

Genetic divergence among mentrasto accessions based on RAPD markers at Tocantins State

Elainy Martins Oliveira^{1,*}, Waldesse Oliveira Junior², Jaqueline Oliveira², Henrique Guilhon de Castro³

ABSTRACT

Ageratum conyzoides (Asteraceae) is known in Brazil for its medicinal properties being mainly used as painkiller and anti-inflammatory. Due to the existence of few genetic studies for this species, this work aimed to characterize the genetic diversity among nine accessions from different sites at Tocantins state, to provide information about its genetic resources. Similarity coefficients obtained varied from 48% to 80%, result of amplification of 102 fragments, of which 72 (70.5%) were polymorphic. Groupment analysis allowed the differentiation in three groups. One of them was distinguished because it presented the highest similarity among all, being composed by ANA and NAT (80% similarity). In general, these data showed there is low degree of association between the geographic location of the accessions and the genetic distances. So, the collected accessions in Tocantins state presented considerable genetic variability and the efficiency of RAPD markers for such characterization was here proven.

Key-words: *Ageratum conyzoides*, genetic variability, medicinal plants.

Divergência genética entre acessos de mentrasto do Estado do Tocantins através de marcadores RAPD

RESUMO

O mentrasto, *Ageratum conyzoides* (Asteraceae), é conhecido no Brasil por suas propriedades medicinais, sendo usado principalmente como analgésico e anti-inflamatório. Como existem poucos estudos genéticos dessa espécie, este trabalho buscou caracterizar a diversidade genética, com base em marcadores RAPD, entre nove acessos provenientes de diferentes municípios do Tocantins, para fornecer informações sobre seus recursos genéticos. Os coeficientes de similaridades obtidos variaram de 48 a 80%, considerando a análise de 102 fragmentos dentre os quais 72 (70.5%) foram polimórficos. A análise de agrupamento permitiu a diferenciação de três grupos. O grupo com maior similaridade genética (80%) foi composto pelos acessos ANA e NAT. No geral, os dados mostraram haver pouca relação entre a origem geográfica dos acessos e o padrão de divergência genética obtido. Assim, os acessos coletados no Tocantins apresentaram considerável variabilidade genética e os marcadores RAPD foram adequados para esta caracterização.

Palavras-chave: *Ageratum conyzoides*, variabilidade genética, plantas medicinais.

*Autor para correspondência.

¹Departamento de Ciências Exatas e Biotecnológicas; Universidade Federal do Tocantins; 77402-970; Gurupi - TO – Brasil. biocris@uft.edu.br

²Laboratório de Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins; 77001-090; Palmas - TO – Brasil.

³Departamento de Ciências Agrárias e Tecnológicas; Universidade Federal do Tocantins; 77402-970; Gurupi - TO - Brasil.

INTRODUÇÃO

A ampla diversidade em populações naturais de plantas disponibiliza grande potencial de genes e alelos de interesse em programas de melhoramento genéticos. Nesse contexto, a conservação de plantas medicinais é uma estratégia fundamental para garantir a manutenção de sua variabilidade genética, possibilitando futuros trabalhos de bioprospecção gênica e de metabólitos secundários, produtos de interesse obtidos destas. A flora medicinal brasileira é riquíssima, com inúmeras espécies utilizadas na medicina popular, porém a grande maioria destas espécies requer estudos básicos que viabilizem sua conservação (Melo et al., 2009).

A diversidade genética em plantas pode ser determinada por meio de características morfológicas e agrônômicas, isoenzimas e análises de marcadores moleculares (Liu, 1997; Xu et al., 2003). Neste cenário, os progressos da biologia molecular vêm proporcionando o desenvolvimento de ferramentas de grande eficiência para as estratégias de conservação *in situ* e *ex situ*, bem como a caracterização da diversidade existente (Santos et al., 2011).

Marcadores moleculares permitem acessar a variabilidade genética ao nível de DNA das plantas. Existem diferentes técnicas que permitem identificar diretamente o polimorfismo de DNA e, portanto, marcar sequências ou partes específicas do mesmo. Com marcadores moleculares é possível ter para cada gene de grande efeito um ou mais marcadores que podem ser utilizados para a identificação do fenótipo desejado (Milach, 1998). Marcadores como RAPD, Microsatélite e AFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados) são alguns dos mais utilizados em estudos genéticos (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Os marcadores RAPD permitem distinguir genótipos de forma eficaz, uma vez que facilitam a identificação de casos de sinonímias e homonímias entre cultivares; e auxiliam na seleção dos indivíduos que poderão ser utilizados para compor bancos de germoplasma ou serem utilizados no melhoramento genético (Paula et al., 2012).

