botucatu – SP, 2004.....	52
5	Análise de componentes principais (ACP) aplicados à composição química do óleo essencial para os onze componentes majoritários dos 60 acessos de <i>Ocimum selloi</i> Benth. e projeção das variáveis fornecidas pelo Círculo de Correlação de Variáveis (CPA). Botucatu – SP, 2004.....	53
6	Gel de agarose (1,2%) ilustrando amplificações de fragmentos RAPD de 60 genótipos de <i>Ocimum selloi</i> Benth. de três regiões de coleta, Iporanga/SP (A), Adrianópolis/PR (B) e Piquete/SP (C). Botucatu – SP, 2004.....	56

7	Representação gráfica da dispersão dos 60 acessos de <i>Ocimum selloi</i> Benth. definido pela análise de coordenadas principais (ACP) obtido a partir da matriz de similaridade genética de <i>Dice</i> calculada a partir de 175 marcadores RAPD. Botucatu – SP, 2004.....	62
8	Dendograma de similaridade entre os 60 acessos de <i>Ocimum selloi</i> Benth. obtido a partir da matriz de similaridade genética <i>Dice</i> calculada a partir de 175 marcadores RAPD e agrupados pelo método UPGMA. Botucatu – SP, 2004.....	63

1. RESUMO

Ocimum selloi Benth. é uma planta nativa da família Lamiaceae que ocorre nas regiões Sudeste e Sul do Brasil, sendo utilizada como antidiarréico, antiespasmódico e antiinflamatório. Apesar do potencial uso de *Ocimum selloi*, pouco se sabe sobre o ponto de vista de diversidade genética, perfil fitoquímico e aspectos agronômicos desta planta. O presente estudo teve por objetivo geral estudar a diversidade genética e química de três populações de *Ocimum selloi*. O material vegetal utilizado foi coletado na região de Iporanga e Piquete, estado de São Paulo, e em Adrianópolis, estado do Paraná. O estudo da diversidade populacional foi realizado pela análise de polimorfismo do DNA do tipo RAPD e a química através da análise da composição química dos óleos essenciais das folhas das populações naturais. Os óleos essenciais foram extraídos pela técnica de destilação por arraste a vapor e a análise da composição química por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas.

Os óleos essenciais dos acessos da população proveniente de Adrianópolis/PR apresentaram composição química média semelhante, apresentando como substâncias majoritárias: elimicina (36%), β -selineno (12%), β -copaen-4- α -ol (9,3%) e

trans-cariofileno (6%). Os acessos da população proveniente de Iporanga/SP, apresentaram composição heterogênea, compondo dois subgrupos: o primeiro representado pelas mesmas substâncias majoritárias dos acessos de Adrianópolis/PR, sendo elimicina (55%), β -selineno (8%), β -copaen-4- α -ol (4,8%) e trans-cariofileno (3%); e o segundo, correspondendo a 15% dos acessos, apresentando, além das substâncias anteriormente citadas, outras como metilchavicol (23%), trans-anetol (10%) e o metileugenol (9%). Os acessos da população provenientes de Piquete/SP, também apresentaram composição química semelhante entre os acessos, mas apresentando substâncias majoritárias diferentes das duas outras populações, tais como, germacreno D (26%), trans- β -bergamoteno (15%), biciclogermacreno (12%) e (E,E)- α -farneseno (3,84%).

A partir do marcador molecular RAPD foram produzidas um total de 175 bandas com vinte e dois *primers* utilizados; desse total, 132 bandas (76%) mostraram-se polimórficas para os acessos de *O. selloi* provenientes de Iporanga/SP, 131 bandas (75%) mostraram-se polimórficas para os acessos provenientes de Adrianópolis/PR e 87 bandas (49%) mostraram-se polimórficas para os acessos provenientes de Piquete/SP. As similaridades genéticas foram obtidas por meio do índice de *Dice*, com variação entre 0,33 e 1,00, revelando uma divergência genética significativa. A análise da estrutura genética nos acessos avaliados, a partir da análise de coordenadas principais, revelou a formação de grupos representados por acessos de um mesmo local, como por acessos de ambas localidades. Portanto, os resultados do estudo de diversidade genética, realizado através do emprego dos marcadores RAPD, revelaram uma forte estruturação genética, cujas informações associadas às de química dos óleos essenciais podem ser devidamente aproveitadas para orientar a utilização, conservação e o melhoramento genético da espécie.

THE GENETIC DIVERSITY CHARACTERIZATION AND THE CHEMICAL COMPOSITION OF THE ESSENTIAL OILS IN POPULATIONS OF *Ocimum selloi* BENTH. Botucatu, 2004. 93p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Horticultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: ROSELAINÉ FACANALI

Adviser: MARCIA ORTIZ MAYO MARQUES

Co-Adviser: CARLOS AUGUSTO COLOMBO

2. SUMMARY

Ocimum selloi Benth. is a native plant from Lamiaceae family that occurs in south and in southeast areas of Brazil. It is used as an antidiarrheal, antispasmodic and antiphlogistic in phytotherapy. Although the *Ocimum selloi* has potential value as medicinal plant, little is known of its genetic diversity, phytochemistry profile and cultivation. The main objective of this study was to evaluate the genetic diversity of three populations of *Ocimum selloi* and the chemical composition of essential oils of its leaves. Plants were collected in three regions of natural occurrence of the specie in Brazil: Iporanga and Piquete in São Paulo state and Adrianópolis in Paraná state. The genetic diversity of populations was determined by analyses of DNA polymorphism (RAPD type) and the chemical composition of leaves essential oils were determined too. The essential oils were extracted by steam distillation and the chemical composition was determined by a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer.

The essential oils of all plants from the Adrianópolis population showed similar chemical composition, having as main substances: elimicine (36%), β -selinene (12%), β -copaen-4- α -ol (9,3%) and trans-caryophyllene (6%). The population of *Ocimum selloi* from Iporanga/SP, showed heterogeneous composition, composing two groups: the first one formed by plants with the main substances: elimicine (55%), β -selinene (8%), β -copaen-4- α -ol (4,8%) and trans-caryophyllene (3%); and the second group, corresponding in 15%, showing the same substances and beyond others as methylchavicol (23%), trans-anisole (10%) and the methyleugenol (9%). The plants of population from Piquete/SP also presented similar chemical composition between itself, although the main substances were different of the other two populations: germacrene D (26%), trans- α -bergamotene (15%), bicyclogermacrene (12%) and (E,E)- α -farnesene (3,84%).

From the molecular marker (RAPD) were produced a total of 175 bands with 22 primers used; in these total, 132 bands (76%) showed polymorphisms for the *Ocimum selloi* accesses from Iporanga/SP, 131 bands (75%) showed polymorphisms for the accesses from Adrianópolis/PR and 87 bands (49%) showed polymorphisms for the accesses from Piquete/SP. The genetics similarities were verified by the *Dice* index with variation between 0,33 and 1,00, showing a significative genetic divergence. The analyses of the genetic structure in the accesses revealed two groups formed by the accesses of the same area, as well as the accesses of different localities. Therefore, the results of the genetic diversity study, realized through the use of RAPD markers, showed a strong genetic structuration. This information associated with the chemical composition of essential oils can be used to guide the utilization, conservation and genetic species improvement.

3. INTRODUÇÃO

Biodiversidade pode ser definida como a variedade e variabilidade existentes entre os organismos vivos e as complexidades ecológicas nas quais eles ocorrem. O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas, de um total estimado entre 350.000 a 550.000 (Nodari e Guerra, 1999), sendo que muitas destas apresentam atividade biológica (Brown *et al.*, 1989).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) estimam que aproximadamente 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam a medicina tradicional (popular) para atendimento primário de saúde, da qual a maior parte envolve o uso de extratos vegetais ou de seus princípios ativos (Ministério da Saúde, 2001).

A espécie *Ocimum selloi* Benth., planta da família Lamiaceae que ocorre nas regiões Sudeste e Sul (Schmidt, 1858, citado por Martins, 1998), é popularmente utilizada como antidiarréico, antiespasmódico e antiinflamatório, propriedades comprovadas por testes pré-clínicos por Vanderline *et al.* 1994).

É popularmente conhecida como elixir paregórico, nos Estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo e anis ou alfavaquinha em Minas Gerais. Assim como outras espécies do gênero, *O. selloi* é rica em óleos essenciais.

Os óleos essenciais constituem um dos mais importantes grupos de matérias primas para as indústrias de alimentos, farmacêutica, perfumaria e afins.

Os óleos essenciais produzidos pelas espécies pertencentes ao gênero *Ocimum* apresentam diversos componentes importantes responsáveis pelo seu aroma e atividade biológica, tais como: estragol ou metilchavicol (nematicida, inseticida e aromatizante), eugenol, metileugenol (hipoanalgésico, inseticida, fungicida), citral, linalol, geraniol, timol, cinamato de metila, farnesol, borneol, safrol, dentre outros, cuja demanda é muito grande para a fabricação de produtos farmacêuticos, alimentícios e de perfumaria (Gupta, 1994).

A análise da composição química dos óleos essenciais das inflorescências e caules com folhas dos acessos de *Ocimum selloi*, provenientes de Viçosa/MG e Tiradentes/MG, apresentaram como componente majoritário o estragol (metilchavicol) e metileugenol, respectivamente (Martins, 1998). Esses dados e a constatação de variações nas características morfológicas e bioquímicas dos dois acessos, através de estudos isoenzimáticos e da morfologia interna e externa, permitiu o estabelecimento de duas variedades taxonômicas para a espécie.

Por outro lado, Moraes *et al.* (2002), ao estudarem a composição química dos óleos essenciais das inflorescências (flores e sementes) e folhas de *Ocimum selloi*, coletadas em duas épocas do ano, oriundas de Botucatu/SP, observaram como componente majoritário, o trans-anetol, consistindo num outro quimiotipo para a espécie.

O uso de metabólitos secundários em taxonomia é bem reconhecido (Hegnauer, 1996; Gottlieb, 1982), podendo auxiliar na classificação taxonômica.

Mais recentemente, a utilização conjunta da química (quimiotaxomia ou quimiosistemática) e da bioquímica (sistemática ou taxonomia molecular) tem-se mostrado uma ferramenta complementar e eficiente em sistemática vegetal. Tais informações são úteis para programas de melhoramento genético de espécies de interesse econômico, incluindo as medicinais.

Em termos de melhoramento genético, o conhecimento da diversidade genética de uma espécie facilita a escolha de progenitores para os cruzamentos, os estudos de herança, a definição de estratégias adequadas de seleção, o mapeamento genético e a seleção assistida por marcadores. Todas as ações relacionadas com a conservação genética também dependem do conhecimento da diversidade genética, onde os marcadores moleculares são ferramentas importantes para sua caracterização e monitoramento (Nodari e Guerra, 1999).

A diversidade genética pode ser feita com o uso de marcadores genéticos. A caracterização genética com marcadores possibilita a estimativa de vários índices genéticos e conhecimento sobre a variabilidade genética entre e dentro de populações.

Apesar do potencial uso de *Ocimum selloi* como aromatizante e medicinal e dos estudos relatados acima, pouco se sabe do ponto de vista de diversidade genética, perfil fitoquímico e aspectos agronômicos desta espécie.

Dessa forma, a correlação dos estudos de marcadores moleculares e da composição químicos do óleo essencial de *Ocimum selloi* daria subsídios para a identificação e diferenciação taxonômica da espécie, informação imprescindível para minimizar equívocos

quanto ao seu uso medicinal, para o melhoramento genético e preservação da espécie, contribuindo assim para seu uso sustentável.

3.1. Objetivos:

O presente trabalho teve por objetivo geral estudar a diversidade genética e química de acessos de *Ocimum selloi* Benth. de populações naturais. Para tanto, teve por objetivos específicos:

- avaliar a composição química dos óleos essenciais de *Ocimum selloi* em acessos coletados em três populações naturais dos estados de São Paulo e Paraná;
- avaliar a diversidade genética de *Ocimum selloi*, por meio de marcadores RAPD, dos acessos coletados das três populações naturais;
- correlacionar as informações obtidas nos estudos genéticos e fitoquímicos a fim de auxiliar na taxonomia da espécie.

4. REVISÃO DE LITERATURA

Planta medicinal é toda espécie vegetal que contém em um ou mais de seus órgãos, substâncias, ou seja, princípios ativos, que possam ser usadas com propósitos terapêuticos ou que sejam precursoras de semi-síntese químico-farmacêutica. Os princípios ativos não se distribuem de maneira homogênea e podem estar concentrados nas raízes, rizomas, talos, caules, folhas, sementes ou flores e o teor varia de acordo com a idade da planta, época do ano, solo ou clima onde a planta vive (Mentz, 1996).

Os produtos naturais oriundos de plantas, como assim foram chamados inicialmente pelos fitoquímicos, são metabólitos secundários e até a década de 50 eram considerados substâncias sem nenhuma função para as mesmas (Saito e Lucchini, 1998). Estes metabólitos eram atribuídos a erros genéticos ou subprodutos não aproveitáveis do metabolismo primário (Alonso, 1997). Este conceito começou a mudar a partir de 1959, graças às pesquisas na área de fitoquímica e fisiologia vegetal e dos estudos da interação dos compostos químicos com microorganismos fitopatogênicos e insetos predadores (Alonso, 1997; Saito e Lucchini, 1998).

Hoje, sabe-se que os metabólitos secundários podem ter papel importante na defesa contra ataque de fungos, bactérias e insetos, ou podem conferir maior vantagem competitiva à espécie produtora, por impedir ou retardar a germinação de sementes de outras espécies de plantas, por favorecer a penetração em novos nichos ecológicos e, por possibilitar, de forma geral, os mecanismos de sobrevivência da espécie (Alonso, 1997).

Os metabólitos secundários são constituídos por uma mistura complexa de diversas classes de substâncias, como por exemplo, os fenilpropanóides, mono e sesquiterpenos, cujas classes constituem grande parte da composição química dos óleos essenciais.

Os terpenos são derivados da rota metabólica do ácido mevalônico e classificam-se, dentre outras, em monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos, apresentando estruturas de 10, 15 e 20 carbonos, respectivamente. Cada composto possui blocos de cinco carbono, denominados unidades de isoprenos. Os monoterpenos apresentam duas destas unidades, os sesquiterpenos três e os diterpenos quatro unidades. Os monoterpenos são muito voláteis, normalmente, predominam como componentes nos óleos essenciais, formando estruturas acíclicas, monocíclicas e bicíclicas. Os sesquiterpenos apresentam maior número de carbonos, entretanto, são menos voláteis. Os diterpenos ocorrem no óleo essencial de algumas plantas e são considerados de menor importância (Mann, 1994).

Os fenilpropenos ou fenilpropanóides são derivados da rota metabólica do ácido chiquímico, e apresentam estruturas formadas basicamente de um anel aromático, constituído por seis carbonos ligados a uma cadeia lateral com três carbonos, contendo uma dupla ligação, apresentando grupos funcionais com oxigênio (Mann, 1994).

Como metabólito secundário, o nível da produção dos óleos essenciais é controlado geneticamente; entretanto a quantidade e a concentração desses compostos pode ser influenciada, dentre outros, por fatores climáticos (temperatura, intensidade de luz, umidade, etc.), edáficos e sazonais (Harborne, 1977).

4.1. O gênero *Ocimum* e a espécie *Ocimum selloi* Benth.

O gênero *Ocimum* compreende cerca 64 espécies (Paton *et al.*, 1999), comumente encontradas em regiões tropicais e subtropicais, muitas das quais empregadas pela população como medicinais, na culinária e no controle de insetos. Suas espécies são todas ricas em óleos essenciais (Grayer *et al.*, 1996a) e caracterizam-se pela grande variabilidade morfológica e de quimiotipos.

De todas as espécies, o *Ocimum basilicum* L., conhecida como manjerição, é a espécie mais utilizada popularmente e de maior importância econômica, (Grayer, 1996a). Atribui-se ao estragol, um componente de seu óleo essencial, o aroma anisado desta espécie, sendo utilizado como flavorizante em alimentos e licores e na formulação de perfumes (Windholz, 1976). Este produto pode ainda ser facilmente convertido a anetol, um isômero de maior valor comercial (Craveiro *et al.*, 1981).

Estudos comprovaram que a plasticidade fenotípica é uma característica marcante da espécie *O. basilicum*. A composição do óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. é extremamente variável, sendo que em acessos dentro de um mesmo cultivar a composição pode não ser homogênea (Kamada *et al.*, 2000). As populações selvagens são

bastante distintas e ao longo dos anos, muitos quimiocultivares de aromas diferentes vêm sendo selecionados e melhorados por meio de cruzamentos entre cultivares e espécies relacionadas (Grayer *et al.*, 1996a; Grayer *et al.*, 1996b).

Estudos morfológicos, químicos e genéticos de doze acessos de *Ocimum gratissimum* foram conduzidos com o objetivo de avaliar a viabilidade do uso de óleos essenciais e flavonóides como marcadores taxonômicos e examinar a relação entre RAPDs e os marcadores químicos (Vieira *et al.*, 2001). Os acessos foram divididos em seis grupos (timol: α -copaeno, eugenol: espatulenol, timol: p-cimeno, eugenol: α -muruleno, eugenol:timol:espatulenol e geraniol) sendo idênticos aos grupos identificados nas observações morfológicas. As análises moleculares mostraram três grupos distintos geneticamente e altamente correlacionados com os constituintes voláteis.

Ocimum selloi Benth., é uma planta anual herbácea, pertencente à família Lamiaceae, que ocorre nas regiões Sudeste e Sul do Brasil (Schmidt, 1858 citado por Martins, 1996). Trata-se de uma espécie nativa do Brasil, pouco conhecida do ponto de vista químico e com potencial de uso medicinal, assim como produtora de óleo essencial.

A espécie *O. selloi* tem largo uso na medicina popular, sendo vulgarmente conhecida como elixir paregórico nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, como anis e alfavaquinha em Minas Gerais e atroveran em São Paulo. Estes termos populares estão relacionados às suas propriedades farmacológicas (por ter uso semelhante ao medicamento comercialmente conhecido como elixir paregórico), químicas (anis, pela semelhança de odor com os aquênios de *Pimpinella anisum* ou *Foeniculum vulgare*, erva doce e funcho, respectivamente) e à semelhança com outras espécies do gênero *Ocimum* (Martins, 1998).

A composição química dos óleos essenciais das inflorescências e folhas de *Ocimum selloi*, cultivada na Estação Biológica da Universidade de Brasília, a partir de mudas provenientes de São Paulo (Morhy, 1973), apresentou como principais componentes o metilchavicol (51,1%) e trans-anetol (46,5%).

Martins (1998) realizou a caracterização isoenzimática, morfologia e a análise da composição química dos óleos essenciais das inflorescências e caules jovens com folhas de *O. selloi* oriundas de dois acessos diferentes (A e B) provenientes de Viçosa/MG e Tiradentes/MG, sendo estas submetidas às mesmas condições de cultivo. O autor comprovou ser o estragol (metilchavicol) o principal componente do óleo essencial do acesso A (81,81%: inflorescência.; 80,70%: caule+folha) e o metileugenol no acesso B (63,00% e 63,08%), notando-se a ausência do estragol neste último acesso. No óleo essencial do acesso A, foi detectada a presença de metileugenol, porém em pequenas concentrações (0,79% e 1,13%). Outros compostos foram identificados em ambos os acessos, sendo estes o bergamoteno, germacreno-B, *E*-ocimeno (presente apenas na inflorescência do acesso B), *E*-cariofileno, epóxido de bisaboleno (presente apenas na inflorescência do acesso B), α -humuleno, biciclosesquifelandreno, trans-cariofileno e β -bisaboleno. Três compostos sesquiterpênicos foram encontrados, porém, não identificados. As inflorescências continham maior conteúdo de óleo essencial, ao comparar-se com as folhas e caules jovens, assim como também foi observado uma maior concentração de óleo essencial no período da manhã. Além dessas diferenças na composição química, os autores observaram diferenças morfológicas e bioquímicas entre os acessos, estabelecendo duas variedades taxonômicas para a espécie.

Estudos realizados por Morais *et al.* (2002) com os óleos essenciais das inflorescências coletadas em junho 2000 e folhas coletadas em duas épocas do ano (junho

2000 e janeiro 2001), oriundas de Botucatu/SP, identificaram como componentes majoritários o trans-anetol (41,34%; 45,42 %; 58,59 %) e metilchavicol (27,10%; 24,14%; 29,96%). Foram identificados ainda, o cis-anetol (4,54%; 3,95%; 2,96%) e vários sesquiterpenos, sendo os mais abundantes o trans-cariofileno (3,47%; 1,83%; 0,80%), germacreno D (1,81%; 4,21%; 0,94) β -selineno (3,34%; 4,14%; 0,93%). Excluindo-se o trans-anetol e metilchavicol, observou-se diferença na proporção relativa das substâncias nos óleos essenciais das folhas em função da sazonalidade, sendo menor para a coleta efetuada no mês de janeiro de 2001.

