



Hinc patriam sustinet

Instituto Superior de Agronomia
Universidade Técnica de Lisboa

TÉCNICAS DE ESTUDO MICROMORFOLÓGICO E MOLECULAR APLICADAS AO GÉNERO *HYPERICUM*

Sílvia Raquel de Araújo Gonçalves da Costa

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agrónómica- Protecção de Plantas

Orientadora: Professora Auxiliar Ana Maria da Silva Monteiro

Co-orientadora: Professora Auxiliar Generosa Maria Manso Teixeira Xavier

Júri:

Presidente: - Doutor José Carlos Augusta da Costa, Professor Associado do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: - Doutora Generosa Maria Manso Teixeira Xavier, Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

- Doutora Ana Maria da Silva Monteiro, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

- Doutora Maria Filomena de Sousa Nóbrega, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Recursos Biológicos, I.P.

Lisboa, 2010

Agradecimentos

Ao chegar ao fim desta etapa, gostaria de começar por agradecer a todos quantos me acompanharam: professores, colegas, amigos e tantas outras pessoas que se cruzaram comigo, e que de forma mais ou menos directa, me proporcionaram experiências enriquecedoras e me apoiaram.

À Professora Doutora Ana Monteiro, que ao aceitar a orientação deste trabalho, me acompanhou com enorme cuidado, pelos conselhos de grande valor, pelo incentivo decisivo, pela amizade com que me tratou e especialmente pela revisão da tese escrita, prontamente efectuada.

À Professora Doutora Generosa Teixeira, por ter se prestado a ser minha co-orientadora, pelo acompanhamento constante, pelo apoio, pelos ensinamentos, pelos conselhos, pelas críticas construtivas, corrigindo a tese prontamente e de forma encorajadora, fazendo-me acreditar que conseguiria chegar a bom termo.

À Doutora Filomena Nóbrega, não apenas por toda a orientação dada a este trabalho, mas também pelo empenhamento e carinho com que me acompanhou, pelos ensinamentos que me transmitiu ao longo desta enriquecedora experiência laboratorial na Estação Florestal Nacional.

Ao Marco Paxis pela paciência e constante apoio, indispensável nos momentos de alegria e também nos de maior desânimo, dando-me força para nunca desistir.

Um agradecimento especial aos meus Pais e Irmãos, pelo enorme apoio, carinho, paciência, constante estímulo que em todas as ocasiões mostraram, e por nunca deixarem de acreditar.

Finalmente, desejo agradecer a todos os que, embora não expressamente mencionados, de algum modo contribuíram para a elaboração deste trabalho.

Resumo

O objectivo deste trabalho consistiu na caracterização micromorfológica e molecular de algumas espécies de *Hypericum*. Na caracterização morfológica foram estudados: *H. calycinum*, *H. canariense*, *H. grandifolium*, *H. x inodorum*, e *H. patulum*. O estudo molecular estendeu-se a mais duas espécies: *H. androsaemum* e *H. perforatum ssp perforatum*.

Procedeu-se à caracterização morfológica, em microscopia óptica e electrónica de varrimento, e histoquímica, utilizando reagentes para os principais grupos de compostos primários e secundários.

Os caracteres epidérmicos, tais como dimensão das células epidérmicas, dimensão e tipos de estomas, índice estomático e presença de glândulas secretoras são similares em todos os *taxa*. Observaram-se diferenças na forma das paredes das células epidérmicas, na densidade das ceras epicuticulares, no índice de glândulas e dimensão do mesófilo. Os compostos histoquímicos detectados são semelhantes, com excepção no *taxon H. patulum*, que possui esteróides nas glândulas (com tricloreto de antimónio).

No estudo molecular utilizaram-se marcadores ISSR e procedeu-se à análise das sequências da região ITS.

Os marcadores ISSR permitiram detectar um elevado grau de polimorfismo e demonstraram que as espécies *H. inodorum* e *H. grandifolium* se encontram muito próximas e os *taxa H. patulum* e *H. calycinum* são as espécies que se encontram mais afastadas, quer a nível molecular como morfológico.

Palavras-chave: anatomia foliar, ceras epicuticulares, testes histoquímicos, ISSR, ITS.

Abstract

The aim of this work was the micromorphological and molecular characterization of some species of *Hypericum*. The morphological studies were accomplished on: *H. calycinum*, *H. canariense*, *H. grandifolium*, *H. x inodorum* and *H. patulum*. The molecular analysis was extended to two more species: *H. androsaemum* and *H. perforatum* ssp. *perforatum*.

The morphological analysis were carried out by optical and scanning electron microscopy , and histochemical studies were done with reagents for the main groups of primary and secondary compounds.

The epidermal characters such as size of epidermal cells, size and shape of stomata, stomatic index and presence of secretory cells are similar in all *taxa*. There were differences in the shape of the walls of epidermal cells, density of the cuticular waxes, index of glands and size of the mesophyll. The detected histochemical compounds are similar, except in the *taxon H. patulum*, which has steroids in glands (with antimony trichloride).

In the study we used molecular markers ISSR and proceeded to the analysis of the sequences of the ITS region.

The ISSR marker might have revealed a high degree of polymorphism and showed that the species *H. inodorum* and *H. grandifolium* are very close and the rate *H. patulum* and *H. calycinum* are species that are more remote, both morphological and molecular.

Key Words: leaf anatomy, cuticular waxes, histochemical tests, ISSR, ITS.

Extended Abstract

The medicinal and aromatic flora has various properties and uses, and therefore its study is of great importance for the development of biomass valorization.

There are some species of the genus *Hypericum* reported in the Botanical Park of Tapada da Ajuda. This is a genus which samples have different types of secretory structures, containing secondary metabolites of diverse chemical nature that underlie the medicinal use of some of its species. *H. perforatum* is the most widespread of them, included in the main western Pharmacopoeias. Other species are also used in traditional medicine by local people, some of which are difficult to distinguish and are sometimes subject to adulteration. Thus, the aim of this work is the micromorphological and molecular characterization of some species of *Hypericum*, in order to obtain patterns that easily allow their distinction.

Mature leaves of five species of *Hypericum* were used: *H. x inodorum*, *H. patulum*, *H. grandifolium*, *H. calycinum* and *H. canariense*. The plant material was subject to the usual procedures for observation with optical microscopy and scanning electron microscopy, and attention was given to the characteristics of epidermal tissue, observation of stomata and glands. In comparative anatomy the plant material was embedded in paraffin and subjected to cross-cut between 10-12 μm in thickness. Thereafter, characteristics of the mesophyll (chlorophyll parenchyma palisade and spongy parenchyma chlorophyll) and of the glands were observed. Different histochemical tests were also carried out, in order to characterize the main groups of compounds (such as lipids, terpenoids, alkaloids, phenols and polysaccharides) and locate them in the leaves.

Data analysis was performed using the statistical program SAS[®] (SAS Institute, Cary, NC, USA), considering the analysis of variance on one factor ANOVA, with a significance level of 5%. Multivariate analysis (agglomerative and principal component analysis) was carried out with STATISTICA version 6.0, in which the data matrix is the average value of each observed parameter. For the agglomerative analysis in groups were calculated two types of coefficients to quantify the degree of similarity / dissimilarity between each species: the mean euclidean distance and the correlation coefficient. Agglomerative analysis in groups is based on the correlation matrices and mean euclidean distances, using the method of UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages). The results are presented in a dendrogram shape, where the levels that combine the different groups refer to the coefficients of dissimilarity. The principal component analysis is useful to get an idea of how species are distributed around the observed variables.

The molecular characterization was extended to two more species: *H. androsaemum* and *H. perforatum* ssp. *perforatum*. The optimization of the technique of extraction of DNA for the test species was accomplished using the DNeasy Plant Kit and CTAB (cationic hexadecyl

trimethyl ammonium bromide). The sample was amplified by PCR with seven ISSR primers: MR, (CACACA)₃, (CA)₈RG, (CAG)₅, (GA)₈YG, (GA)₈YT and HVH(TG)₇ and two pairs of primers ITS : ITS4/ITS5 and C28kj/LEU1. The products amplified with ITS markers were cloned in plasmid pJET1.2/blunt and subsequently sequenced by the STAB Vida. Although the sequences obtained did not have the expected quality and size, they were subjected to multiple alignment by observing the nucleotide differences between the samples, by determining the consensus sequence and by comparing it to homologous sequences of the genus *Hypericum* registered in the GenBank database.

The results were analyzed using numerical taxonomy methods and the software NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System), version 2.02 (Applied Biostatistics Inc.). The similarity was estimated by the Dice coefficient and similarity matrix were subjected to a cluster analysis of the type UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages), resulting in the corresponding dendograms.

The sequences were aligned using the software Geneious Pro 3.0.4. (<http://www.geneious.com/>). The homology analysis were performed by reference to the BLAST algorithm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) and the dendrogram was obtained by Neighbor-Joining algorithm using the software BLAST TREE VIEW.

According to the obtained results, it is possible to conclude that some of the observed micro characteristics, namely the shape of cell walls, the density of the waxes, the thickness of the chlorophyll in the palisade, the index of glands and the presence of crystals of calcium oxalate, allow the differentiation of some of the five studied species of *Hypericum*. Thus, the species were grouped into four groups, with the taxa *H. x inodorum* and *H. grandifolium* not differentiable and considered in the same section, which is consistent with its taxonomic affinity. On the other hand, the taxa *H. calycinum* and *H. patulum* are the species that present greater morphological differences. Similar results were showed by the molecular analysis, using the ISSR primers. In fact, by analyzing the dendrogram with the species *H. androsaemum* and *H. perforatum* ssp. *perforatum*, the results are almost the same, only with the formation of a different group: *H. perforatum* ssp. *perforatum*, which can be explained by significant morphological differences in relation to other species, particularly the presence of black secretory glands.

The same genotypes that were analyzed by ISSR markers were also analyzed using the sequences of the ITS region. However, this study should be repeated because conclusive results were not achieved.

Índice Geral

Índice de Figuras.....	i
Índice de Quadros.....	i
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. O género <i>Hypericum</i> como planta medicinal.....	3
2.2. Taxonomia e descrição do género <i>Hypericum</i>	4
2.2.2. <i>Hypericum canariense</i>	6
2.2.3. <i>Hypericum grandifolium</i>	6
2.2.4. <i>Hypericum x inodorum</i>	7
2.2.5. <i>Hypericum patulum</i>	7
2.3. Uma abordagem molecular.....	9
2.3.1. Aplicação de marcadores na filogenia de plantas.....	11
3. Materiais e Métodos.....	13
3.1. Morfoanatomia foliar.....	13
3.1.1. Material Vegetal.....	13
3.1.2. Métodos.....	13
3.1.2.1. Microscopia Óptica (MO).....	13
3.1.2.2. Microscopia Electrónica de Varrimento (MEV).....	14
3.2. Estudo histoquímico.....	14
3.2.1. Microscopia óptica em campo claro.....	14
3.3. Análise de dados.....	15
3.4. Estudos Moleculares.....	16
3.4.1. Extração e quantificação do DNA genómico.....	16
3.4.2. Amplificação de DNA por PCR.....	16
3.4.2.1. Amplificação de ISSR.....	17
• Electroforese em gel de agarose (AGE).....	18
• Análise dos géis.....	18
• Análise de dados.....	18

3.4.2.2.	Amplificação da região ITS	18
3.4.2.2.1.	Clonagem de Produtos PCR	19
	• Eluição e purificação de fragmentos amplificados	19
	• Ligação ao vector plasmídico	19
	• Multiplicação das células recombinantes de <i>Escherichia coli</i> em meio LB líquido.....	21
	• Extração do DNA plasmídico	21
	• Digestão com enzimas de restrição	21
3.4.2.2.2.	Sequenciação	22
	• Sequenciação dos produtos PCR obtidos com os <i>primers</i> C28Kj/LEU1	22
	• Análise das sequências	22
4.	Resultados e discussão.....	23
4.1.	Morfoanatomia foliar.....	23
4.1.1.	<i>Hypericum calycinum</i>	24
4.1.1.1.	Macrocaracteres	24
4.1.1.2.	Microcaracteres.....	24
4.1.2.	<i>Hypericum canariense</i>	27
4.1.2.1.	Macrocaracteres	27
4.1.2.2.	Microcaracteres.....	27
4.1.3.	<i>Hypericum grandifolium</i>	30
4.1.3.1.	Macrocaracteres	30
4.1.3.2.	Microcaracteres.....	30
4.1.4.	<i>Hypericum x inodorum</i>	32
4.1.4.1.	Macrocaracteres	32
4.1.4.2.	Microcaracteres.....	32
4.1.5.	<i>Hypericum patulum</i>	34
4.1.5.1.	Macrocaracteres	34
4.1.5.2.	Microcaracteres.....	34
4.2.	Análise multivariada	40

4.2.1. Análise aglomerativa	40
4.3. Caracterização histoquímica do conteúdo glandular	44
4.4. Estudo molecular	49
5. Conclusões Gerais e Perspectivas Futuras	58
6. Referências Bibliográficas	59
Anexo I - Fixação e preparação do material vegetal (MO e MEV)	iii
Anexo II - Inclusão do material vegetal em parafina (MO)	iv
Anexo III - Estudo Histoquímico	v
Anexo IV - Estudo Molecular	vi

Índice de Figuras

Figura 1 - A: <i>Hypericum calycinum</i> L.; B: <i>Hypericum canariense</i> L.; C: <i>Hypericum grandifolium</i> Choisy; D: <i>Hypericum x inodorum</i> Mill.; E: <i>Hypericum patulum</i> L.....	8
Figura 2 - Organização da região ITS.....	12
Figura 3 - Vector de clonagem pJET1.2	20
Figura 4 - Mapa de restrição do vector pJET1.2/blunt	21
Figura 5 - <i>H. calycinun.</i> (MO).....	26
Figura 6 - <i>H. calycinum.</i> (MEV).....	27
Figura 7 - <i>H. canariense</i> (MO).	29
Figura 8 - <i>H. canariense</i> (MEV).	30
Figura 9 - <i>H. grandifolium</i> (MO/MEV).....	31
Figura 10 - <i>H. x inodorum</i> (MO/MEV)	33
Figura 11 – <i>H. patulum</i> (MO/MEV).....	35
Figura 12 - <i>H. patulum</i> (MO/MEV)	36
Figura 13 - Dendrograma resultante da análise aglomerativa dos microcaracteres foliares.	41
Figura 14 - Representação gráfica da dispersão dos cinco taxa de <i>Hypericum</i>	43
Figura 15 - Caracterização histoquímica do conteúdo glandular.....	47
Figura 16 - Caracterização histoquímica do conteúdo glandular.....	48
Figura 17 - Perfis electroforéticos com os <i>primers</i> ISSR.....	49
Figura 18 - Perfis electroforéticos com os <i>primers</i> ISSR.....	50
Figura 19 - Dendrograma dos perfis PCR obtidos com os <i>primers</i> ISSR	52
Figura 20 - Dendrograma dos perfis PCR obtidos com os <i>primers</i> ISSR	53
Figura 21 - Amplificação com os <i>primers</i> ITS4/ITS5 e C28 KJ/Leu1.....	54
Figura 22 - Alinhamento múltiplo das sequências para a região ITS.....	55
Figura 23 - Sequência consenso	56
Figura 24 - Dendrograma da relação filogenética entre a sequência consenso e as sequências existentes no <i>GenBank</i>	57

Índice de Quadros

Quadro 1 - Classificação Sistemática do género <i>Hypericum</i> L.,.....	5
Quadro 2 - Identificação dos <i>taxa</i> e secções onde se encontram inseridos	5
Quadro 3 - Identificação do material vegetal e estudos efectuados	13
Quadro 4 - Testes histoquímicos efectuados no presente estudo.....	15
Quadro 5 - Identificação do voucher de <i>H. androsaemum</i> e <i>H. perforatum</i>	16
Quadro 6 - Componentes e respectivos volumes nas misturas da reacção para os <i>primers</i> ISSR.....	17
Quadro 7 - Programa de PCR utilizado	17
Quadro 8 - Códigos e sequências de nucleótidos dos primers forward (F) e reverse (R).....	19
Quadro 9 -Componentes e respectivos volumes nas misturas da reacção para os pares de <i>primers</i> ITS5/ITS4 e C28Kj/Leu1	19
Quadro 10 -Processo de ligação e transformação dos fragmentos de DNA	20
Quadro 11 -Componentes e respectivos volumes nas misturas de reacção de digestão.....	22
Quadro 12 - Características morfoanatômicas.....	23
Quadro 13 - Parâmetros morfoanatômicos médios.....	24
Quadro 14 - Coeficientes de correlação entre os 14 microcaracteres foliares	42
Quadro 15 - Resultados dos testes histoquímicos	46
Quadro 16 - Número de bandas totais, bandas polimórficas e percentagem de polimorfismo obtidos com os <i>primers</i> ISSR	51

1. Introdução

O género *Hypericum* L. é proveniente da Europa e da Ásia. Este género inclui cerca de 460 espécies (Judd *et al.*, 2008) mas apenas 12 espécies ocorrem de forma espontânea em Portugal Continental (Franco, 1971; Núñez, 1993).

As plantas pertencentes a este género podem ser herbáceas ou arbustivas, perenes, com folhas inteiras, em geral opostas (raramente verticiladas) e sem estipulas. É bastante frequente a ocorrência de diferentes tipos de estruturas secretoras: glândulas translúcidas, glândulas pretas e canais secretores (Green, 1884; Metcalfe e Chalk, 1950; Bottega *et al.*, 1999; Lobo, 2000; Ciccarelli *et al.*, 2001a,b; Onelli *et al.*, 2002; Maggi *et al.*, 2004). Aquelas estruturas contêm metabolitos secundários de natureza variada, designadamente: naftodiantronas (hipericina e pseudohipericina), acilfloroglucinol (hiperforina), flavonóides e floroglucinóis (rutina, hiperósido, isoquercitrina, quercitrina e quercitina) (Martónfi *et al.*, 2001).

A única espécie reconhecida pelas farmacopeias ocidentais é *H. perforatum* L. mas existem outros *taxa* de *Hypericum* que também são utilizados para fins medicinais. É o caso da espécie *H. androsaemum* L. usado como protector hepático (Cunha, 2007). Em Portugal também é frequentemente usado em substituição de *H. perforatum* L., mas é alvo de várias adulterações por espécies introduzidas como é o caso de *Hypericum x inodorum* Mill. e de *H. patulum* Thunb, algumas delas já naturalizadas (Teresa Vasconcelos, comunicação pessoal).

As características morfológicas e bioquímicas, para uma mesma espécie de *Hypericum*, diferem consoante a localização geográfica onde a planta se encontra inserida (Rapisarda *et al.*, 1996; Walker *et al.* 2001; Cruz e Teixeira, 2003; Maggi *et al.*, 2004), factor que dificulta a sua identificação. Outro problema quanto à identificação deve-se à possível existência de processos de reprodução por apomixia e também da existência de diversos híbridos dentro do género *Hypericum* (Moraes, 2007).

Os caracteres morfológicos são usados na descrição e classificação das plantas, sendo os caracteres micromorfológicos indicadores mais precisos para a sua identificação (Stace, 1989). Estes caracteres permitem fazer um estudo comparativo e são considerados um critério válido para a diferenciação morfológica entre *taxa*, para a sua conservação e para o controlo da reprodução com vista à obtenção de plantas de qualidade, e até para estudos farmacológicos.

No entanto, a análise molecular torna-se bastante vantajosa face à análise morfológica, uma vez que recorre à utilização de marcadores moleculares, que constituem o método normalmente aplicado no estudo da variabilidade genética.

Um bom marcador molecular deve possuir as seguintes características: co-dominância, ocorrência frequente, elevado grau de polimorfismo, ser de detecção fácil, rápida e pouco dispendiosa, distribuição uniforme ao longo do genoma e os resultados devem ser reproduzíveis dentro e entre laboratórios (Parker *et al.*, 1998; Weising *et al.*, 2005). Actualmente, não existe um marcador que reúna a maioria destas características, pelo que, para um determinado estudo, deve ser escolhido o marcador que combine a maioria das características referidas.

Dada a semelhança morfológica entre *H. androsaemum* e outras espécies do género *Hypericum*, a obtenção de padrões que facilmente permitam a distinção entre os *taxa* é fundamental de modo a detectar adulterações dos produtos medicinais. Por conseguinte, o objectivo deste trabalho consistiu na caracterização micromorfológica, recorrendo a diferentes técnicas de microscopia, de espécies em cultura do género *Hypericum*, existentes no Parque Botânico da Tapada da Ajuda: *Hypericum x inodorum*, *H. patulum*, *H. grandifolium*, *H. calycinum* e *H. canariense*, com a finalidade de encontrar características que possibilitem a sua diferenciação.

Os *taxa* *H. androsaemum* e *H. perforatum* ssp. *perforatum* não foram incluídos no estudo morfológico em virtude de terem sido alvo de trabalhos anteriores. No entanto, estas duas espécies, assim como as referidas anteriormente, foram estudadas com recurso a diferentes técnicas de biologia molecular.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. O género *Hypericum* como planta medicinal

Plantas medicinais são plantas que contêm substâncias bio-activas com propriedades terapêuticas, profiláticas ou paliativas. O seu efeito benéfico resulta, entre outros, da combinação de metabolitos secundários nelas presentes e do seu efeito sinérgico. No entanto, alguns compostos quando ingeridos em concentrações elevadas podem causar problemas secundários e até efeitos contrários ao desejado. Muitas destas plantas podem ser venenosas ou pelo menos levemente tóxicas, devendo ser usadas segundo indicação técnica.

Existe um grande número de espécies em todo o mundo, usadas desde tempos pré-históricos na medicina popular. As suas propriedades são estudadas, a fim de isolar os seus princípios activos e assim, produzir novos fármacos.

O uso medicinal do hipericão (*Hypericum perforatum*) remonta à Antiguidade Clássica. A crença nas qualidades destas plantas prolonga-se pela Idade Média, continuando a ser atribuídos às várias espécies de *Hypericum* diversos fins medicinais.

Actualmente, por várias razões, na Europa Ocidental e América do Norte, a fitoterapia (uso de plantas como medicamento) tem vindo a registar uma importância crescente, sendo um tipo de intervenção terapêutica que visa tirar partido das propriedades medicinais das plantas, apresentando-se como uma alternativa à medicina ocidental (Briskin, 2000; Cruz e Teixeira, 2003).

Devido às acções que lhe estão atribuídas (onde se destacam as acções antidepressivas e antivirais), alguns dos compostos destas plantas são dos mais estudados actualmente. Entre eles encontram-se a hipericina e a pseudohipericina (naftodiantronas) (Southwell e Bourke, 2000; Kosuth *et al.*, 2003; Ayan *et al.*, 2004; Kyrakosyan *et al.*, 2004). Outros estudos parecem indicar que, para além destes, também é possível encontrar actividades atribuídas a outros compostos de onde se destacam as hiperforinas (acilfloroglucinol), flavonóides, xantonas, componentes dos óleos essenciais, carotenos, fitoesteróis e os ácidos gordos de cadeia média (Nogueira, 2002).

Vários estudos indicam que o consumo excessivo de hipericina pode causar depressões enquanto que pequenas quantidades podem ter um efeito antidepressivo (Bourke, 1997). Para além deste também foram reportados outros efeitos adversos como fotossensibilidade que leva à destruição dos tecidos provocando fotodermatite ou “hipericismo”, dor abdominal e obstipação, náuseas e vômitos, tonturas, secura da pele e mucosas, elevação da pressão arterial e cansaço (Forget *et al.*, 2001).

As Farmacopeias Ocidentais, incluindo a Farmacopeia Europeia e a Farmacopeia Portuguesa, apenas consideram como fármaco folhas, flores e caules finos da espécie *H. perforatum*. No entanto existem outras espécies que também são utilizadas para fins medicinais, como é o caso de *H. androsaemum* usado como protector hepático (Cunha, 2007). As duas espécies são alvo de vários tipos de adulterações, sendo comum a sua substituição por outras espécies de *Hypericum*, que apresentam características diferentes, nomeadamente o tipo de glândulas, traduzindo-se numa composição e concentração diferente dos vários compostos com actividade farmacológica (Pinto, 1987; Cruz, 2003). Este aspecto adquire particular importância quando se coloca o problema da dosagem de produtos medicinais de origem vegetal.

A transformação de uma planta medicinal num medicamento é, portanto, uma tarefa que apresenta problemas diferenciados daqueles que caracterizam a busca de protótipos para novos fármacos, embora a investigação e desenvolvimento de fitoterápicos possa conduzir ao reconhecimento de novas substâncias activas (Simões e Guerra, 2004). No entanto, não se pode esquecer a vertente que garante a qualidade, a eficácia e a segurança desses medicamentos.

As potencialidades de uso de plantas medicinais encontram-se longe de estarem esgotadas. Os novos paradigmas de desenvolvimento social e económico, baseados nos recursos renováveis, endossam esta afirmação. Novos conhecimentos e novas necessidades certamente encontrarão no reino vegetal soluções, através da descoberta e desenvolvimento de novas moléculas com actividade terapêutica, ou com aplicações na tecnologia farmacêutica ou no desenvolvimento de medicamentos com maior eficiência de acção (Simões e Guerra, 2004).

2.2. Taxonomia e descrição do género *Hypericum*

A maioria das espécies de *Hypericum* pode ser reconhecida por apresentar:

- Folhas inteiras, opostas (raramente verticiladas) e sem estipulas, contendo glândulas translúcidas, pretas ou vermelhas;
- Flores solitárias terminais ou em dicásios simples (sem ou com pedicelo), sépalas e pétalas amarelas livres (por vezes podem ser avermelhadas), estames menores ou iguais às pétalas, anteras avermelhadas com uma glândula cor de âmbar em cada uma;
- Fruto uma cápsula, contendo muitas e pequenas sementes cilíndricas.

Existem no entanto excepções em relação à generalização de todos os caracteres.

Esta planta pertence à família *Clusiaceae* (*Guttiferae*) e quer a Nova Flora de Portugal (Franco, 1984), quer a Flora Europeae (Tutin *et al.*, 1993), classificam este género da seguinte forma (Quadro 1):

Quadro 1 - Classificação Sistemática do género *Hypericum* L., de acordo com Franco (1984) e Tutin *et al.* (1993)

Divisão:	<i>Angiospermae</i>
Classe:	<i>Dicotyledoneae</i>
Subclasse:	<i>Archichlamydeae</i>
Ordem:	<i>Guttiferales</i>
Família:	<i>Clusiaceae (Guttiferae)</i>
Género:	<i>Hypericum</i> L.

Os dados relativos à secção (sect) e estudos efectuados para cada *taxon* estão referenciados no Quadro 2.

