



# ENEPEX

ENCONTRO DE ENSINO,  
PESQUISA E EXTENSÃO

8° ENEPE UFGD • 5° EPEX UEMS

## SEQUENCIAMENTO DE DNA PLASTIDIAL E ESTUDOS DE FILOGENIA EM POPULAÇÕES NATIVAS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi.

Adrielle Ayumi de Vasconcelos<sup>1</sup>; Bruno do Amaral Crispim<sup>2</sup>; Jannaína Velásquez da Costa Pinto<sup>3</sup>; Alexéia Baruffati Grisolia<sup>4</sup>; Néstor Antonio Heredia Zárate<sup>5</sup>; Maria do Carmo Vieira<sup>5</sup>

UFGD/FCBA – Caixa Postal 533, 79.804-970 – Dourados – MS, E-mail: adriayumi@gmail.com

<sup>1</sup>Acadêmica do curso de Biotecnologia da UFGD, bolsista de iniciação científica PIBIC-UFGD; <sup>2</sup>Doutorando da Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológicas da UFGD; <sup>3</sup>Doutoranda da Faculdade de Ciências Agrárias da UFGD; <sup>4</sup>Professora Doutora da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da UFGD. <sup>5</sup>Professores Doutores da Faculdade de Ciências Agrárias da UFGD, Bolsistas PQ CNPq;

### RESUMO

*Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) é uma planta nativa do Brasil, de alta plasticidade ecológica e amplamente utilizada na medicina popular. O objetivo deste trabalho foi o sequenciamento de regiões intergênicas de DNA plastidial de cinco populações nativas de *Schinus terebinthifolius* para investigar variação intra- e inter-específica e análise filogenética. Amostras de folhas foram coletadas de acessos de populações localizadas em Itaparica (BA), Morro de São Paulo (BA), São Mateus (ES), Santa Maria (RS) e Dourados (MS). O DNA foi extraído usando o método CTAB com modificações e as reações de PCR e sequenciamento das regiões intergênicas trnH-psbA, trnS-trnG, rpl20-5'-rps12 foram realizadas. A região intergênica trnS-trnG apresentou-se como a mais informativa, por encontrar maior número de haplótipos, polimorfismos intersubspecíficos e intravarietais. As regiões trnH-psbA e rpl20-rps12 revelaram apenas um polimorfismo intersubspecífico nos acessos de Dourados, e portanto não foram as mais indicadas para este estudo com a espécie em questão. Os acessos de Dourados se revelaram mais diferentes geneticamente quando comparados aos outros, podendo indicar que esta população esteja sofrendo influências do ambiente ou que tenha uma origem diferente. Desse modo, os marcadores plastidiais utilizados podem ser aplicados na caracterização e identificação de populações de pimenta-rosa. No entanto, estudos adicionais com outras análises, maior número amostral e outros marcadores moleculares seriam necessários para confirmar as diferenças e origem das populações.

**Palavras-chave:** pimenta-rosa, regiões intergênicas, polimorfismos

### INTRODUÇÃO

*Schinus terebinthifolius* Raddi, comumente conhecida como pimenta-rosa, aroeirinha, e aroeira da praia, é uma espécie nativa do Brasil de alta plasticidade ecológica e que se distribui por várias formações vegetais pelo país (LORENZI, 2008). Por seu amplo emprego pela medicina tradicional no Brasil, diversas pesquisas vêm sendo realizadas para evidenciar suas propriedades

medicinais (BENDAOU, 2010; CARLINI *et al.*, 2010) e demonstram seu grande potencial para o desenvolvimento de novos produtos fitoterápicos.

No entanto, prospecções realizadas com o óleo essencial de folhas e frutos da espécie, em diferentes regiões do planeta, têm apresentado variação na composição química e teores individuais dos compostos majoritários das amostras (SANTOS *et al.*, 2007; GUNDIDZA *et al.*, 2008). Essas variações químicas do óleo essencial têm levado à separação de quimiotipos que apresentam diferenças farmacológicas, situação preocupante considerando-se que para a transformação de uma planta em medicamento, deve-se obedecer prioritariamente à preservação da integridade química e farmacológica do vegetal para garantir a constância de sua ação biológica e sua segurança de utilização (CALIXTO, 2000).

Nesse sentido, o uso de marcadores moleculares no gerenciamento de germoplasmas, visando caracterizar a diversidade genética e os relacionamentos filogenéticos entre acessos, pode facilitar a introgressão da variabilidade presente em populações nativas, permitindo a análise dos indivíduos com base no seu DNA (PEREIRA *et al.*, 2009).