4.2. Recursos genéticos de plantas medicinais

Segundo estimativa da Organização Mundial da Saúde, 80% da população mundial utiliza, principalmente, a medicina tradicional (popular) para suprir as necessidades de assistência médica primária. Esse valor indica que cerca de 3,5 a 4 bilhões de pessoas no mundo são dependentes de plantas para cura de doenças (Elisabetsky, 1987 e Vieira, 1993).

O Brasil possui a mais diversificada flora do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas, de um total estimado entre 350.000 a 550.000 (Nodari e Guerra, 1999). Além da grande extensão territorial, tal fato está relacionado com a existência de uma grande quantidade de diferentes situações climáticas, geomorfológicas e de solos, o que resulta na grande variedade de tipos vegetacionais. Essa diversidade não pode ser desprezada (Scheffer *et al.*, 1999). No entanto, o desconhecimento dos valores reais dessa

biodiversidade tem constituído sério obstáculo para que os tomadores de decisão reconheçam a necessidade de introduzir estratégias de conservação dos recursos biológicos nos planos nacionais de desenvolvimento (Heck, 1996).

Nesse sentido, Pereira (1998) ressalta que existe uma preocupação crescente com respeito à conservação de plantas medicinais. O autor afirma que, estas plantas têm sido multiplicadas ao longo do tempo sem domesticação e que conseqüentemente, não foram selecionadas visando à preservação de genes responsáveis por alta produtividade. Populações selvagens dessas plantas constituem, portanto, uma grande fonte de recursos genéticos.

O Brasil, diante de sua rica diversidade, assume extrema responsabilidade na manutenção dessas espécies quando se depara com a extração das plantas medicinais, que através de métodos atualmente desenvolvidos pelos extratores, configura fato potencialmente comprometedor da manutenção da população da flora nativa (Heck, 1996). Além disso, autores como Gottlieb & Mors (1980) alertam para o descompasso entre a velocidade de trabalhos científicos com plantas em relação ao desmatamento das florestas tropicais, onde se encontra a maioria das espécies vegetais do planeta. Os autores ressaltam ainda que, mais da metade das espécies encontradas nestas regiões não são conhecidas do ponto de vista científico, e muito pouco se sabe sobre a fitoquímica de mais de 99% das espécies da flora brasileira.

Os recursos genéticos de plantas medicinais têm importância estratégica no cenário da pesquisa brasileira, pois as graves deficiências do sistema de saúde oficial e a baixa renda da população, associados aos conhecimentos acumulados pelas comunidades locais, faz com que parte da população utilize as plantas medicinais como

recurso terapêutico (Scheffer *et al.*, 1999). Cabe, portanto, às instituições de pesquisa, incrementarem os estudos que visem a proteção e a utilização dos recursos genéticos destas espécies em perigo de extinção, por meio de sua coleta, conservação, multiplicação e avaliação da variabilidade existente.

Segundo Vieira (1994), as atividades com recursos genéticos de plantas medicinais iniciam-se com estudos etnobotânicos. Estes estudos identificam nas comunidades, espécies empregadas para o tratamento e a cura de enfermidades. Baseado nestes dados parte-se para estudos químicos e farmacológicos que determinarão as espécies prioritárias para pesquisa e que justifiquem a sua conservação e uso.

Os métodos de conservação de germoplasma vegetal utilizam duas estratégias, isto é, conservação “in situ” e a “ex situ”. Em ambas modalidades a conservação busca o enriquecimento e/ou manutenção da variabilidade genética de espécies para utilização em benefício do desenvolvimento sustentado. Na conservação “in situ” as populações são mantidas em área natural nas chamadas reservas genéticas, as quais permitem a continuação do processo evolucionário da espécie, ficando a mesma sujeita a efeitos ambientais e à ação antrópica. Por outro lado, na conservação “ex situ” o germoplasma é coletado (sementes, estacas, órgãos subterrâneos, brotos) em seu habitat, em feiras, em pequenas propriedades e, essa amostra devidamente identificada pelos dados de passaporte e *voucher* de herbário devem representar aquela população original. O germoplasma neste caso é conservado em banco de germoplasma, coleções de campo, cultura de tecidos e criopreservação (Vieira, 1999).

Ainda segundo Vieira (1999), no Brasil, a conservação de germoplasma de plantas medicinais está focalizada em três pontos: estudos etnobotânicos, coleta e caracterização de germoplasma e conservação “in situ”.

Segundo Scheffer *et al.* (1999), não há nenhum relato de conservação de plantas medicinais “in situ”. Nas unidades de conservação oficiais que têm por objetivo preservar também espécies medicinais, não são realizados trabalhos sistemáticos de levantamentos de quais seriam estas espécies, estudos de sua variabilidade genética e características ecológicas, informações essas relevantes quando se pretende estabelecer um programa de conservação “in situ”.

Segundo Barros *et al.* (1999), além das variações morfológicas que comumente ocorrem nas espécies medicinais, também são verificadas variações químicas. A enorme diversidade de compostos de sua composição, produtos do metabolismo secundário das plantas, que incluem as substâncias ativas das plantas medicinais expressando diferentes propriedades sensoriais e farmacológicas, tem atraído equipes das mais diversas áreas com o objetivo de entender e documentar as variações encontradas dos produtos secundários das plantas. Esse entendimento passa também pelo estudo genético e de suas biossínteses, especialmente quando há o interesse na obtenção de variedades estáveis e uniformes através do melhoramento genético vegetal.

Segundo Franz, 1993 citado por Barros *et al.*, 1999, a variabilidade genética também se expressa nos compostos químicos, produtos da biossíntese das plantas, tanto interespecificamente quanto intraespecificamente. Espécies de marcante variabilidade morfológica como *Thymus vulgaris* e *Lippia alba* podem mostrar ampla variação química, assim como, espécies reconhecidamente estáveis morfológicamente, podem apresentar diferentes quimiotipos, como demonstrado para como *Chamomila recutita*. Assim, além da coleta e análise de materiais representativos, a avaliação da variabilidade química envolve estudos de três fatores de grande importância: variabilidade genética individual e

populacional, variabilidade morfológica e ontogenética e as diferentes respostas adaptativas ao meio ambiente.

Segundo Scheffer *et al.*, 1999 a variabilidade genética de plantas medicinais está intimamente relacionada com as variabilidades interespecíficas e intraespecíficas (inter-populações), em especial nas espécies nativas e é resultante da pressão ambiental nos diversos biomas produzindo características que são muito importantes nos trabalhos de recursos genéticos. Portanto, a variabilidade genética das plantas medicinais exige o estabelecimento de diferentes estratégias de manejo e conservação.

Essas diferenças ainda não estão suficientemente estudadas pela Ciência, principalmente quando em nível intraespecífico. A evolução dos estudos botânicos e genéticos, onde são envolvidos estudos fitoquímicos, moleculares e ambientais, tem resultado na proposição de alguns re-enquadramentos taxonômicos. O caso da erva-cidreira brasileira, *Lippia alba*, é um exemplo interessante. No estudo conduzido por Moldenke (1965) sobre variedades naturais, foram identificadas duas: var. *alba* e var. *globifera*. No Brasil, existem estudos que mostram a existência de quimiotipos, que possuem diferentes tipos de compostos nos óleos essenciais, associados a diferentes características morfológicas, anatômicas, de hábito e farmacológicas (Ming, 1992; Vale *et al.*, 1996; Borges dos Santos, 1998*).

Há também o caso da alfavaca-anisada ou atroveran, *Ocimum selloi*, cujos nomes populares indicam presença de metilchavicol na folhas, fato este comprovado em diversos acessos; porém há a ocorrência, no Paraná, de uma variedade onde a presença deste composto é muito pequena ou ausente, em verificação no campo (Scheffer *et al.*, 1999).

* BORGES DOS SANTOS, M.M.F. Comunicação Pessoal, Botucatu, 1998.

A variabilidade genética se constitui na fonte primária dos estudos genéticos e sem ela não seria possível ocorrer adaptações e evolução nas espécies, bem como melhoramento genético, pois em padrão único não tem o que selecionar. Portanto, o sucesso de qualquer programa de melhoramento depende, fundamentalmente, da variabilidade genética existente (Oliveira *et al.*, 1999) e do aprofundamento dos estudos como recursos genéticos, que constitui a fonte de variabilidade.

4.3. Marcadores moleculares - RAPD

Segundo Kercher & Conner (1996) e Moraes *et al.* (2002), estudos realizados com aloenzimas em populações naturais de plantas têm revelado a existência de níveis consideráveis de variação entre as mesmas. Entretanto, com a introdução de técnicas de biologia molecular no início da década de 80, estudos de identificação e caracterização genética vêm sendo realizados com maior segurança, rapidez e eficácia. Estas oferecem a possibilidade de identificar diferentes genótipos entre os indivíduos ao invés de apenas caracterizar fenotipicamente o que pode mudar com o ambiente. Segundo Bered *et al.* (1997), a utilização de marcadores moleculares possibilita a avaliação da variabilidade genética existente dentro e entre espécies.

Os marcadores moleculares foram recentemente introduzidos nas análises genéticas de plantas e vêm sendo apontado como importante recurso de apoio a programas de conservação e exploração de germoplasmas, pois além de permitir a avaliação da variabilidade genética, permite também a localização de regiões de genes economicamente

desejáveis, bem como a detecção de acessos duplicados existentes no material conservado em coleções de germoplasma (Kochert *et al.*, 1991; Halward *et al.*, 1992; Harvey & Fraleigh, 1995). Além disso, fornecem dados sobre as relações de afinidade dentre e entre as amostras armazenadas, auxiliando na obtenção de genótipos melhorados a partir de cruzamentos e da introgressão genética (Harvey & Fraleigh, 1995).

Os marcadores RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”) são fragmentos discretos de DNA, amplificados pela reação de polimerização em cadeia (PCR – “Polymerase Chain Reaction”) (Williams *et al.*, 1990). PCR é uma técnica poderosa usada para amplificar pequenas seqüências específicas de nucleotídeos em quantidades acessíveis à análise, a partir de ínfima presença da enzima DNA polimerase e de *primers* específicos ou não. Tais *primers* delimitam a seqüência de DNA de fita dupla a ser amplificado, cujos resultados são milhões de cópias idênticas (Mullis & Faloona, 1987; White *et al.*, 1989).

Os marcadores do tipo RAPD são herdáveis e de caráter dominante, em sua maioria. Os polimorfismos resultam de mudanças na molécula de DNA a partir de alterações de uma única base, causadas por mutações de ponto, deleções ou inserções, que alteram os sítios de ligações do *primer*, diminuindo ou aumentando a distância entre eles. Essas mudanças podem alterar o comprimento do fragmento compreendido entre dois sítios ou mesmo impedir que a amplificação ocorra. Os polimorfismos geralmente são reconhecidos pela presença de um fragmento amplificado em um dos genótipos em relação à ausência deste mesmo fragmento em outro genótipo. A reação de amplificação é repetida com vários *primers* diferentes em condições que resultem na produção de várias bandas para cada *primer*. Um único *primer* pode identificar várias marcas, cada uma representando um loco (Williams *et al.*, 1990).

O principal inconveniente dos marcadores RAPD reside no fato de tratar-se de marcadores dominantes que não mostram o estado heterozigoto, ou seja, os indivíduos contendo duas cópias de um alelo não são distinguíveis daqueles que contêm somente uma cópia do alelo (Williams *et al.*, 1990). Outro problema potencial levantado por Penner *et al.* (1993) e Ferreira & Grattapaglia (1998) é a reprodutividade da técnica, dada à impossibilidade de padronização das condições de amplificação.

No entanto Williams *et al.* (1990) relatam que a grande vantagem da técnica de marcadores RAPD está na sua capacidade de detectar polimorfismo de modo simples e rápido, permitindo assim que possam ser usados como fingerprinting, distinguindo divergências mínimas entre espécies ou clones ou dentre destes. Além disso, os RAPDs são muito eficientes em identificar marcadores mais proximamente ligados, assim como podem mapear regiões constituídas por seqüências repetitivas.

Análise dos marcadores RAPD tem fornecido informações sobre a variabilidade genética de populações, níveis de similaridade entre e dentro das mesmas, permitindo que se façam inferências sobre a proximidade entre populações naturais e as mantidas em instituições como fonte de germoplasma (Gunter *et al.*, 1996).

Atualmente, tem aumentado o interesse pelos marcadores RAPD na análise da variabilidade de populações (Charlmers *et al.*, 1992; Chong *et al.*, 1994; Haig *et al.*, 1994; Crochemore *et al.*, 1996; Ciampi, 2001). Em estudos com plantas medicinais destacam-se os de Gauer e Cavalli-Molina (2000), com erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil, Aquilifoliaceae), Bittencourt (2000) com espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss, Celastraceae), Ciampi (2001) com jatobá (*Hymnaea* spp., Leguminosae), Mendes (2001) com *Lippia alba* e Vieira (2001) com *Ocimum gratissimum*.

Ciampi (2001) desenvolveu estudos com jatobá (*Hymnaea* spp., Leguminosae) de três diferentes biomas: cerrado, mata atlântica e floresta amazônica. A análise de similaridade genética agrupou os indivíduos em três grupos distintos de acordo com os diferentes biomas. A análise de variância nesse caso mostrou que a maior parte (54%) da variabilidade está dentro dos biomas, embora exista também significativa variabilidade entre os biomas (46%).

O trabalho realizado por Gauer e Cavalli-Molina (2000) com quatro populações de *Ilex paraguariensis* coletadas no Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, mostrou baixa variabilidade intrapopulacional e baixa divergência entre populações.

Em outro estudo Vieira *et al.* 2001, através dos estudos morfológicos, químicos e genéticos de doze acessos de *Ocimum gratissimum*, verificou que entre os 18 primers testados, seis geraram 32 fragmentos polimórficos nos três quimiotipos comparados (timol, eugenol e geraniol) mostrando que os três grupos eram distintos geneticamente.

Mendes (2001), em estudos de caracterização morfo-anatômica, molecular e fitoquímica de 8 formas de *Lippia alba* provenientes de diferentes locais do Brasil, obteve concordância entre a caracterização molecular e fitoquímica na separação das oito formas, revelando uma forte estruturação genética e mostrando-se o uso de RAPD ser uma ferramenta adequada para caracterizar a espécie.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Coleta do material vegetal

O material vegetal utilizado para este estudo foi coletado na região de Iporanga e Piquete, estado de São Paulo e em Adrianópolis, estado do Paraná, (Figuras 1 e 2), localizadas em unidades de conservação. A vegetação nas regiões de Iporanga/SP, Adrianópolis/PR e Piquete/SP são de mata Atlântica úmida.

O município de Iporanga/SP está localizado na região do alto do rio Ribeira dentro do Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (PETAR), situada nas coordenadas de 24°35'08" S e 48°35'35" WO. Possui vegetação característica de Mata Atlântica (Floresta Latifoliada Úmida de Encosta), abrigando formações vegetais diferenciadas, de acordo com fatores climáticos, características dos relevos existentes, além do próprio histórico de ocupação humana. As porções mais preservadas da mata são encontradas nas serras e locais mais acidentados. Já nas partes mais baixas predominam as vegetações secundárias e as atividades agrícolas remanescentes (população local). Apresenta clima de tipo

subtropical úmido, com temperatura média anual de 20° C e precipitação anual na faixa de 1.600 mm (áreas mais baixas) e 2.000 mm (áreas mais altas). Os períodos menos chuvosos são de abril a julho e os meses de outubro e novembro.

A região de Piquete/SP está localizada no Vale do Paraíba, vale médio do rio Paraíba do Sul. Está assentado nas encostas da serra da Mantiqueira e grande parte do seu território está dentro da Área de Preservação Ambiental (APA), situada nas coordenadas de 22°36'49" S e 45°10'34" WO. Possui vegetação característica de Floresta Atlântica, também conhecida por floresta latifoliada tropical úmida de encosta. Trata-se de uma vegetação densa exuberante, cuja existência está ligada ao relevo e à umidade. Possui altitude mínima de 658 metros e máxima de 2422 metros. A precipitação de chuvas está por volta de 1500 mm/ano.

Adrianópolis/PR é um município situado no Vale da Ribeira, localiza-se a Sudeste do Estado e pertence à Região Metropolitana de Curitiba, situada nas coordenadas de 24°39'26" S e 48°59'28" WO. Sua riqueza natural está no Parque Estadual das Lauráceas, possui um clima subtropical úmido mesotérmico, verões quentes com tendência de concentração das chuvas (temperatura média superior a 22° C), invernos com geadas pouco frequentes (temperatura média inferior a 18°C), sem estação seca definida (Conde, 1994).

Foram feitas no total três coletas, uma em cada região, sendo no período de setembro e outubro de 2002 (Iporanga/SP e Adrianópolis/PR) e julho de 2003 (Piquete/SP). Nas coletas foram levantadas informações de localização geográfica (altitude, latitude e longitude) através de GPS (Global Positioning System), cujos dados se encontram detalhados no Apêndice 1. O receptor portátil de sinal de satélite usado foi o GPS (Garmin Modelo Legendado 79728002) com unidade de recepção e antena embutida. O equipamento

sintoniza satélites simultaneamente com capacidade de medição instantânea em coordenadas geográficas (latitude/longitude e UTM).

Foram coletados 20 indivíduos adultos em cada área, correspondendo a um total de 60 acessos para as três localidades, sendo ainda esse número determinado pelo tamanho da população encontrada. Para cada ponto de coleta teve-se também o cuidado de coletar material de plantas não muito próximas.

Foram coletadas aproximadamente 10 folhas jovens de cada planta para a extração de DNA, que foram limpas com gaze úmida e acondicionadas em tubos plásticos do tipo Falcon (50 mL) com sílica gel, devidamente identificados e transportados ao laboratório. Amostras das partes aéreas das plantas também foram coletadas para o estudo da composição química dos óleos essenciais.

Foi coletado de cada região material botânico, de preferência plantas adultas em florescimento, para confecção de exsicatas que se encontram depositadas no herbário do Instituto Agrônomo de Campinas – IAC, cadastrados sob os números IAC 42.949, 42.948, 42.946, 42.945, 42.947, 42.944, 42.943, 42.942, 42.952, 42.951, 42.941 e 42.950 (acessos provenientes de Adrianópolis/PR) e os demais acessos (provenientes de Iporanga/SP e Piquete/SP) encontram-se em processo de cadastramento no herbário.

A caracterização quanto à fertilidade dos solos dos três locais de coleta foi realizada com base na análise química de amostras de solos. Essas amostras representam a camada de até 20 cm de profundidade e coletadas aleatoriamente como recomendado por Raij *et al.* (1997). As amostras foram conduzidas ao laboratório de Análises de Solo do Departamento de Ciências do Solo da FCA/UNESP – Botucatu para análises de micro e

macronutrientes, cujos resultados estão detalhados no Apêndice 2 e são apresentados de maneira resumida no Quadro 1 do item resultados e discussão.

Figura 1. Mapa dos estados de São Paulo e Paraná indicando os locais de coleta dos acessos de *Ocimum selloi* Benth. Botucatu – SP, 2004.

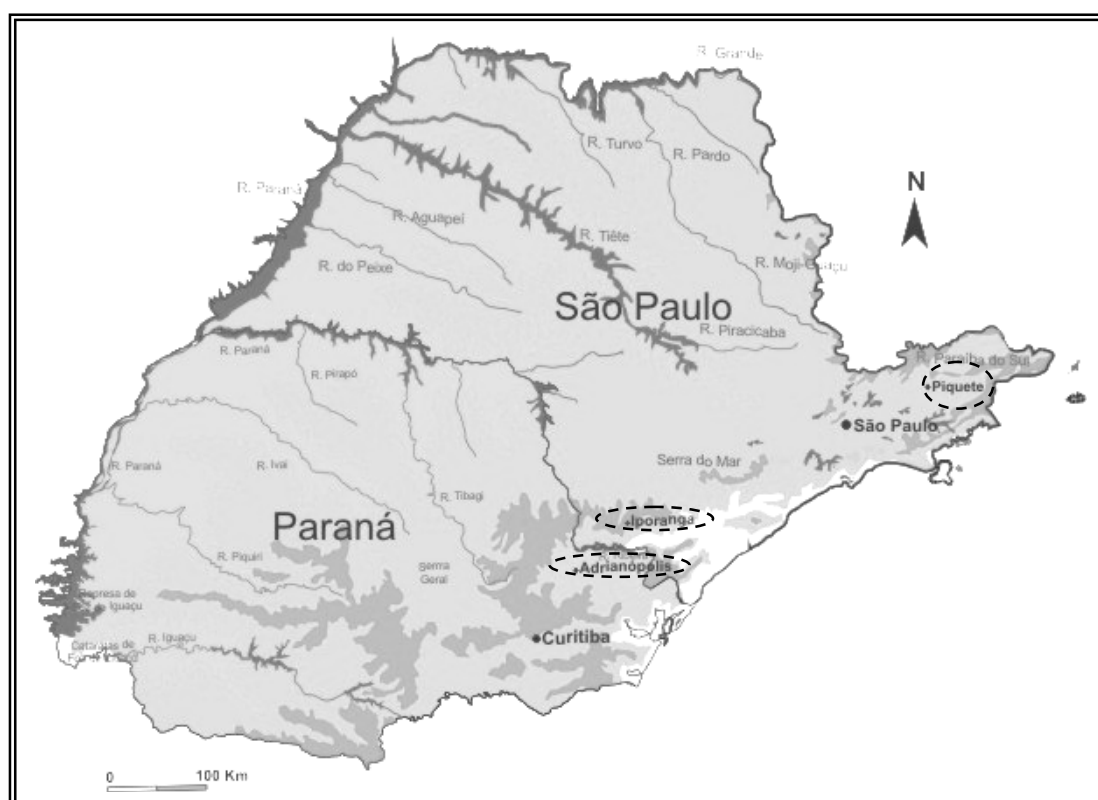




Figura 2. Acessos de *Ocimum selloi* Benth. Botucatu –SP, 2004.