Quadro 2 - Identificação dos *taxa* e secções onde se encontram inseridos

Taxa	Sect
<i>H. androsaemum</i> L.*	Androsaemum (Duh.) Godron (Franco, 1984)
<i>H. calycinum</i> L.**	Eremanthe (Spach) Endl. (Tutin, 1993)
<i>H. canariense</i> L.**	Webbia (Spach) R. Keller (Cullen, 1989)
<i>H. grandifolium</i> Choisy**	Androsaemum (Duh.) Godron (Cullen, 1989)
<i>Hypericum x inodorum</i> Mill.**	Androsaemum (Duh.) Godron (Cullen, 1989)
<i>H. patulum</i> Thunb.**	Ascyreia Choisy (Wight & Amott, 1834)
<i>H. perforatum</i> L. ssp. <i>perforatum</i> *	Hypericum (Franco, 1984)

*espécies espontâneas em Portugal

**espécies cultivadas

2.2.1. *Hypericum calycinum*

Esta planta, também conhecida vulgarmente por hipericão-dos-jardins, é originária do Sudeste da Bulgária e do Norte da Turquia. Na América do Norte é conhecida pelo nome de Rosa-de-Sharon. Encontra-se amplamente divulgada como planta ornamental, incluindo em Portugal (fonte: <http://obotanicoaprendiznateradosespantos.blogspot.com/>).

É um nanofanerófito glabro, perene e rizomatoso; com caules aéreos de 10 a 60 cm, erectos, castanho-alaranjados, com 4 linhas longitudinais; as folhas são verde claro ou

verde escuro (consoante se encontram expostas ao sol ou à sombra) , opostas, oblongas a elípticas, coriáceas, subsésseis sem pecíolo, com glândulas translúcidas (Fig. 1, A). Pétalas obovadas a oblanceoladas; sépalas inteiras, largamente ovadas a suborbiculares, persistentes, com glândulas translúcidas lineares. Estames menores ou iguais às pétalas, anteras avermelhadas com uma glândula cor de âmbar em cada uma. Flores amarelas, solitárias terminais ou em dicásios simples sem ou com pedicelo. Não apresenta glândulas pretas (Tutin *et al.*, 1993).

Devido à rápida propagação do seu sistema radicular, muitas vezes é utilizada na estabilização de aterros e encostas, adaptando-se bem a qualquer tipo de solo desde que não encontre situações extremas de secura ou humidade. É perene em climas com temperaturas amenas, mas semi-perene de folha caduca em locais mais frios.

Dado o seu crescimento agressivo e por ser considerada uma espécie selvagem, esta planta pode tornar-se invasora, desalojando outras plantas (fonte: <http://pt.wikipedia.org>).

2.2.2. *Hypericum canariense*

O *taxon H. canariense* é uma espécie originária das Ilhas Canárias e Madeira, onde cresce em encostas húmidas e arborizadas das cinco ilhas mais ocidentais. É uma planta que foi introduzida na Austrália, Nova Zelândia, Califórnia e no Havaí, onde é considerada planta ornamental (fonte: <http://pt.wikipedia.org>).

É um nanofanerófito com cerca de 2-3 m de altura, com caule lenhoso castanho claro e muito ramificado. As suas folhas são opostas e glabras, sem pecíolo, elípticas a oblongo-elípticas, margem inteira, base estreita em forma de cunha (Fig. 1, B). As pétalas são oblanceoladas e persistentes; os estames são numerosos do tamanho das pétalas. As sépalas com 3 a 4 mm, variam na forma podendo ir de obovadas a oblanceoladas, arredondadas ou lanceoladas e agudas, possuindo algumas glândulas cor de âmbar nas margens. Não apresentam glândulas pretas. As flores encontram-se dispostas em vistosas panículas terminais, apresentado um formato de estrela e uma coloração amarela muito brilhante (Cullen *et al.*, 1989).

2.2.3. *Hypericum grandifolium*

Esta planta, vulgarmente chamada “malfurada”, é uma espécie endémica das Ilhas Canárias e da Ilha da Madeira (fonte: <http://pt.wikipedia.org>).

É um nanofanerófito , muito ramificado desde a base, que se caracteriza pelas suas folhas opostas, ovadas, glabras e subsésseis (Fig. 1, C). As suas flores são amarelo-dourado levemente tingidas de vermelho com pétalas estreitas e oblongo-lanceoladas. Os estames são numerosos e do tamanho das pétalas. As sépalas são lanceoladas a oblongas, inteiras.

Não apresenta glândulas pretas. As suas inflorescências possuem duas a quatro flores, florindo durante todo o ano (Cullen *et al.*, 1989).

2.2.4. *Hypericum x inodorum*

O *taxon* *H. x inodorum* é um híbrido que pode ser obtido através do cruzamento entre *H. androsaemum* e outras espécies: *H. androsaemum* x *H. hircinum*; *H. elatum* Aiton; *H. anglicum* Bertoloni; *H. multiflorum* invalid; *Hypericum* x *persistens* “*Elatum*” Schneider; *Androsaemum pyramidale* invalid; *A. parviflorum* Spach; *Hypericum* x *urberuagae* P. & S. Dupont (Cullen *et al.*, 1989).

É uma planta originária da Europa, normalmente obtida por cultivo, e amplamente naturalizada em vários países.

É um nanofanerófito com cerca de 2 m. As suas flores são amarelas, sendo produzidas individualmente ou em grupos, nas extremidades dos ramos ou nas axilas das folhas. As pétalas são em forma de concha, possuindo numerosos estames, normalmente maiores que as pétalas. Sépalas oblongas ou oblongo-lanceoladas a largamente ovais e inteiras. As folhas são sésseis, oblongo lanceoladas a ovadas, glabras, com base arredondada a cordada (Fig. 1, D) e com uma nervação proeminente em ambos os lados (Cullen *et al.*, 1989).

Sendo um híbrido a sua altura, assim como o tamanho das folhas e flores, variam consideravelmente de acordo com as espécies que lhe deram origem.

2.2.5. *Hypericum patulum*

O *taxon* *H. patulum* é originário da Ásia. Este nanofanerófito com cerca de 2,5 m de altura possui folhas opostas, glabras, lanceoladas a ovais com margem inteira, base acunhada e ápice obtuso-apiculado a arredondado-apiculado (Fig. 1, E). As flores são hermafroditas, amarelas e arredondadas possuindo numerosos estames. As sépalas muitas vezes são avermelhadas e oblongo-elípticas. As suas sementes são aromáticas e possuem propriedades estimulantes (Wight & Amott, 1834).

Esta planta necessita de solos húmidos e bem drenados tendo preferência por locais ensolarados. É frequente encontrá-la em florestas, matas e falésias.

A espécie *H. patulum* é conhecida na medicina tradicional pelo seu potencial terapêutico variado: acção espasmolítica, estimulante, hipotensor, antifúngico e cicatrizante de feridas. Tem sido muito utilizado na fitoterapia chinesa para o tratamento de hepatites, infecções bacterianas e hemorragias nasais (fonte://<http://www.pfaf.org>).

Estudos realizados indicam a presença de esteróides e flavonóides em extractos de folhas (Mukherjee P. *et al.*, 1999).



(A)



(B)



(C)



(D)



(E)

Figura 1 - A: *Hypericum calycinum* L.; **B:** *Hypericum canariense* L.; **C:** *Hypericum grandifolium* Choisy; **D:** *Hypericum x inodorum* Mill.; **E:** *Hypericum patulum* L.

2.3. Uma abordagem molecular

Até meados dos anos 60, os marcadores utilizados em estudos de genética caracterizavam-se por ser controlados através de genes associados a caracteres morfológicos, geralmente fenótipos de fácil identificação visual, como nanismo, cor das pétalas, deficiência em clorofila (Ferreira e Grattapaglia, 1995). Embora estes marcadores apresentem a vantagem de ser facilmente detectados e não requererem equipamentos sofisticados, o que se traduz num baixo custo, as observações devem ser realizadas por um observador experiente e com conhecimento da espécie. Além disso, são na sua maioria dominantes ou recessivos, estão sujeitos a influências ambientais, podem variar com os diferentes estádios de desenvolvimento da planta e ocorrem em número limitado. Para ultrapassar estas limitações surgiram os marcadores moleculares, tanto a nível proteico como a nível do DNA.

Os marcadores moleculares, igualmente definidos por marcadores genéticos quando o seu comportamento está de acordo com as leis básicas de hereditariedade de Mendel (Ferreira e Grattapaglia, 1995), apresentam um elevado nível de polimorfismo e são neutros em relação às influências do meio ambiente e ao estágio de desenvolvimento das plantas (Karp *et al.*, 1997). Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridação ou amplificação de DNA por PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Entre os identificados por amplificação de DNA encontram-se os ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e os ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*).

A técnica da PCR é um método de amplificação enzimática *in vitro* (de criação de múltiplas cópias) de DNA. O surgimento desta tecnologia na década de 80 (Saiki *et al.*, 1985) causou uma revolução na Biologia Molecular em diferentes áreas, permitindo a amplificação em grandes quantidades de segmentos específicos de DNA.

A PCR é um método de análise muito sensível e, por isso, deve ser realizado com muito cuidado para evitar contaminações que possam inviabilizar os resultados. Alguns factores como a qualidade e a concentração de DNA, a concentração de cloreto de magnésio ($MgCl_2$), o conteúdo de G+C, o tamanho do *primer*, a temperatura de emparelhamento e a existência de contaminantes, em termos de número e intensidade dos produtos amplificados podem afectar a reproducibilidade dos resultados (Ellsworth *et al.*, 1993).

Durante a PCR são usadas elevadas temperaturas de forma a separar as moléculas de DNA em duas cadeias simples, permitindo então a ligação de oligonucleótidos iniciadores (*primers*), também em cadeia simples e geralmente constituídos por 15 a 30 nucleótidos, obtidos por síntese química. Para amplificar uma determinada região são necessários dois iniciadores complementares das sequências que flanqueiam o fragmento de DNA a amplificar, nas extremidades 3', de modo a permitir a actuação da DNA polimerase durante

a síntese da cadeia complementar, usando como molde cada uma das duas cadeias simples constituintes do DNA a amplificar. Para realizar PCR são necessárias pequenas quantidades do DNA alvo, uma solução tampão salina contendo a enzima *Taq DNA polimerase* (obtida da bactéria *Thermus aquaticus*), os oligonucleótidos iniciadores, os quatro desoxinucleótidos constituintes do DNA e o cofactor Mg^{2+} . Esta mistura é submetida a vários ciclos de amplificação que consistem em: desnaturação do DNA alvo pelo calor (normalmente 1 minuto a 94-96°C), de modo a separar as duas cadeias; hibridação ou emparelhamento dos iniciadores por ligações de hidrogénio ao DNA alvo em cadeia simples, por arrefecimento da mistura de reacção (normalmente a temperaturas entre 50 e 65°C) e extensão dos iniciadores através da síntese da cadeia complementar de cada cadeia molde, catalisada pela *Taq DNA polimerase* (normalmente 1 minuto a 72°C). O processo envolvendo estes três passos pode ser repetido várias vezes (25 a 30 ciclos) sendo possível aumentar, em cada ciclo, duas vezes a concentração de DNA existente (McPherson *et al.*; 1991; Ferreira e Grattapaglia, 1995), levando a uma amplificação exponencial.

O principal interesse desta metodologia em estudos de sistemática molecular reside na sua conjugação com outras técnicas, tais como a electroforese dos fragmentos amplificados e a sequenciação do DNA. A sequenciação permite o estudo da mesma região do genoma de várias espécies aparentadas e a sua comparação, originando uma classificação mais natural ao nível da espécie (Judd *et al.*, 1999).

A determinação da sequência de nucleótidos que compõem um fragmento de DNA representa um dos processos finais na análise de DNA e é a estratégia mais directa no estudo do polimorfismo de DNA. O uso desta técnica tem-se revelado bastante consistente, reproduzível, informativa e adaptada para diferentes níveis de discriminação através da selecção de regiões específicas do genoma. Com o tempo esta técnica evoluiu muito mais, com a possibilidade da marcação de *primers* por fluorescência e detecção automática das moléculas de DNA por electroforese capilar (Smith, 1986) em sequenciadores automáticos. Na detecção da fluorescência estão quatro fluorocromos diferentes (FAM, NED ou HEX, ROX, e VIC) que emitem luz a diferentes comprimentos de onda quando excitados por laser de iões de árgon e são utilizados na identificação das reacções de extensão com A, C, G, T. Os cromatogramas ou electroferograma produzidos permitem visualizar uma série de picos, de quatro cores diferentes que identificam os nucleótidos.

O polimorfismo pode ser identificado em diferentes tipos de DNA: nuclear e citoplasmático, isto é, no cloroplasto (cpDNA) e na mitocôndria (mtDNA) (Mitton 1994; Parker *et al.*, 1998). O DNA cloroplastidial, geralmente transmitido pelo progenitor feminino nas angiospérmicas, é, na maioria dos casos, muito conservado e muito abundante nas folhas e, por isso, tem tido especial aplicação em estudos filogenéticos (Demesure *et al.*, 1995). O DNA mitocondrial é menos abundante nas folhas e mais difícil de extrair, além de existirem

menos *primers* para a obtenção de marcadores baseados na técnica de amplificação por PCR e nas plantas parece evoluir rapidamente (Vincent e Fulton, 2003). Normalmente é utilizado em estudos de variabilidade ao nível populacional (intraespecífico) (Karp *et al.*, 1997).

2.3.1. Aplicação de marcadores na filogenia de plantas

O genoma nuclear possui muitos genes que se têm mostrado úteis para inferir relações filogenéticas. O melhor exemplo de utilização de genes nucleares em estudos filogenéticos é a unidade de repetição do DNA ribossómico (rDNA), a qual tem sequências intercalares (ITS- *Internal Transcribed Spacer*) que variam intra e interpopulacionalmente e sequências codificantes que são altamente conservadas e que servem como marcadores para comparação entre *taxa* divergentes (Mindell e Honeycutt, 1990; Hillis e Dixon, 1991).

Em eucariotas, o rDNA é uma família multigénica organizada em unidades repetidas ou em *tandem* dentro da região organizadora nucleolar. Cada unidade repetida consiste de regiões altamente conservadas que codificam os genes para os RNAs 18S, 5.8S e 28S, intercaladas por regiões espaçadoras não codificantes mais variáveis. Em estudos de filogenia a região ITS1-5.8S-ITS2 tem sido muito utilizada, por ser, muitas vezes, uma região específica para cada espécie e com baixas variações dentro do género. As regiões ITS possuem elevada variabilidade e evolução rápida, facto pelo qual têm sido alvo de vários estudos com o objectivo de esclarecer os níveis taxonómicos inferiores, como a família, o género e a espécie (Plunkett *et al.*; 1997; Jobs e Thien, 1997; Blattner, 1999).

Para muitas famílias das angiospérmicas a região ITS tem sido considerada uma fonte muito útil de variação esclarecedora para estudos filogenéticos, quer a nível interespecífico quer a nível intergenérico (Baldwin *et al.*, 1995; Lee e Downie, 1999; Spalik e Downie, 2006).

Por último, é uma região que pode ser facilmente amplificada por PCR e sequenciada usando *primers* universais (Fig. 2), mesmo a partir de amostras de DNA de espécimes herborizadas (Baldwin *et al.*, 1995), devido à sua pequena dimensão molecular (< 700 bp nas angiospérmicas) e à presença de sequências altamente conservadas que flanqueiam cada uma das duas regiões espaçadoras.

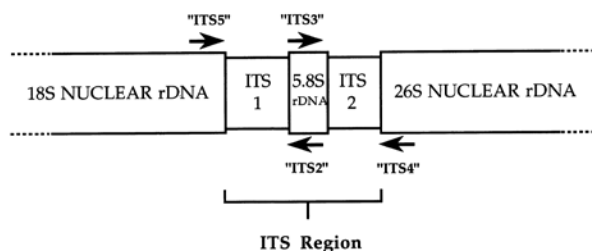


Figura 2 - Organização da região ITS. As setas indicam a orientação e a posição aproximada dos locais dos *primers* (Fonte: Baldwin *et al.*, 1995)

Outro marcador molecular muito utilizado em estudos genéticos, especialmente na detecção clonal, é o ISSR (*Inter Single Sequence Repeats*) que se destaca devido ao seu elevado grau de polimorfismo, reproducibilidade e baixo custo (Salimath *et al.* 1995). Os ISSRs são marcadores dominantes, semiarbitrários, que amplificam via PCR uma sequência de DNA delimitada por duas regiões microssatélites invertidas.

Estes marcadores têm sido utilizados desde a década de 1990 como fonte de polimorfismo na identificação de genótipos, confecção de mapas genéticos, selecção assistida em programas de melhoramento, além de estudos filogenéticos, avaliação e conservação de germoplasma (Gupta *et al.*, 1994; Zietkiewicz *et al.*, 1994; Kantety *et al.*, 1995; Parsons *et al.*, 1997; Ajibabe *et al.*, 2000; Raina *et al.*, 2001; Bornet *et al.*, 2002; Archak *et al.*, 2003; Saxena *et al.*, 2005).

As principais vantagens destes marcadores são a facilidade de utilização, especialmente por não requerer conhecimento prévio sobre a sequência de DNA, o alto grau de polimorfismo gerado, o uso de pequenas quantidades de DNA por reacção (5 a 20 ng), a especificidade e a reproducibilidade devido ao tamanho relativamente grande dos *primers*.

3. Materiais e Métodos

3.1. Morfoanatomia foliar

3.1.1. Material Vegetal

Neste trabalho foram utilizadas cinco espécies do género *Hypericum*, existentes em cultura no Parque Botânico da Tapada da Ajuda, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa: *H. calycinum*, *H. canariense*, *H. grandifolium*, *H. x inodorum* e *H. patulum*.

A colheita de pequenos ramos foi realizada antes da floração, entre 2007 e 2009. Apenas a zona média das folhas foi utilizada nos estudos morfológicos, anatómicos e histoquímicos.

Os dados relativos ao Voucher dos espécimes (LISI, Lisboa) e estudos efectuados estão referenciados no Quadro 3.

Quadro 3 - Identificação do material vegetal e estudos efectuados

Taxa	Voucher (LISI)	Estudo efectuado
<i>H. calycinum</i>	1767/2009	MO, MEV, DNA
<i>H. canariense</i>	771/2008	MO, MEV, DNA
<i>H. grandifolium</i>	1766/2009	MO, MEV, DNA
<i>Hypericum x inodorum</i>	773/2008	MO, MEV, DNA
<i>H. patulum</i>	363/2007	MO, MEV, DNA

3.1.2. Métodos

O estudo morfoanatômico incidiu sobre folhas adultas das espécies referidas no Quadro 3 por recurso a diferentes técnicas de microscopia óptica e electrónica de varrimento.

3.1.2.1. Microscopia Óptica (MO)

Para efectuar este estudo, após a colheita, o material fresco foi submetido ao processo de clarificação em água de Javel e lavado em água destilada (Evans, 2002) ou ao processo de fixação em glutaraldeído segundo o procedimento indicado no Anexo I (Hayat, 1981).

Estes dois procedimentos permitiram a observação das características do tecido epidérmico em ambas as páginas foliares, atendendo à forma, dimensão e orientação das células epidérmicas. Na epiderme da página inferior procedeu-se também à observação das características de estomas como medidas, identificação do tipo de estomas e cálculo do índice estomático. Os estomas foram classificados de acordo com Stace (1989) e o índice estomático foi calculado de acordo com Salisbury (1927), aplicando a seguinte fórmula:

[número de estomas / (número de estomas + número de células epidérmicas)] ×100.

Atendemos ainda à presença e distribuição de glândulas e calculámos também o seu índice de distribuição.

Para observação da anatomia foliar realizámos cortes transversais feitos com recurso a um micrótomo de Minot, Leitz 1520. Para tal, foi necessário conferir uma resistência adequada ao material, para posteriormente sofrer cortes finos. O Anexo II refere toda a preparação do material para corte em micrótomo.

As observações de MO foram realizadas num microscópio Nikon LABOPHOT 2. As imagens foram obtidas com uma câmara Nikon FX-35W equipada com um adaptador semi-automático Nikon PFX.

3.1.2.2. Microscopia Electrónica de Varrimento (MEV)

Para efectuar o estudo do material vegetal das cinco espécies em MEV foi previamente seguido o procedimento indicado no Anexo I.

Em MEV atendemos aos caracteres da superfície foliar em ambas as páginas e já anteriormente referidos, em MO.

Estas observações foram realizadas num aparelho da marca Jeol, JSM-5220 LV a 15 Kv, utilizando um sistema de aquisição directa de imagem.

3.2. Estudo histoquímico

O estudo histoquímico foi efectuado em material fresco, não sujeito a clarificação nem fixação, incidindo na zona média de folhas adultas e onde, por vezes, também se efectuaram cortes transversais manuais.

3.2.1. Microscopia óptica em campo claro

Foram realizados testes histoquímicos dirigidos aos principais grupos de compostos primários e secundários. No Quadro 4 encontra-se a listagem dos testes histoquímicos efectuados no presente estudo. Os protocolos detalhados destes testes, bem como os respectivos controlos negativos e resultados esperados constam do Anexo III. As observações foram realizadas no aparelho referido em MO.

Quadro 4 - Testes histoquímicos efectuados no presente estudo

Grupos de compostos	Teste histoquímico
Mucilagens	Ácido Tânico/Tricloreto de Ferro (Pizzolato e Lillie, 1973)
Polissacáridos gerais	PAS (Feder & O'Brien, 1968)
Lípidos gerais	Vermelho Sudão III (Johansen, 1940)
Lípidos diferenciais (ácidos e neutros)	Azul do Nilo (Jensen, 1962) Acetato de cobre/Ácido Rubeânico (Lison, 1960)
Terpenóides	Nadi (David e Carde, 1964) Tricloreto de antimónio (Hardman and Sofowora, 1972) 2,4-dinitrofenilhidrazina (Lison, 1960)
Fenóis	Tricloreto de Ferro III (Johansen, 1940) Dicromato de potássio (Johansen, 1940) Vanilina (Gardner, 1975)
Alcalóides	Reagente de Dittmar (Furr e Mahlberg, 1981)

Os testes histoquímicos em luz visível foram completados com observações em microscopia óptica de fluorescência onde foi observada a autofluorescência. O material foi seccionado à mão e observado através de um microscópio de fluorescência Olympus BX60 equipado com uma lâmpada de vapor de mercúrio e, um filtro de excitação 340-380 nm com um filtro de barreira a 430 nm e um filtro de excitação a 450-490 nm com paragem a 515 nm. Este equipamento possui também um sistema de aquisição directa de imagem Olympus DP 50.

3.3. Análise de dados

Os valores obtidos resultaram de uma média de 10 observações para os parâmetros: dimensões do mesófilo, índice estomático e índice de glândulas e 15 observações para os parâmetros da epiderme e estomas.

Todos os dados foram tratados estatisticamente através da análise de variância a um factor, ANOVA, com um nível de significância de 5%. Efectuou-se a análise dos dados de acordo com os procedimentos da GML, recorrendo ao programa estatístico SAS® (SAS Institute, Cary, NC, E.U.A.).

Para fazer as análises de variância multivariada (análise aglomerativa e análise de componentes principais) foi usado o programa Statistica versão 6.0, em que a matriz de dados consiste no valor médio de cada parâmetro.

3.4. Estudos Moleculares

Para a obtenção de DNA genómico foram utilizadas folhas jovens das sete espécies do género *Hypericum* L. referidas no Quadro 2, incluindo-se as espécies *H. androsaemum* e *H. perforatum* (Quadro 5), que não foram usadas no estudo morfológico e histoquímico. Estes exemplares foram mantidos em cultura em vaso durante algum tempo, no Parque Botânico da Tapada da Ajuda, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.

Quadro 5- Identificação do voucher de *H. androsaemum* e *H. perforatum*

Taxa	Voucher (LISI)	Estudo efectuado
<i>H. androsaemum</i>	1864/2009	DNA
<i>H. perforatum</i> ssp <i>perforatum</i>	365/2007	DNA

3.4.1. Extracção e quantificação do DNA genómico

Para a extracção do DNA genómico utilizou-se o DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) introduzindo-se algumas modificações ao protocolo apresentado no Anexo IV, A.

Foi necessário recorrer ao método CTAB (Cationic hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide) para extracção do DNA de uma das amostras (Anexo IV, B), uma vez que na espécie *H. calycinum* não se conseguiu extrair o DNA com o Kit anteriormente referido.

A quantificação do DNA foi realizada por comparação visual da intensidade de fluorescência das bandas de alíquotas de 3 µl de DNA de cada amostra com a das bandas padrão do DNA do fago lambda. Esta quantificação foi efectuada em géis de agarose 0,8% (p/v), os quais foram posteriormente submetidos a electroforese em tampão 0,5x TBE (45 mM Tris-Borato pH 8,0 e 1 mM EDTA) contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio.

Após a corrida electroforética, os perfis foram visualizados sob luz ultravioleta, no analisador de imagens VersaDoc (Bio-Rad).

Outra técnica utilizada para quantificar o DNA foi a Espectrofotometria recorrendo à determinação das absorvâncias a 260 nm (A_{260}) e a 280 nm (A_{280}), num espectrofotómetro (BioRad Smart-Spec 3000).

3.4.2. Amplificação de DNA por PCR

O DNA extraído foi amplificado por PCR recorrendo-se ao Kit Taq PCR Master Mix (Qiagen) e as reacções de amplificação foram realizadas num termociclador PCR Express Hybaid.

Todos os reagentes (conservados a -20°C) e material estéril necessários foram manuseados numa câmara com ambiente previamente descontaminado por luz UV.

3.4.2.1. Amplificação de ISSR

Para a detecção de polimorfismos entre as espécies analisadas, foram testados 7 *primers*: MR, (CACAC)₃, (CA)₈RG, (CAG)₅, (GA)₈YG, (GA)₈YT e HVH(TG)₇.

As misturas reaccionais foram preparadas para um volume de 25 µL recorrendo-se ao kit Taq PCR Master Mix (Qiagen) e de acordo com o Quadro 6.

Quadro 6- Componentes e respectivos volumes nas misturas da reacção para os *primers* MR, (CACAC)₃, (CA)₈RG, (CAG)₅, (GA)₈YG, (GA)₈YT e HVH(TG)₇

Componentes	Volumes (µl)	Concentração final
Taq PCR Master Mix (2x)	12,5	dNTPs (200 µM cada) MgCl ₂ (1,5 mM) Taq DNA polimerase (2,5 U)
MgCl ₂ (25 mM)	0,5	0,5 mM
DMSO	1,25	5%
<i>Primers</i>	MR 0,4 (CACAC) ₃ 0,4 (CA) ₈ RG 0,3 (CAG) ₅ 0,3 (GA) ₈ YG 0,4 (GA) ₈ YT 0,3 HVH(TG) ₇ 0,3	0.5 µM
ddH ₂ O	até 25 µL	-
DNA	0,5	30-100 ng/µl

Y = C ou T; R = A ou G; H = A ou C ou T; V = A ou C ou G

A programação utilizada para a amplificação da região ISSR de todos os *primers* consta do Quadro 7.

Quadro 7- Programa de PCR utilizado

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo (min)	N.º Ciclos
Desnaturação inicial	94	3	1
Desnaturação	94	1	45
Hibridação	55	1	
Extensão	72	2	
Extensão final	72	10	1

- **Electroforese em gel de agarose (AGE)**

Os produtos resultantes das amplificações foram submetidos à separação electroforética em gel de agarose com uma concentração de 1,5 % (p/v) em 0,5x TBE com 0,5 µg/mL de brometo de etídio, numa tina de separação Sub-Cell GT (Bio-Rad) e utilizando-se uma fonte eléctrica Pac300 (Bio-Rad). Nos poços do gel foram colocados 20 µL de produto amplificado com 1µL de solução tampão de deposição (0,25 % de azul de bromofenol, 0,25% de xilenocianol e 40% de sacarose). A separação electroforética decorreu a uma voltagem constante de 150 V durante três horas.