Os marcadores baseados em PCR (*Polymerase Chain Reaction*), como o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), têm sido usados com sucesso na análise de distância genética em várias espécies de plantas (Lin et al., 2009; Santos et al., 2011; Oliveira et al., 2012), mostrando ser eficiente na caracterização da variação genética

entre organismos próximos, dentro e entre espécies de uma população.

A técnica de RAPD também se mostra como uma ferramenta útil para a análise da diversidade genética molecular em populações naturais de plantas (Silveira et al., 2009). Essa técnica distingue-se das demais pelo fato de utilizar *primers* com 10 pares de bases de extensão, cuja sequência nucleotídica é arbitrária, ao contrário das outras que requerem informações a respeito da sequência do DNA alvo para o desenho de *primers* específicos (Williams et al., 1990). Dentre as diversas técnicas utilizadas, RAPD é a de menor custo, número de etapas e tempo para obter os resultados, além de fácil execução. Contudo, apresenta a desvantagem de ser de baixa repetibilidade e pouca consistência de um laboratório para o outro, o que dificulta a comparação de dados obtidos em diferentes locais (Milach, 1998). Em geral, como não é necessário conhecimento prévio sobre o genoma da espécie avaliada e os *primers* utilizados são aleatórios, uma série de reações costumam ser realizadas (cada reação um *primer*) para se avaliar polimorfismo através de RAPD. No entanto, alguns trabalhos têm sugerido que quando a variabilidade genética é elevada em uma população, o uso de poucos *primers*, ou um menor número de reações seriam suficientes (Millan et al., 1996; Li et al., 1999), o que reduziria custo e tempo operacional. Vale ressaltar que para o mentrasto, praticamente não há trabalhos de análise genética e deste modo, é interessante iniciar o estudo da espécie com marcadores de baixo custo e com rápidos resultados, verificando se há ou não variação genética na espécie.

O mentrasto (*Ageratum conyzoides* L.) é uma planta herbácea anual pertencente à família Asteraceae, sendo conhecida popularmente como erva-de-são-joão, picão-roxo ou mentrasto (Millani et al., 2010). É uma planta nativa da América tropical com adaptação a diversas condições ambientais, estabelecendo-se em várias regiões de clima tropical e subtropical do mundo. Nos países onde ocorre, pode ser encontrada desde o nível do mar até 3000 metros de altitude, quando a temperatura está acima de 10°C (Castro et al., 2008).

A. conyzoides, possui uso medicinal difundido pela população no Brasil e em outros países. A sua ampla utilização deve-se à inclusão na lista da Central de Medicamentos, sendo preconizada pelo Ministério da Saúde, como medicamento

antirreumático. O óleo essencial de mentrasto é conhecido no Brasil e em outros países da América devido suas propriedades como analgésico, anti-inflamatório e cicatrizante, sendo empregado como fitoterápico (Soares et al., 2011). Entretanto, pouco se conhece sobre a biodiversidade genética dessa espécie. Além disso, por causa da intensa utilização pela população de baixa renda e das múltiplas utilidades atribuídas ao mentrasto, esforços para analisar a diversidade genética dessa espécie têm importância científica, prática e econômica.

Um estudo da divergência genética entre acessos de mentrasto foi recentemente realizado no Estado do Tocantins, mostrando divergência entre tais acessos, avaliados através de caracteres morfológicos (Castro et al., 2011). No entanto, são escassos os trabalhos envolvendo marcadores moleculares na caracterização da diversidade genética dessa espécie (Soares et al., 2011; Millani et al., 2010; Castro et al., 2008; Castro et al., 2006; Castro et al., 2004a; Castro et al., 2004b). No presente trabalho foram estudados os acessos também avaliados por Castro et al. 2011.