5.2. Caracterização molecular

A caracterização molecular das três populações de *Ocimum selloi* foi conduzida no laboratório de Genética Molecular do Centro de P&D de Recursos Genéticos Vegetais do Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

5.2.1. Extração do DNA

Para a extração do DNA genômico, foram utilizadas folhas jovens saudáveis, para todos os acessos. As amostras dos tecidos coletados foram trituradas em almofariz de porcelana na presença de nitrogênio líquido (N₂) e acondicionadas em frascos de vidro âmbar e conservadas em freezer -80°C.

A extração foi feita segundo protocolo CIMMYT (Laboratory Protocols – CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory), com algumas modificações. Em um tubo de 2 mL, foi colocado 2 g de tecido moído; em seguida foi adicionado 800 µL de tampão de extração MATAB pré-aquecido, com 0,2% de mercaptoetanol. Durante uma hora, os tubos ficaram em banho-maria (65°C), sendo agitados de 15 em 15 minutos, e em seguida esfriados à temperatura ambiente. Adicionou-se a seguir, clorofórmio álcool isoamílico (24:1) até completar o volume do tubo, misturando-se suavemente por 5 minutos. Após centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi separado, e sobre este, adicionou-se novamente 1 mL de clorofórmio álcool isoamílico (24:1), misturando-se novamente por 5 minutos. Depois de nova centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos e

recuperação do sobrenadante para outro tubo, adicionou-se 0,8 mL volume de isopropanol para precipitação do DNA. Uma hora após a adição do isopropanol, fez-se nova centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos, retirando-se o álcool, e observando-se para que o *pellet* ficasse no fundo do tubo. Lavou-se com etanol 70% e deixou-se secar por uma hora à temperatura ambiente (com os tubos virados de cabeça para baixo em cima de um papel toalha) e em seguida o DNA foi redissolvido em 200 µl de tampão TE.

5.2.2. Análise do DNA em gel de agarose

Após a extração dos DNAs, foi feita a quantificação dos mesmos em gel de agarose. Aliquotas de 2 µL da suspensão final de DNA em TE acrescidos de 10% do volume de azul de bromofenol, foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% (feitas em cubas horizontais de acrílico, a temperatura ambiente, durante 1 hora, a 3 volts/cm). Em seguida o gel foi imerso em solução de brometo de etídio (10µg/µl) por 15 minutos, e a seguir lavado em água corrente para retirar o excesso de brometo de etídio no gel. A quantificação foi feita sob luz ultravioleta um transluminador do equipamento da PHARMACIA BIOTECH/ImageMaster VDS, condição em que o brometo de etídio fluoresce permitindo a distinção das bandas de DNA, e em seguida foi tirada fotografia com câmara digital FUJI FILM – Thermal Imaging System FTI-500.

5.2.3. Polimorfismo de fragmentos de DNA amplificado ao acaso (RAPD)

As reações para detecção do polimorfismo do DNA amplificado ao acaso foram realizadas pelo método de PCR (*polymerase chain reaction* – reação em cadeia da polimerase), utilizando-se 22 diferentes *primers* da Operon Technology: OPA18, OPAB03, OPAL09, OPB03, OPC08, OPF12, OPG05, OPH18, OPJ01, OPK11, OPK14, OPK15, OPL04, OPX01, OPX03, OPX04, OPX08, OPX17, OPX18, OPX20, OPY20 E OPZ09. As reações de PCR foram realizadas em um volume de 15 µl, sempre no mesmo termociclador modelo PT-100 do fabricante MJ Research, para evitar efeito de variação ambiental devido ao uso de diferentes aparelhos, conforme relato em literatura, e segundo as condições estabelecidas por Williams *et al.* (1990) e Welsh & McClelland (1990): uma desnaturação inicial do DNA a 96°C por 4 minutos; esta etapa foi seguida por 45 ciclos de amplificação: 94°C (1 min) – desnaturação; 35°C (1 min) – pareamento; 72°C (1,5 min) – extensão. Ao término dos 45 ciclos, seguiu-se um passo final de extensão (72°C – 7 min.). Para as reações foram utilizados tubos de polipropileno tipo *eppendorf* com capacidade para 0,2 mL.

O DNA amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,2% para separação dos fragmentos segundo seu peso molecular. A eletroforese foi feita em cubas horizontais de acrílico, a temperatura ambiente, por duas horas a 3 volts/cm. Como padrão de peso molecular das bandas, foi usado o marcador *ladder* de 250 pares de bases fornecidos pela GIBCO.

Após a eletroforese, os géis foram corados em solução de brometo de etídeo por cerca de 15 minutos, lavados em água destilada para remoção de excessos de brometo de etídeo (~10 minutos) e expostos à luz ultravioleta e fotografados com câmara digital FUJI FILM – Thermal Imaging System FTI-500.

5.2.4. Análise da distância genética obtida por RAPD

As bandas dos fragmentos amplificados ao acaso foram avaliadas como caracteres binários, por presença (1) e ausência (0). A partir desses dados, foi estimado o grau de similaridade genética entre os acessos dos três locais amostrados, utilizando-se os coeficientes de similaridade de *Dice*, calculado pelo programa NTSYS (*Numerical Taxonomy and Systematics*, versão 1.70; Rohlf, 1992). A partir da matriz de similaridade gerada foi empregado o método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method, Arithmetic Average*). Também foi realizada a Análise de Coordenadas Principais (ACP), a partir do método de Gower (1966).

A diversidade genética dentro e entre populações foi avaliada utilizando o “*Shannon – information index*”, conforme descrito por Ashburner *et al.*, (1997) e apresentada na expressão abaixo:

$$H = - \sum_{i=1}^k p_i \ln p_i, \text{ onde:}$$

H = diversidade de marcas RAPD na população;

k = número de marcas RAPD na população;

p_i = frequência da i -ésima marca RAPD na população.

A diversidade média de RAPD de todas as populações (H_{pop}) é a média de H_o , que é diversidade de marcas dentro de cada população. H_{tot} é a diversidade considerando todas as marcas da área em estudo. A relação H_{pop} / H_{tot} representa a proporção da diversidade encontra dentro das populações, e $[1 - (H_{pop} / H_{tot})]$ é a proporção da diversidade entre populações.

5.3. Caracterização da composição química dos óleos essenciais

A caracterização da composição química do óleo essencial dos materiais vegetais coletados foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais do Centro de P&D de Recursos Genéticos Vegetais do Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

5.3.1. Extração dos óleos essenciais

Após a coleta, as partes aéreas (folhas, caules e inflorescências) de *Ocimum selloi* foram armazenadas em sacos de papel e secas em estufa com circulação de ar e temperatura controlada de 40°C, por um período de 48h.

Os óleos essenciais foram extraídos por destilação por arraste a vapor em aparelho tipo Moritz, por um período de 1 hora e 30 minutos, e armazenados em frasco âmbar e mantidos no freezer até a análise da composição química.

5.3.2. Análise da composição química dos óleos essenciais

As análises da composição química dos óleos essenciais foram conduzidas em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (Shimadzu, QP-5000), operando a 70 eV, injetor split/splitless 1/30, dotado de coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), hélio como gás de arraste (1,7 mL/min), injetor a 240 $^{\circ}$ C, detector a 230 $^{\circ}$ C e o seguinte programa de temperatura: 50 $^{\circ}$ C (5 minutos) – 180 $^{\circ}$ C, 5 $^{\circ}$ C/min.; 180 $^{\circ}$ C - 280 $^{\circ}$ C, 10 $^{\circ}$ C/min. Os óleos essenciais foram diluídos em acetato de etila (P.A. Merck, lote K25488323 837; 0,05g de óleo/1mL de solvente) e injetado 1 μ L da solução.

A identificação dos constituintes químicos foi efetuada através da análise comparativa dos espectros de massas das substâncias com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist 62.lib) e literatura (McLafferty e Stauffer, 1989) e índice de retenção (Adams, 2001).

Os índices de retenção (IR) das substâncias foram obtidos pela co-injeção da amostra com uma série homologa de n-alcanos (C_9H_{20} - $C_{25}H_{52}$, Sigma – Aldrich, 99%), aplicando-se a equação de Van den Dool e Kratz (Van den Dool & Kratz, 1963).

Os resultados obtidos para cada acesso, das três populações, foram comparados entre si e submetidos à análise estatística pelo programa MINITABTM Statistical Software Release 13.0 Demo. Além disso, os dados referentes à composição química dos óleos essenciais dos acessos das três localidades, foram analisados em conjunto, utilizando-se os métodos multivariados da Análise de Componentes Principais (Sneath & Sokal, 1973), procurando-se agrupar os acessos de acordo com os graus de similaridade, para se verificar a capacidade discriminatória de cada componente no processo de formação dos agrupamentos.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Caracterização do solo das regiões de coleta

Os solos analisados quimicamente (Quadro 1) foram comparados e verificou-se que diferiram significativamente quanto a pH e teores de fósforo, magnésio, potássio e boro (Quadro 2).

Pelos dados apresentados no Quadro 2 e Apêndice 2 e avaliados à luz do Boletim 100 (Raij *et al.*, 1997) não há limitações de fertilidade nos solos amostrados, quanto ao teor de nutrientes. Embora algumas diferenças ocorram entre os solos, os teores encontrados para os principais nutrientes, de maneira geral, são considerados de teor alto. Apenas o pH do solo amostrado na região de Piquete, por ser baixo, (pH=4,6), pode causar indisponibilidade de nutrientes para as plantas (Crocomo *et al.*, 1965; Castro *et al.*, 1987; Malavolta, 1979).

Quadro 1. Análise dos solos coletados em Iporanga/SP, Adrianópolis/PR e Piquete/SP nas profundidades de 0 a 20 cm. Botucatu – SP, 2004.

Amostras	pH CaCl	M.O. g/dm ³	P resina mg/dm ³	H+Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	V%	Boro	Cobre	Ferro	Manganês	Zinco
					mmol/dm ³						mg/dm ³				
VR 1	5,7	30	9	18	0,8	70	7	78	96	81	0,23	1,7	80	15,3	4,8
VR 2	5,0	40	12	34	1,1	36	9	46	81	57	0,28	1,6	161	55,9	5,3
VR 3	4,6	40	10	52	1,5	21	4	26	79	34	0,23	4,1	129	166,6	2,9
VR 4	7,0	74	29	9	3,1	270	16	289	298	97	0,54	1,1	41	15,0	2,5
VR 5	6,3	49	13	18	1,3	75	24	100	118	85	0,45	2,7	42	56,1	5,0
ADR 1	4,9	42	15	34	4,9	29	24	58	92	63	0,21	2,4	162	68,2	8,6
ADR 2	5,6	53	89	31	2,9	88	60	151	182	83	0,25	6,9	344	36,7	7,6
ADR 3	5,4	49	53	26	4,4	61	30	95	122	78	0,20	4,0	202	59,8	6,4
ADR 4	5,1	29	47	26	2,3	37	15	54	80	67	0,16	2,8	126	44,0	15,6
ADR 5	5,5	20	14	16	3,3	23	18	45	61	73	0,12	1,9	98	34,3	5,2
PQ 1	4,7	30	9	34	3,9	15	4	23	57	40	0,50	2,3	210	15,5	6,4
PQ 2	4,8	24	5	36	3,0	15	9	27	63	43	0,44	1,3	84	10,0	3,5
PQ 3	4,9	66	14	42	5,7	43	11	60	102	59	0,61	1,5	177	17,8	8,0
PQ 4	4,2	23	6	58	1,5	15	3	20	78	26	0,41	1,0	102	8,8	9,9
PQ 5	4,4	39	14	47	3,9	18	5	27	74	36	0,52	1,7	231	11,1	6,1

Onde: VR – População de Iporanga/SP;

ADR – População de Adrianópolis/PR;

PQ – População de Piquete/SP;

M.O. – Matéria Orgânica;

SB – Soma de bases;

CTC – Capacidade de troca de cátion;

V% - Saturação por bases;

Quadro 2. Análise de variância (% media) dos solos das três diferentes localidades analisados quimicamente. Botucatu – SP, 2004.

Amstras	pH CaCl	M.O. g/dm ³	Presina mg/dm ³	H+Al	K	Ca	Mg	Boro	Cobre	Ferro	Manganês	Zinco
					mmol/dm ³			mg/dm ³				
VR	5,72a	46,6a	14,6b	26,2a	1,56b	94,4a	12,0b	0,346a	2,24a	90,6a	61,78a	4,1a
ADR	5,3a	38,6a	43,6a	26,6a	3,56a	47,6a	29,4a	0,188b	3,6a	186,4a	48,6a	8,68a
PQ	4,6b	36,4a	9,6b	43,4a	3,6a	21,2a	6,4b	0,496a	1,56a	160,8a	12,64a	6,78a

Onde: *Letras diferentes numa mesma linha mostram diferenças significativas com 95% de confiança;

VR – População de Iporanga/SP;

ADR – População de Adrianópolis/PR;

PQ – População de Piquete/SP;

M.O – Matéria Orgânica;

6.2. Composição química dos óleos essenciais

A composição química dos óleos essenciais de *Ocimum selloi* dos sessenta acessos das três diferentes localidades (Iporanga/SP, Adrianópolis/PR e Piquete/SP), estão apresentados nos Quadros 3,4 e 5.

Foi identificado, para cada local, um número variado de componentes do óleo essencial: acessos da população de Iporanga/SP – 17 componentes (98,8% do óleo essencial) (Quadro 3); acessos da população de Adrianópolis/PR – 17 componentes (94,8% do óleo essencial) (Quadro 4); e, acessos da população de Piquete/SP – 22 componentes (97% do óleo essencial) (Quadro 5).

A análise de variância (Quadro 6) dos compostos majoritários (acima de 5% da proporção relativa média) dos óleos essenciais mostrou efeito significativo em relação à localidade, na proporção relativa de trans-cariofileno, biciclogermacreno, elimicina e β -copaen-4- α -ol. Para os demais componentes dos óleos essenciais as populações de Adrianópolis/PR e Iporanga/SP não apresentaram diferenças significativas entre si. Porém, apresentaram diferenças significativas em relação à população de Piquete/SP.

Quadro 3. Composição Química (% proporcional relativa) do óleo essencial de 20 acessos de *Ocimum selloi* Benth., provenientes de Iporanga/SP. Botucatu - SP, 2004.

Componentes	Acessos											
	VR 1	VR 2	VR 3	VR 4	VR 5	VR 6	VR 7	VR 8	VR 9	VR 10	IK Calc.	IK Liter.
trans- β -ocimeno	tr	tr	nc	tr	nc	tr	tr	tr	tr	0,56	1046	1050
γ -terpineno	tr	tr	nc	tr	nc	tr	tr	tr	tr	0,46	1057	1062
metilchavicol	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	26,49	1197	1195
trans-anetol	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	12,90	1283	1283
α -copaeno	1,64	2,11	1,71	2,19	nc	1,71	1,6	1,91	3,07	2,07	1376	1376
β -bourboneno	1,02	tr	tr	1,34	nc	0,65	1,06	0,84	1,73	0,99	1385	1384
metileugenol	nc	tr	16,83	tr	nc	nc	nc	40,83	0,97	0,63	1403	1401
trans-cariofileno	2,56	0,99	2,70	1,21	nc	0,73	1,79	1,34	4,19	2,05	1419	1418
t- α -bergamoteno	2,56	1,67	2,03	0,96	nc	1,49	1,29	2,19	3,80	0,69	1436	1436
germacreno D	7,14	5,07	6,48	3,87	tr	3,19	7,70	5,63	16,52	5,40	1480	1481
β -selineno	1,06	17,04	10,53	8,22	11,07	12,23	13,32	3,04	2,38	6,62	1487	1485
biciclogermacreno	1,66	6,42	6,36	3,88	tr	3,80	6,65	2,53	4,64	4,12	1495	1494
(E,E)- α -farneseno	1,47	tr	1,85	0,78	nc	1,64	1,42	1,08	2,19	1,19	1508	1508
γ -cadineno	1,31	1,52	1,69	1,17	nc	0,90	1,38	1,26	3,58	1,86	1523	1524
elimicina	71,59	59,97	44,93	69,93	74,87	66,97	54,94	33,49	48,53	30,49	1560	1554
espatulenol	1,98	1,47	0,98	1,88	2,82	1,17	1,85	1,90	2,12	1,43	1578	1576
β -copaen-4- α -ol	6,00	3,74	3,28	3,93	5,66	3,53	3,57	2,92	4,58	2,05	1583	1584

Onde: VR – População de Iporanga/SP; tr – traços ($\leq 0,21$); nc – não consta; IK Calc. - Índice de Kovats calculado; IK Liter. - Índice de Kovats de literatura.

Componentes	Acessos													
	VR 11	VR 12	VR 13	VR 14	VR 15	VR 16	VR 17	VR 18	VR 19	VR 20	IK Calc.	IK Liter.		
trans-β-ocimeno	tr	tr	nc	nc	0,35	0,45	0,27	tr	0,43	tr	1046	1050		
γ-terpineno	tr	tr	nc	nc	0,45	tr	tr	tr	tr	tr	1057	1062		
metilchavicol	7,82	35,25	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	1197	1195		
trans-anetol	1,96	17,30	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	1283	1283		
α-copaeno	1,95	2,31	2,59	2,44	1,74	2,29	2,62	3,45	2,42	2,11	1376	1376		
β-bourboneno	1,07	0,85	0,54	0,92	0,74	0,97	1,86	2,74	1,36	1,26	1385	1384		
metileugenol	4,51	tr	nc	tr	nc	tr	0,22	nc	tr	0,44	1403	1401		
trans-cariofileno	1,31	2,60	0,59	4,02	3,26	3,51	4,94	4,37	5,32	4,55	1419	1418		
t-α-bergamoteno	0,74	0,68	0,22	1,64	tr	1,67	3,87	3,48	3,11	2,22	1436	1436		
germacreno D	3,12	7,34	2,00	6,63	5,64	5,42	9,73	8,92	8,50	8,43	1480	1481		
β-selineno	14,34	3,97	10,21	6,02	11,34	10,09	3,10	2,62	4,82	5,04	1487	1485		
biciclogermacreno	4,86	4,66	2,83	3,72	6,47	5,18	4,55	3,17	4,65	4,65	1495	1494		
(E,E)-α-farneseno	0,79	1,77	tr	1,06	1,13	1,51	2,83	1,77	2,48	2,36	1508	1508		
γ-cadineno	1,01	2,83	0,76	1,91	1,65	1,75	2,52	2,55	2,36	2,18	1523	1524		
elimicina	50,86	15,36	71,99	60,33	61,01	58,49	52,23	54,91	56,54	58,08	1560	1554		
espatulenol	2,13	1,78	2,06	2,28	1,40	2,47	2,40	2,57	2,02	2,09	1578	1576		
β-copaen-4-α-ol	3,62	2,28	5,91	9,03	3,95	5,62	5,60	8,28	5,69	5,67	1583	1584		

Quadro 4. Composição Química (% proporcional relativa) do óleo essencial de 20 acessos de *Ocimum selloi* Benth, proveniente de Adrianópolis/PR. Botucatu - SP, 2004.

Componentes	Acessos										IK Calc.	IK Liter.
	ADR1	ADR2	ADR3	ADR4	ADR5	ADR6	ADR8	ADR9	ADR10	ADR11		
trans- β -ocimeno	0,84	0,97	0,77	tr	tr	1,67	tr	0,15	nc	0,58	1046	1050
γ -terpineno	nc	tr	0,19	tr	tr	tr	tr	tr	nc	tr	1057	1062
metilchavicol	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	1197	1195
trans-anetol	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	1283	1283
α -copaeno	0,72	2,75	4,16	2,80	3,80	2,64	3,53	3,23	nc	2,84	1376	1376
β -bourboneno	tr	1,13	1,21	0,53	0,81	0,79	2,22	0,86	nc	1,14	1385	1384
β -elemeno	tr	0,68	0,82	tr	tr	0,71	0,65	0,65	nc	0,75	1392	1391
trans-cariofileno	2,98	9,69	4,73	2,48	3,21	11,22	5,47	6,86	nc	9,50	1419	1418
t- α -bergamoteno	tr	1,48	tr	tr	tr	tr	3,61	0,45	nc	0,34	1436	1436
germacreno D	6,15	12,18	8,46	2,69	3,75	9,70	7,38	8,16	nc	9,78	1481	1480
β -selineno	4,40	1,09	16,72	14,05	17,48	13,61	9,24	16,03	nc	14,69	1487	1485
biciclogermacreno	2,96	4,02	9,68	5,16	6,26	11,77	5,51	9,29	nc	10,51	1495	1494
(E,E)- α -farneseno	tr	6,23	4,48	1,02	1,15	4,12	2,44	2,71	nc	4,20	1508	1508
γ -cadineno	1,76	3,15	2,67	1,27	1,60	3,16	2,48	2,40	nc	2,82	1523	1524
elimicina	69,82	46,03	26,09	51,92	41,60	29,58	30,21	31,50	69,36	25,56	1557	1554
espatulenol	1,74	1,88	5,14	4,37	4,15	2,35	3,89	3,47	nc	3,30	1577	1576
β -copaen-4- α -ol	6,44	5,33	6,03	11,65	14,13	6,00	20,70	10,72	nc	9,76	1583	1584

Onde: ADR – População de Adrianópolis/PR; tr – traços da substância ($\leq 0,14$); nc – não consta; IK Calc. - Índice de Kovats calculado; IK Liter. - Índice de Kovats de literatura.