- **Análise dos géis**

Os géis foram visualizados no analisador de imagens VersaDoc (Bio-Rad). As dimensões moleculares dos fragmentos visualizados foram determinadas através das suas mobilidades relativas e das de fragmentos de dimensão conhecida, marcador O'RangeRuler™ 100bp+500bp DNA Ladder (Fermentas), utilizando-se o programa de análise molecular Quantity One (Bio-Rad).

- **Análise de dados**

Para análise dos resultados obtidos por PCR a partir da amplificação dos *primers* ISSR recorreu-se a métodos de taxonomia numérica e utilizou-se o programa NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System), versão 2.02 (“Applied Biostatistics Inc”) (Nóbrega, 1996). Deste modo, a partir da leitura dos géis foi construída uma matriz binária para os fragmentos polimórficos com presença (1) e ausência (0) de bandas. A semelhança entre as amostras foi estimada pelo coeficiente de Dice e, para se representar graficamente o padrão de divergência genética, as matrizes de semelhança foram submetidas a uma análise de agrupamento do tipo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using na Arithmetic Average), obtendo-se os respectivos dendogramas.

3.4.2.2. Amplificação da região ITS

Para amplificação da região ITS utilizaram-se os *primers* universais ITS4/ITS5 desenhados por White *et al.* (1990) e referidos por muitos autores. Utilizaram-se também os *primers* C28kj/Leu1, o primeiro desenhado por K. W. Cullings (San Francisco State University) e o segundo por L. E. Urbatsch (Louisiana State University) (Vargas *et al.*, 1998; 2000). No Quadro 8 apresentam-se as sequências de nucleótidos destes *primers*.

Quadro 8- Códigos e sequências de nucleótidos dos primers forward (F) e reverse (R)

Código	Sequência de nucleótidos (5'→3')	Região do DNA amplificada
ITS5 ITS4	F: GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG R: TCCTCCGCTTATTGATATGC	< 700 bp em angiospérmicas
C28Kj Leu1	F: TTGGACGGAATTTACCGCCCG R: GTCCACTGAACCTTATCATTAG	≅ 800 bp

As misturas reaccionais foram preparadas para um volume de 50 µl de acordo com o Quadro 9.

Quadro 9 -Componentes e respectivos volumes nas misturas da reacção para os pares de *primers* ITS5/ITS4 e C28Kj/Leu1

Componentes	Volume (µl)	Concentração final
Taq PCR Master Mix (2x)	25	dNTPs (200 µM cada) MgCl ₂ (1,5 mM) Taq DNA polimerase (2,5 U)
MgCl ₂ (25 mM)	4	2 mM
Primer forward (10 µM)	2	0,4 µM
Primer reverse (10 µM)	2	0,4 µM
ddH ₂ O	16	-
DNA	1	100 ng/µl

A programação utilizada para a amplificação da região ITS consta do Quadro 7, apresentado anteriormente.

3.4.2.2.1. Clonagem de Produtos PCR

- **Eluição e purificação de fragmentos amplificados**

Como os produtos amplificados resultantes contêm uma mistura complexa que inclui, além dos produtos PCR específicos, os componentes residuais da reacção, tais como *primers*, nucleótidos não incorporados, enzimas, sais e produtos PCR inespecíficos, procedeu-se à purificação das bandas (dos produtos amplificados com o par de *primers* C28Kj/LEU1) utilizando o kit QIAquick agarose gel extraction (Qiagen), seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante (Anexo IV, C).

- **Ligação ao vector plasmídico**

O processo de clonagem divide-se fundamentalmente em dois passos, a ligação e a transformação. O primeiro passo consiste em efectuar a ligação dos fragmentos de DNA

purificados ao vector plasmídico pJET1.2/blunt (Fig. 3) utilizando-se para tal o protocolo do PCR Cloning Kit (Fermentas) (Anexo IV, D.1.), de acordo com o Quadro 10.

Quadro 10 -Processo de ligação e transformação dos fragmentos de DNA

Reacção de Ligação (Anexo IV D.1.)		Reacção de Transformação (Anexo IV D.2.)
Tampão de ligação (2x)	10 µl	<ul style="list-style-type: none"> • Mistura de reacção de ligação • Células competentes (TransformAid Bacterial) • Meio SOC • Placas com LB contendo ampicilina
Produto de PCR	2 µl	
ddH ₂ O	5 µl	
DNA blunting enzyme	1 µl	
Vector pJet1.2/blunt (50 ng/ µl)	1 µl	
T4 DNA ligase (5 µl/ µl)	1 µl	
Volume Total	20 µl	

O vector pJET1.2/blunt, fornecido sob a forma linearizada, híbrida com elevada especificidade com os produtos PCR gerados pelo uso de *Taq* contida no PCR Cloning Kit. Este vector contém o gene de resistência à ampicilina e um gene letal *eco471R*, que é interrompido pela ligação do fragmento de DNA (*insert*) e que possibilita a selecção das células transformantes, uma vez que só as células com o plasmídeo recombinante conseguem multiplicar-se em meio de cultura suplementado com ampicilina.

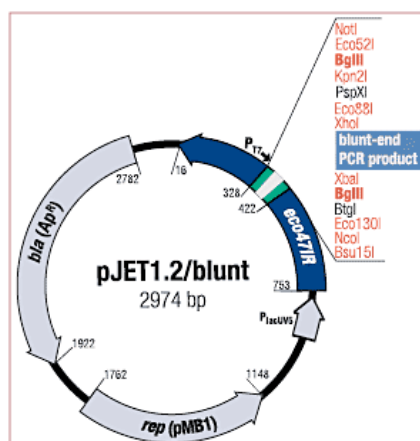


Figura 3 - Vector de clonagem pJET1.2/blunt com a lista das endonucleases de restrição que possuem locais de reconhecimento únicos que ladeiam o local de inserção do DNA clonado (MCS) (adaptado de PCR Cloning Kit (Fermentas))

(Fonte: <http://www.fermentas.com>)

A mistura resultante da ligação foi utilizada para transformar células bacterianas de *E.coli* competentes aptas a incorporar DNA exógeno, de acordo com o protocolo de transformação (Anexo IV, D.2.).

A mistura resultante da transformação foi plaqueada em placas de Petri num meio sólido LB (meio standard Luria Bertani) contendo ampicilina (100 µg/mL). As placas foram incubadas a 37°C durante a noite.

- **Multiplicação das células recombinantes de *Escherichia coli* em meio LB líquido**

Após a multiplicação das células recombinantes, as colónias isoladas foram seleccionadas e colocadas em 2 ml de meio de cultura líquido LB suplementado com ampicilina. Foram incubadas durante a noite a 37°C sob agitação de 150 rpm para posterior extracção do DNA plasmídico.

- **Extracção do DNA plasmídico**

Para a extracção do DNA plasmídico utilizou-se o Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) (Anexo IV, E) seguindo as instruções do fabricante.

- **Digestão com enzimas de restrição**

O vector pJET1.2/blunt contém locais de restrição únicos junto do local de inserção do DNA exógeno- MCS (Multiple Cloning Site) (Fig. 4).

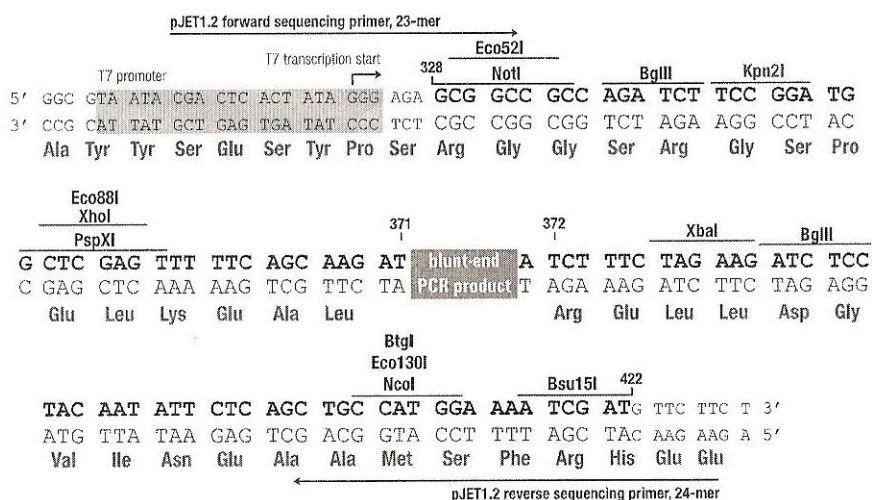




Figura 4 - Mapa de restrição do vector pJET1.2/blunt

De acordo com o mapa de restrição para este vector, o DNA recombinante foi digerido com as enzimas de restrição *NotI* e *XbaI* que, clivando o vector pJET1.2/blunt em dois locais, um precedente e outro subsequente ao local de inserção do DNA exógeno, permite o isolamento deste.

No Quadro 11 apresentam-se os componentes e respectivos volumes utilizados nas reacções de digestão com a *NotI* (BioLabs) e a *XbaI* (BioLabs).

Quadro 11 -Componentes e respectivos volumes nas misturas de reacção de digestão

	Componente	Volume (µl)	Local de reconhecimento da enzima
Digestão com <i>NotI</i> 	Solução tampão (10x)	2	5'...GC↓GGCCGC...3' 3'...CGCCGG↑CG...5'
	Enzima de restrição (10 U/ µl)	1	
	Água destilada esterilizada	15	
	DNA plasmídico	1	
Digestão com <i>XbaI</i> 	Solução tampão (10x)	2	5'...T↓CTAGA...3' 3'...AGATC↑T...5'
	Enzima de restrição (10 U/ µl)	1	
	Água destilada esterilizada	15	
	DNA plasmídico	1	

O procedimento consistiu nos seguintes passos:

- 1) Os tubos eppendorf contendo as misturas de reacção foram colocados a 37°C durante 2 horas.
- 2) Após este período as enzimas foram inactivadas por incubação a 65°C durante 20 minutos.
- 3) Terminada a restrição, os respectivos digestos foram fraccionados por AGE, determinando-se a dimensão dos fragmentos por comparação das suas mobilidades electroforéticas com as de DNAs marcadores moleculares aplicados em simultâneo com as amostras no gel.

3.4.2.2.2. Sequenciação

- **Sequenciação dos produtos PCR obtidos com os primers C28Kj/LEU1**

As reacções de sequenciação foram conduzidas pela empresa STAB Vida.

- **Análise das sequências**

As sequências foram alinhadas utilizando-se o programa Geneious Pro 3.0.4. (<http://www.geneious.com/>).

As análises de homologia foram realizadas recorrendo-se ao algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) e o dendograma foi obtido pelo algoritmo Neighbor-Joining através do programa BLAST TREE VIEW.

4. Resultados e discussão

4.1. Morfoanatomia foliar

Nos taxa *H. calycinum* (HYPCA), *H. canariense* (HYPCN), *H. grandifolium* (HYPGR), *H. x inodorum* (HYPIN) e *H. patulum* (HYPPA) procedemos à observação de caracteres morfológicos e anatómicos foliares que seguidamente passamos a discriminar para cada espécie. No Quadro 12 apresenta-se uma síntese dos principais microcaracteres descritos para estas cinco espécies e no Quadro 13, os valores médios, respectivo erro padrão da média e comparação das médias pelo teste da mínima diferença significativa para um nível de probabilidade de $P > 0,05$.

Quadro 12 - Características morfoanatómicas observadas em folhas de *Hypericum calycinum* L. (HYPCA), *Hypericum canariense* L. (HYPCN), *Hypericum grandifolium* Choisy (HYPGR), *Hypericum x inodorum* Mill. (HYPIN) e *Hypericum patulum* Thunb (HYPPA). (+) → pouco; (+++) → muito

Características morfoanatómicas	Taxa				
	HYPCA	HYPCN	HYPGR	HYPIN	HYPPA
Epiderme superior:					
Forma das células	Poligonais, com paredes sinuosas (+) e pontuações	Poligonais com paredes direitas e pontuações	Poligonais, com paredes sinuosas (+) e pontuações	Poligonais com paredes direitas e pontuações	Poligonais, papiláceas com paredes direitas e pontuações
Depósitos cuticulares	Depósitos em placas dispostos ao acaso com elevada densidade	Depósitos em placas dispostos ao acaso com densidade média	Depósitos em placas dispostos ao acaso com baixa densidade	Depósitos em placas dispostos ao acaso com baixa densidade	Depósitos em placas dispostos ao acaso com baixa densidade
Epiderme inferior:					
Forma das células	Poligonais, com paredes sinuosas (+++) e pontuações	Poligonais, com paredes sinuosas (+) e pontuações	Poligonais, com paredes sinuosas (+) e pontuações	Poligonais com paredes direitas e pontuações	Células papiláceas com forma indefinida
Depósitos cuticulares	Depósitos em placas dispostos ao acaso com elevada densidade	Depósitos em placas dispostos ao acaso com densidade média	Depósitos em placas dispostos ao acaso com baixa densidade	Depósitos em placas dispostos ao acaso com baixa densidade	Depósitos em placas dispostos ao acaso com baixa densidade
Tipos de estomas	Diacíticos e Anisocíticos	Anomocíticos e Anisocíticos	Paracíticos	Paracíticos e Anomocíticos	-
Cortes transversais:					
Parênq. clorofilino em paliçada	2 camadas	1 camada	1 camada	1 camada	1 camada
Parênq. clorofilino lacunoso	4-5 camadas	4-5 camadas	4-5 camadas	4-5 camadas	4-5 camadas
Glândulas secretoras, translúcidas	presentes no parênquima clorofilino em paliçada ou na zona de transição entre os dois parênquimas *observam-se também cristais de oxalato de cálcio	presentes no parênquima clorofilino em paliçada e no parênquima clorofilino lacunoso	presentes no parênquima clorofilino em paliçada e no parênquima clorofilino lacunoso	presentes no parênquima clorofilino em paliçada e no parênquima clorofilino lacunoso	presentes no parênquima clorofilino em paliçada ou na zona de transição entre os dois parênquimas

Quadro 13 - Parâmetros morfoanatômicos médios observados em folhas de *Hypericum calycinum* L.(HYPCA), *Hypericum canariense* L. (HYPCN), *Hypericum grandifolium* Choisy (HYPGR), *Hypericum x inodorum* Mill. (HYPIN) e *Hypericum patulum* Thunb (HYPPA)

Parâmetro morfo anatômico	Taxa				
	HYPCA	HYPCN	HYPGR	HYPIN	HYPPA
⁽¹⁾ Mesófilo total (μm)	185,0 (2,69) a	119,9 (8,51) c	93,3 (5,06) d	101,1 (5,24) d	154,2 (3,86) b
⁽¹⁾ Parênquima paliçada (μm)	97,0 (1,53) a	31,5 (1,31) c	26,8 (1,17) c	27,8 (1,23) c	45,0 (3,00) b
⁽¹⁾ Parênquima lacunoso (μm)	80,0 (2,98) a	54,1 (1,01) b	45,0 (6,62) b	48,4 (3,29) b	76,7 (4,47) a
⁽¹⁾ Índice estomático	17,4 (0,63) c, b	18,8 (1,30) b	20,2 (1,27) b	14,2 (0,79) c	28,7 (1,72) a
⁽¹⁾ Índice glândulas	1,0 (0,12) c	34,4 (6,80) a	11,5 (1,10) b	16,1 (0,76) b	27,6 (2,91) a
⁽²⁾ C. estomas (μm)	25,5 (0,59) a	23,0 (0,58) b	19,4 (0,66) c	16,8 (0,56) d	24,4 (0,75) b, a
⁽²⁾ L. estomas (μm)	24,4 (0,68) a	14,2 (0,31) c	13,3 (0,50) c	13,7 (0,65) c	17,0 (0,84) b
⁽²⁾ C. células ep. Inferior (μm)	79,3 (1,63) a	36,4 (2,73) b	37,3 (1,33) b	27,6 (1,10) c	39,3 (1,81) b
⁽²⁾ L. células ep. Inferior (μm)	28,6 (1,07) a	25,9 (1,76) b	17,0 (0,66) c	13,2 (0,65) d	19,2 (0,75) c
⁽²⁾ C. células ep. Superior (μm)	47,6 (2,14) a	28,1 (1,59) d	38,0 (1,18) b	30,1 (0,58) d, c	33,6 (1,31) c
⁽²⁾ L. células ep. Superior (μm)	31,7 (1,45) a	28,8 (2,25) a	21,1 (1,50) b	15,4 (0,49) c	19,2 (1,01) c, b
⁽²⁾ Estomas (C/L)	1,1 (0,04) b	1,6 (0,06) a	1,5 (0,07) a	1,3 (0,08) b	1,5 (0,06) a
⁽²⁾ Células ep. inferior - C/L	2,9 (0,14) a	1,5 (0,17) c	2,3 (0,13) b	2,2 (0,15) b	2,1 (0,11) b
⁽²⁾ Células ep. superior - C/L	1,5 (0,08) b	1,1 (0,12) c	1,9 (0,11) a	2,0 (0,08) a	1,8 (0,16) b, a

Em cada linha letras diferentes indicam - diferenças altamente significativas entre espécies para um nível de probabilidade de 0,05;

Entre parêntesis - erro padrão da média; L = largura; C = comprimento;

⁽¹⁾ Valores médios de 10 observações; ⁽²⁾ Valores médios de 15 observações

4.1.1. *Hypericum calycinum*

4.1.1.1. Macrocaracteres

Este *taxon* possui folhas opostas, oblongas a elípticas, coriáceas, subsésseis sem pecíolo, glabras, de margem inteira, com 35-95 mm x 10-40 mm e numerosas glândulas secretoras translúcidas, visíveis em ambas as páginas e distribuídas aleatoriamente (Fig. 5, A). Esta espécie não apresenta outro tipo de estruturas secretoras.

4.1.1.2. Microcaracteres

A epiderme superior apresenta células poligonais de parede celular sinuosa, com pontuações, isto é, paredes celulares com espessamentos em rosário (Fig. 5, B), e uma camada densa de ceras epicuticulares, de tipo placa, dispostas ao acaso (Fig. 6, A). As

células desta epiderme apresentam uma razão comprimento / largura de 1,54 μm (Quadro 13). Não apresenta estomas.

As células da epiderme inferior são poligonais, com paredes celulares muito sinuosas, com pontuações, e uma razão comprimento / largura média de 2,86 μm (Quadro 12 e 13). Em microscopia electrónica observam-se também ceras epicuticulares (Fig. 6, C) e numerosos estomas do tipo diacítico e anisocítico, ambos distribuídos ao acaso e sem orientação definida (Fig. 5, C). As dimensões dos estomas são, em média, de 25,5 μm e 24,4 μm , comprimento e largura, respectivamente. Este comprimento difere significativamente do das células estomáticas de *H. canariense*, *H. grandifolium* e *Hypericum x inodorum*, mas não de *H. patulum*. A largura das células estomáticas de *H. calycinum* difere significativamente do valor encontrado em todos os outros *taxa*. O índice estomático calculado foi de 17,4 e difere dos *taxa* *Hypericum x inodorum* e *H. patulum* (Quadro 13).

O mesófilo apresenta cortes transversais muito uniformes, com duas camadas de parênquima clorofilino em paliçada (Fig. 5, D), com espessura média de 97 μm , quatro a cinco camadas de parênquima clorofilino lacunoso, com espessura média de 80 μm , este com numerosos e grandes espaços intercelulares. Observam-se cristais de oxalato de cálcio em forma de drusas, sempre na proximidade de feixes vasculares (Fig. 5, D). As glândulas translúcidas situam-se no seio do parênquima clorofilino em paliçada (Fig. 6, B) ou na zona de transição entre este e o parênquima clorofilino lacunoso. O índice de glândulas é de 1,0, o valor mais baixo observado, diferindo significativamente dos outros quatro *taxa* analisados (Quadro 13).

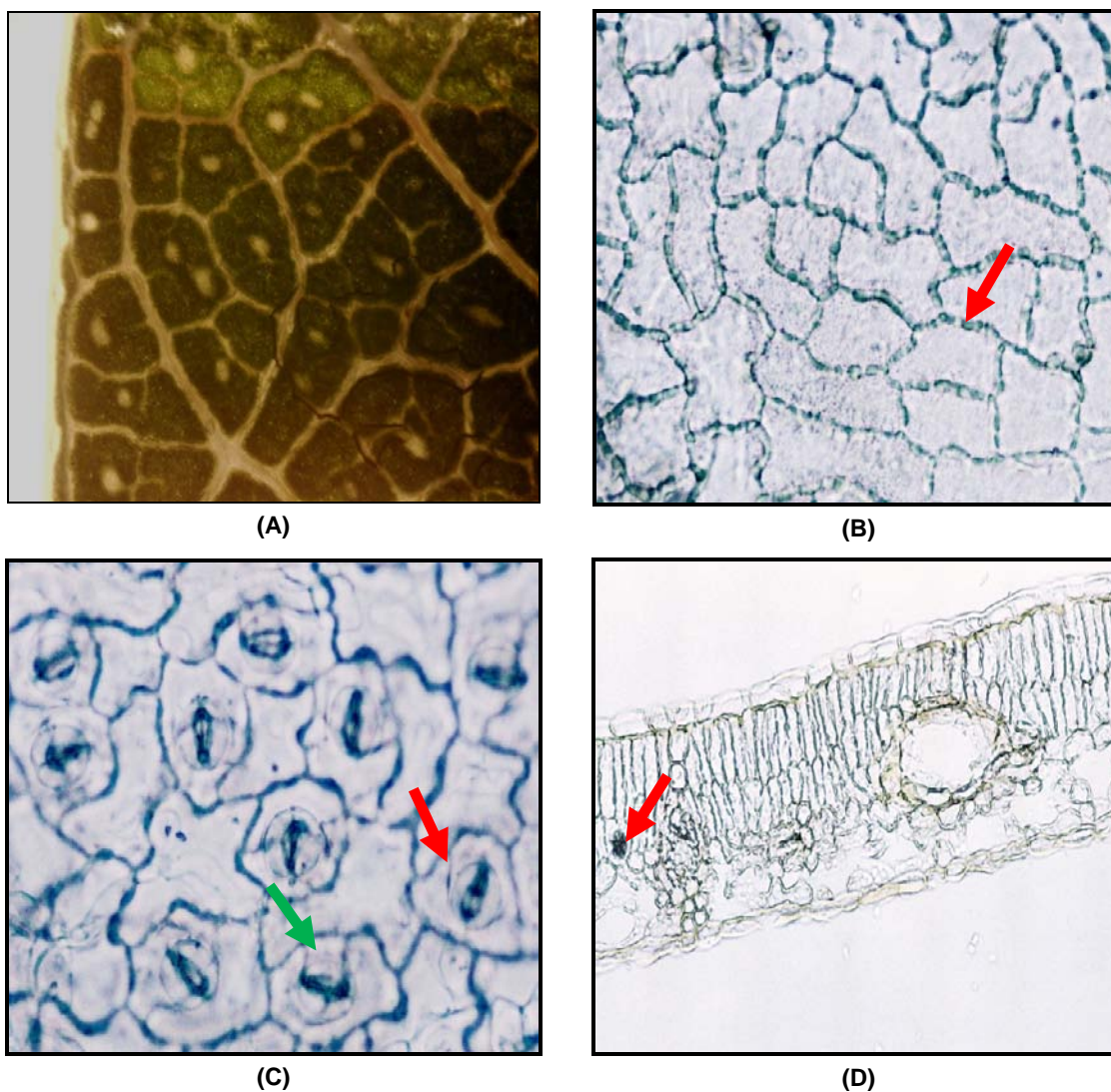
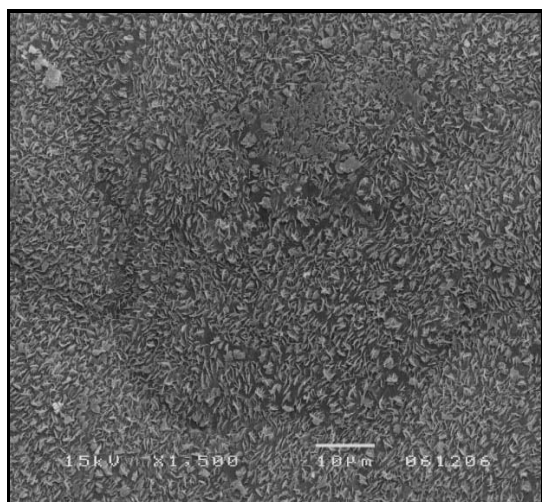
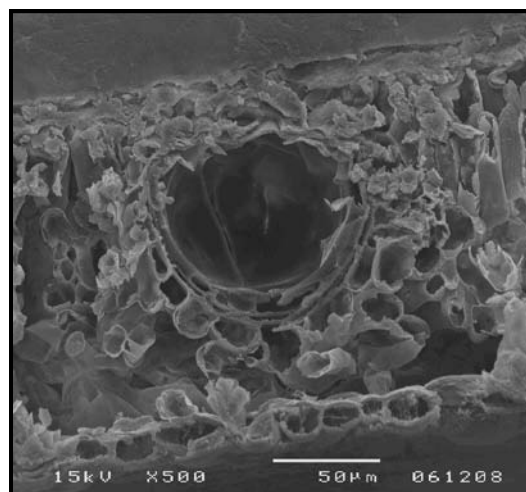


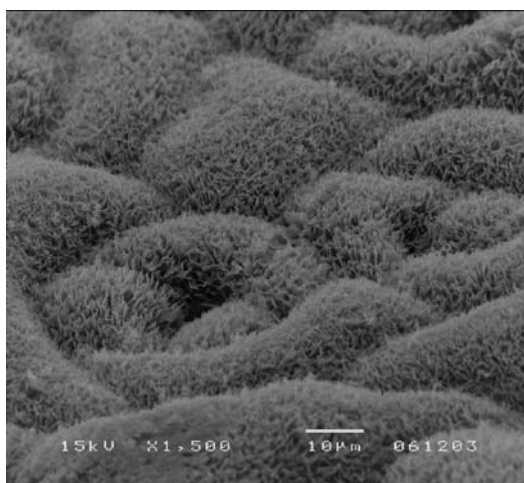
Figura 5 - *H. calycinum* L.: **A** – Pormenor da página superior da folha observando-se a distribuição de glândulas secretoras translúcidas (MO x 12,5); **B** – Epiderme superior com células poligonais e paredes celulares com pontuações (seta vermelha) (MO x 420); **C** - Epiderme inferior com estomas diacíticos (seta verde) e anisocíticos (seta vermelha) (MO x 420); **D** - Corte transversal da folha com duas camadas de parênquima clorofílico em paliçada, cristais de oxalato de cálcio em forma de drusa (seta vermelha) e uma glândula secretora inserida na zona de transição entre o parênquima clorofílico em paliçada e o parênquima clorofílico lacunoso (MO x 200)



(A)



(B)



(C)

Figura 6 - *H. calycinum* L.: **A** – Epiderme superior, observando-se uma camada densa de ceras epicuticulares (MEV x 1500); **B** – Pormenor de corte transversal observando-se uma glândula secretora no parênquima clorofilino em paliçada (MEV x 500); **C** - Epiderme inferior, observando-se a densa distribuição de ceras epicuticulares (MEV x 1500)

4.1.2. *Hypericum canariense*

4.1.2.1. Macrocaracteres

As suas folhas com dimensões de 26-70 mm x 5-15 mm são opostas e glabras, subsésseis sem pecíolo, elípticas a oblongo-elípticas, com margem inteira, por vezes não clorofilina (Fig. 7, A), e base estreita acunhada. Apresenta glândulas secretoras translúcidas visíveis em ambas as páginas, não possuindo glândulas pretas.