Este estudo teve por objetivo caracterizar a diversidade genética com base em marcadores

moleculares do tipo RAPD, entre acessos de mentrasto coletados em diferentes cidades no Estado do Tocantins. Assim, o trabalho procurou agregar informações básicas para futuros programas de melhoramento e obtenção de um panorama que subsidie melhores estratégias de manejo dessa planta medicinal.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Nove acessos de mentrasto foram comparados usando marcadores RAPD. Os acessos foram provenientes de cinco diferentes regiões climáticas do Estado do Tocantins, segundo o método de Thornthwaite & Mather (1955). Assim, a coleta das sementes foi realizada em plantas individuais, tomadas ao acaso em vários municípios e como *out group* foi utilizado um exemplar da cultivar BD#115 de batata-doce do Banco de Germoplasma da UFT (Tabela 1). Em cada área foram coletadas sementes de 15 plantas e, posteriormente, retirada a mesma quantidade de sementes por planta para a formação do *bulk* e a implantação do experimento.

Tabela 1. Relação dos municípios onde foram realizadas as coletas dos acessos (*Ageratum conyzoides*) estudados e seus respectivos códigos.

Identificação	Origem	Código	Latitude e longitude	Clima*
01	Formoso	FOR	11°47'S, 49°32'W	B2rA'a'
02	Gurupi	GUR	11°43'S, 49°03'W	B1wA'a'
03	Aliança	ALI	11°18'S, 48°56'W	B1wA'a'
04	Ananás	ANA	06°22'S, 48°05'W	C2rA'a'
05	Natividade	NAT	11°37'S, 47°45'W	C2wA'a'
06	Arraias	ARR	12°55'S, 46°57'W	C1dA'a'
07	Novo Alegre	NOV	12°55'S, 46°34'W	C1dA'a'
08	Taguatinga	TAG	12°24'S, 46°21'W	C1dA'a'
09	Combinado	COM	12°47'S, 46°32'W	C1dA'a'
10	---	BD#115	---	

* B₂rA'a' - clima úmido, com pequena ou nula deficiência hídrica; B₁wA'a' - clima úmido, com moderada deficiência hídrica; C₂rA'a' - clima úmido subúmido, com pequena deficiência hídrica; C₂wA'a' - clima úmido subúmido, com moderada deficiência hídrica; C₁dA'a' - clima subúmido seco, com moderada deficiência hídrica.

O cultivo dos acessos foi realizado durante os meses de Outubro a Dezembro de 2005 em casa de vegetação, na área experimental da Universidade Federal do Tocantins – UFT, *campus* universitário de Palmas, localizado a uma latitude de 10°20'S e longitude de 48°35'W, em clima úmido com temperatura média de 27°C. A produção de mudas

para a propagação dos acessos foi realizada por sementes em bandejas de isopor, preenchidas com substrato comercial à base de vermiculita e carvão vegetal. As mesmas foram transplantadas para a unidade experimental 50 dias após a semeadura, onde se utilizou um vaso de seis litros com três

plantas, e uma mistura de terra e substrato comercial.

Extração e ampliações de DNA

O DNA foi extraído a partir de 50 mg de folhas jovens tomadas ao acaso, de três indivíduos de cada acesso, utilizando o método de extração CTAB, conforme o protocolo descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998), com modificações. Após a extração, a quantidade, a integridade e a pureza do DNA foram estimadas por espectrofotometria

(Modelo Ultraspec 1000, GE – HEALTHCARE, USA) e por eletroforese em gel de agarose 1%. As concentrações foram ajustadas para 20 ng/μL, que foi a concentração final da solução de trabalho.

A seleção dos *primers* foi realizada de acordo com aqueles que produziram um bom padrão de detecção e o maior número de fragmentos amplificados. No total, foram testados 30 primers (Operon Technologies, Alameda, CA), sendo selecionados 11 primers mais informativos quanto ao número de alelos.

Tabela 2. Sequência dos *primers* arbitrários usados para as reações de RAPD.