Componentes		Acesso												
	ADR12	ADR13	ADR14	ADR15	ADR16I	ADR16II	ADR17	ADR18	ADR19	ADR20	IK	Calc.	IK	Liter.
trans-β-ocimeno	0,79	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,91	0,79	0,64	1046	1050	
γ-terpineno	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	1057	1062	
metilchavicol	nc	nc	nc	nc	nc	46,01	0,63	nc	nc	nc	nc	1197	1195	
trans-anetol	nc	nc	nc	nc	nc	26,51	tr	nc	nc	nc	nc	1283	1283	
α-copaeno	2,61	3,56	3,85	4,62	3,75	0,86	3,18	2,30	2,17	2,64	1376	1376		
β-bourboneno	0,64	1,23	0,97	3,36	0,81	tr	0,61	0,81	0,94	0,81	1385	1384		
β-elemeno	0,43	tr	tr	0,91	0,67	0,15	tr	0,65	0,64	0,78	1392	1391		
trans-cariofileno	5,00	9,67	4,34	4,65	8,00	4,57	5,25	9,57	6,99	7,50	1419	1418		
t-α-bergamoteno	0,51	3,75	1,03	0,88	1,47	tr	0,58	1,05	0,89	3,39	1436	1436		
germacreno D	6,48	13,46	9,96	9,83	9,04	4,99	4,71	7,91	8,03	17,92	1481	1480		
β-selineno	9,72	11,04	24,99	8,80	19,78	2,17	15,89	11,31	8,76	2,90	1487	1485		
bicidogermacreno	6,40	8,53	11,95	8,20	10,50	3,69	6,61	8,10	6,72	7,28	1495	1494		
(E,E)-α-farneseno	2,05	3,32	1,52	3,46	3,12	1,98	1,65	4,05	4,44	0,56	1508	1508		
γ-cadineno	2,15	3,18	3,60	3,29	3,41	1,92	2,03	2,56	2,53	4,12	1523	1524		
elimicina	52,77	19,62	13,42	15,61	18,41	5,69	38,85	41,26	50,67	46,45	1557	1554		
espatulenol	2,500	3,44	4,78	9,79	2,45	0,24	2,63	1,43	1,16	0,87	1577	1576		
β-copaen-4-α-ol	6,64	13,07	12,69	15,61	13,79	0,18	14,9	5,02	2,91	1,21	1583	1584		

Quadro 5. Composição Química (% proporcional relativa) do óleo essencial de 20 acessos de *Ocimum selloi* Benth., proveniente de Piquete/SP. Botucatu - SP, 2004.

Componentes	Acessos										IK Calc.	IK Liter.
	PQ 1	PQ 2	PQ 3	PQ 4	PQ 5	PQ 6	PQ 7	PQ 8	PQ 9	PQ 10		
t- β -ocimeno	nc	0,32	1,51	0,89	0,58	0,30	0,07	nc	nc	nc	1046	1050
delta elemeno	nc	1,20	1,42	1,59	2,14	0,19	tr	0,64	tr	tr	-	1339
α -copaeno	1,63	2,24	1,94	2,25	2,10	2,60	2,16	2,24	1,40	1,67	1376	1376
β -bourboneno	1,45	1,65	1,73	2,28	1,94	2,00	1,30	1,48	1,33	1,24	1385	1384
β -cubebeno	0,50	0,56	0,60	0,77	0,74	0,93	0,76	0,7	tr	tr	1390	1390
β -elemeno	tr	1,21	1,03	1,35	1,36	0,64	0,75	0,93	0,96	1,31	1392	1391
metileugenol	nc	nc	tr	nc	0,11	tr	nc	nc	nc	nc	1403	1401
trans-cariofileno	3,80	3,69	3,26	3,89	3,21	4,22	5,60	4,64	3,87	4,13	1419	1418
t- β -bergamoteno	18,00	14,13	16,33	20,57	16,03	16,37	16,73	13,82	12,79	16,67	1437	1436
α -guaiene	tr	2,79	1,84	2,87	2,25	0,25	2,70	0,92	1,01	3,52	1440	1439
α -humuleno	0,52	0,58	0,61	0,83	0,8	1,21	1,50	0,80	tr	0,70	1453	1454
seycheleno	0,62	0,48	0,28	0,40	0,36	0,48	0,50	0,64	tr	0,45	1457	1460
allo-aromadendreno	0,96	0,73	0,35	0,49	0,47	0,71	0,62	0,81	tr	0,71	1460	1461
germacreno D	28,56	29,22	18,56	26,85	20,61	23,78	24,41	32,82	38,65	34,32	1480	1483
β -selineno	3,48	1,66	0,63	0,85	0,91	2,96	0,23	3,19	4,18	1,13	1487	1485
biciclogermacreno (E,E)- α -farneseno	18,13	12,83	6,10	9,50	8,04	12,18	11,85	17,21	19,96	16,02	1497	1494
7-epi- α -selineno	1,29	5,85	4,05	6,05	5,19	1,64	6,77	2,77	3,56	8,31	1508	1508
γ -cadineno	3,16	0,78	nc	nc	nc	3,45	nc	3,00	3,07	nc	1517	1517
elimicina	2,08	2,15	1,75	2,54	2,17	2,22	2,25	2,40	2,83	2,59	1523	1524
espatulenol	15,04	16,03	35,44	11,73	26,57	17,68	15,20	8,67	5,43	5,41	1558	1554
tr	tr	0,33	0,35	0,45	0,44	0,39	0,20	0,14	tr	tr	1577	1576
β -copaen-4- α -ol	tr	0,26	0,25	0,35	0,17	0,26	0,16	tr	tr	tr	1583	1584

Onde: PQ – População de Piquete/SP; tr – traços da substância ($\leq 0,04$); nc – não consta; IK Calc. - Índice de Kovats calculado; IK Liter. - Índice de Kovats de literatura.

Quadro 6. Análise de variância (% média) dos compostos majoritários do óleo essencial de acessos de *Ocimum selloi* Benth coletados em três diferentes locais. Botucatu – SP, 2004.

Compostos	Locais		
	1- VR	2 - ADR	3 - PQ
metilchavicol	3,478 a	2,332 a	-
trans-anetol	1,608 a	1,328 a	-
metileugenol	3,234 a	-	3,470 a
trans-cariofileno	2,601 c	6,084 a	3,880 b
trans-β-bergamoteno	1,718 b	0,983 b	15,146 a
germacreno D	6,339 b	8,029 b	25,688 a
β-selineno	7,853 a	11,134 a	1,910 b
biciclogermacreno	4,242 c	7,157 b	12,314 a
(E,E)-α-farneseno	1,37 b	2,627 ab	3,837 a
elimicina	54,78 a	36,22 b	17,63 c
β-copaen-4-α-ol	4,746 b	8,839 a	0,140 c

Onde: *Letras diferentes numa mesma linha mostram diferenças significativas com 95% de confiança;

VR – População de Iporanga/SP;

ADR – População de Adrianópolis/PR;

PQ – População de Piquete/SP;

(-) – Ausência da substância.

A análise de Componentes Principais (ACP) aplicados à composição química do óleo essencial para os onze componentes majoritários dos sessenta acessos de *Ocimum selloi* (Quadros 7, 8 e 9), expressou 58,73% da variância total nos dois primeiros componentes principais e reproduziu a separação dos acessos das três localidades (Iporanga/SP, Adrianópolis/PR e Piquete/SP), em quatro grupos: A – Acessos VR10, VR12 e ADR16II; B – Acessos PQ18 e VR8; C – Acessos PQ1 a PQ17, PQ19 e PQ20; e D – Acessos VR1 a VR7, VR9, VR11, VR13 a VR20, ADR1 a ADR16I, ADR17 a ADR20 (Figura 3). A Figura 4 reúne os onze compostos majoritários do óleo essencial dos sessenta acessos de *Ocimum selloi*, cujas coordenadas (x e y) foram fornecidas pelo Círculo de Correlação de Variáveis. A projeção das variáveis fornecidas pelo círculo de correlação de variáveis no

mesmo gráfico da análise de coordenadas principais (ACP), permite identificar quais delas foram responsáveis pela discriminação dos acessos das três diferentes regiões (Adrianópolis/PR, Iporanga/SP e Piquete/SP). A separação dos sessenta acessos nesses grupos foi estabelecida a partir dos seguintes componentes majoritários: grupo A: metilchavicol e trans-anetol; grupo B: metileugenol; grupo C: germacreno D, trans- α -bergamoteno, biciclogermacreno e (E,E)- α -farneseno; e grupo D: elimicina, β -selineno, β -copaen-4- α -ol e trans-cariofileno (Figura 5).

Vieira *et al.* (2001) por meio dos estudos morfológicos, químicos e genéticos de doze acessos de *Ocimum gratissimum*, puderam verificar que os acessos analisados foram divididos em seis grupos distintos (1. timol: α -copaeno, 2. eugenol: espatulenol, 3. timol: p-cimeno, 4. eugenol: γ -muruleno, 5. eugenol:timol:espatulenol e 6. geraniol) sendo idênticos aos grupos identificados nas observações morfológicas. As análises moleculares mostraram três grupos distintos geneticamente e altamente correlacionados com os constituintes voláteis.

Já Mendes (2001) efetuou a caracterização morfo-anatômica, molecular e da composição química dos óleos essenciais de 8 formas de *Lippia alba* (Mill) N. E. Br.ex Britt & Wilson, e revelou que tanto a caracterização morfo-anatômica, como a fitoquímica e a molecular apontaram a presença de variação entre as oito formas de *L. alba*. A análise das principais substâncias dos óleos essenciais permitiu a separação das oito formas em quatro grupos (quimiotipos): A): linalol, 1,8 - cineol e trans - β - guaieño; B): cânfora, trans-cariofileno, ρ - cimeno, canfeno e óxido de cariofileno; C): geraniol, acetato de geraniol, β - cedreno, neral e β - mirceno; D): germacreno D, carvona e D - limoneno. A caracterização

molecular por meio de marcadores RAPD apresentou concordância com o agrupamento para os óleos essenciais.

Em nosso estudo, analisando esses agrupamentos obtidos pela análise de componentes principais (ACP), os locais de origem dos materiais vegetais, bem como a composição química individual do óleo essencial de *Ocimum selloi* de cada acesso, pode-se efetuar as considerações a seguir:

i) com exceção do grupo C, os demais agrupamentos (A, B e D) não revelam estruturação geográfica, sendo formados por acessos coletados no mesmo local, como por acessos coletados em locais distantes geograficamente;

ii) os constituintes químicos (majoritários) do óleo essencial dos acessos (Quadros 7, 8 e 9) demonstram que o *Ocimum selloi* tem no seu metabolismo secundário a presença de duas vias biossintéticas: a via do chiquimato (ou ácido chiquímico) e a via do mevalonato (ou do acetil co-enzima A);

iii) que os óleos essenciais dos acessos da população proveniente de Adrianópolis/PR apresentaram composição química média semelhante, tendo como substâncias majoritárias a elimicina (36%), um fenilpropanóide derivado da via metabólica do ácido chiquímico, o β -selineno (12%), β -copaen-4- α -ol (9,3%) e o trans-cariofileno (6%), todos compostos sesquiterpênicos derivados da via do mevalonato;

iv) que os acessos da população de *Ocimum selloi*, proveniente de Iporanga/SP, apresentaram composição química média dos óleos essenciais heterogênea, compondo dois subgrupos: o primeiro composto pelas mesmas substâncias majoritárias dos acessos de Adrianópolis/PR, sendo estas a elimicina (55%), o β -selineno (8%), β -copaen-4- α -ol (4,8%) e o trans-cariofileno (3%); e o segundo, correspondendo a 15% dos acessos,

apresentando, além das substâncias anteriormente citadas, outras como metilchavicol (23%), trans-anetol (10%) e o metileugenol (9%), todas substâncias pertencentes à classe dos fenilpropanóides derivados da via metabólica do ácido chiquímico;

v) já os acessos da população provenientes de Piquete/SP, apresentaram composição química do óleo essencial semelhante entre os acessos, mas apresentando substâncias majoritárias diferentes das duas outras populações (Iporanga/SP e Adrianópolis/PR), tais como, o germacreno D (26%), o trans- β -bergamoteno (15%), o biciclogermacreno (12%) e o (E,E)- α -farneseno (3,84%), sendo todas substâncias sesquiterpênicas derivadas da via do mevalonato.

Ao analisar essas questões, deve-se levar em conta, primeiramente, que a composição química dos óleos essenciais de uma planta é determinado geneticamente, sendo geralmente específica para um determinado órgão e características para seu estágio de desenvolvimento (Teuscher, 1990). Além desses fatores, há que se considerar as influências das condições ambientais (temperatura, umidade relativa, duração total da exposição ao sol, e o regime de ventos) capazes de causar variações significativas (Simões & Spitzer, 2001). Os materiais vegetais, utilizados no presente estudo, considerados acessos, foram coletados em diferentes regiões, geralmente localizadas em unidades de conservação, em diferentes condições edafo-climáticas. Portanto, ao analisar a composição química dos óleos essenciais dos acessos dos três locais, deve-se considerar, além dos fatores apontados acima (genética, ontogenia, ambiente, etc.) que essa é uma característica cujo fenótipo depende da expressão de muitos genes e como consequência da interação entre eles e o ambiente, sendo esta uma situação onde o ambiente exerce grande influência (Nodari & Guerra, 1999).

Kamada et al. (2000) realizaram um estudo sobre a plasticidade fenotípica da composição química do óleo essencial de *O. Basilicum* e por meio deste puderam comprovar que a grande plasticidade fenotípica é uma característica marcante da espécie *O. basilicum*, e que a composição do óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. é extremamente variável, sendo que dentro de um mesmo acesso as composições podem não ser homogêneas.

Entretanto, devemos levar ainda em consideração, a origem exata desses acessos de *Ocimum selloi* das três diferentes localidades do presente estudo, já que se trata de uma espécie nativa do Brasil e de uso popular. Assim os acessos unidos dentro de um mesmo grupo, revelado pela análise de componentes principais, poderiam ser plantas geneticamente idênticas estabelecidas em locais distantes provavelmente levadas pelo próprio homem ao se deslocar para essas regiões. Ou, por outro lado, como relatado por Poser & Mentz (2001), são materiais originados do mesmo ancestral, que no processo evolutivo, através de mutações, sofreu divergência química, levando a diferenças na produção de metabólitos secundários, devido a modificações nas suas rotas biossintéticas com resposta adaptativa às condições ambientais em que estiveram expostas.

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que a espécie *Ocimum selloi* Benth apresenta quatro outros quimiotipos para o óleo essencial, além do relatado por Moraes et al. (2002), que ao estudarem a composição química dos óleos essenciais das inflorescências (flores e sementes) e folhas de *Ocimum selloi*, coletadas em duas épocas do ano, oriunda de Botucatu/SP, observaram como componente majoritário, o trans-anetol, consistindo num outro quimiotipo para a espécie.

Quadro 7. Compostos Majoritários (% da propoção relativa) do óleo essencial de 20 acessos de *Ocimum selloi* Benth., provenientes de Iporanga/SP. Botucatu - SP, 2004.

Acessos	Substâncias (%)										
	metilchavicol	t-anetol	metileugenol	t-cariofileno	t- α -bergamoteno	D β -selineno	biciclogermacreno (E,E)- α -farneseno	eliminina	β -copaen-4- α -ol		
VR 1	nc	nc	nc	2,56	2,56	7,14	1,06	1,66	1,47	71,59	6,00
VR 2	nc	nc	tr	0,99	1,67	5,07	17,04	6,42	tr	59,97	3,74
VR 3	nc	nc	16,83	2,70	2,03	6,48	10,53	6,36	1,85	44,93	3,28
VR 4	nc	nc	tr	1,21	0,96	3,87	8,22	3,88	0,78	69,93	3,93
VR 5	nc	nc	nc	nc	nc	tr	11,07	tr	nc	74,87	5,66
VR 6	nc	nc	nc	0,73	1,49	3,19	12,23	3,80	1,64	66,97	3,53
VR 7	nc	nc	nc	1,79	1,29	7,70	13,32	6,65	1,42	54,94	3,57
VR 8	nc	nc	40,83	1,34	2,19	5,63	3,04	2,53	1,08	33,49	2,92
VR 9	nc	nc	0,97	4,19	3,80	16,52	2,38	4,64	2,19	48,53	4,58
VR 10	26,49	12,90	0,63	2,05	0,69	5,40	6,62	4,12	1,19	30,49	2,05
VR 11	7,82	1,96	4,51	1,31	0,74	3,12	14,34	4,86	0,79	50,86	3,62
VR 12	35,25	17,30	tr	2,60	0,68	7,34	3,97	4,66	1,77	15,36	2,28
VR 13	nc	nc	nc	0,59	0,22	2	10,21	2,83	tr	71,99	5,91
VR 14	nc	nc	tr	4,02	1,64	6,63	6,02	3,72	1,06	60,33	9,03
VR 15	nc	nc	nc	3,26	tr	5,64	11,34	6,47	1,13	61,01	3,95
VR 16	nc	nc	tr	3,51	1,67	5,42	10,09	5,18	1,51	58,49	5,62
VR 17	nc	nc	0,22	4,94	3,87	9,73	3,10	4,55	2,83	52,23	5,60
VR 18	nc	nc	nc	4,37	3,48	8,92	2,62	3,17	1,77	54,91	8,28
VR 19	nc	nc	tr	5,32	3,11	8,50	4,82	4,65	2,48	56,54	5,69
VR 20	nc	nc	0,44	4,55	2,22	8,43	5,04	4,65	2,36	58,08	5,67
Média	23,19	10,72	9,20	2,74	1,91	6,67	7,85	4,46	1,61	54,78	4,75

Onde: VR – População de Iporanga/SP; tr – traços ($\leq 0,22$); nc – não consta.

Quadro 8. Compostos Majoritários (% da propoção relativa) do óleo essencial de 20 acessos de *Ocimum selloi* Benth., provenientes de Adrianópolis/PR, Botucatu - SP, 2004.