Considerando a eminente necessidade de seleção e melhoramento para atender a expansão da cadeia produtiva e promissor mercado desta espécie medicinal, associados às exigências da legislação vigente para evitar variações e assegurar a qualidade de fitoterápicos no Brasil, o objetivo deste trabalho foi aplicar técnicas moleculares de pré-melhoramento através do sequenciamento e estudo de filogenia de regiões não codificadoras plastidiais de populações nativas de *Schinus terebinthifolius* Raddi.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas folhas jovens de acessos de *Schinus terebinthifolius* de populações localizadas em Itaparica (BA), Morro de São Paulo (BA), São Mateus (ES), Santa Maria (RS) e Dourados (MS). Para cada marcador molecular, foram utilizados inicialmente 5 acessos de cada população nativa.

Para a extração de DNA total das folhas foi utilizado o método CTAB descrito por Doyle e Doyle (1987), com modificações. Para a avaliação da qualidade do DNA extraído, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio. Além disso, os dados referentes à concentração (ng/μL) e pureza dos ácidos nucléicos (razão de 260/280 nm) foram obtidos por espectrofotometria no equipamento NanoPhotometer® (Implen 300).

Os marcadores moleculares de DNA plastidial utilizados neste trabalho foram as regiões intergênicas trnH-psbA, trnS-trnG e rpl20-5'-rps12, cujos pares de *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) foram desenhados a partir das sequências iniciadoras publicadas por Hamilton (1990). As reações de PCR foram realizadas em termociclador BIORAD modelo *MyCycler™ thermal cycler*, sendo que para as regiões intergênicas trnH-psbA e trnS-trnG realizou-se desnaturação

inicial de 95°C por 3 minutos, seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento (56 °C e 52 °C, respectivamente) por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, com extensão final a 72°C por 10 minutos. Já a reação de PCR da região intergênica rpl20-5'rps12 constituiu de desnaturação inicial de 96°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 96°C por 45 segundos, anelamento a 50°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 30 segundos, com extensão final a 72°C por 10 minutos. Para visualização dos fragmentos amplificados, os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

Em seguida, os fragmentos amplificados foram purificados seguindo protocolo fenol-clorofórmio. O sequenciamento foi realizado utilizando a metodologia de Sanger (SANGER et al., 1977) em sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems®) usando os *primers* originais.

As sequências foram avaliadas quanto a qualidade dos eletroferogramas e editadas usando o software BioEdit. As sequências consenso foram obtidas usando o software CAP3. Foi realizado o alinhamento local (Blastn) das sequências utilizando o banco de dados NCBI para identificar sequências similares. O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado utilizando o ClustalW, e utilizou-se o MEGA 6.0 software para calcular a distância genética e construir o dendograma pelo método *neighbor-joining* com o modelo de substituição *p-distance*. As sequências obtidas foram caracterizadas em termos do número de haplótipos e diversidade de haplótipos e diversidade de nucleotídeos, dentro e entre populações.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foram utilizados 5 acessos de cada local de coleta para cada marcador, no entanto nem todos puderam ser amplificados com sucesso. Os números de acessos de cada local de coleta que amplificaram para cada marcador estão demonstrados na Tabela 1.

**Tabela 1** – Número de acessos por local de coleta que amplificaram para cada marcador de DNA plastidial.

Local de Coleta	Nº de acessos/marcador molecular		
	trnH-psbA	trnS-trnG	rpl20-5'rps12
Dourados (MS)	3	3	3
Itaparica (BA)	4	4	5
Morro de São Paulo (BA)	4	3	4
Santa Maria (RS)	4	4	4
São Mateus (ES)	5	5	5
<b>TOTAL</b>	20	19	21

O sequenciamento dos fragmentos amplificados da região intergênica trnH – psbA resultou em sequências de 473 pares de bases. Todas as sequências apresentaram-se idênticas, exceto as

sequências dos acessos de Dourados que revelaram como única diferença um polimorfismo inter-subespecífico [SNP tipo A (G)] na posição 341. Quando submetidas ao alinhamento local no Blastn, todas sequências retornaram maior similaridade (99%) com a sequência de *Schinus terebinthifolius* contendo a região trnH - psbA depositada no GenBank (GU135324.2). Em comparação a essa sequência, foi encontrado um polimorfismo do tipo A (G) na posição 460 em todas as sequências, sendo que as sequências de Dourados também apresentaram o polimorfismo da posição 341.

Os fragmentos sequenciados da região intergênica rpl20 - rps12 resultaram em 785 pb. Todas as sequências também foram idênticas entre elas com exceção das sequências dos acessos de Dourados (MS), que apresentaram um polimorfismo inter-subespecífico [SNP tipo A (C)] na posição 235 . Quando submetidas ao alinhamento local no Blastn, todas sequências retornaram maior similaridade (97%) com sequências de *Mangifera indica* para esse marcador (FJ937751.1 e FJ937752.1), não havendo sequências depositadas de *S. terebinthifolius* para essa região. A *M. indica* também pertence a família Anacardiaceae e isso justificaria a maior similaridade. No trabalho de Khan & Azim (2011) com as sequências de *Mangifera indica*, a região rpl20-rps12 pôde fornecer informações consideráveis quanta a variação genética em variedades de manga. No entanto, neste estudo este marcador não apresentou muitas informações quanto a polimorfismos inter-subespecíficos e não revelou variações intravarietais, assim como o marcador trnH-psbA.