<i>Primers</i>	Sequência nucleotídica	Nf	Np
OPC – 18	5'-TGAGTGGGTG-3'	12	6
OPK – 11	5'-AATGCCCCAG-3'	12	11
OPL – 01	5'-GGCATGACCT-3'	8	7
OPM – 04	5'-GGCGGTTGTC-3'	6	5
OPM – 10	5'-TCTGGCGCAC-3'	12	9
OPM – 20	5'-AGGTCTTGGG-3'	12	7
OPN – 18	5'-GGTGAGGTCA-3'	5	4
OPT – 08	5'-AACGGCGACA-3'	11	9
OPT – 16	5'-GGTGAACGCT-3'	4	2
OPY – 17	5'-GACGTGGTGA-3'	10	8
OPY – 19	5'-TGAGGGTCCC-3'	10	4

Nf: número de fragmentos; Np: número de fragmentos polimórficos.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador modelo PxE *Thermal Cycler* (Thermo Electron Coporation), com um volume final de 15 μL, com 9,25 μL de água destilada, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 1X tampão da Taq polimerase (100 mM Tris-HCl, 500 mM de KCl), 10 pmoles de *primer*, 1U de Taq DNA Polimerase (LCG do Brasil, Rio de Janeiro RJ); e 40 ng de DNA. As condições de PCR foram: 94°C por 40s, 35°C por 1min, 72°C por 2min; sendo estas três etapas repetidas três vezes, seguidas por mais 37 ciclos de 94°C por 40s, 37°C por 40s, 72°C por 2min. Adicionalmente, houve a extensão

final de 72°C por 5 min e incubação de 4°C por 10min como etapa final.

Análise dos dados

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio (10mg/mL), tampão de 0,5x, fonte a 80W com 1h de corrida. A visualização foi feita em transluminador UV modelo LTA 20x20 (Loccus Biotecnologia), e fotografados para as análises. Os marcadores RAPD gerados foram convertidos em uma matriz de dados binários, a partir da qual foi calculada a similaridade genética pelo índice definido por Jaccard:

$$D_{ij} = \frac{a}{a + b + c}$$

sendo: a = número de casos em que ocorre a presença da banda em ambos os indivíduos, simultaneamente; b = número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo X; c = número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo Y. A partir desses índices, foi construído um dendograma, pelo método do UPGMA. Tais análises foram desenvolvidas por meio do *software* PAST, versão 1.44.

Estimativas de distâncias geográficas entre locais de coleta de 13 acessos foram calculadas de acordo com Steiner e Garcia de Los Santos (2001), utilizando-se as informações de latitude e longitude disponíveis (Tabela 1).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 30 *primers* testados, 11 foram selecionados pelo padrão de amplificação, sendo que todos apresentaram fragmentos polimórficos. Um total de 102 fragmentos foi gerado, com uma média de 9,27 por *primer* (Tabela 2). Castro et al. (2004) trabalhando com mentrasto, utilizaram 14 *primers* e obtiveram 26 bandas polimórficas, com média de 1,86 banda por *primer*, onde o número de bandas polimórficas variou de um a quatro por *primer* utilizado. Isso mostra que a média encontrada no presente trabalho foi maior.

Dentre os fragmentos de RAPD, 72 (70,5%) foram polimórficos, variando de dois (OPT-16) a 11 (OPK-11) fragmentos amplificados por *primer*, os quais foram utilizados na caracterização da variabilidade genética. A figura 1 mostra alguns dos marcadores gerados por um dos iniciadores selecionados. As similaridades genéticas obtidas entre os nove acessos de mentrasto, relativas aos 102 loci, variaram de 48 a 80%. Tais valores foram obtidos entre os acessos GUR e ARR e entre ANA e NAT, respectivamente.

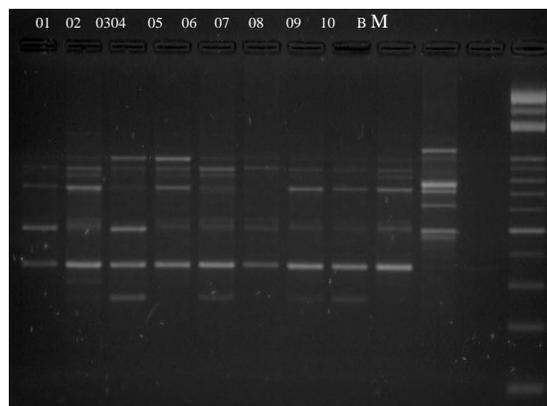


Figura 1 -Perfil eletroforético de um gel de RAPD utilizando o *primer* OPY-17 em 09 acessos de mentrasto, um de batata-doce (10), um controle (B) e na extremidade o padrão de peso molecular de 100 pb (M).