Acessos	Substâncias (%)									
	metilchavicol	t-anetol	t-cariofileno	t- α -bergamotem	germacreno D	β -selineno	bicidlogermacreno (E,E)- α -farneseno	eliminina	β -copaen-4- α -ol	
ADR 1	nc	nc	2,98	tr	6,15	4,40	2,96	tr	69,82	6,44
ADR 2	nc	nc	9,69	1,48	12,18	1,09	4,02	6,23	46,03	5,33
ADR 3	nc	nc	4,73	tr	8,46	16,72	9,68	4,48	26,09	6,03
ADR 4	nc	nc	2,48	tr	2,69	14,05	5,16	1,02	51,92	11,65
ADR 5	nc	nc	3,21	tr	3,75	17,48	6,26	1,15	41,60	14,13
ADR 6	nc	nc	11,22	tr	9,70	13,61	11,77	4,12	29,58	6,00
ADR 8	nc	nc	5,47	3,61	7,38	9,24	5,51	2,44	30,21	20,70
ADR 9	nc	nc	6,86	0,45	8,16	16,03	9,29	2,71	31,50	10,72
ADR 10	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	69,36	nc
ADR 11	nc	nc	9,50	0,34	9,78	14,69	10,51	4,20	25,56	9,76
ADR 12	nc	nc	5,00	0,51	6,48	9,72	6,40	2,05	52,77	6,64
ADR 13	nc	nc	9,67	3,75	13,46	11,04	8,53	3,32	19,62	13,07
ADR 14	nc	nc	4,34	1,03	9,96	24,99	11,95	1,52	13,42	12,69
ADR 15	nc	nc	4,65	0,88	9,83	8,80	8,20	3,46	15,61	15,61
ADR 16 I	nc	nc	8,00	1,47	9,04	19,78	10,50	3,12	18,41	13,79
ADR 16 II	46,01	26,51	4,57	tr	4,99	2,17	3,69	1,98	5,69	0,18
ADR 17	0,63	tr	5,25	0,58	4,71	15,89	6,61	1,65	38,85	14,9
ADR 18	nc	nc	9,57	1,05	7,91	11,31	8,10	4,05	41,26	5,02
ADR 19	nc	nc	6,99	0,89	8,03	8,76	6,72	4,44	50,67	2,91
ADR 20	nc	nc	7,50	3,39	17,92	2,90	7,28	0,56	46,45	1,21
Média	23,32	26,51	6,40	1,49	8,45	11,72	7,53	2,92	36,22	9,30

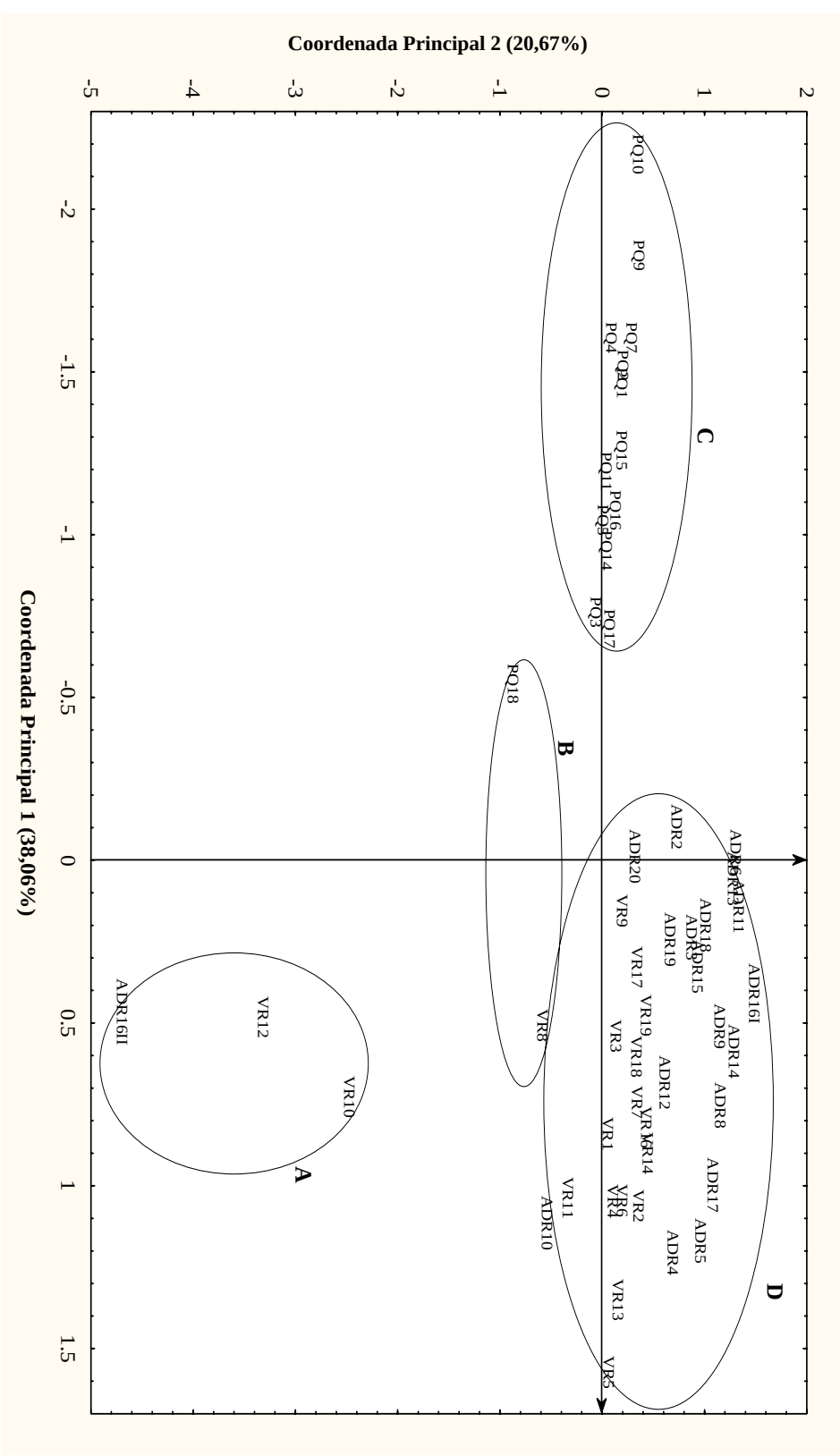
Onde: ADR – População de Adrianópolis/PR; tr – traços $\leq$ 0,18); nc – não consta.

Quadro 9. Compostos Majoritários (% da propoção relativa) do óleo essencial de 20 acessos de *Ocimum selloi* Benth., provenientes de Piquete/SP. Botucatu - SP, 2004.

Acessos	Substâncias (%)									
	metileugenol	t-cariofileno	t- β -bergamoteno	germacreno D	β -selineno	biciclogermacreno (E,E)	α -farneseno	elimicina	β -copaen-4- α -ol	
PQ 1	nc	3,80	18,00	28,56	3,48	18,13	1,29	15,04	tr	
PQ 2	nc	3,69	14,13	29,22	1,66	12,83	5,85	16,03	0,26	
PQ 3	tr	3,26	16,33	18,56	0,63	6,10	4,05	35,44	0,25	
PQ 4	nc	3,89	20,57	26,85	0,85	9,50	6,05	11,73	0,35	
PQ 5	0,11	3,21	16,03	20,61	0,91	8,04	5,19	26,57	0,17	
PQ 6	tr	4,22	16,37	23,78	2,96	12,18	1,64	17,68	0,26	
PQ 7	nc	5,60	16,73	24,41	0,23	11,85	6,77	15,20	0,16	
PQ 8	nc	4,64	13,82	32,82	3,19	17,21	2,77	8,67	tr	
PQ 9	nc	3,87	12,79	38,65	4,18	19,96	3,56	5,43	tr	
PQ 10	nc	4,13	16,67	34,32	1,13	16,02	8,31	5,41	tr	
PQ 11	nc	3,08	14,77	23,78	0,34	8,96	5,99	26,26	0,12	
PQ 12	tr	3,66	11,49	24,92	1,02	9,56	6,04	25,68	tr	
PQ 13	tr	3,15	13,42	19,72	0,78	6,98	4,78	34,50	0,24	
PQ 14	5,17	4,16	13,76	24,54	3,01	12,15	1,33	21,22	0,11	
PQ 15	3,57	4,59	13,29	26,61	2,92	16,59	1,60	14,60	0,16	
PQ 16	0,11	4,69	15,64	25,49	2,98	13,26	0,94	19,09	0,14	
PQ 17	tr	3,84	14,07	18,54	1,73	13,10	1,01	37,95	0,11	
PQ 18	54,34	1,57	11,24	12,22	0,42	4,67	2,57	5,72	tr	
PQ 19	5,56	4,65	20,44	28,84	3,22	14,31	2,52	4,14	tr	
PQ 20	0,33	3,89	13,36	31,31	2,56	14,89	4,49	6,24	0,18	
Média	9,88	3,88	15,15	25,69	1,91	12,31	3,84	17,63	0,19	

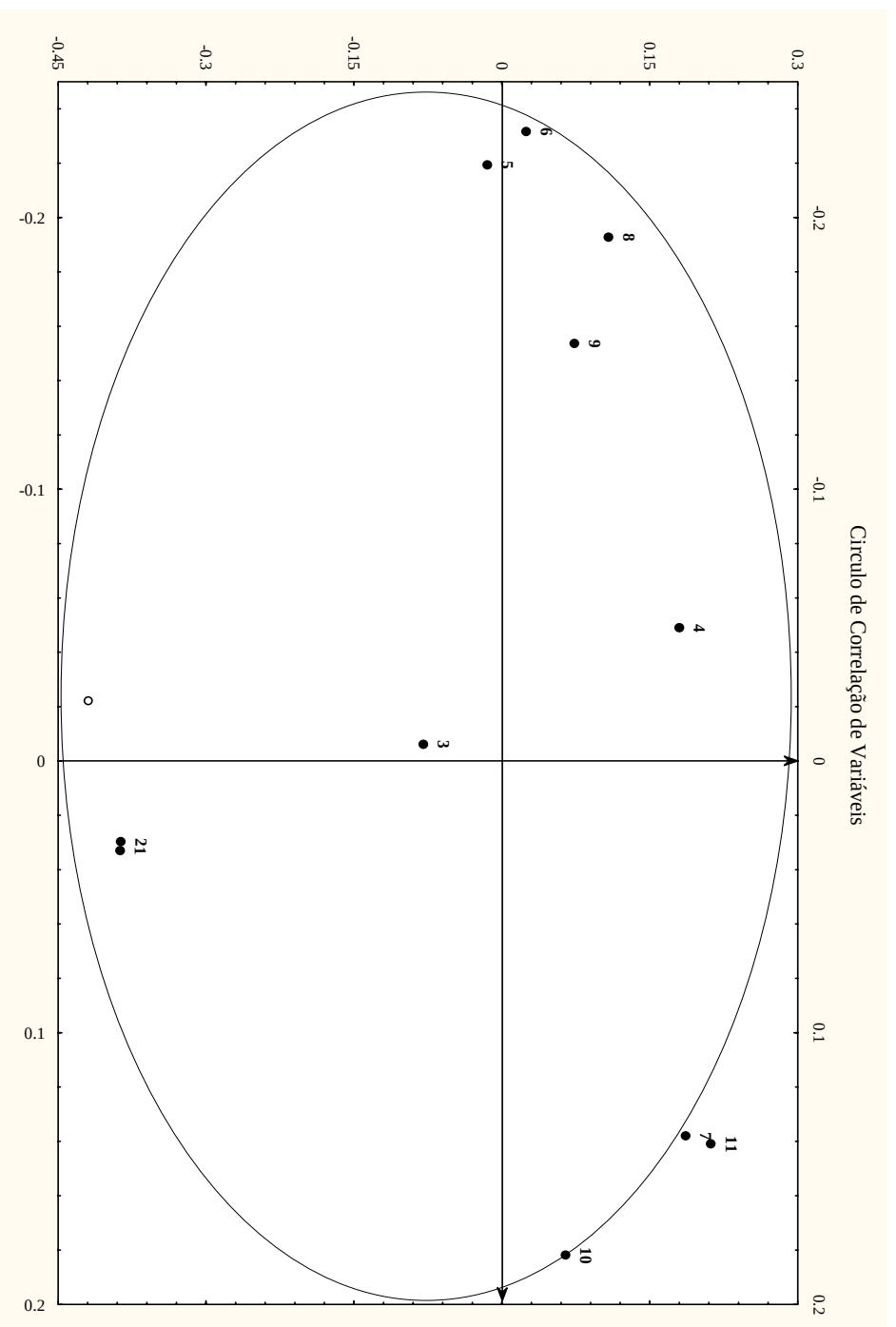
Onde: PQ – População de Piquete/SP; tr – traços ($\leq 0,11$); nc – não consta.

Figura 3. Análise de componentes principais (ACP) aplicados à composição química do óleo essencial para os onze componentes majoritários dos 60 acessos de *Ocimum selloi* Benth . Botucatu – SP, 2004.



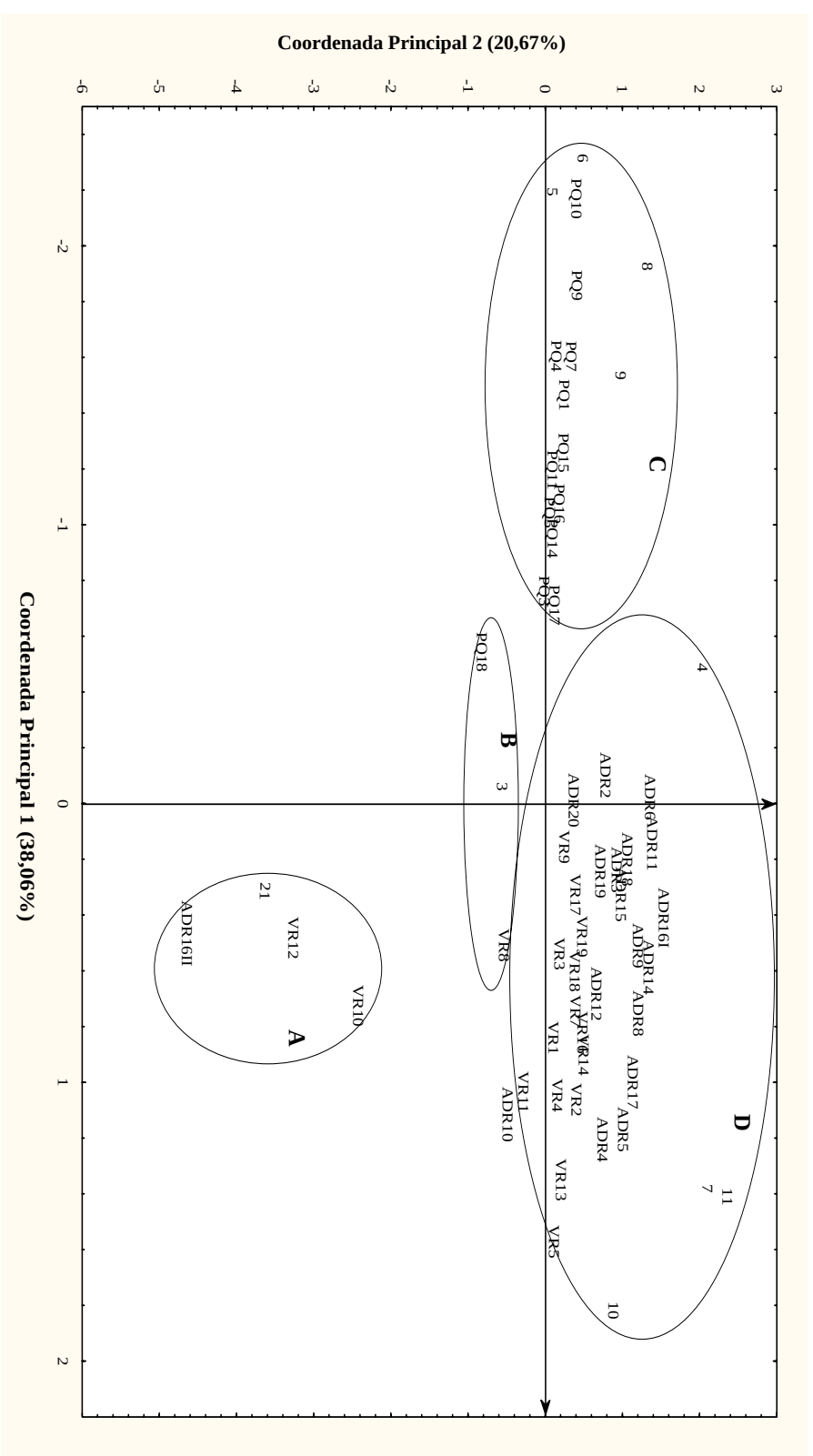
Onde: **VR** – População de Iporanga/SP; **ADR** – População de Adrianópolis/PR ; **PQ** – População de Piquete/SP.

Figura 4. Círculo de Correlação de Variáveis (CPA) aplicados à composição química do óleo essencial para os onze componentes majoritários dos 60 acessos de *Ocimum selloi* Benth. Botucatu – SP, 2004.



Onde : **1** – metilchavicol ; **2** – trans-anetol ; **3** – metileugenol ; **4** – trans-cariofileno ; **5** – trans- β -bergamoteno ; **6** – germacreno D ; **7** – β -selineno ; **8** – biciclogermacreno ; **9** – (E,E)- α -farneseno ; **10** – elimicina ; **11** – β -copaen-4- α -ol.

Figura 5. Análise de componentes principais (ACP) aplicados à composição química do óleo essencial para os onze componentes majoritários dos 60 acessos de *Ocimum selloi* Benth e projeção das variáveis fornecidas pelo Círculo de Correlação de Variáveis (CPA). Botucatu – SP, 2004.



Onde: **VR** – População de Iporanga/SP; **ADR** – População de Adrianópolis/PR ; **PQ** – População de Piquete/SP;
1 – metilchavicol; **2** – trans-anetol; **3** – metileugenol; **4** – trans-cariofileno; **5** – trans- β -bergamoteno; **6** – germacreno D;
7 – β -selineno; **8** – biciclogermacreno ; **9** – (E,E)- α -farneseno ; **10** – elimicina ; **11** - β -copaen-4- α -ol.

6.3. Caracterização molecular – RAPD

Na caracterização molecular dos sessenta acessos de *Ocimum selloi*, via RAPD, foram produzidas um total de 175 bandas nos vinte e dois *primers* utilizados. Desse total, 132 bandas (76%) mostraram-se polimórficas para os acessos de *Ocimum selloi* provenientes de Iporanga/SP, 131 bandas (75%) para os acessos provenientes de Adrianópolis/PR e 87 bandas (49%) para os acessos provenientes de Piquete/SP, conforme se observa no Quadro 10.

A Figura 6 mostra a fotografia de um gel de agarose, no qual se observa os fragmentos RAPD amplificados dos 60 acessos e o *ladder* (Ld – marcador de peso molecular de 100 pb) que auxilia na indicação do tamanho das bandas. O *primer* utilizado nessa figura, foi OPAL09. O exemplo ilustra a ocorrência de polimorfismo entre os genótipos estudados.

Quadro 10: Número total de bandas e de bandas polimórficas produzidas por diferentes *primers* em reações de RAPD para acessos de *Ocimum selloi* Benth provenientes de três locais de coleta. Botucatu – SP, 2004.

Primers (Operon Technology)	Número Total Bandas	Número Bandas Polimórficas p/ VR	Número Bandas Polimórficas p/ ADR	Número Bandas Polimórficas p/ PQ
A18	9	9	8	3
AB03	12	10	11	3
AL09	9	5	9	6
B03	7	7	6	6
C08	5	5	5	2
F12	8	4	6	6
G05	5	2	3	3
H18	7	1	7	2
J01	5	4	4	3
K11	9	7	7	6
K14	11	11	10	6
K15	12	11	10	3
L04	5	4	1	2
X01	7	6	5	2
X03	11	6	5	3
X04	3	2	3	1
X08	5	4	4	4
X17	7	6	6	6
X18	10	4	3	7
X20	9	8	7	4
Y20	10	9	5	4
Z09	9	7	6	5
TOTAL	175	132	131	87

Onde: VR – População de Iporanga/SP;
 ADR – População de Adrianópolis/PR;
 PQ – População de Piquete/SP.

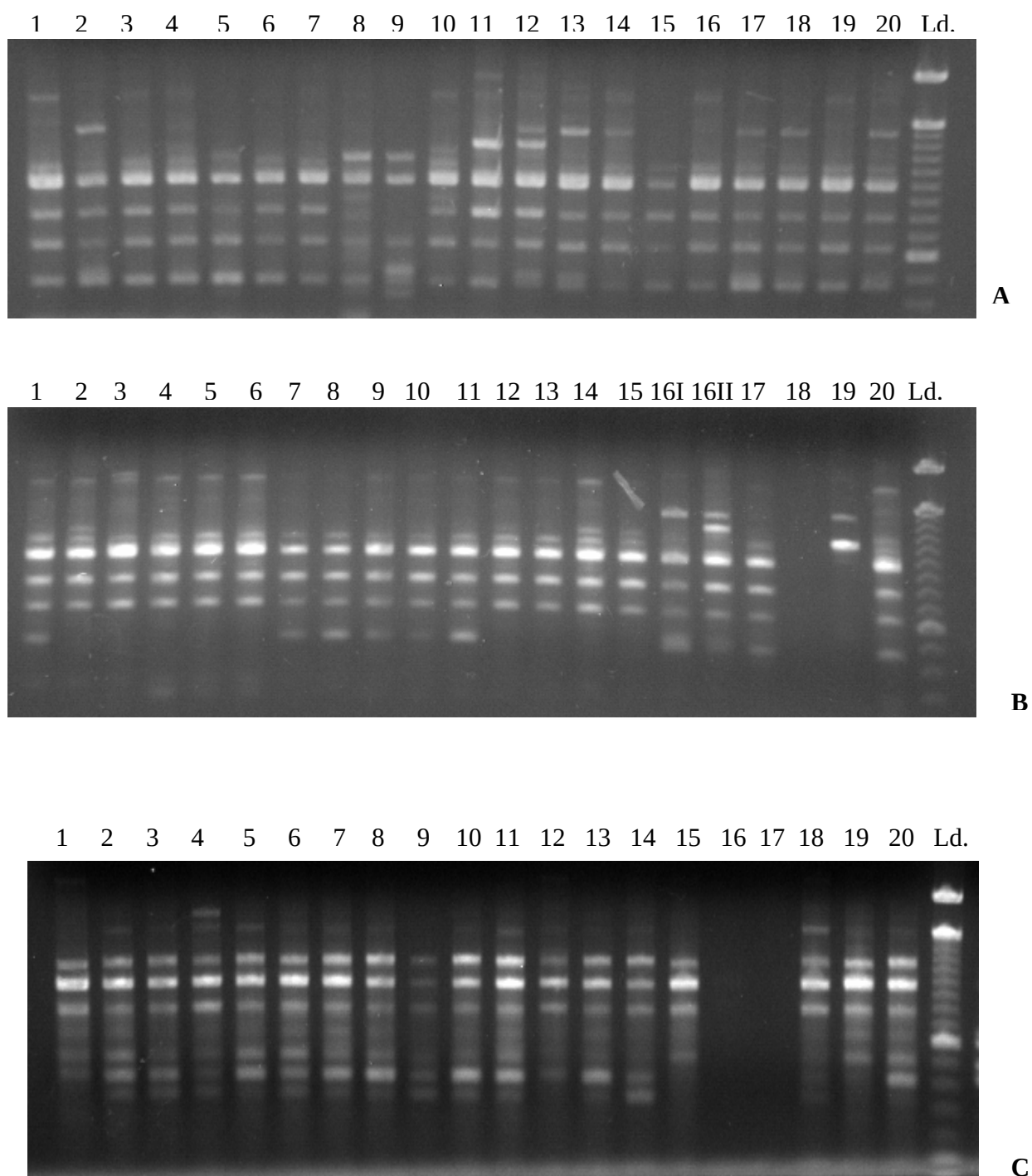


Figura 6. Gel de agarose (1,2%) ilustrando amplificações de fragmentos RAPD de 60 genótipos de *O. selloi* de três regiões de coleta, Iporanga/SP (A), Adrianópolis/PR (B) e Piquete/SP (C). Botucatu – SP, 2004.