4.1.2.2. Microcaracteres

As células adaxiais são poligonais e apresentam paredes celulares direitas, com pontuações (Fig. 7, B). O comprimento e largura média das células epidérmicas da página superior são de 28,1 µm e 28,8 µm, respectivamente (Quadro 13). O comprimento destas células difere

do observado nos taxa *H. calycinum*, *H. grandifolium* e *H. patulum*, enquanto a largura é semelhante à encontrada em *H. calycinum*. A epiderme superior também não possui estomas.

A epiderme abaxial é constituída por células poligonais, paredes celulares sinuosas com pontuações, com dimensões médias de comprimento e largura de 36,4 µm e 25,9 µm, respectivamente. O comprimento difere significativamente de *H. calycinum* e de *H. x inodorum* (Quadro 13). Os estomas existentes nesta epiderme são numerosos e de dois tipos: anomocíticos e anisocíticos, distribuídos ao acaso e sem orientação definida (Quadro 12, Fig. 7, C). Em média, o comprimento e largura das células estomáticas é de 23,0 µm e 14,2 µm, respectivamente. O índice estomático foi de 18,8 diferindo do encontrado em *H. patulum* e *H. x inodorum* (Quadro 13).

O mesófilo de *H. canariense* apresenta cortes transversais apenas com uma camada de parênquima clorofilino em paliçada, com espessura média de 31,5 µm, e quatro a cinco camadas de parênquima clorofilino lacunoso, com espessura média de 54,1 µm, este com numerosos e grandes espaços intercelulares (Fig. 7, D). A espessura dos dois parênquimas difere significativamente da dos taxa *H. calycinum* e *H. patulum*. No revestimento das duas epidermes é visível uma camada de ceras epicuticulares de densidade média, dispostas ao acaso, sob a forma de placas de grandes dimensões (Fig. 8, A e B).

As glândulas translúcidas situam-se quer ao nível do parênquima clorofilino em paliçada, quer ao nível do parênquima clorofilino lacunoso. O índice de glândulas foi de 34,4 (o valor mais elevado observado). Este valor não difere significativamente do taxon *H. patulum* (27,6) mas difere do das outras três espécies.

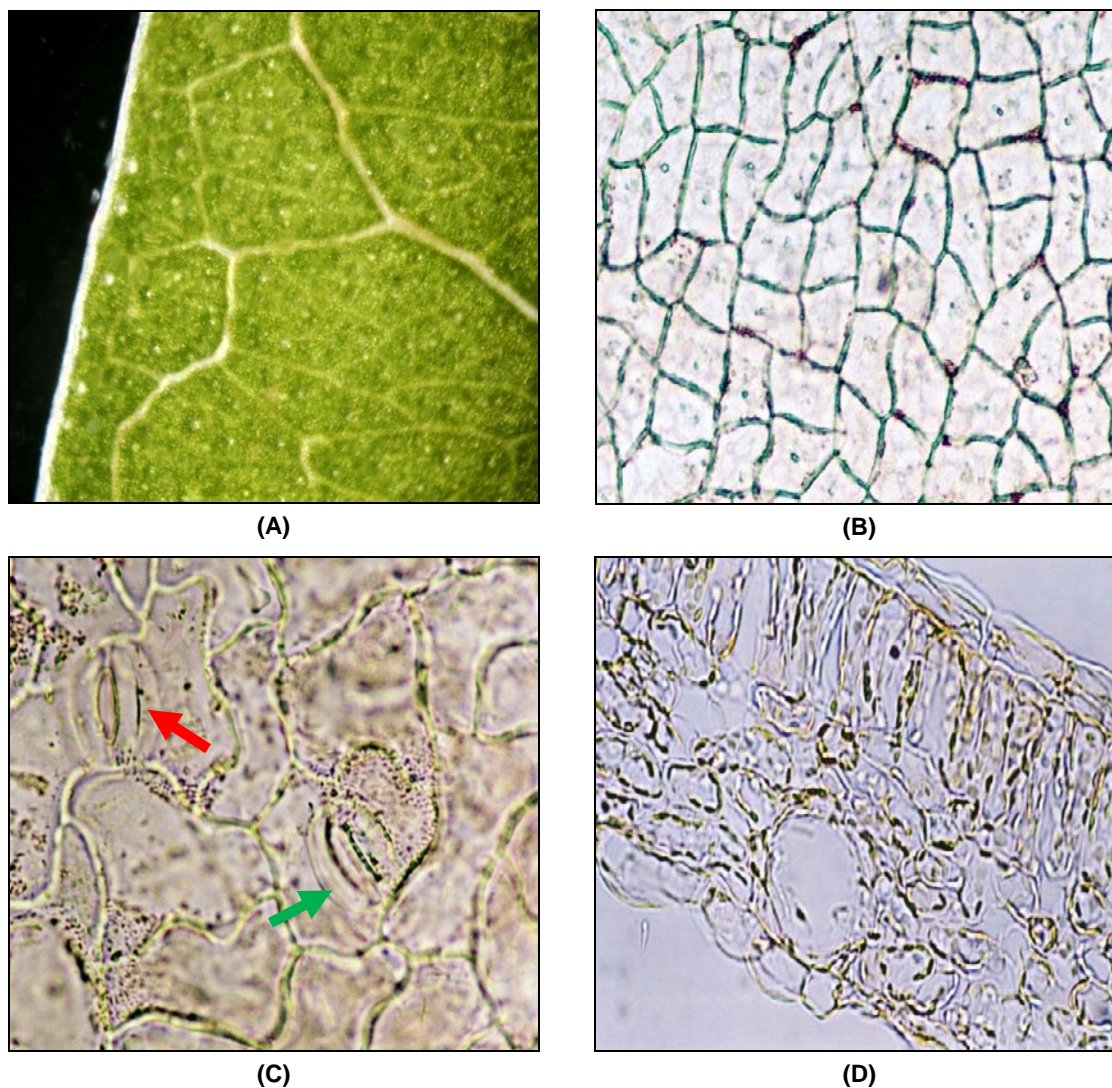


Figura 7 - *H. canariense* L.: **A**- Pormenor da página superior, margem inteira, não clorofilina e glândulas translúcidas visíveis (MO x 8); **B** - Epiderme superior com células poligonais, paredes direitas e com pontuações na parede celular (MO x 420); **C** - Epiderme inferior, células de parede sinuosa, com estomas anomocíticos (seta vermelha) e anisocíticos (seta verde) (MO x 420); **D** - Corte transversal com uma camada de parênquima clorofilino em paliçada e uma glândula secretora entre as células do parênquima clorofilino lacunoso

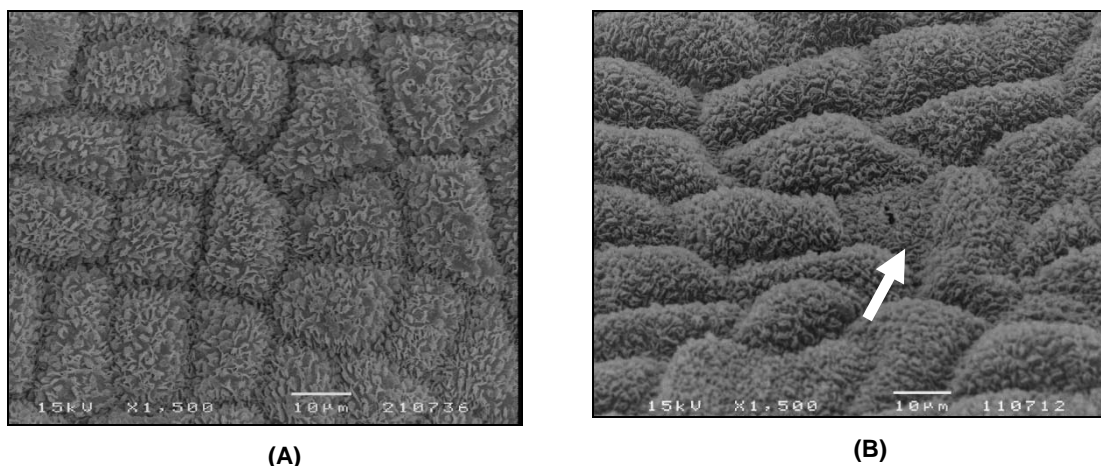


Figura 8 - *H. canariense* L.: **A** - Epiderme da página superior, pormenor da forma das células e distribuição das ceras sob a forma de placas (MEV x 1500); **B** - Epiderme da página inferior, pormenor das ceras epicuticulares e estoma (seta branca) (MEV x 1500).

4.1.3. *Hypericum grandifolium*

4.1.3.1. Macrocaracteres

As folhas de *H. grandifolium* têm dimensões de 40-90 mm x 25-45 mm, são opostas e glabras, com margem inteira, subsésseis sem pecíolo, largamente triangulares, ovadas a oblongo-ovadas, ápice obtuso a arredondado, base cordiforme a arredondada. Apresentam glândulas secretoras translúcidas visíveis em ambas as páginas, não possuindo glândulas pretas (Fig. 9, A).

4.1.3.2. Microcaracteres

A epiderme superior está revestida por ceras epicuticulares pouco densas, dispostas ao acaso sob a forma de placas (Fig. 9, B). É formada por células poligonais com paredes celulares pouco sinuosas e sem estomas (Quadro 12). As células epidérmicas adaxiais apresentam um comprimento e largura médios de 38,0 µm e 21,1 µm, respectivamente. O comprimento difere significativamente do das outras espécies enquanto que a largura é apenas semelhante à da espécie *H. patulum* (Quadro 13).

A epiderme abaxial é revestida por ceras epicuticulares pouco densas e apresenta estomas do tipo paracítico (Fig. 9, C), também sem orientação definida e distribuídos ao acaso. As dimensões médias das células estomáticas são 19,4 µm e 13,3 µm de comprimento e largura, respectivamente. O comprimento apresenta um valor significativamente menor que qualquer das outras espécies. O índice estomático nesta espécie é similar ao verificado em *H. calycinum* e *H. canariense*, mas significativamente superior ao de *H. x inodorum* e significativamente inferior ao de *H. patulum* (Quadro 13). As células da epiderme inferior são

poligonais, paredes celulares pouco sinuosas e com pontuações, com um comprimento e largura médios de 37,3 μm e 17,0 μm , respectivamente. Os dois parâmetros diferem significativamente dos observados em *H. calycinum* e *H. x inodorum*.

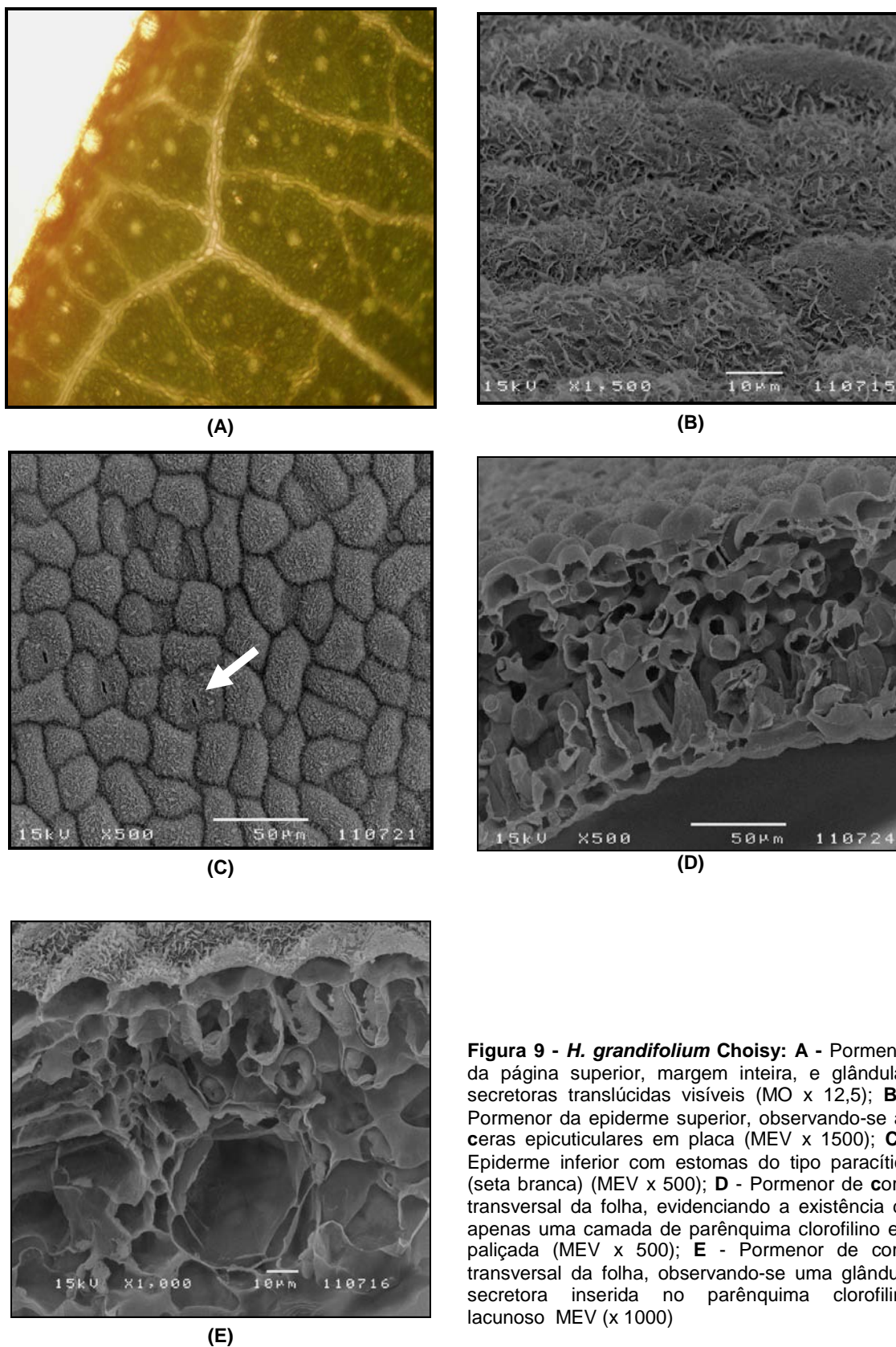


Figura 9 - *H. grandifolium* Choisy: **A** - Pormenor da página superior, margem inteira, e glândulas secretoras translúcidas visíveis (MO x 12,5); **B** - Pormenor da epiderme superior, observando-se as ceras epicuticulares em placa (MEV x 1500); **C** - Epiderme inferior com estomas do tipo paracítico (seta branca) (MEV x 500); **D** - Pormenor de corte transversal da folha, evidenciando a existência de apenas uma camada de parênquima clorofilino em paliçada (MEV x 500); **E** - Pormenor de corte transversal da folha, observando-se uma glândula secretora inserida no parênquima clorofilino lacunoso MEV (x 1000)

Os cortes transversais das folhas ilustram um mesófilo com apenas uma camada de parênquima clorofilino em paliçada (Fig. 9, D) com dimensões médias de 26,8 µm, valor significativamente inferior ao de *H. calycinum* e ao de *H. patulum* (Quadro 13). Observam-se quatro a cinco camadas de parênquima clorofilino lacunoso com dimensões médias de 45 µm, com um valor também significativamente inferior ao de *H. calycinum* e ao de *H. patulum* (Quadro 13). As glândulas translúcidas encontram-se distribuídas tanto no parênquima clorofilino em paliçada como no parênquima clorofilino lacunoso (Fig. 9, E). O índice médio de glândulas calculado foi de 11,5, valor que difere significativamente do encontrado nos taxa *H. calycinum*, *H. canariense* e *H. patulum*.

4.1.4. *Hypericum x inodorum*

4.1.4.1. Macrocaracteres

O híbrido *H x inodorum* tem folhas com dimensões de 35 mm x 110 mm, oblongo-lanceoladas a largamente ovadas, sésseis, glabras e sem pecíolo, margem inteira. Ápice agudo a arredondado, base arredondada a cordada, nervação em rede apertada e proeminente em ambos os lados da folha. Apresenta glândulas secretoras translúcidas, visíveis em ambas as páginas e sem glândulas pretas (Fig. 10, A).

4.1.4.2. Microcaracteres

A epiderme superior é revestida por ceras epicuticulares pouco densas dispostas ao acaso sob a forma de placas, sem estomas (Fig. 10, C). Apresenta células poligonais, paredes celulares direitas, com comprimento e largura médios de 30,1 µm e 15,4 µm, respectivamente e igualmente com pontuações (Fig. 10, B). O comprimento e a largura das células adaxiais diferem dos taxa *H. grandifolium*, *H. calycinum* e *H. canariense* não havendo diferenças significativas para o taxon *H. patulum* (Quadro 13).

As células da epiderme abaxial são poligonais com paredes celulares direitas e com pontuações. Também estão revestidas por ceras epicuticulares dispostas ao acaso sob a forma de placas e pouco densas. O comprimento e largura médios são de 27,6 µm e 13,2 µm, respectivamente, diferindo significativamente dos outros quatro taxa (Quadro 13).

Os estomas são de dois tipos: paracítico e anomocítico (Fig. 10, D), sem orientação definida e distribuídos ao acaso. O comprimento e largura médios das células estomáticas são de 16,8 µm e 13,7 µm, respectivamente. O comprimento apresenta diferenças significativas em relação às outras espécies em estudo e a largura é semelhante à de *H. canariense* e *H. grandifolium*. O índice estomático é de 14,2, valor significativamente inferior ao observado nos outros taxa (Quadro 13).

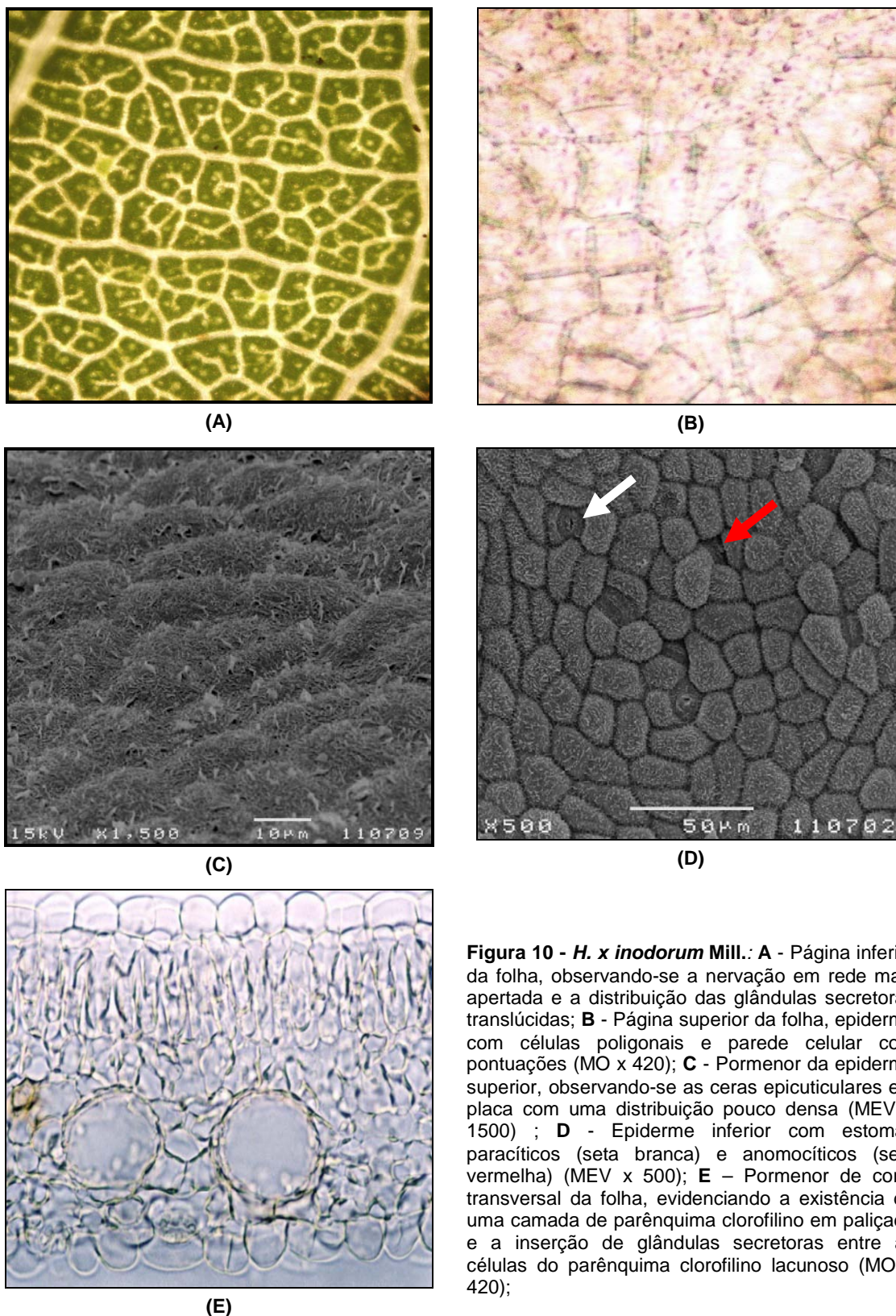


Figura 10 - *H. x inodorum* Mill.: **A** - Página inferior da folha, observando-se a nervação em rede mais apertada e a distribuição das glândulas secretoras translúcidas; **B** - Página superior da folha, epiderme com células poligonais e parede celular com pontuações (MO x 420); **C** - Pormenor da epiderme superior, observando-se as ceras epicuticulares em placa com uma distribuição pouco densa (MEV x 1500) ; **D** - Epiderme inferior com estomas paracíticos (seta branca) e anomocíticos (seta vermelha) (MEV x 500); **E** - Pormenor de corte transversal da folha, evidenciando a existência de uma camada de parênquima clorofilino em paliçada e a inserção de glândulas secretoras entre as células do parênquima clorofilino lacunoso (MO x 420);

No mesófilo observa-se uma camada de parênquima clorofilino em paliçada (Fig. 10, E) com dimensões médias de 27,8 μm , quatro a cinco camadas de parênquima clorofilino lacunoso com dimensões médias de 48,4 μm (Quadro 13). As glândulas translúcidas encontram-se distribuídas nos dois parênquimas. O índice de glândulas de 16,1, é estatisticamente semelhante a *H. grandifolium* mas diferente do valor observado nos outros *taxa* (Quadro 13).

4.1.5. *Hypericum patulum*

4.1.5.1. Macrocaracteres

As folhas de *H. patulum* são opostas, sésseis, glabras, lanceoladas a ovais com margem inteira, base acunhada e ápice obtuso-apiculado a arredondado-apiculado. As folhas têm dimensões aproximadas de 15-60 mm x 5-30 mm, com glândulas translúcidas de dimensões heterogêneas em ambas as páginas e sem glândulas pretas (Fig. 11, A).

4.1.5.2. Microcaracteres

A epiderme superior não tem estomas. Apresenta ceras epicuticulares pouco densas dispostas ao acaso sob a forma de placas (Fig. 11, C). Todas as células possuem pontuações na parede celular (Figura 11, B). As suas células são poligonais, ligeiramente papilosas e de paredes celulares direitas com comprimento de 33,6 μm e largura 19,2 μm . O comprimento não difere significativamente do *taxon H. x inodorum* e a largura não apresenta diferenças significativas em relação ao *H. grandifolium* (Quadro 13).

A epiderme inferior apresenta células nitidamente papilosas, cuja forma é difícil de entender (Figura 12, A), com comprimento de 39,3 μm e largura de 19,2 μm . O comprimento e a largura não diferem significativamente do *taxon H. grandifolium* (Quadro 13).

As ceras epicuticulares são pouco densas e dispostas ao acaso sob a forma de placas (Fig. 12, B). Os estomas têm um comprimento e largura médios de 24,4 μm e 17 μm . No comprimento não apresentam diferenças significativas em relação ao *taxon H. calycinum* e na largura diferem estatisticamente dos outros *taxa*. O índice estomático foi de 28,7, significativamente superior ao dos outros *taxa* em estudo (Quadro 13). Não foi possível determinar o tipo estomático nesta espécie.

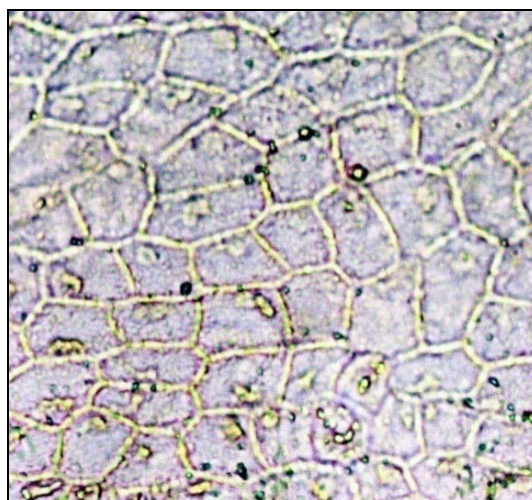
As folhas em corte transversal apresentam um mesófilo com uma camada de parênquima clorofilino em paliçada com espessura de 45 μm , valor significativamente diferente do observado nos outros *taxa*, e quatro a cinco camadas de parênquima clorofilino lacunoso, com numerosos espaços intercelulares (Figura 12, D), e espessura média de 76,7 μm , não apresentando diferenças significativas em relação ao *taxon H. calycinum* (Quadro 13).

As glândulas secretoras translúcidas encontram-se no parênquima clorofilino lacunoso e algumas vezes na zona de transição entre o parênquima clorofilino em paliçada e o lacunoso (Figura 12, C). O índice de glândulas calculado para esta espécie foi de 27,6, valor

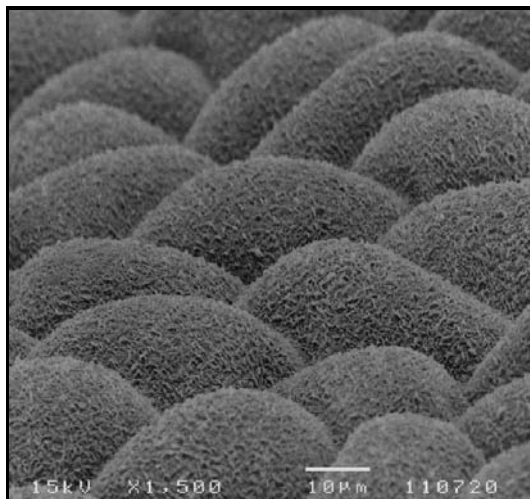
semelhante ao observado em *H. canariense* (34,4) mas significativamente superior aos valores registados em *H. calycinum*, *H. grandifolium* e *H. x inodorum* (Quadro 13).