Melo et al.(2009), avaliando a divergência genética em *Lychnophora ericoides* Less.- Asteraceae, popularmente conhecida como arnica e constituinte da mesma família do mentrasto, obteve um índice de dissimilaridade variando entre 62 a 71%. Os mesmos autores afirmaram que os resultados obtidos com a técnica RAPD demonstram a clara separação genética entre as populações de arnica.

Por meio do dendograma obtido, verificou-se a separação dos acessos de mentrasto em 2 grupos principais, com ponto de corte a aproximadamente 65% (Fig. 2). Também houve a formação de um grupo isolado, formado pela batata-doce, apresentando a menor similaridade (17%) quando comparada aos diferentes acessos, como era esperado. Outro grupo formado pelos acessos ARR e FOR apresentou similaridade genética de 65%. No terceiro grupo, composto por sete acessos e subdividido em dois grupos, o coeficiente de similaridade variou de 63 a 80%, onde se destaca o subgrupo constituído por cinco acessos (ANA, NAT, COM, NOV e TAG). Segundo Castro et al. (2011) os acessos ALI, GUR, COM e NOV estiveram nos mesmos grupos, quando enfatizado as similaridades entre esses acessos com base no uso de características morfológicas. Podemos observar que os acessos COM e NOV se comportam de forma similar, tanto na avaliação molecular como na avaliação morfológica. Os acessos ANA (06°22'S) e NAT (11°37'S) mostraram a maior similaridade genética (80,51%) em relação aos demais acessos de mentrasto. Dessa forma, não houve relação entre os grupos de

similaridade genética (Fig. 2) e as distâncias geográficas (Tabela 3).

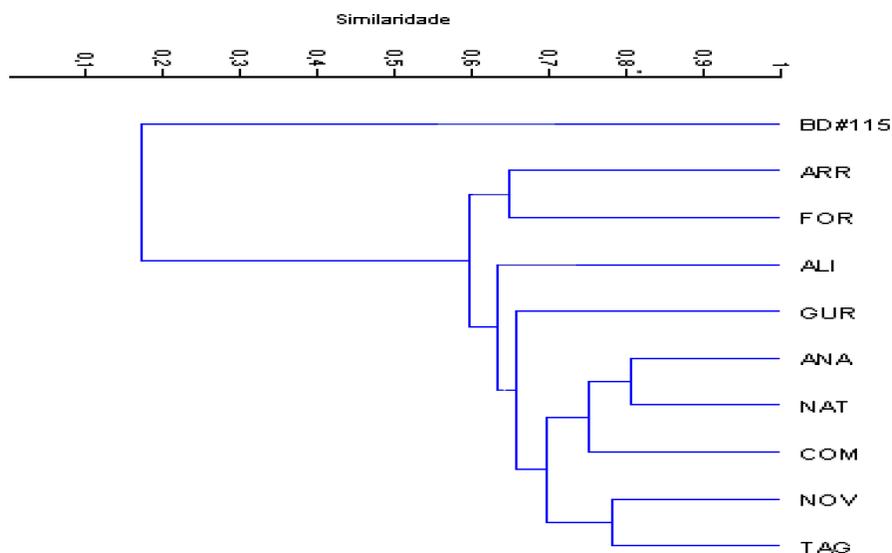


Figura 2 -Dendograma feito a partir de nove acessos de mentrasto e um de batata-doce (BD#115), por meio do índice de similaridade de Jaccard e agrupamento UPGMA.

Tabela 3. Distâncias geográficas (em km) entre os locais de coleta de 09 acessos de *Ageratum conyzoides*.