As similaridades genéticas foram obtidas por meio do índice de *Dice* (Quadro 11). Com variação entre 1,00 e 0,33, a similaridade média nos três locais amostrados foram similares para os acessos de VR e ADR (0,77 e 0,73, respectivamente), e para os acessos de PQ foi de 0,85. As maiores similaridades foram encontradas para PQ em relação à VR e ADR (0,73; 0,47 e 0,34; respectivamente). Quando comparou-se a divergência genética média entre os três locais, observou-se que as mesmas foram similares entre si (0,69 para VRxADR ; 0,62 para VRxPQ e 0,60 para ADRxPQ). Tais valores revelam uma divergência genética acentuada.

Quadro 11. Valores do índice de similaridade genética de *Dice* (máximo, mínimo e médio) encontrado dentro e entre comparações dos 60 acessos de *Ocimum selloi* provenientes de três diferentes regiões (Adrianópolis/PR, Iporanga/SP e Piquete/SP) baseados em 175 marcadores RAPD. Botucatu – SP, 2004.

	Max	Min	Med
VR	0,96	0,47	0,77
ADR	1,00	0,34	0,73
PQ	0,99	0,73	0,85
VRxADR	0,98	0,33	0,69
VRxPQ	0,80	0,41	0,62
ADRxPQ	0,79	0,35	0,60
Total	1,00	0,33	0,68

Onde: **Max** – máximo;
Min – mínimo;
Med – média;

VR – População de Iporanga/SP;
ADR – População de Adrianópolis/PR;
PQ – População de Piquete/SP

A partir da matriz de similaridade genética (Quadro 12) entre os acessos das três regiões (Iporanga/SP, Adrianópolis/PR e Piquete/SP) foi realizada uma representação gráfica da dispersão dos 60 acessos de *Ocimum selloi* utilizando-se a análise de coordenadas principais (Figura 7). Da mesma forma, a partir da mesma matriz de similaridade genética, foi obtido um dendograma (Figura 8) pelo método de agrupamento hierárquico por pares de médias aritméticas (UPGMA) (Sneath & Sokal, 1973).

Os três primeiros eixos da análise de coordenadas principais (eixo 1 = 25,8%, eixo 2 = 10,8% e eixo 3 = 6,8%) acumularam 43,4% da variância total, revelando existência de estrutura genética. Embora nem toda a variância acumulada tenha sido explicada, as coordenadas principais dos eixos 1 e 2 permitiram identificar a separação dos acessos das três localidades em seis grupos distintos (Figura 7), sendo: grupo A - formado pelos acessos de Piquete/SP, grupo B e C - formados pelos acessos de Iporanga/SP e grupos D, E e F formados tanto pelos acessos de Adrianópolis/PR como pelos acessos de Iporanga/SP, refletindo o mesmo padrão de associação observada no dendograma (Figura 8).

Observa-se ainda que, com exceção dos grupos A, B e C, os demais agrupamentos (D, E e F) não revelam estruturação geográfica, sendo formados por acessos coletados no mesmo local, como por acessos coletados em diferentes locais. Segundo Gauer (1999), a distribuição geográfica de uma espécie tem grande influência sobre o nível de variabilidade genética da mesma. Espécies com ampla distribuição geográfica, possuem uma variabilidade genética superior a espécies com distribuição restrita. Isso ocorre porque populações de espécies com ampla distribuição geográfica normalmente sofrem diferentes pressões seletivas nos diferentes ambientes que ocupa.

A menor divergência genética entre os acessos das localidades de Iporanga/SP e Adrianópolis/PR poderia ser explicada pela ocorrência de fluxo gênico entre as mesmas. Populações que se encontram geograficamente próximas normalmente apresentam baixa divergência genética devido à possibilidade de fluxo gênico entre as mesmas (Almeida *et al.*, 1998).

Vieira *et al.* (2001) por meio de estudos genéticos (RAPD) de doze acessos de *Ocimum gratissimum*, verificaram que entre os 18 *primers* testados, 6 geraram 32 fragmentos polimórficos nos três quimiotipos comparados (timol, eugenol e geraniol) mostrando que os três grupos eram geneticamente distintos.

Já Mendes (2001) efetuou a caracterização molecular (RAPD) de 8 formas de *Lippia alba* (Mill) N. E. Br.ex Britt & Wilson, popularmente conhecida como erva-cidreira ou falsa melissa, utilizada como antiespasmódica, estomáquica, etc., apontando a presença de variação entre elas. Dos cem *primers* utilizados, 60 deles revelaram bom perfil de amplificação RAPD, gerando um total de 662 bandas. Destas, 318 (48%) foram consideradas polimórficas, revelando uma forte estruturação genética.

Portanto, os resultados do estudo de diversidade genética das três populações de *Ocimum selloi*, realizado através do emprego dos marcadores RAPD, revelaram uma forte diversidade genética. Em termos de melhoramento genético, o conhecimento da diversidade genética de uma espécie facilita a escolha de progenitores para os cruzamentos, os estudos de herança, a definição de estratégias adequadas de seleção, o mapeamento genético e a seleção assistida por marcadores. Todas as ações relacionadas com a conservação genética também dependem do conhecimento da diversidade genética, onde os marcadores moleculares são ferramentas importantes para sua caracterização e monitoramento. Sendo estes

devidamente aproveitados para orientar a utilização, conservação e o melhoramento genético da espécie.

Quadro 12. Matriz de Similaridade Genética (Dice) obtida a partir de 175 marcadores RAPD para os 60 acessos de *O. selloi* Benth provenientes de três localidade. Botuca

1	1.00																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						</
---	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

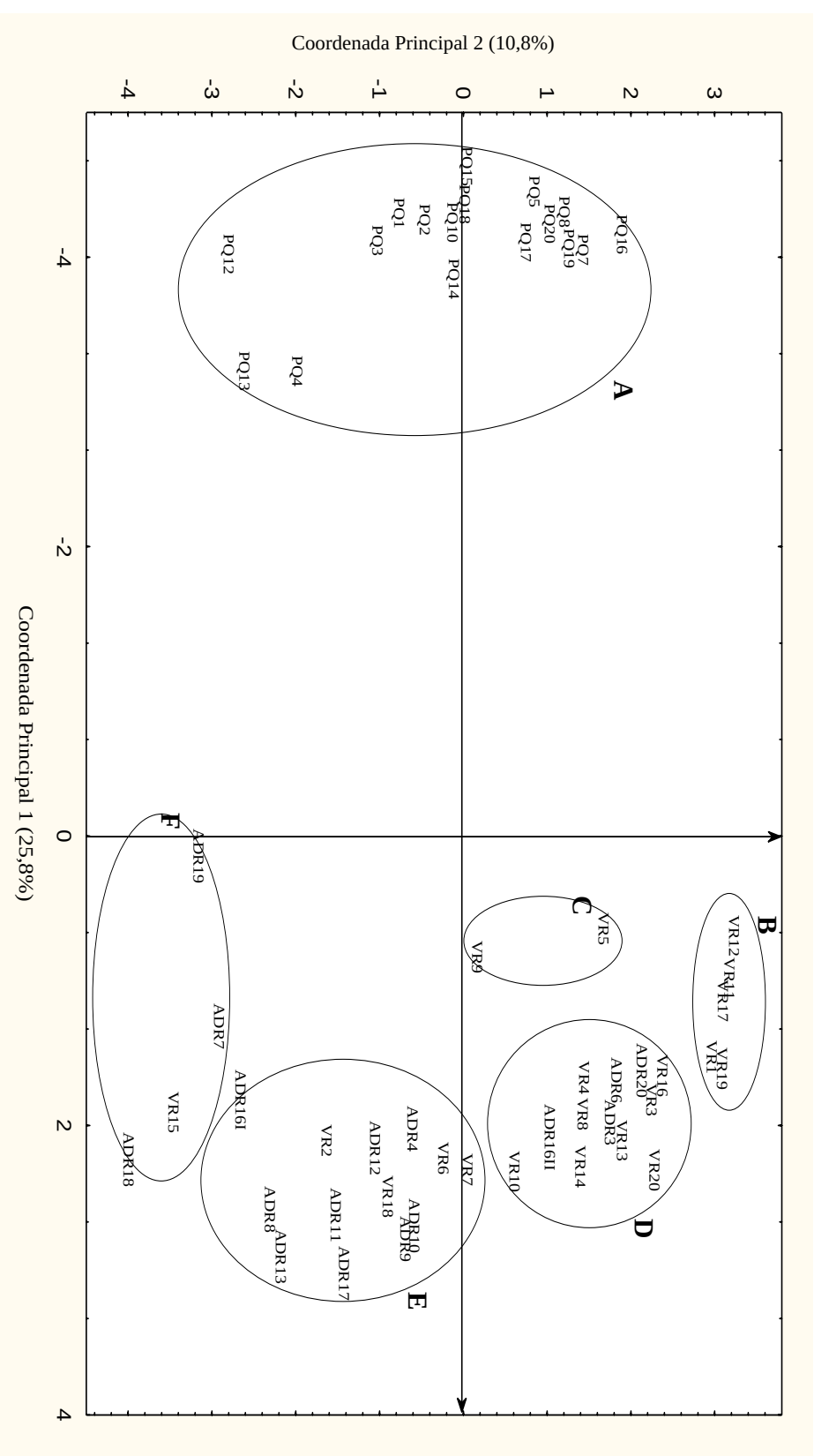
40	0.39	0.39	0.40	0.35	0.45	0.33	0.40	0.38	0.45	0.35	0.34	0.37	0.40	0.42	0.20	0.36	0.36	0.47	0.37	0.41	0.44	0.46	0.46	0.47	0.43	0.42	0.37	0.34	0.43	0.41	0.44	0.44	0.42	0.44	0.45	0.35
41	0.85	0.67	0.80	0.78	0.69	0.72	0.76	0.83	0.65	0.73	0.84	0.82	0.83	0.81	0.54	0.87	0.83	0.73	0.87	0.84	0.86	0.87	0.85	0.77	0.86	0.87	0.60	0.73	0.78	0.78	0.78	0.71	0.87	0.75	0.63	
42	0.62	0.53	0.56	0.57	0.57	0.54	0.53	0.56	0.54	0.51	0.63	0.63	0.59	0.56	0.44	0.62	0.61	0.58	0.60	0.58	0.61	0.62	0.60	0.61	0.60	0.61	0.50	0.49	0.54	0.57	0.59	0.62	0.52	0.64	0.56	0.51
43	0.65	0.55	0.64	0.63	0.59	0.56	0.59	0.58	0.56	0.54	0.66	0.66	0.62	0.58	0.46	0.66	0.64	0.59	0.64	0.60	0.64	0.62	0.63	0.63	0.62	0.64	0.52	0.56	0.62	0.59	0.60	0.61	0.55	0.64	0.57	0.50
44	0.64	0.58	0.62	0.65	0.58	0.58	0.62	0.60	0.56	0.57	0.67	0.67	0.63	0.62	0.50	0.66	0.64	0.61	0.63	0.62	0.64	0.64	0.61	0.63	0.62	0.63	0.56	0.56	0.56	0.59	0.62	0.63	0.55	0.66	0.59	0.55
45	0.60	0.59	0.60	0.61	0.54	0.55	0.61	0.59	0.49	0.56	0.63	0.64	0.62	0.61	0.52	0.64	0.61	0.60	0.60	0.62	0.61	0.63	0.62	0.65	0.65	0.64	0.61	0.60	0.58	0.60	0.63	0.65	0.61	0.66	0.62	0.55
46	0.70	0.55	0.65	0.65	0.60	0.56	0.59	0.63	0.54	0.59	0.71	0.73	0.65	0.60	0.42	0.68	0.69	0.56	0.70	0.65	0.68	0.67	0.68	0.64	0.68	0.70	0.52	0.53	0.57	0.60	0.60	0.63	0.55	0.69	0.58	0.49
47	0.69	0.54	0.66	0.65	0.61	0.56	0.61	0.63	0.54	0.60	0.70	0.72	0.64	0.63	0.45	0.69	0.68	0.58	0.69	0.65	0.66	0.64	0.66	0.62	0.66	0.68	0.51	0.54	0.59	0.60	0.60	0.60	0.55	0.68	0.56	0.49
48	0.72	0.57	0.68	0.67	0.64	0.57	0.62	0.65	0.57	0.61	0.74	0.74	0.67	0.64	0.47	0.72	0.74	0.61	0.74	0.69	0.70	0.71	0.70	0.66	0.71	0.73	0.54	0.57	0.61	0.63	0.64	0.63	0.54	0.72	0.59	0.54
49	0.70	0.57	0.67	0.66	0.64	0.55	0.59	0.65	0.56	0.60	0.71	0.72	0.67	0.63	0.44	0.71	0.72	0.60	0.72	0.67	0.69	0.69	0.70	0.65	0.70	0.72	0.53	0.57	0.60	0.61	0.61	0.63	0.53	0.72	0.60	0.52
50	0.68	0.60	0.65	0.65	0.59	0.55	0.59	0.61	0.56	0.56	0.69	0.69	0.63	0.61	0.46	0.66	0.68	0.60	0.68	0.63	0.67	0.67	0.65	0.62	0.66	0.67	0.57	0.55	0.57	0.58	0.61	0.63	0.51	0.68	0.56	0.54
51	0.71	0.56	0.67	0.65	0.61	0.55	0.61	0.65	0.55	0.60	0.72	0.73	0.66	0.61	0.44	0.69	0.71	0.58	0.71	0.66	0.67	0.68	0.64	0.69	0.71	0.54	0.56	0.61	0.61	0.62	0.63	0.54	0.70	0.59	0.49	
52	0.54	0.54	0.53	0.56	0.49	0.51	0.51	0.57	0.50	0.55	0.58	0.57	0.57	0.56	0.52	0.58	0.57	0.57	0.56	0.55	0.53	0.56	0.54	0.60	0.57	0.58	0.57	0.56	0.52	0.56	0.59	0.63	0.58	0.61	0.56	0.55
53	0.60	0.61	0.57	0.62	0.56	0.56	0.59	0.62	0.55	0.61	0.63	0.61	0.61	0.63	0.52	0.62	0.62	0.63	0.60	0.61	0.57	0.60	0.58	0.61	0.59	0.61	0.61	0.62	0.56	0.58	0.62	0.65	0.61	0.63	0.58	0.63
54	0.67	0.58	0.65	0.63	0.57	0.55	0.59	0.63	0.54	0.59	0.68	0.68	0.66	0.64	0.47	0.68	0.67	0.58	0.67	0.64	0.67	0.67	0.68	0.68	0.71	0.70	0.55	0.57	0.58	0.62	0.62	0.65	0.55	0.70	0.61	0.51
55	0.66	0.55	0.62	0.63	0.56	0.54	0.58	0.59	0.51	0.56	0.67	0.67	0.63	0.58	0.43	0.66	0.65	0.55	0.65	0.63	0.63	0.66	0.65	0.63	0.66	0.66	0.53	0.54	0.56	0.58	0.57	0.61	0.54	0.68	0.58	0.50
56	0.72	0.58	0.67	0.69	0.65	0.59	0.60	0.64	0.54	0.61	0.76	0.77	0.67	0.63	0.41	0.73	0.74	0.60	0.74	0.69	0.70	0.69	0.69	0.63	0.70	0.72	0.48	0.53	0.56	0.60	0.59	0.63	0.52	0.71	0.58	0.51
57	0.69	0.59	0.64	0.67	0.61	0.59	0.62	0.61	0.53	0.59	0.72	0.73	0.68	0.62	0.43	0.72	0.71	0.61	0.72	0.68	0.70	0.69	0.69	0.68	0.72	0.72	0.53	0.58	0.60	0.64	0.64	0.67	0.56	0.73	0.61	0.54
58	0.66	0.56	0.62	0.62	0.57	0.54	0.58	0.61	0.53	0.57	0.68	0.68	0.64	0.60	0.46	0.67	0.64	0.58	0.66	0.62	0.67	0.66	0.66	0.65	0.69	0.69	0.52	0.54	0.59	0.62	0.62	0.64	0.57	0.69	0.62	0.50
59	0.72	0.58	0.68	0.68	0.63	0.59	0.62	0.64	0.55	0.60	0.71	0.73	0.68	0.62	0.44	0.72	0.71	0.61	0.71	0.68	0.69	0.70	0.71	0.66	0.71	0.73	0.51	0.56	0.60	0.63	0.63	0.65	0.58	0.71	0.61	0.52
60	0.69	0.58	0.68	0.67	0.62	0.58	0.62	0.63	0.58	0.60	0.71	0.72	0.67	0.63	0.45	0.71	0.69	0.61	0.71	0.67	0.69	0.70	0.68	0.66	0.70	0.71	0.52	0.56	0.59	0.61	0.61	0.62	0.53	0.70	0.59	0.54

Onde: 1 a 20 - Provenientes de Iporanga/SP; 21 a 41 - Provenientes de Adrianópolis/PR; 42 a 60 - Provenientes de Piquete/SP.

37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

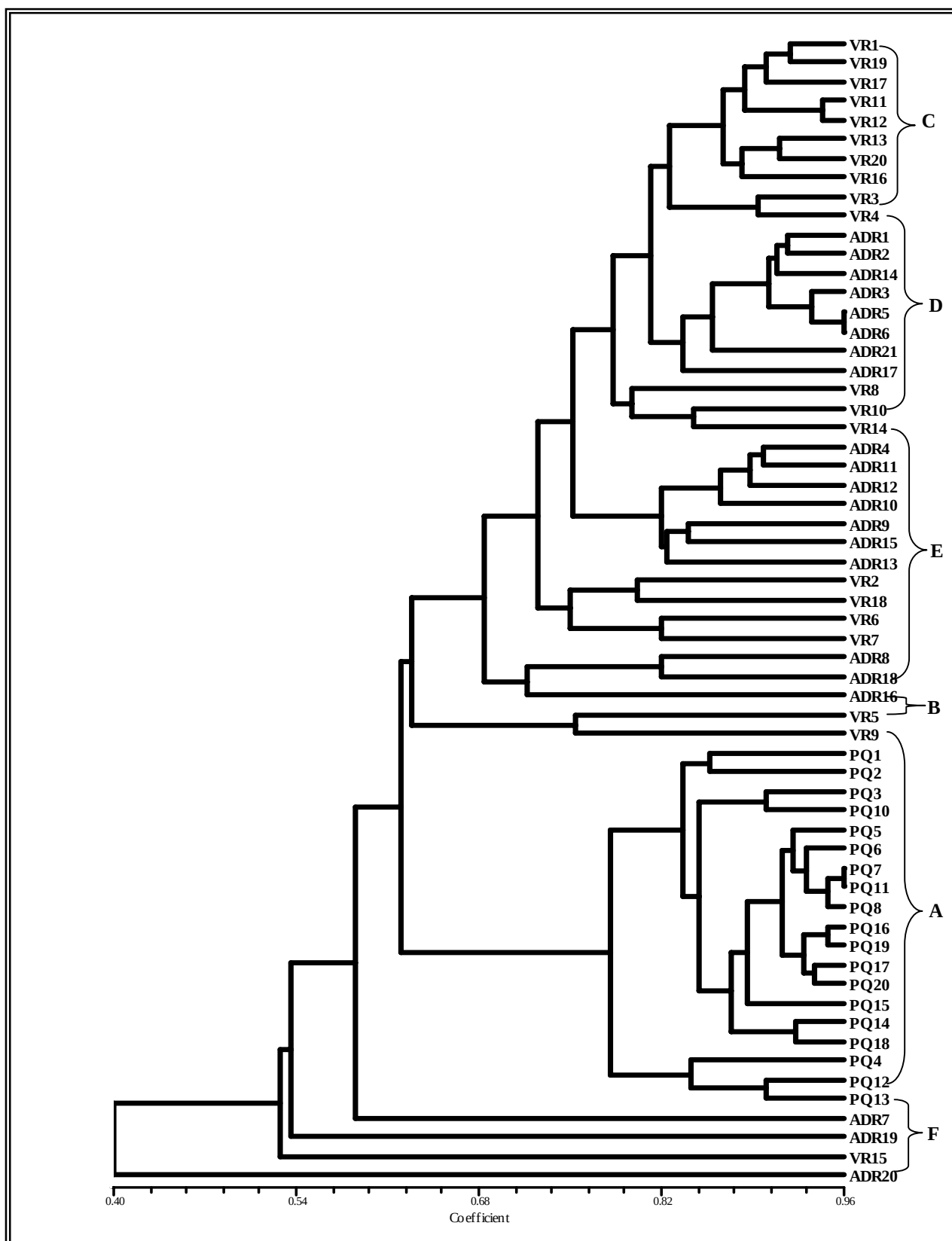
1,00	
0,76	1,00
0,56	0,63 1,00

Figura 7. Representação gráfica da dispersão dos 60 acessos de *Ocimum selloi* Benth definido pela análise de coordenadas principais (ACP) obtido a partir da matriz de similaridade genética de *Dice* calculada a partir de 175 marcadores RAPD. Botucatu – SP, 2004.