(A)



(B)



(C)

Figura 11 – *H. patulum* Thunb: **A** - Pormenor da página superior, observando-se a distribuição e as dimensões heterogêneas das glândulas secretoras translúcidas (MO x12,5); **B**– Pormenor da epiderme da página superior apresentando pontuações (espessamento em rosário) na parede celular e forma poligonal; **C**- Pormenor da epiderme da página superior, distribuição das ceras epicuticulares(MEV x 1500);

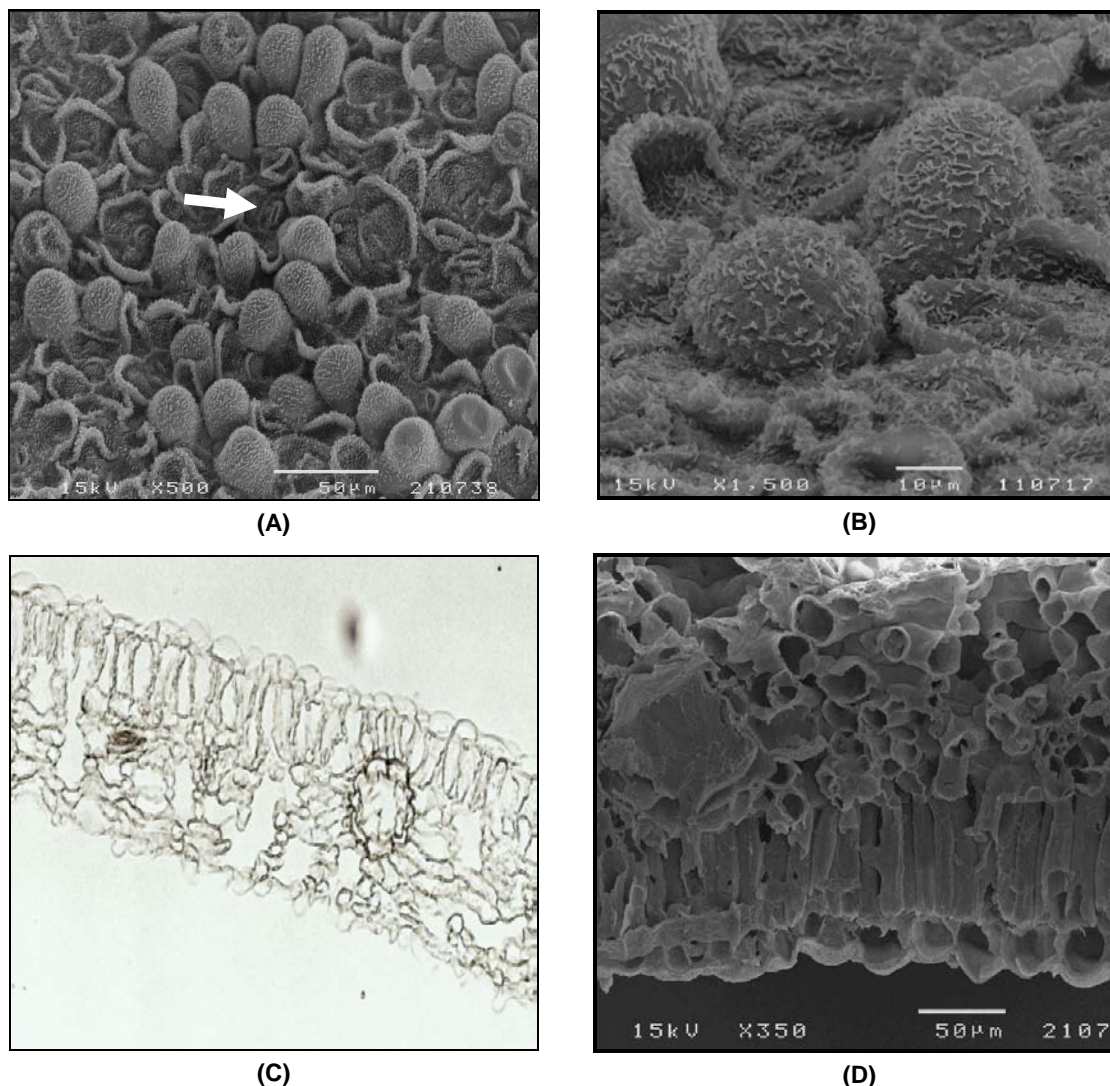


Figura 12 - *H. patulum* Thunb: **A** - Aspecto geral da epiderme inferior com células papiláceas e estomas distribuídos ao acaso (seta branca) (MEV x 500); **B** - Pormenor da epiderme da página inferior, distribuição pouco densa das ceras epicuticulares (MEV x 1500); **C** - Pormenor de corte transversal da folha, evidenciando a existência de uma camada de parênquima clorofilino em paliçada e a inserção de glândula secretora translúcida na zona de transição entre as células do parênquima clorofilino em paliçada e lacunoso (MO x 420); **D** - Pormenor de corte transversal da folha, idêntico ao anterior (MEV x 350)

Do que atrás ficou exposto e pela análise dos Quadros 12 e 13 depreende-se a existência de diferenças qualitativas e quantitativas em alguns macro e microcaracteres, observados nos exemplares das cinco espécies estudadas. Nos macrocaracteres destacamos as diferenças a nível da forma, dimensão e base foliar. No entanto, os *taxa H. grandifolium* e *H. patulum* apresentam algumas dificuldades quanto à sua distinção macroscópica, uma vez que as suas folhas são muito semelhantes. A dimensão das folhas é uma característica que varia com as condições ambientais, pelo que possui um valor taxonómico limitado (Metcalf e Chalk, 1950).

Uma vez que as amostras de fármacos de hipericão encontram-se no mercado fragmentadas e pulverizadas e são maioritariamente constituídas por folhas, os seus

microcaracteres têm uma especial importância no estabelecimento das diferenças entre os vários *taxa*.

Nos microcaracteres as diferenças observadas foram: dimensão das células da epiderme inferior e superior com parede celular mais ou menos sinuosa, a espessura da cutícula, densidade dos depósitos epicuticulares, tipos, dimensão e índice estomático, dimensão e índice de estruturas secretoras e ainda o número de camadas de células existente nos dois tipos de parênquimas clorofilinos, que condiciona a espessura dos mesmos. Ainda ao nível das folhas, caracteres como a forma das células epidérmicas, o tipo e forma dos estomas são considerados bons caracteres taxonómicos (Metcalf e Chalk, 1950). Stace (1989) considera que quando a dimensão dos estomas é constante dentro de um *taxon*, ele pode ser considerado um bom carácter taxonómico. Segundo Metcalf e Chalk (1979), o índice estomático é também considerado um bom carácter taxonómico, uma vez que é independente do habitat, da idade da planta e da região da planta estudada. No entanto, segundo estes autores, por vezes as características da cutícula e das células da epiderme podem oferecer uma grande variabilidade dentro de um mesmo *taxon*.

Todas as espécies estudadas apresentaram células poligonais nas duas epidermes com pontuações na parede celular. Na espécie *H. patulum* foram observadas células papilosas nas duas epidermes, o que a distingue de todos os outros *taxa*.

A forma da parede das células da epiderme superior foi semelhante nas espécies *H. calycinum* e *H. grandifolium*, assim como entre os *taxa* *H. canariense* e *H. x inodorum* (Quadro 12). As células desta epiderme apresentaram um rácio comprimento/largura entre 1,1 (*H. canariense*) e 2,0 (*H. x inodorum*). Não se registaram diferenças significativas entre *H. grandifolium*, *H. x inodorum* e *H. patulum* mas estes *taxa* diferiram de *H. calycinum* e *H. canariense* (Quadro 13).

Na página inferior, as espécies *H. calycinum*, *H. canariense* e *H. grandifolium* apresentaram paredes celulares com formas semelhantes diferindo no *taxon* *H. x inodorum* (Quadro 12). O rácio comprimento/largura relativos às células epidérmicas desta página variaram entre 1,5 e 2,9. A análise de variância separou três grupos: 1) *H. canariense* com o valor significativamente mais baixo (1,5); 2) *H. grandifolium*, *H. x inodorum* e *H. patulum* com valores intermédios e 3) *H. calycinum* com o valor significativamente mais elevado (2,9). Na bibliografia consultada não foi encontrada qualquer referência a estes caracteres.

À superfície da cutícula é muito frequente o depósito de ceras epicuticulares cuja estrutura pode ter uma grande variação de planta para planta (Martin e Juniper, 1970; Esau, 1972; Fahn, 1979). Algumas das funções destes depósitos são a regulação da permeabilidade da superfície epidérmica e a reflexão da luz para que não ocorram danos a nível dos fotossistemas e ainda contra herbivoria (Fahn, 1979). Os depósitos epicuticulares

apresentaram elevada densidade na espécie *H. calycinum* enquanto nos restantes taxa a densidade foi média / baixa.

A existência de estomas só foi observada na página inferior. Para Metcalfe e Chalk (1950), no género *Hypericum*, os estomas, geralmente confinados à página inferior, encontram-se rodeados por três ou mais células podendo-se encontrar de todos os tipos numa só folha. No entanto, num estudo feito pela World Health Organization (1999) sobre *Hyperici Herba*-*H. perforatum*, verificou-se que o tipo de estomas mais frequente na página inferior, era o paracítico e raramente anomocítico. De acordo com os resultados apresentados no Quadro 12, verificou-se que o tipo de estomas não é um bom carácter a considerar para uma distinção entre as espécies estudadas, pois existe sempre mais do que um tipo.

A razão entre o comprimento/largura das células estomáticas variou entre 1,1 e 1,6, o que é semelhante ao encontrado por Fonseca (2005) que refere uma razão comprimento/largura nos taxa *H. perforatum* e *H. androsaemum* de 1,3. Estatisticamente diferenciaram-se dois grupos: 1) *H. calycinum* e *H. x inodorum* com os valores significativamente mais baixos e 2) *H. canariense*, *H. grandifolium* e *H. patulum*. Relativamente ao índice estomático variou entre os 14,2 (*H. x inodorum*) e 28,7 (*H. patulum*). Nas espécies *H. perforatum* e *H. androsaemum* foi encontrado um índice estomático de 16,7 e 11,5, respectivamente (Fonseca, 2005). As folhas de *H. x inodorum* têm uma dimensão maior, o que poderá fazer com que os estomas se encontrem mais espalhados, e por isso o índice seja menor. Outra explicação poderá ter que ver com a menor dimensão das células epidérmicas nesta espécie. Para o índice estomático a análise de variância indica que entre *H. canariense*, *H. grandifolium* e *H. calycinum* as diferenças não são significativas, assim como entre *H. calycinum* e *H. x inodorum*. Neste aspecto, o taxon *H. patulum* difere significativamente das outras espécies, apresentando um valor mais elevado (Quadro 13).

A presença de glândulas é característica das folhas do género *Hypericum* (Metcalfe e Chalk, 1950; Ciccareli et al., 2001b). As glândulas translúcidas apresentam-se, como o próprio nome indica, como pontos esbranquiçados e pálidos, esféricas ou elípticas. São constituídas por um espaço central, a cavidade propriamente dita, delimitada por uma camada de células secretoras muito fina, e por uma camada achatada de células, esta com paredes mais espessas. Elas encontram-se na proximidade dos feixes vasculares, o que pode indicar uma relação entre os dois tipos de tecidos, o secretor e o de transporte, nomeadamente na translocação de secretados. Este resultado vai de acordo com Green (1884) quando este descreve os vasos condutores como indo mesmo até às glândulas, terminando abruptamente junto delas e nunca as penetrando.

A posição das glândulas no mesófilo foi semelhante em todos os taxa estudados, podendo estar inseridas ao nível de qualquer dos dois tipos de parênquima clorofilinos, nunca chegando a tocar as duas epidermes em simultâneo. Green (1884) descreve as glândulas

como cavidades ocas de forma mais ou menos esférica, estendendo-se por todo o mesófilo, tocando a epiderme superior e inferior; é o que acontece no *taxon H. perforatum* (Fonseca, 2005). Nas cinco espécies estudadas as glândulas encontram-se inseridas mais profundamente no mesófilo, e por isso só ocupam uma parte deste, tendo por isso menor dimensão. Este facto deve-se à maior espessura das suas folhas, comparativamente com *H. perforatum*. No entanto, Ciccareli et al. (2001b) em *H. perforatum* e Bottega et al. (1999) em *H. elodes*, referem que estas glândulas só se encontram perto da página inferior (no parênquima clorofilino lacunoso). É provável que a sua inserção também tenha a ver com condições ambientais, embora não se tenha encontrado qualquer referência a esse dado. O índice de glândulas observado permitiu agrupar os *taxa* em três grupos: 1) *H. calycinum*, com valor 1,0, significativamente inferior ao de qualquer outro *taxon*; 2) *H. grandifolium* (11,5) e *H. x inodorum* (16,1), com valores intermédios, semelhantes entre si mas significativamente diferentes dos outros *taxa* e 3) *H. patulum* (27,6) e *H. canariense* (34,4), semelhantes entre si, mas com valores significativamente superiores aos dos outros *taxa* (Quadro 13).

O mesófilo é bifacial para as cinco espécies de *Hypericum*, constituído por um parênquima clorofilino em paliçada na página superior e um parênquima clorofilino lacunoso na página inferior. O *taxon H. calycinum* possui duas camadas de parênquima clorofilino em paliçada e quatro a cinco camadas de parênquima clorofilino lacunoso com muitos espaços intercelulares, sendo a única espécie que apresenta cristais de oxalato de cálcio inseridos no mesófilo. Todas as restantes espécies estudadas têm folhas menos espessas e possuem apenas uma camada de parênquima clorofilino em paliçada. Estas diferenças ao nível do mesófilo apenas permitem fazer uma distinção entre *H. calycinum* e as outras quatro espécies. Em relação ao parâmetro, espessura média total do mesófilo, observam-se quatro grupos significativamente diferentes: 1) *H. grandifolium* e *H. x inodorum* com a menor espessura, os valores variaram entre 93,3 e 101,1 µm; 2) *H. canariense* com 119,9 µm; 3) *H. patulum* com 154,2 µm e 4) *H. calycinum* com 185,0 µm (Quadro 13).

Pela espessura do parênquima clorofilino em paliçada separam-se três grupos significativamente diferentes entre si: 1) *H. canariense*, *H. grandifolium* e *H. x inodorum* com a menor espessura, e com valores entre 27,8 e 31,5 µm; 2) *H. patulum* com 45,0 µm e 3) *H. calycinum* com 97,0 µm (Quadro 13). O parênquima clorofilino lacunoso apresentou uma espessura média entre os 45 µm (*H. grandifolium*) e os 80 µm (*H. calycinum*) e, estatisticamente, separam-se os mesmos grupos observados para o parênquima clorofilino em paliçada (Quadro 13).

4.2. Análise multivariada

Os 14 microcaracteres morfológicos do limbo foliar de cinco *taxa* de *Hypericum* foram submetidos aos testes estatísticos multivariados de Análise Aglomerativa e Análise de Componentes Principais (Sneath & Sokal, 1973), a fim de agrupar as espécies de acordo com seu grau de similaridade e verificar a capacidade discriminatória dos caracteres originais no processo de formação dos agrupamentos. Os valores médios referentes aos 14 caracteres considerados encontram-se referidos no Quadro 13.

4.2.1. Análise aglomerativa

Pela análise aglomerativa, representada na forma de dendograma (Fig. 13), foi possível agrupar as cinco espécies estudadas, inserindo-se num mesmo grupo as espécies que apresentam maior similaridade.

Procedeu-se à formação de quatro grupos principais na escala de distância de similaridade. Os grupos apresentam a seguinte disposição: Grupo 1 formado pela espécie *H. calycinum* (HYPCA); Grupo 2 constituído pela espécie *H. patulum* (HYPPT), Grupo 3 formado pela espécie *H. canariense* (HYPCN), e o Grupo 4 pelos *taxa* *H. grandifolium* (HYPGF) e *H. x inodorum* (HYPIN). Verificou-se também que a espécie do Grupo 1 e a do Grupo 2 apresentaram maior dissimilaridade, enquanto as do Grupo 3 e 4 mostraram maior similaridade, com base nos caracteres estruturais quantitativos avaliados.

De realçar que estes resultados, no que respeita ao Grupo 4, formado por *H. grandifolium* e *H. x inodorum*, confirmam a sua identificação taxonómica, através da sua colocação na mesma secção, a secção *Androsaemum* (Quadro 2).

Quadro 14 - Coeficientes de correlação entre os 14 microcaracteres foliares quantitativos dos cinco *taxa* do género *Hypericum* L. e os quatro primeiros eixos de componentes principais (Y₁, Y₂, Y₃, Y₄).

Parâmetro anatómico foliar		Y1	Y2	Y3	Y4
Abreviatura	Designação				
Mes_tot	⁽¹⁾ Mesófilo total (µm)	0.903378	-0.194460	0.376027	0.068534
Mes_pal	⁽¹⁾ Parênquima paliçada(µm)	0.994925	0.029481	0.041101	0.086984
Mes_lac	⁽¹⁾ Parênquima lacunoso (µm)	0.806137	-0.172327	0.566075	-0.002498
IND_EST	⁽¹⁾ Índice estomático	0.983182	0.091431	-0.132264	0.086597
IND_GLAN	⁽¹⁾ Índice glândulas	-0.613369	-0.710539	0.337073	0.072764
Es_C	⁽²⁾ C estomas (µm)	0.755487	-0.554405	0.284159	-0.202801
Es_L	⁽²⁾ L estomas (µm)	0.989212	0.013215	0.122415	0.079374
Epinf_C	⁽²⁾ C células ep. inferior (µm)	0.990768	-0.007353	-0.125057	-0.051827
Epinf_L	⁽²⁾ L células ep. inferior (µm)	0.755763	-0.620462	-0.209365	0.004038
Esup_C	⁽²⁾ C células ep. superior (µm)	0.878853	0.341218	-0.165785	-0.289314
Esup_L	⁽²⁾ L células ep. superior (µm)	0.705226	-0.571260	-0.418007	-0.039860
EsC_L	⁽²⁾ Estomas (C/L)	-0.685872	-0.632826	0.027881	-0.358236
Einf_C_L	⁽²⁾ Células ep. inferior - C/L	0.726803	0.680765	-0.034752	-0.084315
Esup_C_L	⁽²⁾ Células ep. superior - C/L	-0.203971	0.903612	0.337795	-0.166660
	Variância (% total)	65,79133	24,26688	7,62963	2,31216
	Variância acumulada (%)	65,7913	90,0582	97,6878	100,0000

Nota: ⁽¹⁾ Média de 10 observações; ⁽²⁾ Média de 15 observações

Com o primeiro eixo da ACP, explicando 66 % da variação dos dados, observa-se uma grande sobreposição dos efeitos entre as variáveis índice estomático, espessura total do mesófilo, dos parênquimas clorofilino em paliçada e lacunoso, e comprimento das células epidérmicas da página abaxial e adaxial (Fig. 14). O índice de glândulas e a razão comprimento/largura quer das células estomáticas quer das células da epiderme superior são responsáveis pelas variações ao longo do segundo eixo (24% de variância).

As correlações positivas da maioria das variáveis utilizadas justificam a dispersão dos *taxa* na ACP da Figura 14. O Grupo 1 (*H. calycinum*) está isolado à direita do diagrama de ordenação, consequência lógica do menor índice de glândulas (IND_GLAN), mas também pela maior espessura do mesófilo; o Grupo 3 (*H. canariense*) está correlacionado com o maior índice de glândulas, o que permite utilizar esta variável para distinguir estas duas espécies. Os *taxa H. x inodorum* e *H. grandifolium* encontram-se correlacionados com a razão comprimento/largura da epiderme superior (Esup_C_L). Usando esta variável, estas duas espécies podem ser diferenciadas do Grupo 1 e 3 mas não do Grupo 2. Neste grupo, formado pelo *H. patulum*, podemos afirmar que nenhuma das variáveis consideradas parece ser apropriada para a sua identificação.

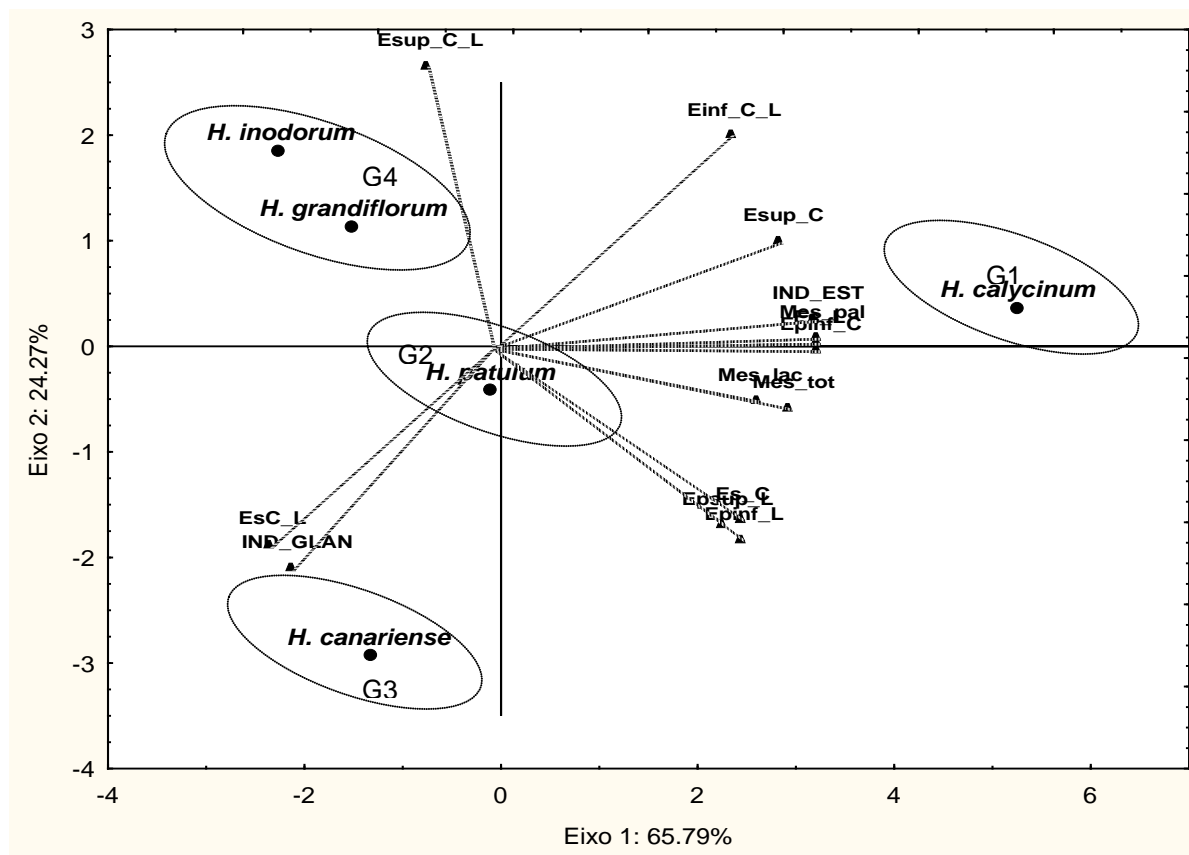


Figura 14 - Representação gráfica da dispersão dos cinco taxa de *Hypericum*, e dos vectores das variáveis (linhas a tracejado) nos dois primeiros eixos de componentes principais para o conjunto dos 14 parâmetros anatómicos foliares utilizados e ainda grupos de taxa (elipse a tracejado). (Ver no Quadro 14, significado das abreviaturas).

4.3. Caracterização histoquímica do conteúdo glandular

O Quadro 15 esquematiza os grupos de compostos analisados, reagentes utilizados e resultados obtidos na caracterização histoquímica. Seguidamente, apresentam-se, com mais detalhe, os resultados obtidos para cada um dos cinco *taxa* em estudo.

Em todas as espécies a aplicação de ácido tânico/tricloreto de ferro, para detecção de mucilagens, revelou resultados positivos a nível dos tecidos foliares mas negativo no conteúdo das bolsas secretoras. Do mesmo modo, a detecção de polissacáridos gerais, em secções transversais das folhas, com ácido periódico/reagente de Schiff (PAS), apresentou resultados negativos para o conteúdo das bolsas secretoras que permaneceu incolor (Fig. 15, A). Estes resultados estão de acordo com os obtidos na caracterização histoquímica das glândulas translúcidas por Bottega *et al.* (1999) em *H. elodes*, Lobo (2000) em *H. glandulosum* e Ciccareli (2001b) em *H. perforatum*.

Na detecção de lípidos gerais, em secções transversais das folhas, observou-se a presença de material lipofílico na cavidade das glândulas secretoras, evidenciada pela coloração avermelhada, obtida pelo teste Sudão III (Fig. 15, B). Os resultados obtidos estão de acordo com os de alguns autores para outras espécies de *Hypericum* (Costa, 1985; Bottega *et al.*, 1999; Lobo, 2000; Briskin e Gawienowski, 2001; Ciccareli *et al.*, 2001b). Este carácter lipofílico geral pode ser devido à existência de triglicéridos e ácidos gordos insaturados (Lobo, 2000).

Os ácidos gordos foram identificados submetendo os cortes transversais da folha ao teste a acetato de cobre/ácido rubeânico. A coloração verde escuro observada nas células envolventes das bolsas e no conteúdo da cavidade (Fig. 15, C), mostrou a presença deste tipo de lípidos, acontecendo o mesmo nas glândulas dos cinco *taxa* estudados. Este teste indica-nos a presença dos dois tipos de ácidos gordos, insaturados e saturados (Barroso, 1999).

A presença de lípidos ácidos e neutros foi determinada recorrendo ao sulfato azul de Nilo, aplicado igualmente a secções transversais da folha. As glândulas coraram de azul revelando assim a presença de lípidos ácidos (ácidos gordos livres) (Fig. 15, D). Não foi detectada a presença de lípidos neutros, coloração rosa.

A natureza química diversificada de terpenóides leva à utilização de diferentes testes para a sua distinção. Na avaliação da existência de óleos essenciais e de oleoresinas, nos cortes transversais das folhas submetidos ao reagente de Nadi, as glândulas coraram de azul, o que indica apenas a presença de óleos essenciais (Fig. 15, E). Os esteróides foram identificados pela aplicação de tricloreto de antimónio. O teste revelou ausência de coloração nas glândulas secretoras de todas as espécies, à excepção de *H. patulum* onde as glândulas coraram de vermelho-alaranjado, evidenciando a presença de esteróides nesta

espécie. Bottega *et al.*(1999) refere também a existência de esteróides nas glândulas translúcidas de *H. elodes*.

Relativamente aos terpenóides com o grupo carbonilo, as glândulas não coraram com a aplicação de 2,4-dinitrofenilhidrazina, parecendo indicar a não existência deste tipo de compostos, em todas as espécies. Estes resultados estão em concordância com os resultados obtidos por Bottega *et al.* (1999) e Ciccareli *et al.* (2001b) para outros *taxa*.