Acesso	FOR	GUR	ALI	ANA	NAT	ARR	NOV	TAG	COM
FOR	-								
GUR	98,68	-							
ALI	76,2	69,06	-						
ANA	191,74	175,8	135,65	-					
NAT	125,29	111,54	69,87	158,41	-				
ARR	275,55	250,58	185,71	276,53	166	-			
NOV	290,83	264,93	196,69	292,46	173,77	223,96	-		
TAG	288,81	263,12	194,09	294,08	171,88	220,11	217,09	-	
COM	291,28	265,36	196,91	293,24	173,94	223,72	222	216,46	-

No trabalho de Castro et al. (2011), os autores conseguiram formar vários grupos, de acordo com a época de colheita (Tabela 4). Na primeira época de colheita, dois grupos foram formados, onde o par mais divergente foi formado pelos acessos NAT e ARR enquanto o par menos divergente foi constituído pelos acessos ALI e TAG. Os acessos NAT e ARR também formaram o par mais divergente na segunda

época de colheita e o par menos divergente foi constituído pelos acessos ANA e TAG. De forma diferente, na terceira época de colheita os acessos ANA e TAG formaram o par mais divergente. Na quarta e ultima época de colheita avaliada o acesso TAG formou o par mais divergente com o acesso FOR e o acesso GUR formou o par menos divergente com o acesso ALI.

Tabela 4. Grupos de acessos similares de nove acessos de mentrasto (*Ageratum conyzoides*) estabelecidos por meio do método de Tocher, em quatro épocas de colheita.

Grupos	Épocas de colheita											
	21 Dat			42 Dat			63 Dat			84 Dat		
1	ALI NOV ARR	TAG FOR e COM	GUR ANA	ALI NOV e COM	TAG FOR	GUR ANA	ALI ARR	GUR COM	NOV e NAT	ALI NOV ARR	TAG NAT e COM	GUR ANA
2	NAT		ARR			FOR			FOR			
3	NAT						ANA					
4	TAG											

Fonte: Castro et al., 2011.

DAT: Dias após transplante.

Ainda no trabalho de Castro et al. (2011) foi observada uma variação na constituição dos grupos pelos acessos de acordo com o estágio de desenvolvimento no qual a divergência genética foi estimada, e portanto, a divergência genética entre acessos de mentrasto, avaliada por caracteres morfológicos, é influenciada pelo estágio de desenvolvimento da espécie e que, de uma forma geral, os acessos coletados na mesma região climática formaram grupo juntos. Este fato mostra a importância da coleta de germoplasma de *A. conyzoides* em diferentes regiões climáticas, com o objetivo de obter maior representatividade da variabilidade genética existente.

Os acessos COM, NOV e TAG, que apresentaram similaridade genética, estão na mesma região climática, sugerindo que existe influência climática na divergência genética (Tabela 1). Castro et al. (2011), verificou que a divergência genética estimada estava relacionada com um determinado estágio de desenvolvimento. Assim, os acessos que formaram grupo nas quatro épocas de colheita foram ALI, GUR, COM e NOV, mostrando similaridade. Já no presente estudo, pela análise de marcadores RAPD, os acessos COM e NOV foram os únicos que também apresentaram similaridade genética, sendo aqui agrupados com ANA, NAT e TAG. Quanto à relação entre as divergências genéticas dos acessos e regiões climáticas, observou-se que de forma geral, acessos coletados na mesma região climática foram mais semelhantes. Apenas os acessos ARR, na segunda época de colheita, e TAG, na terceira época de colheita, formaram grupos separados dos outros acessos coletados na mesma região climática.

Castro et al. (2011) enfatizou as similaridades entre esses acessos com base no uso de características morfológicas. Os acessos que

revelaram menor proximidade genética, utilizando características morfológicas, foram NAT e FOR que não formaram grupo juntos em nenhuma época de colheita.

Possivelmente, as circunstâncias ambientais sob as quais os acessos foram coletados diferem consideravelmente entre os estudos. Assim, ligeiras diferenças genéticas entre eles podem representar adaptações a diferentes condições (Gustine et al., 2002).

Outros trabalhos realizados em *Curcuma longa*, (Janet et al., 2011) e em *Bidens* spp, (Vidal et al., 2006), mostraram a eficácia do uso de marcadores RAPD na detecção da variabilidade genética. Castro et al. (2004), também estudando *A. conyzoides* por RAPD confirmou a eficiência da técnica. Os marcadores moleculares atuam como uma ferramenta eficiente na análise da variabilidade genética, identificando diferenças entre os materiais em nível de DNA. As técnicas moleculares fornecem aos pesquisadores uma nova fonte de informações, que utilizadas em conjunto com os dados morfológicos e agrônomicos acabam contribuindo para o aumento da eficácia do programa (Faleiro, 2007).