Onde : **VR** – População de Iporanga/SP; **ADR** – População de Adrianópolis/PR; **PQ** – População de Piquete/SP.

Figura 8. Dendograma de similaridade entre os 60 acessos de *Ocimum selloi* Benth obtido a partir da matriz de similaridade genética *Dice* calculada a partir de 175 marcadores RAPD e agrupados pelo método UPGMA. Botucatu – SP, 2004.



Onde: VR – População de Iporanga/SP; ADR – População de Adrianópolis/PR; PQ – População de Piquete/SP.

6.4. Estudo da diversidade genética dentro e entre populações

A diversidade genética da espécie *Ocimum selloi* Benth. entre e dentro das populações analisadas foi calculada pelo índice de Shannon modificado para análises de RAPD. Os resultados obtidos estão apresentados no Quadro 13.

Quadro 13. Diversidade genética entre e dentro de populações de *Ocimum selloi* Benth. calculada pelo Índice de Shannon (H_o). Botucatu – SP. 2004.

Diversidade dentro de populações ¹			
Iporanga – SP (VR)	Adrianópolis – PR (ADR)	Piquete – SP (PQ)	H_{pop}
0,308	0,317	0,237	0,287
$H_{tot} = 0,304$	Variabilidade dentro (H_{pop} / H_{tot}) = 0,287/0,304=0,94		
	Variabilidade entre [$1 - (H_{pop} / H_{tot})$] = 1-0,94=0,06		

¹ $H = -\sum_{i=1}^k p_i \ln p_i$ onde H = diversidade de marcas RAPD na população; k = número de marcas RAPD na população; p_i = frequência da i-ésima marca RAPD na população. A média de H é a diversidade de marcas RAPD dentro da população (H_o). H_{pop} é a média de H_o . H_{tot} é a diversidade considerando todas as marcas das populações da área em estudo.

A diversidade genética média dentro das populações (H_{pop}) foi de 0,287 e a diversidade calculada entre as populações estudadas (H_{tot}) foi 0,304. A proporção da diversidade dentro das populações foi de 0,94 (94%) obtida pela razão entre H_{pop}/H_{tot} , enquanto que a diversidade entre as populações [$1 - (H_{pop} / H_{tot})$] obteve valor igual a 0,06 (6%). Assim, a diversidade dentro das populações foi maior que entre as populações.

A variabilidade detectada dentro das populações estudadas de *Ocimum selloi* deve estar relacionada a alguma característica desta espécie, como por exemplo, seu sistema de cruzamento (fecundação cruzada). Segundo Gauer (1999), o sistema de cruzamento de cada espécie apresenta um efeito marcante na composição genética de suas populações. Espécies de fecundação cruzada possuem, em geral, uma alta variabilidade, suas populações normalmente têm um alto polimorfismo interno, mas uma baixa divergência entre populações, quando há fluxo gênico entre as mesmas. Assim, a maior parte de variabilidade se concentra dentro das populações.

Vários autores têm estudado a variabilidade genética em populações de diferentes espécies. Bertoni (2003) em estudo com populações naturais da espécie medicinal, bolsa-de-pastor (*Zeyheria montana* Mart., Bignoniaceae), usando o índice de Shannon, obteve valores similares com os encontrados para *Ocimum selloi*. A variabilidade dentro e entre populações foi 90,5% e 9,5%, respectivamente.

Wolff *et al.*, (1997) em estudo com a espécie *Alkanna orientalis*, obteve através do Índice de Shannon, variabilidade intrapopulacional de 62% e interpopulacional de 38%. Valores semelhantes foram encontrados por Monaghan *et al.*, (1996) em *Tylosema esculentum*, com valores de 84,6% e 15,4% para as variabilidades intra e interpopulações, respectivamente.

Em concordância com a baixa variabilidade entre populações, Ohashi *et al.*, (1992), obteve valores que concordam com os autores anteriormente citados. Estudando variação genética entre populações de *Euterpe oleraceae* Mart., a partir de caracteres quantitativos, encontraram pequena variação genética entre e grande variação dentro de populações.

A maior variação genética dentro da população indica que a estratégia de conservação genética deve priorizar a amostragem dentro das populações (Siqueira *et al.*, 2000). Assim, a alta variabilidade genética verificada dentro das populações de *Ocimum selloi* Benth., indica a necessidade de coletas de maior número de indivíduos dentro de cada população para representar a variabilidade existente na espécie. Por outro lado, quando se pensa na conservação “*in situ*” da espécie, já que segundo Vieira (1999), no Brasil, a conservação de germoplasma de plantas medicinais está focalizada em três pontos: estudos etnobotânicos, coleta e caracterização de germoplasma e conservação “*in situ*”, a alta variabilidade genética intrapopulacional implicará na manutenção de populações com número grande de indivíduos e na preservação da espécie como um todo.

6.5. Considerações finais

Tanto a caracterização molecular, como da composição química dos óleos essenciais apontaram a presença de variações entre os acessos das três populações de *Ocimum selloi* Benth.

Considerando-se que os metabólitos secundários sofrem influências de fatores ambientais, dentre outros, propõe-se estudos futuros com a espécie, através do monitoramento de sua composição química em condições edafoclimáticas diferentes daqueles de seu *habitat* natural.

Em termos de melhoramento genético, o conhecimento da diversidade genética de uma espécie facilita a escolha de progenitores para futuros cruzamentos e estudos de herança. Portanto, também seriam necessários estudos, sobre herança genética e viabilidade

de futuros cruzamentos da mesma, para orientar se as divergências encontradas (composição química e diversidade genética) seriam a nível ambiental ou genético, para futuros programas de melhoramento genético da espécie com fins econômicos e para a preservação da espécie.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- A técnica de marcadores RAPD mostrou ser uma ferramenta adequada para analisar a variabilidade genética em acessos de *Ocimum selloi* Benth.;
- A caracterização da composição química dos óleos essenciais dos acessos das três populações naturais, demonstrou que o *Ocimum selloi* tem no seu metabolismo secundário a presença de duas vias biossintéticas: a via do chiquimato (ou ácido chiquímico) e a via do mevalonato (ou do acetil co-enzima A);
- A variabilidade genética de *Ocimum selloi*, por meio de marcadores RAPD, em acessos coletados nas três populações naturais dos estados de São Paulo e Paraná, revelaram uma forte diversidade genética;
- A espécie mostra um padrão de isolamento por distância, isto é, populações mais próximas geograficamente apresentaram maior similaridade genética;

- Houve concordância entre a caracterização fitoquímica e molecular na separação dos sessenta acessos de *Ocimum selloi*, sendo formados 4 grupos (quimiotipos): grupo A: metilchavicol e trans-anetol; grupo B: metileugenol; grupo C: germacreno D, trans- α -bergamoteno, biciclogermacreno e (E,E)- α -farneseno; e grupo D: elimicina, β -selineno, β -copaen-4- α -ol e trans-cariofileno.

- Portanto, conclui-se assim, que os resultados do estudo de diversidade genética por meio dos marcadores RAPD, cujo conhecimento, associado aos dados da composição química dos óleos essenciais (quimiotaxonomia), pode ser devidamente aproveitado para orientar na utilização, conservação e no melhoramento genético da espécie.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ADAMS, R. P. *Identification of essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy*, Allured Publ. Corp, Carol Stream, 2001.

ALMEIDA, S. P., PROENÇA, C. E. B., SANO, S. M., RIBEIRO, J. F. *Cerrado: espécies vegetais úteis*. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464p.

ALONSO, M. A. *Porque las plantas producen metabolitos secundarios fisiologicamente activos*. Universidad de Los Andes. **Revista de la Facultad de Farmacia**, Mérida – Venezuela, v. 26, n. 10, 1997.

* UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Faculdade de Ciências Agronômicas. *Normas para a elaboração de dissertação e teses*. Botucatu, 1997. 35p.

ASHBURNER, G. R., THOMPSON, W. K., HALLORAN, G. M. RAPD analysys as South Pacific cocconut palm populations. **Crop Science**. v. 37. p. 992-997. 1997.

BARROS, I. B. I. de, SILVA, M. A. S. da, SCHEFFER, M. Mini-curso Recursos Genéticos de Plantas Medicinais. **In:** 39º CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, Tubarão, 1999. **apostila**. 13p.

BERED, F., NETO, J. F. B., CARVALHO, F. I. F. de. *Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 3, p. 513-520, 1997.

BERTONI, B. W. Propagação, variabilidade genética e química de *Zeyheria montana* Mart.. 165p. Jaboticabal. 2003. Tese (Doutorado em Horticultura). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária.

BITTENCOURT, J. V. M. *Variabilidade genética em populações naturais de Maytenus ilicifolia por meio de marcadores RAPD*. 58p. Curitiba, 2000. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Federal do Paraná.

BORGES DOS SANTOS, M. M. F. Comunicação pessoal, Botucatu, 1998.

BROWN, L. R., FLAVIN, C. & POSTEL, S. A world at risk. *In: BROWN L. R. (Ed)*, State of the World. W. W. Norton Co, New York, p.1 - 6, 1989.

CASTRO, P. R. C., FERREIRA, S. O., YAMADA, T. *Ecofisiologia da Produção Agrícola*, Piracicaba: POTAFOS, 1987. 249p.

CHALMERS, K. J.; WAUGH, R.; SPRENT, J. I.; SIMONS, A. J.; POWELL, W. Detection of genetic variation between and within populations of *Gliciridia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. **Heredity**. v. 69, p. 465-472. 1992.

CHONG, D. K. X., YANG, R. C., YEH, F. C. Nucleotide divergence between populations of trembling aspen (*Populus tremuloides*) estimated with RAPDs. **Curr. Genet.** v. 26, p. 374-376. 1994.

CIAMPI, A. Y. *Uso de marcadores moleculares nos estudos genéticos de populações de espécies florestais*. In: III SIMPOSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE. Londrina, IAPAR, 2001. **Anais**. p.19-22.

CONDE, R. P. & YAMAMOTO, J. K. Avaliação de recursos por métodos computacionais: um estudo de caso na mina de canoas 2 (PR). **Revista Brasileira de Geociências**. v. 26, n. 1, p. 35-42, 1996.

CROCOMO, O. J., NEPTUNE, A. M. L., REYES-ZUMETA, H. *Absorción de iones por las plantas*. Univ. Del Zulia, Maracaibo, Venezuela, 185p., 1965

CROCHEMORE, M. L., HUYGHE, C., KERLAN, M. C., DURAND, F., JULIER, B. Partitioning and distribution of RAPD variation in a set of population of the *Medicago sativa* complex. **Agronomie**, v. 16, p. 421-432. 1996.

CRAVEIRO, A. A., FERNANDES, A. G., ANDRADE, C. H. S. *Óleos Essenciais de Plantas do Nordeste*, Fortaleza, EUFC, 210 p. , 1981

ELISABETSKY, E. *Pesquisa em plantas medicinais*. Ciência e Cultura, v. 39, n. 8, p. 697-702. 1987.

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

GAUER, L. *Variabilidade genética em populações naturais de erva-mate usando marcadores RAPD*. Porto Alegre, 1999. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 153p.

GAUER, L., CAVALLI-MOLINA, S. Genetic variation in natural population of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) using RAPD markers. **Heredity**. v. 84, p. 647-656, 2000.

GOTTLIEB, O. R. & MORS, W. B. Potencial utilization of brasilian wood extratives. **J. Agric. Food. Chem.** v. 28, p. 196-215, 1980.

GOTTLIEB, O. R. Micromolecular evolution, systematics, and ecology: An essay into a novel botanical discipline. Sprongir, Berlin, 1982.

GOWER, J. C. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. **Biometrika**, v. 53, p. 325-338, 1966.

GRAYER, R.J., KITE, G.C., GOLDSTONE, F.J., BRYAN, S.E., PATONT, A., PUTIEVSKY, E., Intraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, *Ocimum basilicum*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 5, p. 1033-1039, 1996a.

GRAYER, R.J., BRYAN, S.E., VEITCH, N.C., GOLDSTONE, F.J., PATONT, A. WOLLENWEBER, E. External flavones in sweet basil *Ocimum basilicum* and related taxa. **Phytochemistry**, v. 43, n. 5, p. 1041-1047, 1996b.

GUNTER, L. E., TUSKAN, G. A., WULLSHLEGER, D. Diversity among population of Switchgrass based on RAPD markers. **Crop Sci.**, v. 36, p. 1017-1022, 1996.

GUPTA, R. Basil (*Ocimum* spp.) G-15 Gene banks for medicinal and aromatic plants Newsletter, v. 1, n. 5/6, p. 1-3, 1994.

HAIG, S. M.; RHYTMER, M.; HECKEL, D. G. Population differentiation in randomly amplified polymorphic DNA of red-cockaded woodpeckers *Picoides borealis*. **Molecular Ecology**, v. 3, p. 581-595, 1994.

HARBORNE, J. B. The plant and its biochemical adaptation to the environment. *Introduction to Ecological Biochemistry*, Academic Press, London , 1 – 27 , 1977.

HALWARD, T. M., STALKER, H. T., LA RUE, E. A., KOCHERT, G. Use simple-primer DNA amplifications in genetic studies of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant Mol. Biol.**, v. 18, n. 2, p. 315-325, 1992.

HARVEY, B. L. & FRALEIGH, B. Impacts on Canadian agriculture of the Convention on Biological Diversity. **Can. J. Plant Sci.**, v. 75, p. 17-21, 1995.

HECK, M. C. *Legislação e controle na coleta de plantas medicinais*. In: II WORKSHOP DE PLANTAS MEDICINAIS DE BOTUCATU – MESA REDONDA, 1996. **Resumo:** Botucatu, UNESP, 2000, p. 17-21.

HEGNAUER, R. Chemotaxonomie der Pflanzen, band IV. Birkhauser Verlag, Basel/Stuttgart, 1996.

KAMADA, T., CASALI, V.W.D., FINGER, F.L., FURTADO, M.R. Plasticidade fenotípica de caracteres morfológicos em acesso de manjerição. **Horticultura Brasileira**, v. 18, p. 925-926, 2000.

KERCHER, S. & CONNER, J. K. Patterns of genetic variability within and among populations of wild radish, *Raphanus raphanistrum* (Brassicaceae). **American Journal Botany**. v. 83, n. 11, p. 1416-1421, 1996.

KOCHERT, G., HALVARD, T., BRANCH, W. D., SMPSON, C. E. RFLP variability in peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars and wild species. **Theor. Appl. Genet.**, v. 81, p. 565-570, 1990.

MALAVOLTA, E. *Nutrição Mineral*. **In:** FERRI, M. G. Fisiologia Vegetal 1. São Paulo: EDUSP, 1979. p. 97-113.

MANN, J. *Chemical Aspects of Biosynthesis*. Oxford University Press, Oxford. 1994.

MARTINS, E.R. *Morfologia interna e externa, caracterização e óleo essencial de Ocimum selloi Benth.* Viçosa, 1996. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa.

MARTINS, E. R. Estudos em *Ocimum selloi* Benth: isoenzimas, morfologia e óleo essencial. **In:** *Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares: Avanços na Pesquisa Agronômica*, Ed. da UNESP, v. 1, p. 193-217, 1998.

McLAFFERTY, F. W., STAUFFER, D. *The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data*, v. 1 –6, New York : John Wiley Sons, 1989.

MENDES, M. F. B. S. *Caracterização morfo-anatômica, fitoquímica em molecular de 8 formas de Lippia alba (Mill.) N.E.Br ex Britt & Wilson (Verbenaceae)*, Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Agronômicas – Universidade Estadual Paulista (Unesp), Botucatu, São Paulo, Brasil, 2001.

MENTZ, L. A. Minicurso: Coleta e identificação de plantas medicinais. **In:** *XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*, Florianópolis - SC (anais), 1996.

Proposta de Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos – Fórum Brasília - 17,18 e 19 de dezembro de 2001, <http://www.saude.gov.br/sps>.

MING, L. C. *Influência de diferentes níveis de adubação orgânica na produção de biomassa e teor de óleos essenciais de Lippia alba (Mill.) N. E. Br. Verbenaceae*. Curitiba, 1992. 206p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas/Botânica) – Ciências Biológicas – Universidade Federal do Paraná.

MOLDENKE, H. N. Materials toward a monograph of the genus *Lippia* . **Phytologia**, v. 12, n. 1, p. 6-71, 1965.

MORAES, P. L. R., MONTEIRO, R., VENCOVSKY, R. Genetic differentiations and diversity of natural populations of *Cryptocarya* spp. (Lauraceae) from the Brazilian Atlantic rain forest. **Lundiana**, v. 3, n. 2, p. 99-109, 2002.

MORAIS, L. A. S. de; FACANALI, R.; MARQUES, M. O. M.; MING, L. C.; MEIRELES, M. A. A. Phytochemical characterization of essential oil of *Ocimum selloi* Benth. **An. Acad. Brasil. Ciênc.**, v. 74, n. 1, p. 183-186, 2002.

MORHY, L. Metilchavicol , cis e trans-Anetol no óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth, **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 45, n. 3/4, p. 401-412, 1973.

MONAGHAN, B. G., HALLORAN, G. M. RAPD variation within and between natural populations of morana [*Tylosema esculentum* (Burchell) Schreiber] in southern Africa. **S. Afr. J. Bot.**, v. 62, n. 6, p. 287-291, 1996.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 55, p. 335-350, 1987.

NODARI, R. O . & GUERRA, M . P. *Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos*. **In:** Simões *et al.* 1999. *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade UFRGS/UFSC, 1999. p. 11-24.

NODARI, R. O . & GUERRA, M . P. *Aspectos Genéticos e Moleculares da Produção Vegetal*. **In:** Simões *et al.* 1999. *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade UFRGS/UFSC, 1999. p. 25-28.

OLIVEIRA, J. E. Z., AMARAL, C. L. F., CASALI, V. W. D. *Recursos genéticos e perspectivas do melhoramento de plantas medicinais*. **In:** QUEIROZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. *Recursos genéticos e melhoramento de plantas para nordeste brasileiro. (on line)*. Versão 1.0. Petrolina-PE. Embrapa Semi-Arido. Brasília-DF. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 1999. <http://www.capta.embrapa.br>.

OHASHI, S. T., KAGEYAMA, P. Y., COSTA, L. G. S. Variação genética entre populações de *Euterpe oleraceae* Mart. Do estuário amazônico. **In:** CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSENCIAS NATIVAS. Anais. São Paulo: Unipress, v. 4, p. 1246- 1251, 1992.

PATON, A., HARLEY, R. M., HARLEY, M. M. *Ocimum* – an overview of relationships and classification. In: Holm, Y.; HILTUNEN, R. *Ocimum. Medicinal and aromatic plants – industrial profiles*. Series Ed. Hardman, Harwood Academic, Amsterdam, p. 1-38, 1999

PENNER G.A., BUSH A., WISE R., KIM W., DOMIER L., KASHA K., LAROCHE A., SCOLES G., MOLNAR S.J., FEDAK G. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories, **PCR Methods and Applications**. v. 2, p. 341-345, 1993.

PEREIRA, A. M. S. Micropropagação de espinheira-santa (*Maytenus aquifolia* Mart e *Maytenus ilicifolia* Mart.). **In:** Plantas medicinais aromáticas e condimentares avanços na pesquisa agronômica. v. 2, p. 19-32, 1998.

POSER, G. L. V., MENTZ, L. A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. **In:** SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P. de, MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2001. p. 61-74.

RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. *Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo*, 2. ed. rev., Campinas, Instituto Agrônomo/FUNDAG, Boletim 100, 285 p., 1997. (IAC – BOLETIM TÉCNICO, 100).

ROBERTS, J. E., SPEEDIE, M. K., TYLER, V. E. Pharmacognosy and pharmacobiotechnology. *Baltimore: Williams & Wilkins*, 1996.

ROHLF, F. J. Adaptive hierarchical clustering schemes. *Sist. Zool.*, v. 19, p. 58-82, 1992.

SAITO, M.& LUCCHINI, F. *Substâncias obtidas de plantas e a procura por praguicidas eficientes e seguros ao meio ambiente*. Jaguariuna: EMBRAPA - CNPMA, 46 p., 1998.