Quanto à presença de polifenóis, os testes tricloreto de ferro III, dicromato de potássio e vanilina, proporcionaram resultados idênticos, isto é, negativos para o conteúdo secretor mas positivos para alguns conteúdos celulares de tecidos foliares (Fig. 16, A, B, C).

Em microscopia de fluorescência estes resultados não se confirmam inteiramente, em nenhuma das espécies, pois verificou-se a emissão de fluorescência azul a nível do conteúdo glandular, indicadora da presença de flavonóides, um tipo de polifenóis (Fig. 16, D e E). Robson (1981) também refere a presença de taninos mas em canais secretores de *H. perforatum*. É sabido que alguns flavonóides se acumulam nos tecidos superficiais, ajudando na protecção a radiações UV (Harborne, 1993) e a sua associação com alguns terpenóides está documentada para a família *Lamiaceae* (Bisio *et al.*, 1999). Pode ser isso que se verifique nestas glândulas secretoras, sendo contudo necessário outros testes complementares.

Os alcalóides foram avaliados pela aplicação do reagente de Dittmar e verificou-se a presença destes compostos nos cinco *taxa* estudados. A presença de alcalóides foi também detectada em glândulas translúcidas de *H. elodes*, *H. glandulosum* e *H. perforatum* por Bottega *et al.* (1999), Lobo (2000) e Ciccareli *et al.* (2001b), respectivamente. Os resultados obtidos por este teste, de acordo com Costa (1985), devem ser interpretados com precaução, uma vez que os reagentes utilizados podem reagir com outros compostos azotados diferentes dos alcalóides, tais como proteínas, amins e compostos azotados.

Analisando os resultados obtidos observamos que, nas cinco espécies estudadas, o interior das glândulas translúcidas apresenta maioritariamente compostos lipofílicos, como lípidos gerais, lípidos ácidos, ácidos gordos, óleos essenciais, e apenas alcalóides como compostos de natureza hidrofílica. Em relação aos esteróides, apenas foram detectados no interior das glândulas de *H. patulum* quando se utilizou o reagente tricloreto de antimónio. Este grupo de compostos também foi encontrado em folhas de *H. perforatum* (Robson, 1981), não especificando o tipo de estrutura secretora.

Verifica-se assim, que os compostos histoquímicos existentes nestes cinco *taxa* são semelhantes, havendo apenas alguma diferença no *H. patulum*. Estes resultados parecem estar de acordo com outros realizados no género *Hypericum* que falam da presença de lípidos, alcalóides, além de óleos essenciais em glândulas secretoras translúcidas (Bombardelli and Morazzoni, 1995; Bottega *et al.*, 1999; Ciccarelli *et al.*, 2001b).

No entanto, é importante referir que o facto de alguns testes terem dado resultados negativos, não exclui completamente a ausência dos compostos uma vez que estes podem estar presentes, mas não em quantidades suficientes para serem detectados.

Quadro 15 - Resultados dos testes histoquímicos em glândulas secretoras translúcidas de folhas de *Hypericum calycinum* L. (HYPCA), *Hypericum canariense* L. (HYPCN), *Hypericum grandifolium* Choisy (HYPGR), *Hypericum x inodorum* Mill. (HYPIN) e *Hypericum patulum* Thunb. (HYPPA). (- negativo; + ligeiramente positivo; ++ positivo; +++fortemente positivo)

Grupo químico	Teste histoquímico	Taxa				
		HYPCA	HYPCN	HYPGR	HYPIN	HYPPA
Mucilagens	Ácido tânico/tricloreto de ferro	-	-	-	-	-
Polissacáridos gerais	PAS	-	-	-	-	-
Lípidos gerais	Vermelho Sudão III	+++	+++	+++	+++	+++
Lípidos diferenciais	Azul de Nilo (ácidos e neutros)	+++ (ácidos)	+++ (ácidos)	+++ (ácidos)	++++ (ácidos)	+++ (ácidos)
	Acetato de cobre/Ácido rubeânico (ácidos gordos)	+	+	+	+	+
Terpenóides	Nadi	++	+	+	++	++
	Tricloreto de antimónio	-	-	-	-	+
	2,4-dinitrofenilhidrazina	-	-	-	-	-
Polifenóis	Tricloreto de Ferro III	-	-	-	-	-
	Dicromato de potássio	-	-	-	-	-
	Vanilina	-	-	-	-	-
Alcalóides	Reagente de Dittmar	++	++	++	++	++

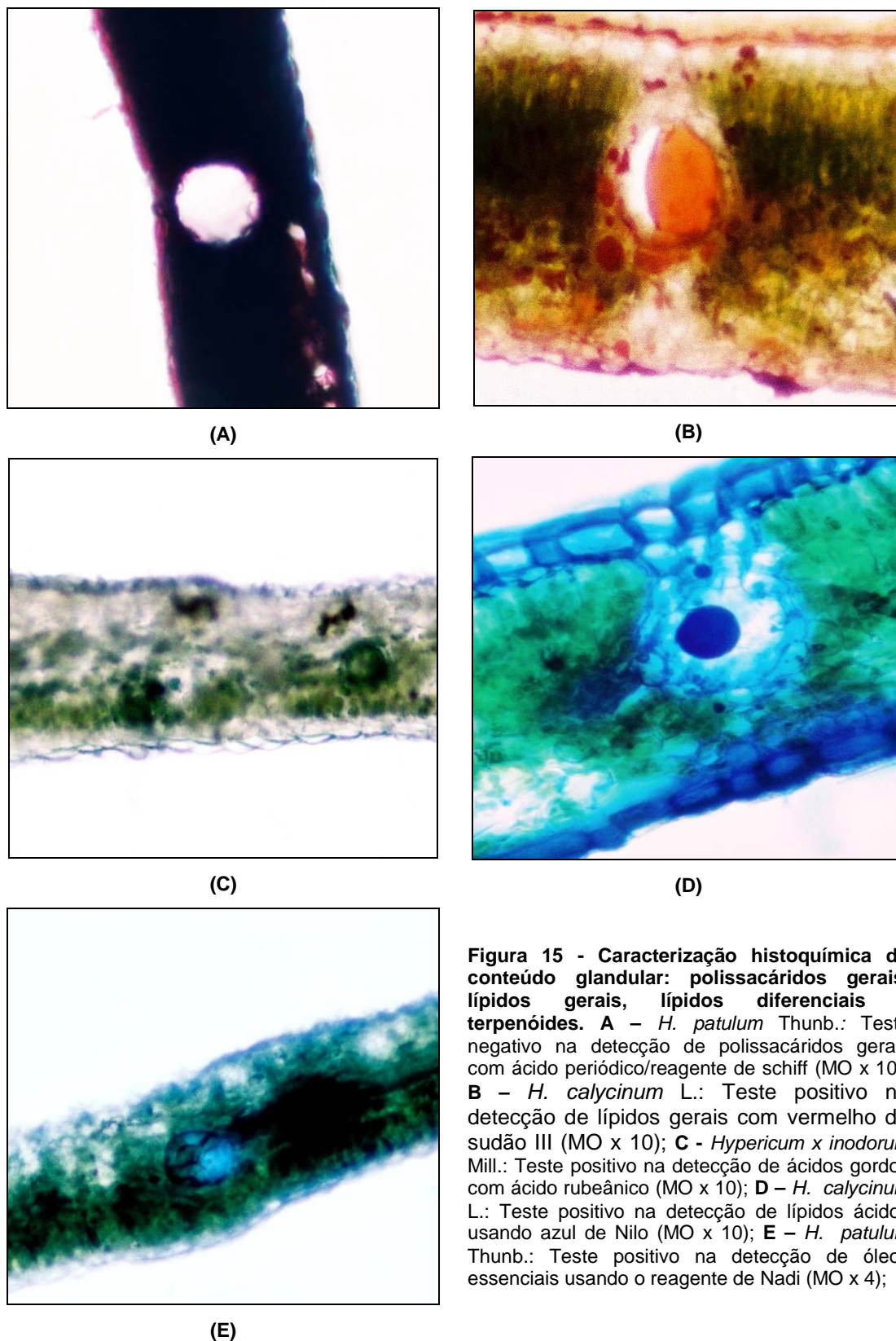
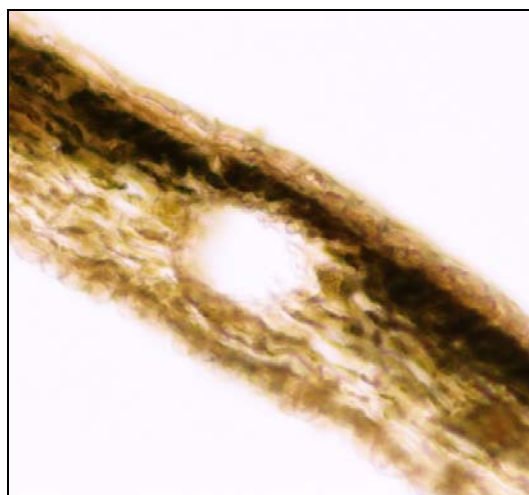


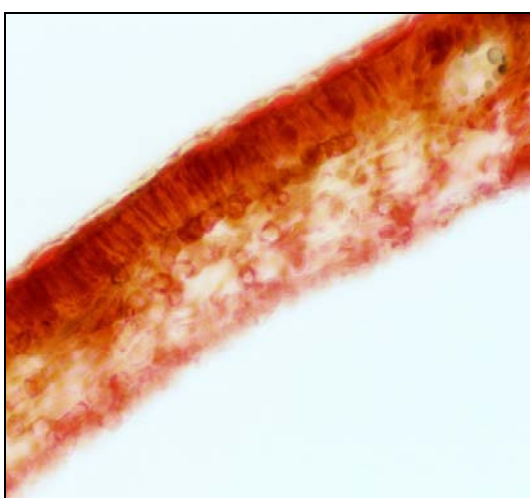
Figura 15 - Caracterização histoquímica do conteúdo glandular: polissacáridos gerais, lípidos gerais, lípidos diferenciais e terpenóides. A - *H. patulum* Thunb.: Teste negativo na detecção de polissacáridos gerais com ácido periódico/reagente de schiff (MO x 10); B - *H. calycinum* L.: Teste positivo na detecção de lípidos gerais com vermelho de sudão III (MO x 10); C - *Hypericum x inodorum* Mill.: Teste positivo na detecção de ácidos gordos com ácido rubeânico (MO x 10); D - *H. calycinum* L.: Teste positivo na detecção de lípidos ácidos usando azul de Nilo (MO x 10); E - *H. patulum* Thunb.: Teste positivo na detecção de óleos essenciais usando o reagente de Nadi (MO x 4);



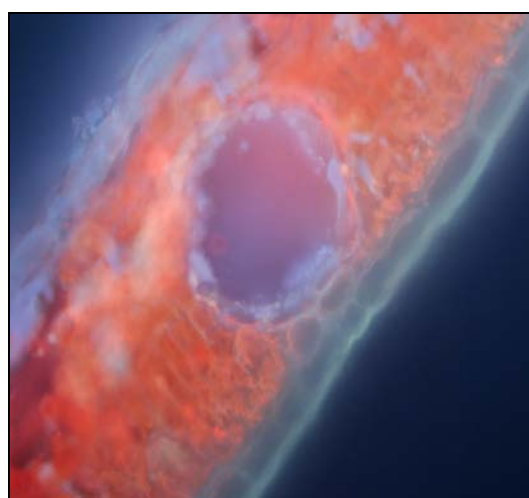
(A)



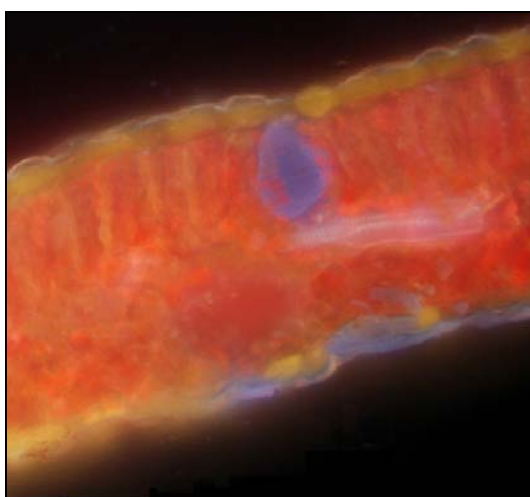
(B)



(C)



(D)

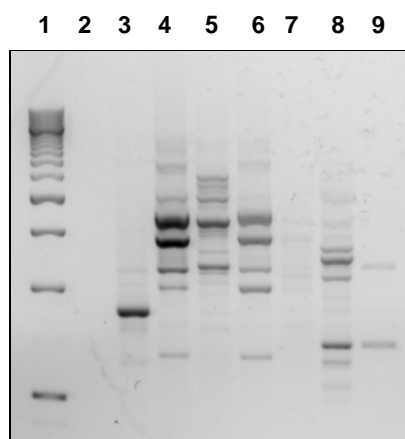


(E)

Figura 16 - Caracterização histoquímica do conteúdo glandular: polifenóis e alcalóides.
Hypericum x inodorum Mill.: **A** - Teste negativo para detecção de polifenóis com Tricloreto de Ferro III (MO x 10); **B** - Teste negativo na detecção de taninos com dicromato de potássio (MO x 10); **C** - Teste para a detecção de composto fenólicos (taninos) com vanilina. Resultado positivo nos tecidos e negativo nas glândulas (MO x 10); *Hypericum calycinum* L.: **D** - Corte transversal observando-se uma glândula secretora em microscopia de fluorescência emitindo fluorescência azul (MO x420); *Hypericum canariense* L.: **E** - Glândula secretora em microscopia de fluorescência emitindo fluorescência azul (MO x420)

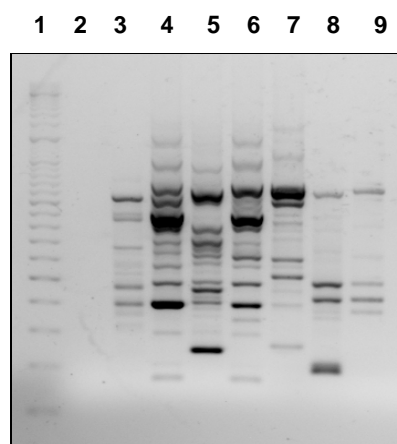
4.4. Estudo molecular

Nos perfis electroforéticos obtidos pela amplificação de fragmentos de DNA com os sete *primers* utilizados (Fig. 17 e 18) observam-se um total de 108 bandas (Quadro 16).



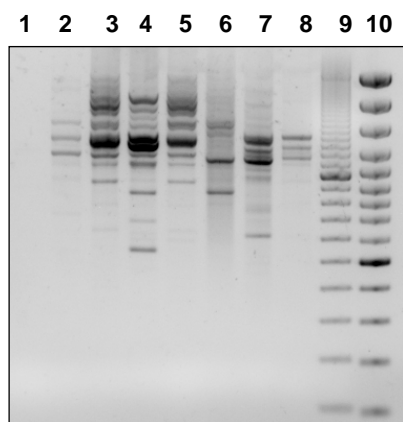
(A)

1 - Marcador O'RangeRuler 500 bp; 2 - controlo;
3 - *H. patulum*; 4 - *H. x inodorum*; 5 - *H. canariense*; 6
- *H. grandifolium*; 7 - *H. calycinum*; 8 - *H.*
androsaemum; 9 - *H. perforatum* ssp. *perforatum*



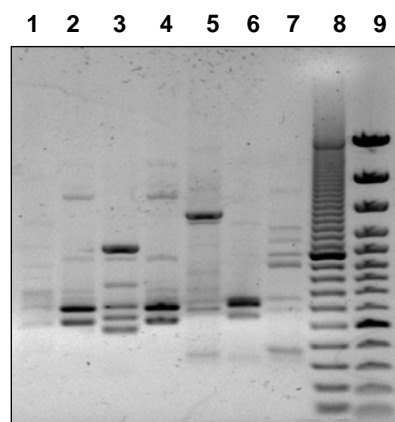
(B)

1 - Marcador O'RangeRuler 100+500 bp; 2 - controlo;
3 - *H. patulum*; 4 - *H. x inodorum*; 5 - *H. canariense*; 6
- *H. grandifolium*; 7 - *H. calycinum*; 8 - *H.*
androsaemum; 9 - *H. perforatum* ssp. *perforatum*



(C)

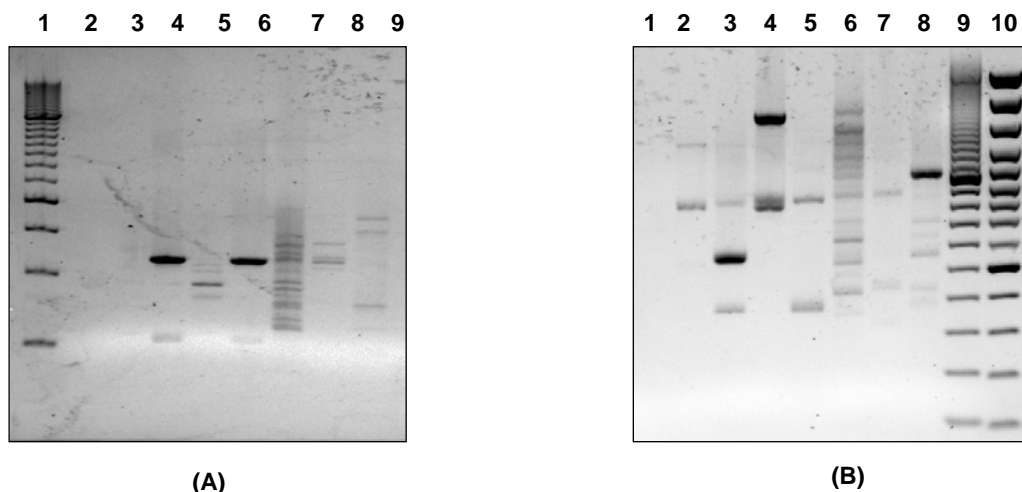
1 - controlo; 2 - *H. patulum*; 3 - *H. x inodorum*; 4 - *H.*
canariense; 5 - *H. grandifolium*; 6 - *H. calycinum*; 7 - *H.*
androsaemum; 8 - *H. perforatum* ssp. *perforatum*; 9 -
Marcador EZ Load; 10 - Marcador GeneRuler 100 bp



(D)

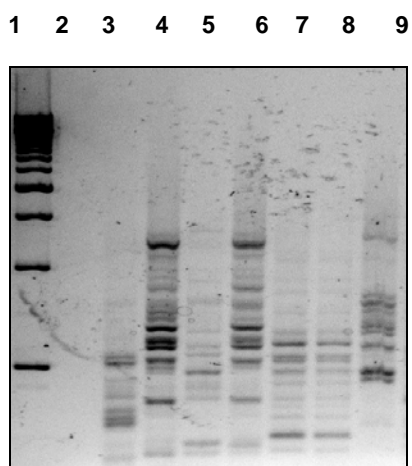
1 - *H. patulum*; 2 - *H. x inodorum*; 3 - *H. canariense*; 4
- *H. grandifolium*; 5 - *H. calycinum*; 6 - *H.*
androsaemum; 7 - *H. perforatum* ssp. *perforatum*; 8 -
Marcador EZ Load; 9 - Marcador GeneRuler 100 bp

Figura 17- Perfis electroforéticos com os *primers* utilizados nas sete espécies: **A** - *primer* MR; **B** - *primer* (GA)₈YT; **C** - *primer* (CAG)₅; **D** - *primer* HVH(TG)



1 - Marcador O'RangeRuler 500 bp; 2 - controlo; 3 - *H. patulum*; 4 - *H. x inodorum*; 5 - *H. canariense*; 6 - *H. grandifolium*; 7 - *H. calycinum*; 8 - *H. androsaemum*; 9 - *H. perforatum* ssp. *perforatum*

1 - controlo; 2 - *H. patulum*; 3 - *H. x inodorum*; 4 - *H. canariense*; 5 - *H. grandifolium*; 6 - *H. calycinum*; 7 - *H. androsaemum*; 8 - *H. perforatum* ssp. *perforatum*; 9 - Marcador EZ Load; 10 - Marcador GeneRuler 100 bp



1 - Marcador O'RangeRuler 500 bp; 2 - controlo; 3 - *H. patulum*; 4 - *H. x inodorum*; 5 - *H. canariense*; 6 - *H. grandifolium*; 7 - *H. calycinum*; 8 - *H. androsaemum*; 9 - *H. perforatum* ssp. *perforatum*

Figura 18- Perfis electroforéticos com os *primers* utilizados nas sete espécies: **A** - *primer* (CACAC)₃; **B** - *primer* (CA)₈RG; **C** - *primer* (GA)₈YG

Quadro 16 - Número de bandas totais, bandas polimórficas e percentagem de polimorfismo obtidos com os primers MR, (CACAC)₃, (CA)₈RG, (CAG)₅, (GA)₈YG, (GA)₈YT e HVH(TG)₇

Primers	Nº de bandas	Nº de bandas polimórficas	Polimorfismo (%)
MR	19	19	100
(CACAC) ₃	10	10	100
(CA) ₈ RG	17	17	100
(CAG) ₅	15	13	86,7
(GA) ₈ YG	14	14	100
(GA) ₈ YT	22	22	100
HVH(TG) ₇	11	11	100

Estes resultados indicam a existência de um elevado grau de polimorfismo. A detecção de altos níveis de polimorfismo faz da análise de ISSR uma ferramenta poderosa para avaliar a diversidade genética interespecífica (Mendes *et al.*, 2009). Um polimorfismo semelhante já foi relatado, por meio destes marcadores, noutras plantas medicinais e aromáticas (Mohsen *et al.*, 2008; Qiu *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006; Sarwat *et al.*, 2008). O número de bandas geradas por *primer* variou de 10 ((CACAC)₃) a 22 ((GA)₈YT). A média do número total de bandas e do número de bandas polimórficas foi de 15,4 e 15,1, respectivamente.

A análise estatística multivariada dos perfis electroforéticos com o programa NTSYS-pc permitiu a obtenção do dendograma apresentado na Fig.19. O coeficiente de correlação cofenética (*r*) é de 0,966, o que indica que o dendograma é uma boa representação da respectiva matriz de semelhança. Com base na similaridade genética verifica-se no referido dendograma a presença de dois grupos. O Grupo I associa os taxa *H. patulum*, *H. x inodorum*, *H. grandifolium*, *H. canariense*, *H. androsaemum* e *H. calycinum*, com uma semelhança genética que varia de 45 % a 84%, enquanto que o Grupo II é formado apenas pelo *H. perforatum*. Esta separação do taxa *H. perforatum* num grupo é explicada pela presença de glândulas secretoras negras que apresentam composição molecular diferente das glândulas translúcidas existentes nas outras espécies estudadas. No Grupo I, a maior semelhança genética observa-se entre os taxa *H. x inodorum* e *H. grandifolium* (84%) que formam um sub-grupo, e a menor semelhança genética encontra-se entre os taxa *H. patulum* e *H. calycinum* (45%).

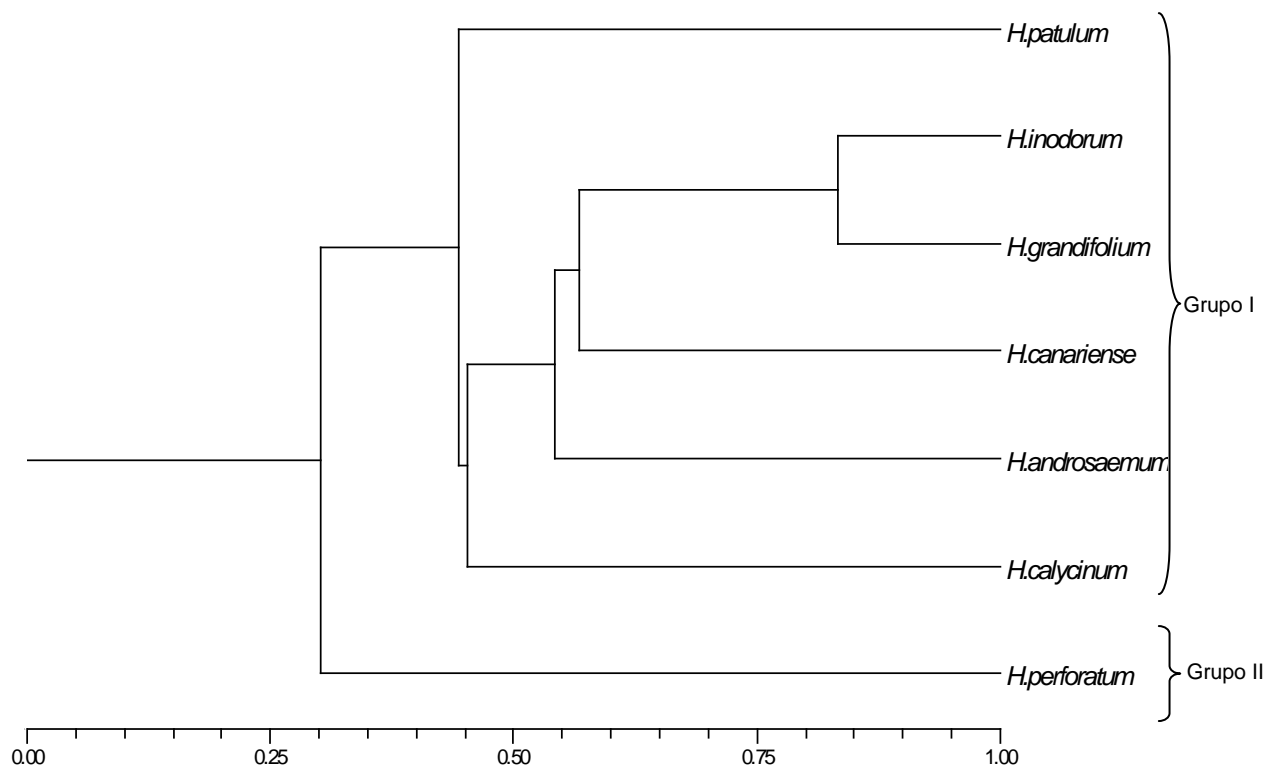


Figura 19- Dendrograma dos perfis PCR obtidos com os *primers* ISSR , baseado no método UPGMA aplicado à matriz de semelhança (coeficiente de correlação cofenética $r = 0,966$)

Na tentativa de podermos relacionar os resultados morfológicos com os resultados moleculares, apresenta-se na Fig. 20 o dendrograma considerando apenas as espécies analisadas no estudo morfológico. O coeficiente de correlação cofenética (r) é de 0,982, o que indica que o dendrograma continua a ser uma boa representação da respectiva matriz de semelhança.