De acordo com Melo et al. (2009) a alta variação genética entre populações tem implicação direta para a proposta de conservação, indicando uma coleta de sementes de grande número de populações, no sentido de salvaguardar maior diversidade genética existente da espécie. Além disso, estudos com marcadores moleculares podem no futuro gerar marcadores que possibilitem rastrear a origem da matéria prima para fitomedicamentos derivados desta espécie (Percifield et al., 2007).

CONCLUSÕES

Os acessos que se apresentaram mais divergentes foram GUR e ARR. Os acessos ANA e NAT mostraram a maior similaridade genética.

Na formação dos grupos, não houve relação entre a similaridade genética e as distâncias geográficas. O uso de marcadores RAPD foi eficiente na caracterização da estrutura genética entre os acessos de mentrasto, onde essa caracterização molecular pode fornecer informações para evitar as redundâncias ou misturas de genótipos em estudos e programas de conservação de germoplasma dessa espécie.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da REALGENE/CNPq e da UFT.

REFERÊNCIAS

- CASTRO, H.G.; SILVA, D.J.H.; OLIVEIRA, L.O.; FERREIRA F.A.; SAKIYAMA, N.S.; BARBOSA, L.C.A.; RIBEIRO JÚNIOR, J.I. Diversidade genética entre acessos de mentrasto avaliada por características botânico-agronômicas, moleculares e fitoquímicas. **Revista Ceres**, v. 51, n. 294, p. 227-241. 2004a.
- CASTRO, H.G.; BARBOSA, L.C.A.; LUI, J.J.; OLIVEIRA, W.F.; SANTOS, G.R.; CARVALHO, A.R.S. Growth, content and composition of the essential oil of accessions of mentrasto (*Ageratum conyzoides*) collected in the state of Tocantins, Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 10, n. 2, p. 36-43, 2008.
- CASTRO, H.G.; SANTOS, G.R.; MOMENTÉ, V.G.; SILVA, D.J.H.; RIBEIRO JÚNIOR, J.I. Estudo da divergência genética por características morfológicas entre acessos de mentrasto (*Ageratum conyzoides* L.) coletados no Estado do Tocantins em diferentes épocas. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.13, n.1, p.24-29, 2011.
- CASTRO, H.G. FERREIRA, F.A.; SILVA, D.J.H.; RIBEIRO JÚNIOR J.I. Análise do crescimento de acessos de mentrasto (*Ageratum conyzoides* L.) em dois ambientes. **Revista Ciência Agronômica**, v.37, n.1, p.44-49, 2006
- CASTRO, H.G.; OLIVEIRA, L.O.; BARBOSA, L.C.A.; FERREIRA, F.A.; SILVA, D.J.H.; MOSQUIM, P.R.; NASCIMENTO, E.A. Teor e composição do óleo essencial de cinco acessos de mentrasto. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 55-57, 2004b.
- FALEIRO, F.G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 102p., 2007.
- FERREIRA, M.E.e GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Embrapa-Cenargen, Brasília, 220p., 1998.
- GUSTINE, D.L.; VOIGT, P.W.; BRUMMER, E.C.; PAPADOPOULOS, Y.A. Genetic variation of RAPD markers for North American white clover collections and cultivars. **Crop Science**, v. 42, n. 2, p. 343-347. 2002.
- JAN, H.U.; RABBANI, M.A.; SHINWARI, Z.K. Assessment of genetic diversity of indigenous turmeric (*Curcuma longa* L.) germplasm from Pakistan using RAPD markers. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 5, p. 823-830, 2011.
- LI, M. e MIDMORE, D. J. Estimating the genetic relationships of Chinese water chestnut (*Eleocharis dulcis* (Burn. f.) Hensch) cultivated in Australia, using random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.74, n.2, p.224-231, 1999.
- LIN, K.H.; LAI, Y.C.; LI, H.C.; LO, S.F; CHEN, L.F.O.; LO, H.F. Genetic variation and its relationship to root weight in the sweet potato as revealed by RAPD analysis. **Scientia Horticulturae**, v. 120, n. 1, p. 2-7, 2009.
- LIU, C. J. Geographical distribution of genetic variation in *Stylosanthes scabra* revealed by RAPD analysis. **Euphytica**, v.98, n.1-2, p.21-27, 1997.
- MELO, L.Q.; CIAMPI, A.Y.; VIEIRA, R.F. Análise da variabilidade genética de arnica (*Lychnophora ericoides* Less. - Asteraceae) usando marcadores RAPDs. **Acta Botânica Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 259-266, 2009.

- MILACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: S.C.K. Milach, 141p., 1998.
- MILLANI, A.A.; ROSSATTO, D.R.; RUBIN FILHO, C.J.; KOLB, R.M. Análise de crescimento e anatomia foliar da planta medicinal *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) cultivada em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.2, p.127-134, 2010.
- MILLAN, T.; OSUNA, F.; COBOS, S.; TORRES, A. M.; CUBERO, A. M. Using RAPDs to study phylogenetic relationships in rosa. **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, n.2, p.273-277, 1996.
- OLIVEIRA, N.P.; OLIVEIRA, M.S.P.; MOURA, E.F. Variabilidade e divergência genética entre genótipos de tucumanzeiro-do-pará (*Astrocaryum vulgare* Mart.) promissores para a produção de frutos por marcadores RAPD. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 34, n. 1, p. 216-226, 2012.
- PAULA, L.A.; BIANCHI, V.J.; FACHINELLO, J.C. Caracterização molecular e variabilidade genética entre porta-enxertos de pessegueiro com base em marcadores codominantes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v.47, n.2, p.193-199, 2012.
- PERCIFIELD, R.J.; HAWKINS, J.S.; MCCOYS, J.A.; WIDRLECHNERZ, M.P.; WENDEL, J.F. Genetic diversity in *Hypericum* and AFLP markers for species-specific identification of *H. perforatum* L. **Planta Medica**, v. 73, n. 15, p. 1614-1621, 2007.
- SANTOS, K.L.; DUCROQUET, J.P.H.J.; NODARI, R.O. Caracterização genética de populações naturais de goiabeira serrana (*Acca sellowiana*) com marcadores microssatélites heterólogos. **Biomass**, v. 24, n. 4, p. 75-83, 2011.
- SANTOS, M.F.; NETO, R.B. De A.; NASCIMENTO, M.P.S.B.C. Do N.; LIMA, P.S. Da C. Diversidade genética entre acessos de canafístula (*Senna spectabilis*) por marcadores RAPD. **Proceedings of the III International Symposium on Forage Breeding**. November 7th to 11th, 2011.
- SILVEIRA, D.G.; AMORIN, E.P.; JESUS, O.N.; SOUZA, F.V.D.; PESTANA, K.N.; SANTOS, V.J.; SANTANA, J.R.F. Variabilidade genética de populações naturais de caroá por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.3, p.283-290, 2009.
- STEINER, J.J. e LOS SANTOS, G.G. Adaptive ecology of *Lótus corniculatus* L. genotypes: I. Plant morphology and RAPD marker characterizations. **Crop Science**, v, 41, n.2, p. 552-563. 2001.
- SOARES, C.S.A.; COSTA, M.B.; SOARES, A.H.V.; BEZERRA, C.E.S.; CARVALHO, L.M. Avaliação da atividade inseticida do óleo essencial de mentrasto (*Ageratum conyzoides* L.) sobre o pulgão *Macrosiphum euphorbiae* (thomas, 1878), (hemiptera: aphididae) em roseira. **Revista Verde**, v.6, n.5, p. 21. (EDIÇÃO ESPECIAL), 2011.
- THORNTHWAITE, C. W. e MATHER, R.J. The water balance. New Jersey: Laboratory of Climatology, 104p., 1955.
- VIDAL, R.A.; HERNANDES, G.C.; WINKLER, L.M.; FEDERIZZI, L.C.; SILVA, P.R. Relação entre distância geográfica e variabilidade genética de uma população de *Bidens* spp. com resistência aos herbicidas inibidores de ALS. **Planta Daninha**, v. 24, n. 1, p. 149-155, 2006.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIC, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. D. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.
- XU, C.; ZHANG, W.; FU, C.; LU, B. Genetic diversity of alligator weed in China by RAPD analysis. **Biodiversity and Conservation**, v.12, n.4, p.637-645, 2003.

Recebido: 03/05/2013
Received: 05/03/2013

Aprovado: 02/10/2013
Approved: 10/02/2013