SCHEFFER, M. C.; MING, L. C.; ARAUJO, A. J. de. *Conservação de recursos genéticos de plantas medicinais*. **In:** QUEIROZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. *Recursos genéticos e melhoramento de plantas para nordeste brasileiro*. (on line). Versão 1.0. Petrolina-PE. Embrapa Semi-Arido. Brasília-DF. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 1999. <http://www.capta.embrapa.br>.

SCHMIDT, J. A.. Labiatae. **In:** Martius, K. F. P. *Flora Brasiliensis: Enumerato plantarum in Brasíliã*, New York, Wheldon & Wesley, p. 117 - 338. 1858.

SIMÕES, C. M. O., SPITZER, V. *Óleos Voláteis*. **In:** SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P. de, MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2001. p. 397-428.

SNEATH, P. H. A., SOKAL, R. R. *Numerical taxonomy*. San Francisco: W. H. Freeman, 1973. 573p.

SIQUEIRA, A. C. M. De F., SEBBENI, A. M., ETTORI, L. de C., NOGUEIRA, J. C. B. Variação genética entre e dentro de populações de *Balfourodendron riedelianum* (Engler) Engler para conservação “*ex situ*”. **Revista do Instituto Florestal**, v.12, n. 2, p. 89-103, 2000.

TEUSCHER, E. *Pharmazeutische Biologie*. Braunschweig: Vieweg, 1990.

VALE, T.G., MATOS, F. J. A., VIANA, G. S. B. *Efeito anticonvulsivante do óleo essencial de Lippia alba (Mill.) N. E. Brown: um estudo comparativo das variedades carvoneífera e citralífera*. **In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL**, 14, Florianópolis, 1996. **Resumos**. Florianópolis, 1996. p. 607.

VAN DEN DOOL H & KRATZ D. J. A generalization of the retention index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography, **J. Chromatography**, v. 11, p. 463-467, 1963.

VANDERLINE, F. A., COSTA, E. A., D'ANGELO, L. C. A. Atividades farmacológicas gerais e atividade antiespasmódica do extrato etanólico de *Ocimum selloi* Benth, (elixir paregórico). **In: ANAIS DO SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL**, Fortaleza, UFCE, 1994.

VIEIRA, R. F. Espécies medicinais prioritárias para conservação-levantamento preliminar. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1993. **Comunicado técnico**, 14.

VIEIRA, R. F. Coleta e conservação de recursos genéticos de plantas medicinais. **In:** I CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA E TERAPIAS NATURAIS. 1994. 6p.

VIEIRA, R. F. Conservation of medicinal and aromatic plants in Brazil. **In:** JANIK, J. *News Crops and New Uses: Biodiversity and Agricultural Sustainability*. ASHS press: Alexandria, p. 152-159. 1999.

VIEIRA, R. F.; GRAYER, R. J.; PATON, A. & SIMON, J. E. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 287-304, 2001.

WELSH J. & McCLELLAND M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, **Nucleic Acids Res.**, v. 18, p. 7213-7224, 1990.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.K.; LIVAK, J.L.; RAFASLA, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, p. 6531-5, 1990.

WINDHOLZ, M. (Ed.). *The Merk Index: an encyclopedia of chemical and drugs*. 9. ed. Rahaway: Merk, 1976.

WHITE, T.J.; ARNHEIM, N.; ERLICH, H.A. The polymerase chain reaction. **Trends in Genetics**, v. 5, p. 185-189, 1989.

WOLFF, K., AKKAD, E. L., ABBOTT, R. J. Population substructure in *Alkana orientalis* (Boraginaceae) in the Sinai Desert in relation to its pollinator behaviour. **Molecular ecology**, v. 6, p. 365-372. 1997.

APÊNDICE

Apêndice 1. Relação das coordenadas (latitude e longitude) e altitude de todos os acessos coletados de *Ocimum selloi* Benth. Botucatu-SP, 2003.

População	Acesso	Latitude	Longitude	Altitude (m)
Iporanga/SP	VR 1	S 24° 34' 47,6"	WO 48° 37' 50,6"	105
	VR 2	S 24° 34' 34,0"	WO 48° 37' 31,5"	104
	VR 3	S 24° 34' 28,1"	WO 48° 37' 27,8"	104
	VR 4	S 24° 34' 25,0"	WO 48° 37' 27,8"	195
	VR 5	S 24° 34' 23,0"	WO 48° 37' 24,6"	182
	VR 6	S 24° 34' 21,4"	WO 48° 37' 22,8"	208
	VR 7	S 24° 34' 17,9"	WO 48° 37' 20,2"	190
	VR 8	S 24° 34' 14,2"	WO 48° 37' 16,2"	215
	VR 9	S 24° 34' 10,7"	WO 48° 37' 14,0"	244
	VR 10	S 24° 34' 09,4"	WO 48° 37' 12,2"	208
	VR 11	S 24° 34' 08,2"	WO 48° 37' 10,5"	213
	VR 12	S 24° 34' 06,3"	WO 48° 37' 10,3"	202
	VR 13	S 24° 33' 45,4"	WO 48° 40' 16,0"	175
	VR 14	S 24° 33' 35,7"	WO 48° 40' 32,8"	220
	VR 15	S 24° 33' 36,7"	WO 48° 40' 32,5"	217
	VR 16	S 24° 33' 37,1"	WO 48° 40' 32,6"	221
	VR 17	S 24° 33' 26,5"	WO 48° 40' 34,8"	204
	VR 18	S 24° 33' 26,5"	WO 48° 40' 35,5"	208
	VR 19	S 24° 33' 26,5"	WO 48° 40' 36,0"	208
	VR 20	S 24° 33' 25,9"	WO 48° 40' 36,4"	208
Piquete/SP	PQ 01	S 22° 36' 26,9"	WO 45° 14' 03,6"	875
	PQ 02	S 22° 36' 25,5"	WO 45° 14' 09,0"	875
	PQ 03	S 22° 36' 25,5"	WO 45° 14' 09,0"	875
	PQ 04	S 22° 36' 25,5"	WO 45° 14' 09,0"	875
	PQ 05	S 22° 36' 25,2"	WO 45° 14' 09,0"	887
	PQ 06	S 22° 36' 25,5"	WO 45° 14' 09,8"	887
	PQ 07	S 22° 36' 22,0"	WO 45° 14' 14,0"	890
	PQ 08	S 22° 36' 23,5"	WO 45° 14' 14,6"	959
	PQ 09	S 22° 36' 23,3"	WO 45° 14' 14,8"	956
	PQ 10	S 22° 36' 23,3"	WO 45° 14' 14,7"	958
	PQ 11	S 22° 36' 23,3"	WO 45° 14' 14,7"	958
	PQ 12	S 22° 36' 26,1"	WO 45° 14' 09,1"	938
	PQ 13	S 22° 36' 26,3"	WO 45° 14' 08,8"	948
	PQ 14	S 22° 36' 29,9"	WO 45° 13' 59,1"	918
	PQ 15	S 22° 36' 29,9"	WO 45° 13' 59,1"	918
	PQ 16	S 22° 36' 30,2"	WO 45° 13' 57,4"	901
	PQ 17	S 22° 36' 30,5"	WO 45° 13' 56,9"	912
	PQ 18	S 22° 36' 30,8"	WO 45° 13' 57,5"	873
	PQ 19	S 22° 36' 37,3"	WO 45° 13' 53,9"	891
	PQ 20	S 22° 36' 44,2"	WO 45° 13' 50,4"	869

Continuação do Apêndice 1.

Adrianópolis/PR	ADR 1	S 24° 42' 17,1"	WO 48° 50' 24,7"	180
	ADR 2	S 24° 42' 16,9"	WO 48° 50' 24,7"	199
	ADR 3	S 24° 42' 18,6"	WO 48° 50' 26,3"	201
	ADR 4	S 24° 42' 38,1"	WO 48° 50' 38,0"	264
	ADR 5	S 24° 42' 37,8"	WO 48° 50' 37,9"	274
	ADR 6	S 24° 42' 37,6"	WO 48° 50' 37,5"	280
	ADR 7	S 24° 42' 37,2"	WO 48° 50' 37,3"	292
	ADR 8	S 24° 42' 37,3"	WO 48° 50' 37,3"	283
	ADR 9	S 24° 42' 36,7"	WO 48° 50' 37,0"	291
	ADR 10	S 24° 42' 36,8"	WO 48° 50' 36,3"	280
	ADR 11	S 24° 42' 36,7"	WO 48° 50' 37,3"	284
	ADR 12	S 24° 42' 36,6"	WO 48° 50' 37,4"	282
	ADR 13	S 24° 42' 36,7"	WO 48° 50' 37,1"	284
	ADR 14	S 24° 42' 36,7"	WO 48° 50' 37,1"	278
	ADR 15	S 24° 42' 36,7"	WO 48° 50' 36,5"	263
	ADR 16 I	S 24° 42' 06,9"	WO 48° 50' 24,5"	170
	ADR 16 II	S 24° 42' 06,9"	WO 48° 50' 24,5"	170
	ADR 17	S 24° 42' 07,0"	WO 48° 50' 24,5"	172
	ADR 18	S 24° 42' 06,9"	WO 48° 50' 24,5"	164
	ADR 19	S 24° 42' 03,6"	WO 48° 50' 23,6"	165
	ADR 20	S 24° 42' 03,6"	WO 48° 50' 23,6"	157

Apêndice 2. Análise dos solos coletados em Iporanga/SP, Adrianópolis/PR e Piquete/SP nas profundidades de 0 a 20 cm. Botucatu – SP, 2004.

LABORATÓRIO DE FERTILIDADE DO SOLO
RESULTADOS DE ANÁLISE DE SOLO

INTERESSADO: Roselaine Facanali
PROCEDÊNCIA: DPV - Horticultura / Prof. Lin

AMOSTRA(S)		BORO	COBRE	FERRO	MANGANÊS	ZINCO
Labor.		mg/dm ³				
	Int.	-----				
LP 41	1	0,23	1,7	80	15,3	4,8
LP 42	2	0,28	1,6	161	55,9	5,3
LP 43	3	0,23	4,1	129	166,6	2,9
LP 44	4	0,54	1,1	41	15,0	2,5
LP 45	5	0,45	2,7	42	56,1	5,0

Botucatu, 02 de outubro de 2003 Prof. Dr. Leonardo Theodoro Büll Prof. Dr. Dirceu M. Fernandes
Responsável Responsável

Classe	B	Cu	Fe	Mn	Zn
	Água quente	DTPA	DTPA	DTPA	DTPA
----- mg/dm ³ -----					
Baixo	0,0 - 0,20	0,0 - 0,2	0 - 4	0,0 - 1,2	0,0 - 0,5
Médio	0,21 - 0,60	0,3 - 0,8	5 - 12	1,3 - 5,0	0,6 - 1,2
Alto	>0,60	>0,8	>12	>5,0	>1,2

###	###	67	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	68	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	69	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	70	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	71	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!

###	###	77	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	78	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	79	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	80	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	81	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	82	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	83	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	84	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	85	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	86	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	87	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	88	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	89	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	90	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	91	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	92	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	93	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	94	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	95	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	96	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	97	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	98	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!

###	###	99	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	100	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	101	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	102	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	103	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	104	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	105	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	106	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	107	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	108	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	109	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	110	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	111	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	112	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	113	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	114	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	115	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	116	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!

LABORATÓRIO DE FERTILIDADE DO SOLO
RESULTADOS DE ANÁLISE DE SOLO

INTERESSADO: Roselaine Facanali

PROCEDÊNCIA: DPV - Horticultura / Prof. Lin

AMOSTRA(S)		pH	M.O.	P _{resina}	Al ³⁺	H+A1	K	Ca	Mg	SB	CTC	V%	S
Labor.	Int.	CaCl ₂	g/dm ³	mg/dm ³	mmol _c /dm ³								
LP 41	1	5,7	30	9	---	18	0,8	70	7	78	96	81	---
LP 42	2	5,0	40	12	---	34	1,1	36	9	46	81	57	---
LP 43	3	4,6	40	10	---	52	1,5	21	4	26	79	34	---
LP 44	4	7,0	74	29	---	9	3,1	270	16	289	298	97	---
LP 45	5	6,3	49	13	---	18	1,3	75	24	100	118	85	---

Botucatu, 30 de setembro de 2002 Prof. Dr. Leonardo T. BüllProf. Dr. Dirceu M. Fernandes
Responsável Co-Responsável

Classe	P resina				Al	S-SO42	K	Ca	Mg	pH	V%	Metodologia
	Floresta	Perenes	Anuais	Hortaliças								
M. Baixo	0 - 2	0 - 5	0 - 6	0 - 10			0,0 - 0,7			Até - 4,3	0 - 25	De acordo com o BT
Baixo	3 - 5	6 - 12	7 - 15	10 - 25	< 5	0 - 4	0,8 - 1,5	0 - 3	0 - 4	4,4 - 5,0	26 - 50	81 do IAC (P, K, Ca,
Médio	6 - 10	13 - 30	16 - 40	25 - 60		5 - 10	1,6 - 3,0	4 - 7	5 - 8	5,1 - 5,5	51 - 70	Mg) - Extração pela
Alto	10 - 20	31 - 60	41 - 80	61 - 120	> 5	> 10	3,1 - 6,0	> 7	> 8	5,6 - 6,0	71 - 90	resina trocadora de
M. Alto	> 20	> 60	> 80	> 120			> 6,0			> 6,0	> 90	ions.

LABORATÓRIO DE FERTILIDADE DO SOLO
RESULTADOS DE ANÁLISE DE SOLO

INTERESSADO: Roselaine Facanali

PROCEDÊNCIA: DPV - Horticultura / Prof. Lin

AMOSTRA(S)		pH	M.O.	P _{resina}	Al ³⁺	H+Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	V%	S
Labor.	Int.	CaCl ₂	g/dm ³	mg/dm ³	mmol _c /dm ³								
LX 71	1	4,9	42	15	---	34	4,9	29	24	58	92	63	---
LX 72	2	5,6	53	89	---	31	2,9	88	60	151	182	83	---
LX 73	3	5,4	49	53	---	26	4,4	61	30	95	122	78	---
LX 74	4	5,1	29	47	---	26	2,3	37	15	54	80	67	---
LX 75	5	5,5	20	14	---	16	3,3	23	18	45	61	73	---

Botucatu, 14 de novembro de 2002				Prof. Dr. Leonardo T. Büll				Prof. Dr. Dirceu M. Fernandes					
Responsável												Co-Responsável	
Classe	P resina			Al	S-SO42-	K	Ca	Mg	pH	V%	Metodologia		
	Florestais	Perenes	Anuais									Hortaliças	
M. Baixo	0 - 2	0 - 5	0 - 6	0 - 10		0,0 - 0,7				Alé - 4,3	0 - 25	De acordo com o BT	
Baixo	3 - 5	6 - 12	7 - 15	10 - 25	< 5	0 - 4	0,8 - 1,5	0 - 3	0 - 4	4,4 - 5,0	26 - 50	81 do IAC (P, K, Ca)	
Médio	6 - 10	13 - 30	16 - 40	25 - 60		5 - 10	1,6 - 3,0	4 - 7	5 - 8	5,1 - 5,5	51 - 70	Mg) - Extração pela	
Alto	10 - 20	31 - 60	41 - 80	61 - 120	> 5	> 10	3,1 - 6,0	> 7	> 8	5,6 - 6,0	71 - 90	resina trocadora de	
M. Alto	> 20	> 60	> 80	> 120			> 6,0			> 6,0	> 90	íons.	

LABORATÓRIO DE FERTILIDADE DO SOLO
RESULTADOS DE ANÁLISE DE SOLO

INTERESSADO: Roselaine Facanali
PROCEDÊNCIA: DPV - Horticultura / Prof. Lin

AMOSTRA(S)		BORO	COBRE	FERRO	MANGANÊS	ZINCO
Labor.		mg/dm ³				
	Int.					
LX	71 1	0,21	2,4	162	68,2	8,6
LX	72 2	0,25	6,9	344	36,7	7,6
LX	73 3	0,20	4,0	202	59,8	6,4
LX	74 4	0,16	2,8	126	44,0	15,6
LX	75 5	0,12	1,9	98	34,3	5,2

Botucatu, 14 de novembro de 2003 Prof. Dr. Leonardo Theodoro Büll Prof. Dr. Dirceu M. Fernandes

Classe	Responsável				Responsável	
	B	Cu	Fe	Mn	Zn	
	Água quente	DTPA	DTPA	DTPA	DTPA	
----- mg/dm ³ -----						
Baixo	0,0 - 0,20	0,0 - 0,2	0 - 4	0,0 - 1,2	0,0 - 0,5	
Médio	0,21 - 0,60	0,3 - 0,8	5 - 12	1,3 - 5,0	0,6 - 1,2	
Alto	>0,60	>0,8	>12	>5,0	>1,2	

###	###	68	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	69	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	70	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	71	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!

###	###	77	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	78	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	79	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	80	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	81	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	82	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	83	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	84	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	85	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	86	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	87	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	88	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	89	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	90	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	91	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	92	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	93	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	94	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	95	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	96	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	97	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	98	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	99	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!

###	###	100	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	101	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	102	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	103	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	104	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	105	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	106	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	107	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	108	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	109	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	110	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	111	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	112	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	113	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	114	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	115	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	116	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!

LABORATÓRIO DE FERTILIDADE DO SOLO
RESULTADOS DE ANÁLISE DE SOLO

INTERESSADO: Roselaine Facanali

PROCEDÊNCIA: DPV - Horticultura / Prof. Lin

AMOSTRA(S)		pH	M.O.	P _{resina}	Al ³⁺	H+Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	V%	S
Labor.	Int.	CaCl ₂	g/dm ³	mg/dm ³	mmol _c /dm ³								
QD 74	1	4,7	30	9	---	34	3,9	15	4	23	57	40	---
QD 75	2	4,8	24	5	---	36	3,0	15	9	27	63	43	---
QD 76	3	4,9	66	14	---	42	5,7	43	11	60	102	59	---
QD 77	4	4,2	23	6	---	58	1,5	15	3	20	78	26	---
QD 78	5	4,4	39	14	---	47	3,9	18	5	27	74	36	---

Botucatu, 19 de setembro de 2003 Prof. Dr. Leonardo T. Büll Prof. Dr. Dirceu M. Fernandes
Responsável Co-Responsável

Classe	Presina				Al	S-SO42-	K	Ca	Mg	pH	V%	Metodologia
	Florestais	Perenes	Anuais	Hortaliças								
M. Baixo	0 - 2	0 - 5	0 - 6	0 - 10			0,0 - 0,7			Até - 4,3	0 - 25	De acordo com o BT
Baixo	3 - 5	6 - 12	7 - 15	10 - 25	< 5	0 - 4	0,8 - 1,5	0 - 3	0 - 4	4,4 - 5,0	26 - 50	81 do IAC (P, K, Ca,
Médio	6 - 10	13 - 30	16 - 40	25 - 60		5 - 10	1,6 - 3,0	4 - 7	5 - 8	5,1 - 5,5	51 - 70	Mg) - Extração pela
Alto	10 - 20	31 - 60	41 - 80	61 - 120	> 5	> 10	3,1 - 6,0	> 7	> 8	5,6 - 6,0	71 - 90	resina trocadora de
M. Alto	> 20	> 60	> 80	> 120			> 6,0			> 6,0	> 90	íons.

LABORATÓRIO DE FERTILIDADE DO SOLO
RESULTADOS DE ANÁLISE DE SOLO

INTERESSADO: Roselaine Facanali
PROCEDÊNCIA: DPV - Horticultura / Prof. Lin

AMOSTRA(S)		BORO	COBRE	FERRO	MANGANÊS	ZINCO
Labor.		mg/dm ³				
	Int.					
QD 74	1	0,50	2,3	210	15,5	6,4
QD 75	2	0,44	1,3	84	10,0	3,5
QD 76	3	0,61	1,5	177	17,8	8,0
QD 77	4	0,41	1,0	102	8,8	9,9
QD 78	5	0,52	1,7	231	11,1	6,1

Botucatu, 30 de setembro de 2003
Prof. Dr. Leonardo Theodoro Büll
Prof. Dr. Dirceu M. Fernandes

Classe		B	Cu	Fe	Mn	Zn
		Água quente	DTPA	DTPA	DTPA	DTPA
mg/dm ³						
Baixo		0,0 - 0,20	0,0 - 0,2	0 - 4	0,0 - 1,2	0,0 - 0,5
Médio		0,21 - 0,60	0,3 - 0,8	5 - 12	1,3 - 5,0	0,6 - 1,2
Alto		>0,60	>0,8	>12	>5,0	>1,2

###	###	67	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	68	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	69	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	70	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	71	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!

###	###	77	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	78	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	79	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	80	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	81	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	82	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	83	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	84	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	85	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	86	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	87	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	88	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	89	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	90	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	91	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	92	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	93	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	94	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	95	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	96	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	97	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	98	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!

###	###	99	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	100	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	101	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	102	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	103	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	104	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	105	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	106	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	107	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	108	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	109	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	110	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	111	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	112	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	113	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	114	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	115	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!
###	###	116	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!	#REF!