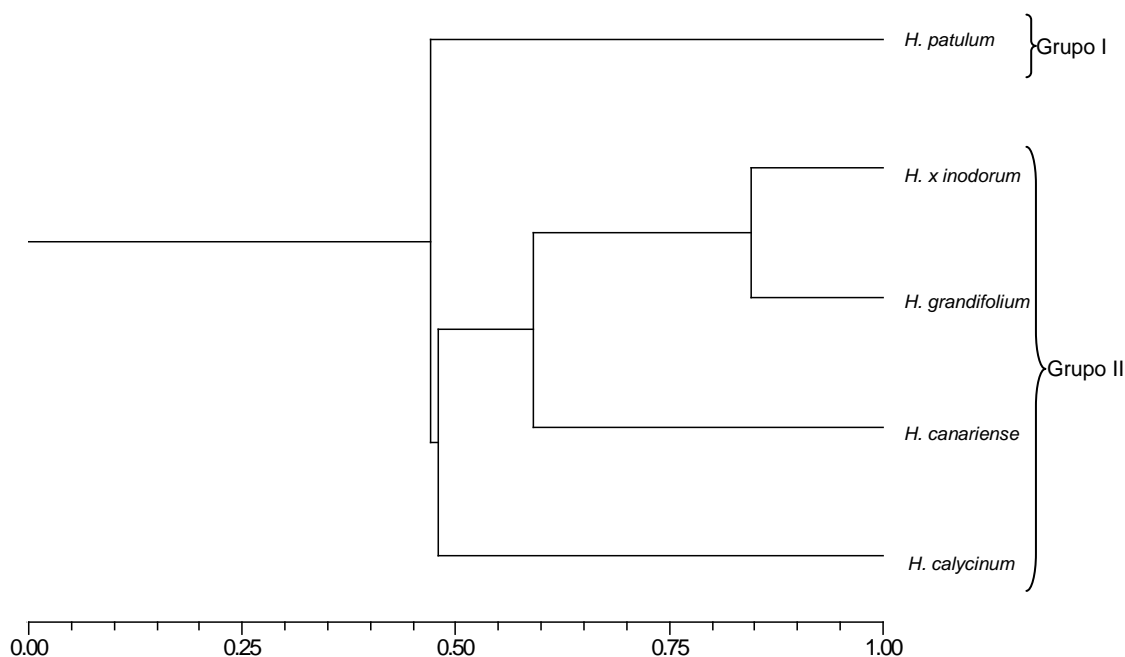


Figura 20- Dendrograma dos perfis PCR obtidos com os *primers* ISSR , baseado no método UPGMA aplicado à matriz de semelhança (coeficiente de correlação cofenética $r = 0,982$)

Da análise deste dendrograma observa-se que retirando as espécies *H. androsaemum* e *H. perforatum* os resultados são semelhantes aos obtidos anteriormente, existindo também uma separação em dois grupos. O Grupo I formado pelo *taxon* *H. patulum* e o Grupo II formado pelos *taxa* *H. x inodorum*, *H. grandifolium*, *H. canariense* e *H. calycinum*. Observa-se igualmente que as espécies *H. x inodorum* e *H. grandifolium* encontram-se muito próximas e que os *taxa* *H. patulum* e *H. calycinum* são aqueles que se encontram mais afastados.

Para o estudo da variabilidade genética destas espécies é importante analisar outros tipos de marcadores, uma vez que, dependendo da metodologia utilizada, podem ser detectados diferentes níveis de polimorfismo.

Neste sentido, os mesmos genótipos analisados por marcadores ISSR foram também, neste trabalho, analisados através das sequências da região ITS. Os perfis electroforéticos obtidos apresentam-se na Figura 21.

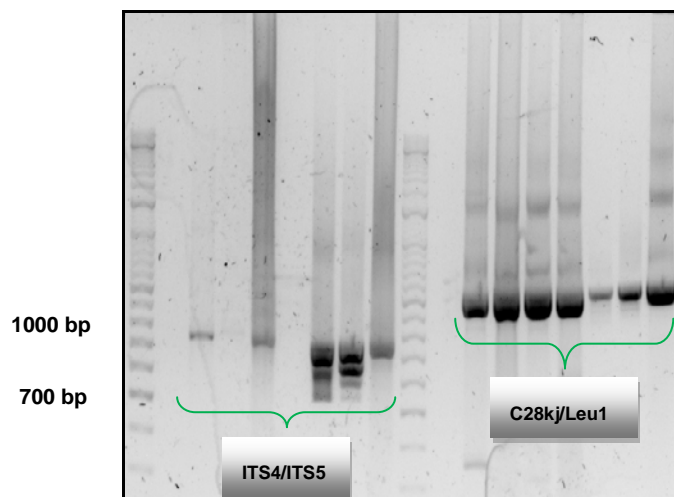


Figura 21- Amplificação com os *primers* ITS4/ITS5 e C28 KJ/Leu1

Com dimensões moleculares correspondentes aos tamanhos esperados, isto é, cerca de 700 bp para os *primers* ITS4/ITS5 e 950 bp para os *primers* C28Kj/Leu1, os produtos amplificados resultantes foram clonados e sequenciados.

Embora as sequências obtidas não tenham qualidade que justifique uma análise detalhada e não tenham o tamanho esperado, apresenta-se na Fig. 22 o alinhamento múltiplo obtido.

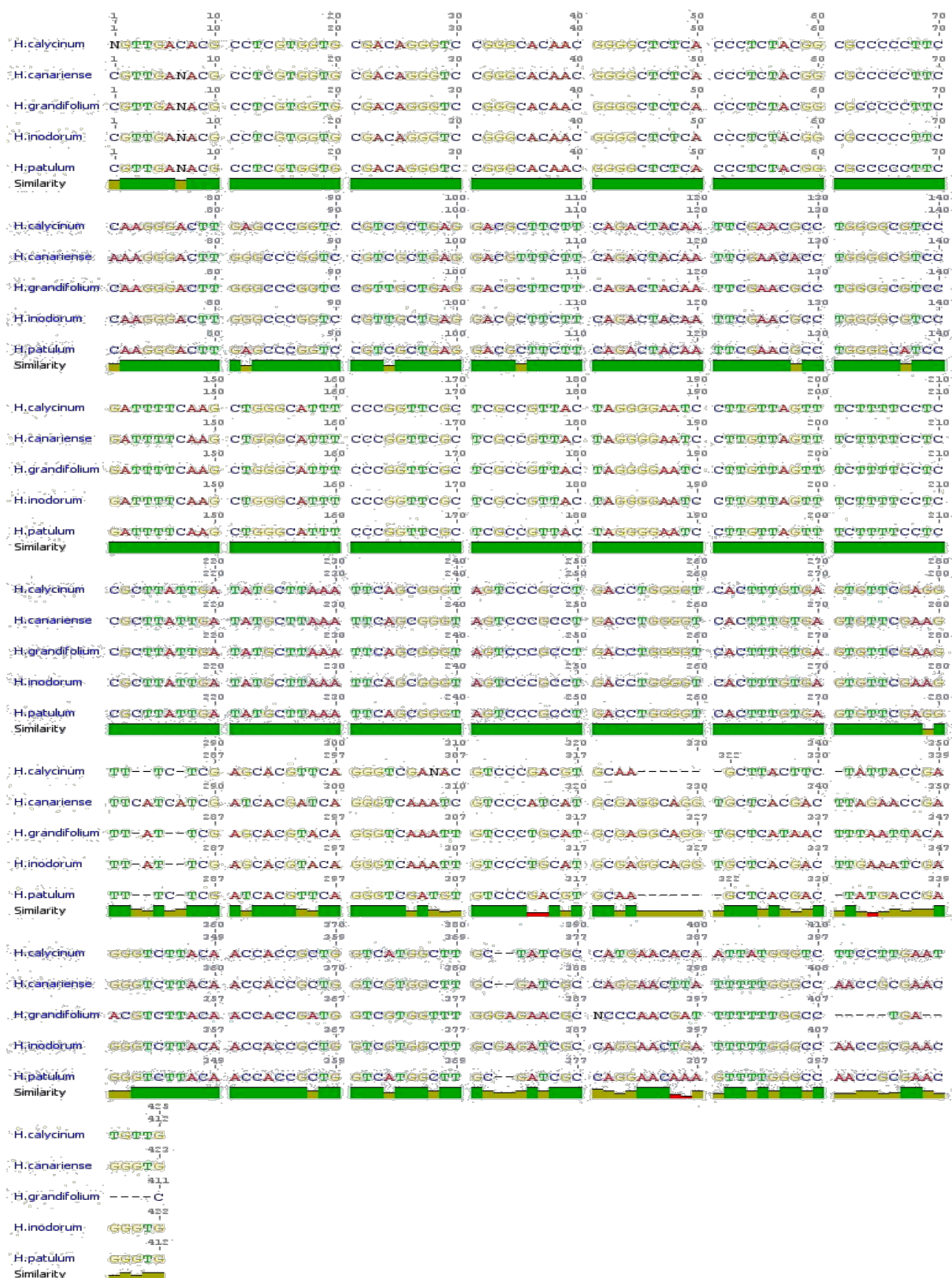


Figura 22- Alinhamento múltiplo das seqüências para a região ITS com os primers C28Kj/Leu1. Verde escuro: corresponde aos locais onde as seqüências para todas as espécies é a mesma; Verde claro: locais onde existem diferenças nucleotídicas entre as amostras.

Atendendo aos resultados descritos por Park e Kim (2004), que mostram que, após o alinhamento de sequências ITS obtidas para 36 espécies de *Hypericum*, para as sequências com 731 bp, 276 bp correspondem à região ITS1, 205 bp para a região 5.8 S e 250 bp para a região ITS2 e ainda que existem 402 posições nucleotídicas invariáveis e 329 variáveis, e atendendo também à localização dos *primers* C28Kj/Leu1 utilizados (Fig. 2), a análise de alinhamento mostra, provavelmente, parte da região ITS2, onde se observa a variação nucleotídica entre as espécies.

Com base no alinhamento referido anteriormente, determinou-se a sequência consenso (Fig. 23).

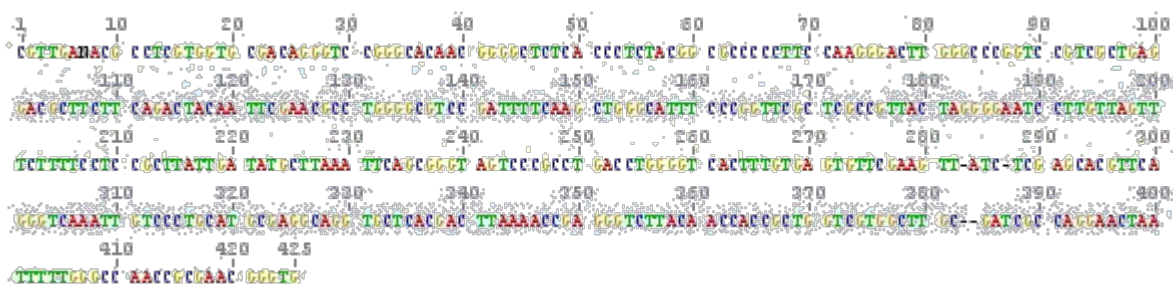


Figura 23- Sequência consenso

Para uma análise simples, esta sequência consenso foi comparada com as sequências homólogas do género *Hypericum* registadas na base de dados *GenBank*, apresentando-se na Fig. 24 o dendrograma obtido.

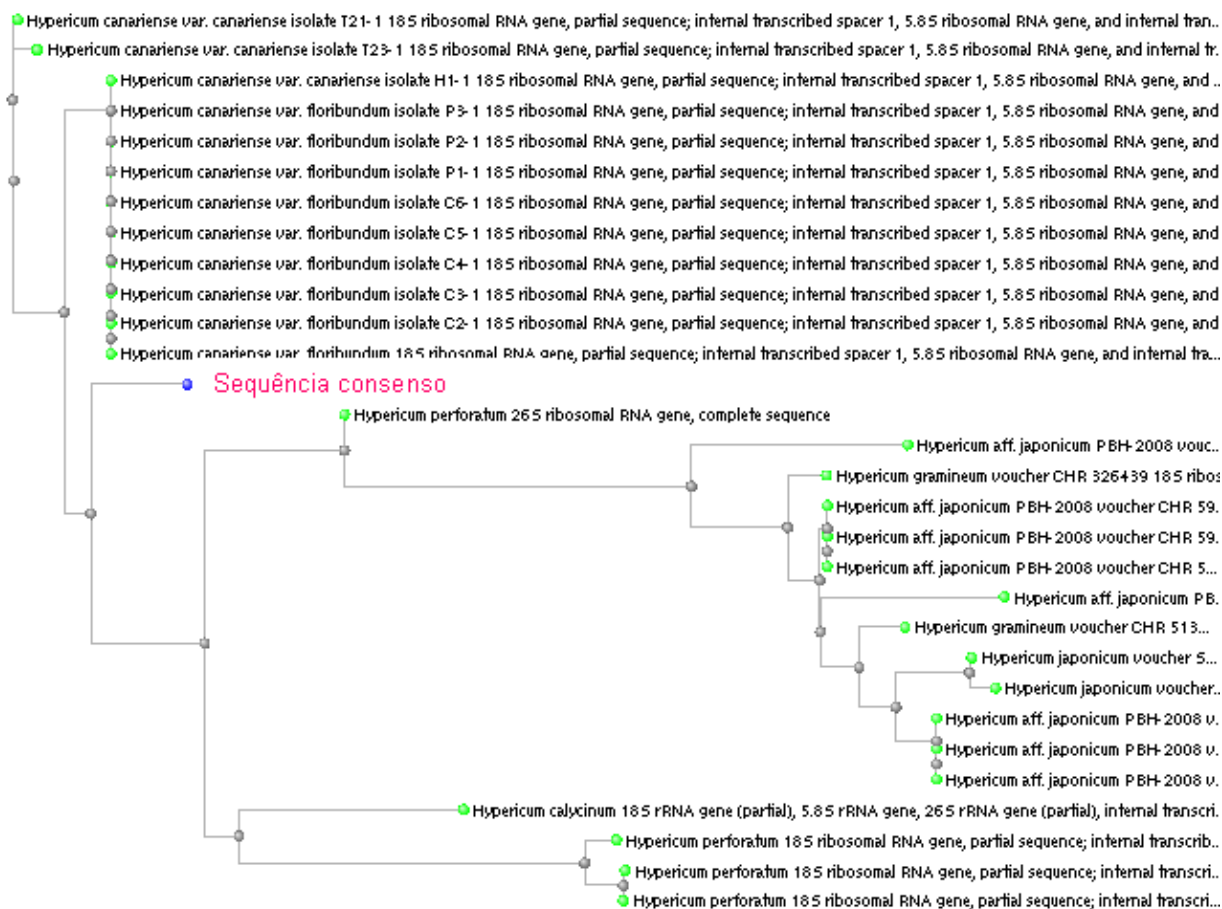


Figura 24- Dendrograma da relação filogenética entre a sequência consenso e as sequências existentes no *GenBank*

Com base neste dendrograma pode verificar-se quais as espécies com maior homologia à nossa sequência. Podemos verificar que a nossa sequência está ligada a um grupo formado pelo *H. perforatum* e *H. calycinum* e por outro lado ao *taxon H. canariense*, todas estas espécies estudadas neste trabalho

5. Conclusões Gerais e Perspectivas Futuras

A diferenciação macroscópica das cinco espécies estudadas levanta alguns problemas, principalmente nos taxa *H. grandifolium* e *H. patulum*, uma vez que as suas folhas são muito semelhantes. O taxon *H. x inodorum* diferencia-se das restantes espécies por apresentar folhas de maiores dimensões e nervação proeminente em ambas as páginas.

Dos microcaracteres observados, a forma das células foi semelhante em todos os taxa, apenas com algumas diferenças a nível das paredes que podem ser mais ou menos sinuosas. A espécie *H. patulum* apresenta células papiláceas nas duas epidermes e esteróides nas glândulas, detectados com o teste histoquímico tricloreto de antimónio, o que permite diferenciá-la das restantes espécies. A presença de duas camadas de parênquima clorofilino em paliçada, elevada densidade dos depósitos cuticulares, presença de cristais de oxalato de cálcio e menor índice de glândulas permite distinguir *H. calycinum* dos restantes taxa. O taxon *H. canariense* difere das outras espécies por apresentar um rácio comprimento/largura das células epidérmicas inferior, assim como um maior índice de glândulas. Em relação aos taxa *H. x inodorum* e *H. grandifolium* não se encontraram caracteres que os permitissem diferenciar, o que está de acordo com a sua afinidade taxonómica, pela colocação na mesma secção.

No estudo molecular efectuado os resultados foram similares aos apresentados anteriormente. Comparando o dendograma obtido na análise dos microcaracteres morfológicos com o dendograma obtido no estudo molecular com os primers ISSR, com as mesmas espécies, constata-se que os resultados são semelhantes, isto é, os taxa *H. x inodorum* e *H. grandifolium* encontram-se muito próximos quer a nível morfológico, quer a nível molecular, e as espécies que se encontram mais afastadas são os taxa *H. calycinum* e *H. patulum*. Ao analisarmos o dendograma com as espécies *H. androsaemum* e *H. perforatum* ssp. *perforatum* inseridas, constatamos que os resultados não variam, havendo apenas a formação de um grupo diferente: *H. perforatum* ssp. *perforatum*. Esta separação é explicada pela existência de diferenças morfológicas consideráveis em relação às outras espécies, sendo a mais significativa a presença de glândulas secretoras negras.

Apesar de não conhecermos trabalhos com marcadores ISSR em *Hypericum*, os nossos resultados preliminares apontam para que estes marcadores sejam considerados úteis na determinação da variabilidade interespecífica.

Em relação aos marcadores ITS, seria importante e uma mais valia, que este estudo fosse repetido e completado, visto que os resultados obtidos não foram conclusivos.

Seria também importante que o universo de amostras para cada espécie fosse maior, a fim de se poder também avaliar a variabilidade intraespecífica.

6. Referências Bibliográficas

- AJIBADE, S.R.; WEEDEN, N.F.; CHITE, S.M. 2000. *Inter simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus Vigna Euphytica*. **111**: 47-55.
- ARCHAK, S.; GAIKWAD, A.B.; GAUTAM, D.; RAO, E.V.V.B.; SWAMY, K.R.M.; KARIHALOO, J.L. 2003. *Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew (Anacardium occidentale L.) accessions of India*. *Genome*. **46**: 362-369.
- AYAN, A.K.; CRAK, C.; KEVSERO, K.; ÖZEN, T. 2004. *Hypericin in some Hypericum species from Turkey*. *Asian Journal of Plant Sciences*. **3(2)**: 200-202.
- BALDWIN, B.G.; SANDERSON, M.J.; PORTER, J.M.; WOJCIECHOWSKI, M.F.; CAMPBELL, C.S.; DONOGHUE, M.J. 1995. *The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny*. *Ann. Mol. Bot. Gard*. **82**: 247-277.
- BARROSO, J.M.G. 1999. *Histoquímica e Citoquímica*. Associação dos Estudantes da Faculdade de Ciências de Lisboa. 35-42 pp.
- BISIO, A.; CORALLO, A.; GASTALDO, P.; ROMUSSI, G.; CIARALLO, G.; FONTANA, N.; TOMMASI, N.; PROFUMO, P. 1999. *Glandular hairs and secreted material in Salvia blepharophylla grown in Italy*. *Annals of Botany*. **83**: 441-452.
- BLATTNER, F. 1999. *Direct Amplification of entire ITS region from poorly preserved plant material using recombinant PCR*. *BioTechniques*. **27**: 1180-1186.
- BOMBARDELLI, E.; MORAZZONI, P. 1995. *Hypericum perforatum*. *Fitoterapia*. **66**: 43-68.
- BORNET, B.; MULLER, C.; PAULUS, F.; BRANCHARD, M. 2002. *Highly informative nature of inter simple sequence repeat (ISSR) sequences amplified using tri- and tetranucleotide primers from DNA of cauliflower (Brassica oleracea var. botrytis L.)*. *Genome*. **45**: 890-896.
- BOTTEGA, S.; GARBARI, F.; PAGNI, A.M. 1999. *Secretory structures in Hypericum elodes (Hypericaceae). I. Preliminary observations*. *Soc. Tosc. Sci. Nat. Mem., Serie B*. **106**: 93-98.
- BOURKE, C.A. 1997. *Effects of Hypericum perforatum (St. John's wort) on animal health and production*. *Plant Protection Quarterly*. **12(12)**: 91-92.
- BRISKIN, D.P. 2000. *Medicinal Plants and Phytomedicines. Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Health*. *Plant Physiology*. **124**: 507-514.
- BRISKIN, D.P.; GAWIENOWSKI, M.C. 2001. *Differential effects of light and nitrogen on production of hypericins and leaf glands in Hypericum perforatum*. *Plant Physiology Biochemistry*. **39**: 1075-1081.

- CARVALHO, R.F. 2005. *Estudos Morfológicos e Moleculares em Hypericum perforatum L. e H. androsaemum L.* Relatório de estágio profissionalizante da Licenciatura em Biologia Vegetal Aplicada. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- CICCARELLI, D.; ANDREUCCI, AC; PAGNI, AM. 2001a. *The "black nodules" of Hypericum perforatum L. ssp perforatum: Morphological, anatomical, and histochemical studies during the course of ontogenesis.* *Israel Journal of Plant Sciences.* **49**: 33-40.
- CICCARELLI, D.; ANDREUCCI, AC; PAGNI, AM. 2001b. *Translucent glands and secretory canals in Hypericum perforatum L. (Hypericaceae): Morphological, anatomical, and histochemical studies during the course of ontogenesis.* *Annals of Botany.* **88**: 637-644.
- CLAMOTE, F. 2009. *Hiperião-dos-jardins (Hypericum calycinum).* Disponível em: <http://obotanicoaprendiznaterradosespantos.blogspot.com/2009/06/hipericao-dos-jardins-hypericum.html>. Acesso em: 12 de Outubro de 2009.
- COSTA, T.P. 1985. *Bolsas secretoras de Ruta chalepensis L., ontogenia e secreção.* Dissertação de Doutoramento. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. 109 pp.
- CRUZ, J. & TEIXIERA, G. 2003. *Controlo de Qualidade em Fármacos do Origem Vegetal: Caracteres macro e microscópicos em Hyperici herbua.* *Revista Portuguesa de Farmácia* LII(1): 165
- CULLEN, J.; BRADY, A.; BRICKELL, C.D; Green, P.S; HEYWOOD, V.H; JÖGENSEN, P.M.; JURY, S.L; KNEES, S.G; LESLIE, A.C; MATTHEWS, V.A; ROBSON, N.K.B.; WALTERS, S.M.; WIJNANDS, D.O; YEO, P.F. 1989. *The European Garden Flora .* Volume IV, Dicotyledons (Part. II). Cambridge University Press.
- CUNHA, P. 2007. *Plantas aromáticas em Portugal- Caracterização e Utilizações.* Ed.FCG, Lisboa.
- DAVID, R.; CARDE, J.P. 1964. *Coloration différentielle des pseudophylles de Pin maritime au moyen réactif de Nadi.* *Comptes Rendus de l' Academie des Sciences.* Paris, Serie D 258. 1338-1340 pp.
- DEMASURE, B.; SOZI, N.; PETIT, R.J. 1995. *A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants.* *Molecular Ecology.* **4**: 129-131.
- ELLSWORTH, D.L.; RITTENHOUSE, K.D; HONEYCUTT, R.L. 1993. *Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns.* *BioTechniques.* **14**: 214-217.
- ESAU, K. 1972. *Anatomía Vegetal.* 2nd Ed. Omega ediciones. Barcelona. 5-197 pp.
- EVANS, C. W. *Trease and Evans Pharmacognosy.* 15th Ed. Saunders Company Ltd. London.

- FAHN, A. 1979. *Secretory tissues in vascular plants*. London. Ac. Press.
- FEDER, N.; O'BRIEN, T.P. 1968. *Plant microtechnique – some principles and new methods*. *American Journal of Botany*. **55**: 123-139.
- FERREIRA, M.E & GRATTAPAGLIA, D. 1995. *Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética*. Brasília, Ministério da agricultura do abastecimento e da Reforma Agrária - MAARA, Empresas Brasileiras de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia – CENARGEN, Brasília, DF.
- FORGET, L.; GOLDROSEN, J.; HART, J.A; HYUN, T.; MEACHAM, D.; TYLER, T. 2001. *Herbal Companion to AHFS DI*. American Society of Health-System Pharmacists Bethesda, Maryland.
- FRANCO, J.A. 1984. *Nova Flora de Portugal (Continente e Açores)*. Vol I. Lisboa.
- FURR, M.; MAHLBERG, P.G. 1981. *Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products*. **44**: 153-159.
- GARDNER, R.O. 1975. *Vanillin-hydrochloric acid as a histochemical test for tannin*. *Stain technology*. **50**: 315-317.
- GREEN, J. 1884. *On the organs of secretion in the Hipericaceae*. *Journal of the Linnean Society of London*. **20**: 202-464.
- GUPTA, M.; CHYI, Y.S.; ROMERO-SEVERSON, J.; OWEN, J.L. 1994. *Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats*. *Theor. Appl. Genet.* **89**: 998-1006.
- HARBORNE, J.B. 1993. *Introduction to ecological biochemistry*. 4th Ed. Ac. Press. London.
- HARDMAN, R.; SAFOWORA, E.A. 1972. *Antimony trichloride as a test for steroids especially diosgenin and yamogenin in plant tissues*. *Stain Technol.* **47**: 205-208.
- HAYAT, M. 1981. *Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications*. 2nd Ed. Ed. Arnold Publ. London.
- HILLIS, D.M.; DIXON, M.T. 1991. *Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference*. *Quart. Rev. Biol.* Vol. 66. 411-453 pp.
- JENSEN, W.A. 1962. *Botanical Histochemistry: principles and practice*. San Francisco, CA: Freeman.
- JOBES, D.; THIEN, L. 1997. *A Conserved Motif in the 5.8S Ribosomal RNA (rRNA) Gene is a Useful Diagnostic Marker for Plant Internal Transcribed Spacer (ITS) sequences*. *Plant Molecular Biology Reporter*. **15**: 326-334.
- JOHANSEN, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill.
- JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S. . KELLOGG, E. 2008. *Plant Systematics: A phylogenetic approach with CDROM (Hardcover)*. Massachusetts: Sinauer Assoc. Publ., 3^aEd.

- KANTETY, R.V.; ZENG, X.; BENNETZEN, J.L.; ZEHR, B.E. 1995. *Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (Zea mays L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. Mol. Breed. 1(4): 365-373.*
- KARP, A.; KRESOVICH, K.V.; AYAD, W.G.; HODGKIN, T. 1997. *Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. IPGRI Technical Bulletin, Nº 2.*
- KOSUTH, J.; KOPERDÁKOVÁ, J.; TOLONEN, A.; HOHTOLA, A.; CELLÁROVÁ, E. 2003. *The content of hypericins and phloroglucinols in Hypericum perforatum L. seedlings at early stage of development. Plant Science. 165: 515-521.*
- KYRAKOSYAN, A.; SIRVENT, T.M; GIBSON, D.M; KAUFMAN, P.B. 2004. *Review: The production of hypericins and hiperforin by in vitro cultures of St. wurtin (Hypericum perforatum). Biotechnology Applied Biochemistry. 39: 71-81.*
- LEE, B.Y.; DOWNIE, S.R. 1999. *A Molecular Phylogeny of Apiaceae Tribe Caucalideae and Related Taxa: Inferences Based on ITS Sequence Data. Systematic Botany. Vol. 24. Nº3.*
- LISON, L. 1960. *Histochemie et cytochemie animals. Principes et méthodes. Vol. 1,2. Gauthier-Villars, Paris.*
- LOBO, C. 2000. *Estudo Morfológico e Histoquímico de Hypericum glandulosum Ait. Relatório de Estágio Científico, Licenciatura em Biologia Vegetal Aplicada 1999-2000. 54 pp.*
- MAGGI, F.; FERRETI, G.; POCESCHI, N.; MENGHINI, L.; RICCIUTELLI, M. 2004. *Morphological, histochemical and phytochemical investigation of the genus Hypericum of the Central Italy. Fitoterapia. 75: 702-711.*
- MARTIN, J.T.; JUNIPER, B.E. 1970. *The cuticles of plants. Edward and Arnold (Publ.) Ltd. 99-120 pp.*
- MÁRTONFI, P.; REPCA, M.; CICCARELLI, D.; GARBARI, F. 2001. *Hypericum perforatum L.- Chemotype without rutin from Italy. Biochemical Systematics and Ecology. 29: 659-661.*
- MCPHERSON, M.J; QUIRKE, P.; TAYLOR, G.R. 1991. *PCR – A practical approach. Vol.1, Oxford University Press.*
- MENDES, M.; TRINDADE, H.; FIGUEIREDO, A.; BARROSO, J.; FONTINHA, S.; PEDRO, L. 2009. *Volatile and molecular characterization of two Portuguese endemic species: Angelica lignescens and Melanoselinum decipiens. Biochemical Systematics and Ecology. 37: 98-105.*
- METCALFE, C. & CHALK, L. 1950. *Anatomy of Dicotyledons. Volume1. Clarendon Press, Oxford Sciences Publication, Oxford. 165-169 e 712-724.*

- METCALFE, C.; CHALK, L. 1979. *Anatomy of Dicotyledons*. Vol. I. 2nd Ed. Clarendon Press, Oxford Sciences Publication. Oxford. 97-165 pp.
- MINDELL, D.P.; HONEYCUTT, R.L. 1990. *Ribosomal RNA in vertebrates: Evolution and phylogenetic implications*. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* Vol. 21. 541-566 pp.
- MITTON, J.B. 1994. *Molecular approaches to population biology*. *Annual Review of Ecology and Systematics*. **25**: 45-69.
- MOHSEN, H.; ALI, F. 2008. *Study of genetic polymorphism of Artemisia herba-alba from Tunisia using ISSR markers*. *Afr. J. Biotechnol.* **7(1)**: 044-050.
- MORAES, I. 2007. *Caracterização citogenética e da biologia reprodutiva de espécies do género Hypericum L.* Tese Dout. Univ. SP. CDD: 576, 36234.
- NÓBREGA, F. 1996. *Polimorfismo isoenzimático em Quercus suber L.- Contribuição para o estudo da sua relação com a qualidade da cortiça*. Tese de Doutoramento. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa.
- NOGUEIRA, T. 2002. *O Género Hypericum L. em Portugal Continental- Contribuição para o estudo Quimiotaxonómico*. Dissertação de Doutoramento (Instituto Superior de Agronomia- Universidade Técnica de Lisboa). 330 pp.
- NÚÑEZ, A.F.R. 1993. *Hypericum L.* In: CASTROVIEJO, S.; AEDO, C.; CIRUJANO, S.; LAINZ, M.; MONTSERRAT, P.; MORALES, R.; GARMENDIA, F.M.; NAVARRO, C.; PAIVA, J.; SORIANO, C. (Eds.). *Flora Iberica, Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*. Volume III. Real Jardín Botánico, C.S.I.C. Madrid. 157 pp.
- ONELLI, E.; RIVETTA, A.; GIORGI, A.; BIGNAMI, M.; COCUCCI, M.; PATRIGNANI, G. 2002. *Ultrastructural studies on the developing secretory nodules of Hypericum perforatum- Abstract*. *Ingenta*. 191(2): 92-102.
- PARK, S.J.; KIM, K. 2004. *Molecular Phylogeny of the Genus Hypericum (Hypericaceae) from Korea and Japan: Evidence from Nuclear rDNA ITS Sequence Data*. *Journal of Plant Biology*. **47(4)**: 366-374.
- PARKER, P.G.; SNOW, A.A.; SCHUG, M.D.; BOOTON, G.C.; FUERST, P.A. 1998. *What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker*. *Ecology*. **79**: 361-382.
- PARSONS, B.J.; NEWBURY, H.J.; JACKSON, M.T.; FORD-LLOYD, B.V. 1997. *Contrasting genetic diversity relationships are revealed in rice (Oryza sativa L.) using different marker types*. *Mol. Breed.* **3(2)**: 115-125.
- PINTO, R.S. 1987. *Contribuição para o estudo de compostos flavónicos em espécies de Hypericum da Flora Portuguesa*. Dissertação de Doutoramento apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. 193 pp.
- PIZZOLATO, P.; LILLIE, R.D. 1973. *Mayer's Tannic acid-Ferric chloride stain for mucins*. *J. Histochem. Cytochem.* **21**: 56-64.

- PLANTS FOR A FUTURE. Edible, medicinal and useful plants for a healthier world.
Disponível em: <http://www.pfaf.org/database/plants.php?Hypericum+patulum>.
Acesso em 16 de Novembro de 2009.
- PLUNKETT, G.M.; SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. 1997. *Clarification of the relationship between Apiaceae and Araliaceae based on matK and rbcL sequence data. American Journal of Botany*. **84**: 565-580.
- PRESS, J.R.; SHORT, M.J. 1994. *Flora of Madeira*. London: HMSO. 221-223.
- QIU, Y.X.; HONG, D.Y.; FU, C.X.; CAMERON, K.M. 2004. *Genetic variation in the endangered and endemic species Changium smyrnioides (Apiaceae). Biochem. Syst. Ecol.* **32**: 583-596.
- RAINA, S.N.; RANI, V.; KOJIMA, T.; OGIHARA, Y.; SINGH, K.P.; DEVARUMATH, R.M. 2001. *RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (Arachis hypogaea) cultivars and wild species. Genome*. **44**: 763-772.
- RAPISARDA *et al.* 1996. *A análise das imagens. Uma ferramenta para a investigação de drogas. Microscopia e análise*. **44**: 15-26.
- ROBSON, N. 1981. *Studies in the genus Hypericum L. (Guttiferae). Infrageneric classification Bull. Br. Mus. Nat. Hist. Bot.* **5**: 291-355.
- SAIKI, R.K.; SCHARF, S.J.; FALLONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ELRICH, H.A.; ARNHEIM, N. 1985. *Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. Science*. 230:1350-1354.
- SALIMATH, S.S.; OLIVEIRA, A.C.; GODWIN, I.D.; BENNETZEN, J.L. 1995. *Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus Eleusine with DNA markers. Genome*. **38**: 757-763.
- SALISBURY, E. 1927. *On the causes and ecological of stomatal frequency with special reference to the woodland flora. Philos. Trans. R. Soc. B*. **216**: 1-65.
- SARWAT, M.; DAS, E.S.; SRIVASTAVA, E.P.S. 2008. *Analysis of genetic diversity through AFLP, SAMPL, ISSR and RAPD markers in Tribulus terrestris, a medicinal herb. Plant Cell Rep.* **27**: 519-528.
- SAXENA, S.; CHANDRA, R.; SRIVASTAVA, A.P.; MISHRA, M.; PATHAK, R.K.; RANADE, S.A. 2005. *Analysis of genetic diversity among papaya cultivars using single primer amplification reaction (SPAR) methods. J. Hortic Sci Biotechnol.* **80(3)**: 291-296.
- SIMOES, C.; GUERRA, M. 2004. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5ª Ed. Editora UFSC.
- SMITH, L.M.; SANDERS, J.Z.; HAISER, R.J.; HUGHES, P.; DODD, C.; CONNELL, C.R.; HEINER, C.; KENT, S.B.H.; HOOD, L.E. 1986. *Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. Nature*. **321**: 674-679.

- SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. 1973. *Numerical taxonomy*. San Francisco: W. H. Freeman. 573 pp.
- SOUTHWELL, I.A.; BOURKE, C.A. 2000. *Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort)*. *Phytochemistry*. **56**: 437-441.
- SPALIK, K.; DOWNIE, S.R. 2006. *The Evolutionary History of *Sium Sensy Lato* (Apiaceae): Dispersal, Vicariance and Domestication as Inferred from its rDNA Phylogeny*. *American Journal of Botany*. **93(5)**: 747-761.
- STACE, C. 1989. *Plant Taxonomy- Biosystematics*. 2ª Ed. Cambridge University Press, Cambridge. 67-85.
- TUTIN, T.G.; HEYWOOD, V.H; BURGESS, N.A.; MOORE, D.M; VALENTINE, D.H; WALTERS, S.M; WEBB, D.A. 1993. *Flora European*. Volume 2. Cambridge University Press.
- VARGAS, P. 2000. *A phylogenetic study of *Saxifraga* sect. *Saxifraga* (Saxifragaceae) based on nrDNA ITS sequences*. *Plant Syst. Evol.* **223**: 59-70.
- VARGAS, P.; BALDWIN, B.; CONSTANCE, L. 1998. *Nuclear Ribosomal DNA Evidence for a Western North American Origin of Hawaiian and South American Species of *Sanicula* (Apiaceae)*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 235-240.
- VINCENT, M.C.; FULTON, T. 2003. *Using molecular marker technology in studies on plant genetic diversity: IPGRI*, recuperado em 14 de Novembro de 2009, de <http://www.idg.cornell.edu/Molecularmarkers/Vol2cover.jpg>.
- WALKER et al. 2001. *As diferenças regionais entre as plantas de *Hypericum perforatum* no noroeste dos Estados Unidos*. *Poder. J. Bot.* **79**: 1248-1255.
- WANG, L.; LIU, J.; JIAN, S.; ZHANG, W.; WANG, Q.; ZHAO, X.; LIU, N.; ZHONG, Y. 2006. *Genetic diversity and population structure in *Elephantopus scaber* (Asteraceae) from South China as revealed by ISSR markers*. *Plant Biosyst.* **140(3)**: 273-279.
- WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K.; KAHL, G. 2005. *DNA Fingerprinting in plants: Principles, Methods and Applications*. 2ª Ed. CRC Press.
- WIGHT & AMOTT. 1834. *Flora of China*. Prod. F1. Ind. Orient. **1**: 99.
- WIKIPEDIA. 2009. *Hypericum canariense*. Disponível em: http://en.wikipedia.org/wiki/Hypericum_canariense. Acesso em: 14 Novembro de 2009.
- WIKIPEDIA. 2009. *Hypericum grandifolium*. Disponível em: http://en.wikipedia.org/wiki/Hypericum_grandifolium. Acesso em: 14 Novembro de 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1999. *Monographs on Selected Medicinal Plants (Herbs)*. Vol. II. *World Health Organization*. Geneva.

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

Anexo I - Fixação e preparação do material vegetal (MO e MEV)

- **Fixação**
 1. Solução de glutaraldeído a 3%, 3 horas a 4°C.
 2. Lavagem em tampão fosfato de sódio 0,1 M, a pH 7,0, 24 horas a 4°C.
 3. Lavagem em água destilada, 3x, 10 minutos cada.
- **Desidratação**
 1. Em soluções aquosas de concentrações ascendentes de etanol, 30%, 50%, 70% e 100%, 10 a 20 minutos cada.
- **Secagem**
 1. Pelo método de ponto crítico do CO₂, efectuada num aparelho Critical Point Polaron BioRad E3500, tempo variável.
- **Metalização**
 1. Montagem em suportes metálicos cobertos com fita adesiva dupla;
 2. Metalização por irradiação com ouro, num metalizador Jeol JFC-1200, tempo variável.

Anexo II - Inclusão do material vegetal em parafina (MO)

(O material vegetal a ser sujeito a este protocolo deve ser previamente fixado e desidratado, como indicado no Anexo I)

- **Diafanização**
 1. Passagem em TBA (álcool butílico terciário), 2x, 1 hora
 2. Nova passagem em TBA, uma noite em estufa, a 45^o-60^oC
- **Impregnação**
 1. 1^o banho em mistura parafina líquida - TBA (em estufa, a 45^o-60^oC, 4 horas)
 2. 2^o banho em parafina líquida (em estufa, a 60^oC, 4 horas)
- **Inclusão**
 1. Banho em parafina de inclusão líquida (em estufa a 60^oC, 16 horas)
 2. Colocação de parafina de inclusão líquida em moldes metálicos
 3. Colocar e orientar o material no molde, ainda com a parafina de inclusão líquida;
 4. Deixar solidificar (polimerização).

Anexo III - Estudo Histoquímico

A. Detecção de Mucilagens

Ácido tânico/Tricloreto de Ferro (Pizzolato e Lillie, 1973)	Tempo
Ácido tânico 5%	3-5 minutos
Lavagem rápida em água	-
Solução de tricloreto de ferro 3%	1 minuto
Lavagem rápida em água e montagem em água	-
Controlo negativo: Cortes tratados só com ácido tânico ou só com o tricloreto de ferro	-
Resultado esperado: As mucilagens coram de negro	-

B. Detecção de Polissacáridos gerais

Ácido periódico/Reagente de Schiff (PAS) (Feder & O'Brien, 1968)	Tempo
Ácido periódico 1%	10 minutos
Lavagem rápida em água	-
Reagente de Schiff	30 minutos
Lavagem em metabissulfito de sódio 0,5%	3x2 minutos
Lavagem em água e montagem em água	-
Controlo negativo: Omissão do tratamento com ácido periódico	-
Resultado esperado: Os polissacáridos coram de rosa vivo	-

C. Detecção de Lípidos Gerais

Vermelho de Sudão III (Johansen, 1940)	Tempo
Vermelho Sudão III 0,3% em etanol 70%(filtrar antes de utilizar)	5-15 minutos
Lavagem rápida a etanol 70%	-
Lavagem rápida em água e montagem em água	-
Controlo negativo: Cortes previamente tratados com metanol/clorofórmio/H ₂ O/HCl (66:33:4:1), à temperatura ambiente	1 hora
Resultado esperado: Os lípidos coram de vermelho-laranja	-

D. Detecção Diferencial de Lípidos

Sulfato de Azul do Nilo (Jensen, 1962)	Tempo
Solução de sulfato azul de Nilo 1% a 60°C	2 minutos
Ácido acético 1%	½-2 minutos
Lavagem rápida em água e montagem em água	-
Controlo negativo: Cortes previamente tratados com metanol/clorofórmio/H ₂ O/HCl (66:33:4:1) durante 1h, à temperatura ambiente	-
Resultado esperado: Os lípidos neutros coram rosa e os lípidos ácidos coram azul	-

Acetato de Cobre/Ácido Rubeânico (Lison, 1960)	Tempo
Solução de acetato de cobre 0,05%	60 minutos
Solução de Na ₂ EDTA 0,1% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0	5 minutos
Lavagem em água	10 minutos
Ácido rubeânico 0,1% em etanol 70%	20 minutos
Lavagem em etanol 70%	5 minutos
Lavagem e montagem em água	
Controlo negativo: Cortes previamente tratados com metanol/clorofórmio/H ₂ O/HCl (66:33:4:1), à temperatura ambiente	1 hora
Resultado esperado: Os ácidos gordos coram de verde escuro	

E. Detecção de Terpenóides

Reagente de Nadi (David e Carde, 1964)	Tempo
Reagente de Nadi, à temperatura ambiente, no escuro (preparar no momento)	60-90 minutos
Lavagem em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0	2 minutos
Montagem em água	-
Controlo negativo: Cortes previamente tratados com metanol/clorofórmio/H ₂ O/HCl (66:33:4:1), à temperatura ambiente	1 hora
Resultado esperado: Os óleos essenciais coram de azul e as oleoresinas coram de vermelho tinto	-

Tricloreto de Antimónio (Hardman and Sofowora, 1972)	Tempo
Montar directamente os cortes numa solução saturada de tricloreto de antimónio em ácido perclórico 60% e observar ao fim de	5-10 minutos
Controlo negativo: Cortes previamente tratados com tetrahidreto boreto de sódio 1% (preparar na altura)	10 minutos
Lavagem em água	3x15 minutos
Resultado esperado: Os esteróides coram de vermelho alaranjado	

2,4 Dinitrofenihidrazina (Lison, 1960)	Tempo
Solução saturada de 2,4 Dinitrofenihidrazina em HCl 2N a 25°C	10 minutos
Lavagem rápida em água e montagem em água	-
Controlo negativo: Cortes previamente tratados com metanol/clorofórmio/H ₂ O/HCl (66:33:4:1), à temperatura ambiente	1 hora
Resultado esperado: Os terpenóides coram de vermelho alaranjado	-

F. Detecção de Fenóis

Tricloreto de Ferro III (Johansen, 1940)	Tempo
Solução de tricloreto de ferro 10%	10 minutos
Lavagem rápida em água e montagem em água	-
Resultado esperado: Os fenóis coram de negro	-

Dicromato de Potássio (Johansen, 1940)	Tempo
Solução de dicromato de potássio 10%	10 minutos
Lavagem rápida em água e montagem em água	-
Resultado esperado: Os fenóis coram de castanho escuro	-

Vanilina (Gardner, 1975)	Tempo
Montar os cortes numa solução alcoólica saturada de vanilina	5 minutos
Adicionar algumas gotas de HCl concentrado	-
Colocar a lamela e observar	-
Resultado esperado: Os taninos coram de castanho	-

G. Detecção de Alcalóides

Reagente de Dittmar (Furr e Mahlberg, 1981)	Tempo
Reagente de Dittmar	5-10 minutos
Lavagem rápida em água e montagem em água	
Controlo negativo: Cortes previamente tratados com ácido tartárico 5% em etanol 95%, durante 48-72 horas	
Resultado esperado: Os alcalóides coram de castanho avermelhado	

Anexo IV - Estudo Molecular

A. Kit Dneasy Plant Mini Kit (QIAGEN)

1. Macerou-se cerca de 0,1 g de material vegetal, com azoto líquido, num almofariz. Transferiu-se o macerado para um tubo eppendorf de 1,5 ml.
2. Adicionaram-se 400 µl de tampão de lise API e logo de seguida 4 µl de Rnase A, submetendo o tubo ao vortex.
3. Incubou-se a mistura durante 30 minutos no banho seco a 65°C (em vez de 10 minutos). Misturou-se 2 a 3 vezes o tubo eppendorf, por inversão.
4. Adicionou-se 130 µl de tampão AP2, misturou-se e incubou-se durante 5 minutos no gelo.
5. Centrifugou-se a 13000 rpm durante 5 minutos.
6. Colocou-se uma coluna "QIAshredder mini spin column" num tubo de 2 ml e aplicou-se o sobrenadante à coluna. Centrifugou-se durante 2 minutos a 13000 rpm.
7. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo eppendorf
8. Adicionou-se 1,5 volumes de AP3/E e misturou-se com a pipeta
9. Colocou-se uma coluna "Dneasy mini spin column" num tubo de 2 ml e transferiu-se 650 µl do tubo de eppendorf para a coluna. Centrifugou-se a 8000 rpm durante 1 minuto e desprezou-se o sobrenadante. Repetiu-se este passo com o resto da amostra.
10. Transferiu-se a coluna "Dneasy mini spin column" para um novo tubo de eppendorf de 1,5 ml e adicionou-se 500 µl de tampão de lavagem AW. Centrifugou-se a 8000 rpm durante 1 minuto e desprezou-se o sobrenadante.
11. Adicionou-se novamente 500 µl de tampão AW à coluna e centrifugou-se a 13000 rpm durante 2 minutos.
12. Centrifugou-se uma terceira vez, sem tampão de lavagem, durante 1 minuto, a 13000 rpm.
13. Transferiu-se a coluna para um tubo de eppendorf de 1,5 ml, e eluiu-se o DNA com 30 µl (em vez de 100 µl) de tampão AE pré-aquecido (65°C). Incubou-se à temperatura ambiente durante 60 minutos, e centrifugou-se a 8000 rpm durante 1 minuto (1ª eluição).
14. Repetiu-se a eluição para outro tubo de 1,5 ml e adicionou-se novamente 30 µl de tampão AE. A incubação à temperatura ambiente foi só durante 30 minutos. (este tubo ficou n frigorífico durante a noite) (2ª eluição).

B. Método CTAB (Cationic hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide) (DOYLE & DOYLE, 1987)

1. Macerou-se cerca de 2 g de material vegetal , com azoto liquido, num almofariz. Após maceração, o material vegetal foi transferido para um tubo Falcon de 50 ml contendo 15000 µl de IB pré-aquecido a 65°C ("isolation buffer":CTAB 2% (p/v); NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM; Tris-HCl 100 mM pH 8,0; PVP-40 1%) e 150 µl de mercaptoetanol.
2. Esta mistura foi mantida a 65°C durante 90 minutos, em banho-maria, com agitações periódicas.
3. Ao fim deste tempo adicionou-se 15000 µl de solução de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), homogeneizando-se a mistura por inversão durante 10 minutos.
4. A amostra foi centrifugada durante 10 minutos a 6000 rpm.
5. Retirou-se a fase aquosa para um novo tubo Falcon.
6. Para a precipitação do DNA, adicionou-se 0,5 volumes de isopropanol frio, invertendo-se cuidadosamente o tubo que foi seguidamente colocado a -20°C durante a noite.
7. Através de centrifugação a 7500 rpm durante 10 minutos e a 4°C o pellet foi recuperado e transferido para um tubo de eppendorf ao qual se adicionou 500 µl de WS (solução de lavagem: 70% etanol; 10 mM acetato de amónio). Retirou-se o pellet para um novo eppendorf e lavou-se com mais 500 µl de WS.
8. Centrifugou-se 10 minutos a 10000 rpm.
9. Retirou-se o sobrenadante e o pellet foi seco à temperatura ambiente.
10. Após o pellet estar totalmente seco adicionou-se 1 ml de solução TE (Tampão de Eluição: 10 mM Tris-HCL pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) para o dissolver completamente.
11. Adicionou-se 500 µl de acetato de amónio 7,5 M, agitou-se bem a solução e colocou-se em gelo durante 15 minutos.
12. Centrifugou-se 30 minutos a 12000 rpm.
13. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo eppendorf (colocou-se apenas 500 µl de sobrenadante em cada eppendorf).
14. Adicionou-se 2 volumes de etanol absoluto a 96% (1000 µl a cada tubo) e misturou-se por inversão. Colocou-se a -20°C durante a noite.
15. Centrifugou-se 10 minutos a 12000 rpm
16. Lavou-se a solução com 1000 µl de etanol a 70%.
17. Centrifugou-se novamente 2 minutos a 12000 rpm e secou-se o pellet.
18. Dissolveu-se com TE (20 µl em cada tubo) e juntou-se tudo num só eppendorf.
19. Ao DNA extraído foi adicionada a ribonuclease RNase A de forma a obter uma concentração final de 100 µl/ml (0,6 µl). A mistura foi incubada a 37°C durante 1 hora.

C. QIAquick Agarose Gel Extraction Protocol (QIAGEN)

1. Excisaram-se as bandas de DNA do gel de agarose, com um bisturi.
2. Pesaram-se as bandas. Adicionaram-se 3 volumes de tampão QG para 1 volume de gel.
3. Incubou-se a 50°C durante 10 minutos.
4. Observou-se a cor da solução após a dissolução do gel (deverá apresentar uma coloração amarela).
5. Adicionar isopropanol para o mesmo volume de gel.
6. Colocar a amostra na coluna e centrifugar durante 1 minuto a 13000 rpm.
7. Deitar fora o líquido, voltar a colocar a coluna no mesmo tubo
8. Lavar com 750 µl do tampão PE, voltar a centrifugar durante 1 minuto.
9. Colocar a coluna num eppendorf limpo e centrifugar durante 1 minuto.
10. Repetir o passo anterior.
11. Eluir o DNA (produto de PCR) com 30 µl de água destilada estéril. Centrifugar.

D. PCR Cloning Kit Protocol (Fermentas)

D.1. Protocolo para a Reacção de Ligação

1. Descongelaram-se o tampão de ligação (2x reaction buffer) e o vector pJET 1.2/blunt .
2. Preparou-se a mistura de reacção de ligação de acordo com a tabela referido nos materiais e métodos (Tabela 8).
3. Após agitação por inversão, a mistura de reacção de ligação foi incubada durante 1 hora a 22°C.

D.2. Protocolo para a Reacção de Transformação

• Preparação das bactérias

1. Inocular 2000 µl de TransformAid C-Medium com as bactérias E.Coli (liofilizadas). Incubar overnight a 37°C.
2. Preparar 8 eppendorf com TransformAid C-Medium (1500 µl para cada transformação).
3. Adicionar 1/10 do volume da cultura de bactérias ao C-Medium (1500 µl C- Medium + 150 µl de E.coli).
4. Incubar os tubos a 37°C durante 20 minutos.

● **Processo de transformação**

1. Preparar a solução TransformAid T-solution com uma mistura de igual volume de T-solution (A) e T-solution (B) (500 µl de solução para cada duas transformações) (2100 µl TA + 2100 µl TB). Manter a solução no gelo.
2. Retirar 1500 µl da cultura de bactérias para um tubo de centrifuga e centrifugar a 13000 rpm durante 1 minuto.
3. Descartar o sobrenadante e resuspender o pellet com 300 µl da solução TransformAid T-solution. Incubar os tubos no gelo durante 5 minutos.
4. Centrifugar novamente a 13000 rpm durante 1 minuto e retirar o sobrenadante.
5. Resuspender as células com 120 µl de TransformAid T-solution e incubar no gelo durante 5 minutos.
6. Colocar 2,5 µl da reacção de ligação num novo tubo de centrifuga e colocar no gelo durante 2 minutos.
7. Adicionar 50 µl das células resuspendidas e incubar no gelo durante 5 minutos.
8. Colocar as células nas placas que contêm LB + Ampicilina
9. Incubar overnight a 37°C.

E. Gene Jet⁺ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) (Extracção do DNA plasmídico)

1. Centrifugar os tubos que contêm a bactéria E.coli e deitar fora o líquido (deixar só o pellet).
2. Ressuspender o pellet com 250 µl de solução de ressuspensão (Ressuspension solution) e 2,5 µl de Rnase A. Transferir a suspensão para um eppendorf.
3. Adicionar 250 µl de solução de Lise (Lysis solution) e misturar bem invertendo o tubo 4-6 vezes.
4. Adicionar 350 µl de solução de neutralização (Neutralization solution) e misturar bem.
5. Centrifugar durante 5 minutos.
6. Transferir o sobrenadante para o Spin Column GeneJet.
7. Centrifugar durante 1 minuto. Descartar o que passou para o tubo e colocar a coluna no mesmo tubo.
8. Adicionar 500 µl de solução de lavagem (Wash solution). Centrifugar durante 60 segundos e descartar o líquido que passou para o tubo. Colocar a coluna no mesmo tubo.
9. Repetir o passo anterior.
10. Descartar o líquido e colocar a coluna num eppendorf limpo. Centrifugar durante 1 minuto para remover os resíduos da solução de lavagem.

11. Transferir a coluna para um eppendorf limpo e adicionar 30 µl de água destilada estéril no centro da coluna para eluir o DNA plasmidico. Incubar durante 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugar durante 2 minutos.
12. Descartar a coluna .