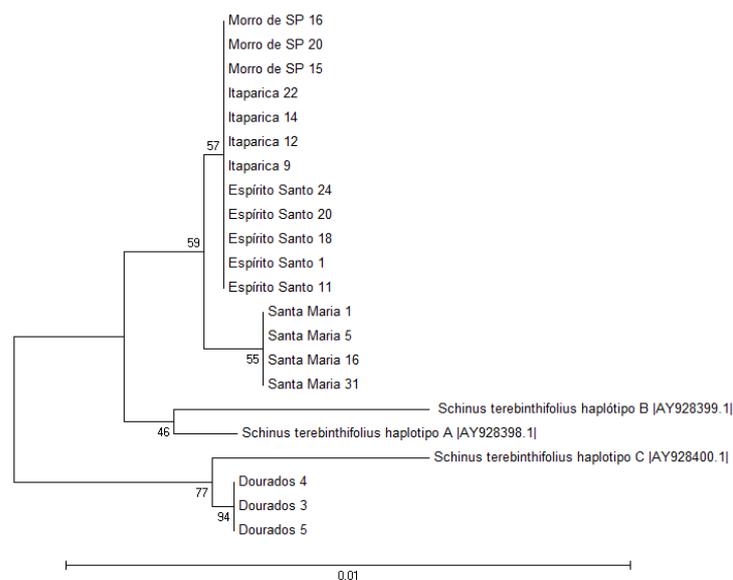
O sequenciamento da região intergênica trnS – trnG resultou em sequências de 736 pb para os acessos de Santa Maria, e 739 pb para os demais acessos. As sequências foram submetidas ao alinhamento local utilizando a ferramenta Blastn e retornaram maior similaridade aos haplótipos A (AY928398.1), B (AY928399.1) e C (AY928400.1) de *Schinus terebinthifolius* depositados no GenBank por Williams et al. (2005), sendo o haplótipo B o mais encontrado. As sequências dos acessos de Dourados apresentaram maior similaridade (99%) com o haplótipo C; os de Santa Maria apresentaram maior similaridade (99%) com o haplótipo A e os demais acessos (Itaparica, Morro de São Paulo e Espírito Santo) com o haplótipo B (99% de similaridade).

Quando comparadas com as sequências depositadas por Williams et al. (2005), todas as sequências apresentaram duas inserções/deleções de citocinas nas mesmas posições (entre 253 e 255) e também apresentaram um polimorfismo na posição 293 do tipo A (G). Além dessas três variações nucleotídicas, as sequências dos acessos de Itaparica, São Mateus e Morro de São Paulo, que tiveram maior similaridade com o haplótipo B, quando comparadas com este apresentaram também um polimorfismo do tipo T (G) na posição 30 e outro do mesmo tipo na posição 243.

Realizando a comparação entre as sequências da região trnS-trnG dos acessos deste experimento, puderam ser encontradas variações entre as populações e dentro de algumas populações. Quando comparados com as demais populações, os acessos de Santa Maria

apresentaram 3 deleções de adeninas entre a posição 233 e 234, e um polimorfismo do tipo T (C) na posição 459. Já os acessos de Dourados apresentaram polimorfismos do tipo A (C) na posição 259, T (A) na posição 369, C (A) na posição 567, G (T) na posição 597 e T(C) na posição 691. Quanto as variações intravarietais, dois acessos de São Mateus apresentaram uma deleção de adenina na posição 236 das sequências dos outros 3 acessos dessa população; e um acesso de Itaparica apresentou uma inserção de adenina na posição 237.

Para análise filogenética, foram utilizadas as sequências da região intergênica trnS-trnG, sendo incluídas na análise as sequências referentes ao haplótipos A, B e C depositadas no GenBank por Williams et al. (2005). A distância genética entre as sequências realizada no programa MEGA foi de 0.004. Inicialmente, a árvore filogenética formou dois cladogramas distintos (Figura 1). Um clado agrupando os acessos de Dourados juntamente com o haplótipo C, confirmando a similaridade encontrada no alinhamento local; e outro clado agrupando as demais sequências. Este último subdividiu-se em dois cladogramas, agrupando os acessos de Santa Maria com os demais acessos (Itaparica, Espírito Santo e Morro de São Paulo) e sequências referentes aos haplótipos A e B.



**Figura 1** – Árvore filogenética baseada na região intergênica trnS – trnG construída com as sequências obtidas dos acessos nativos e sequências do GenBank.

Os acessos que apresentaram similaridade com os haplótipos A (Santa Maria) e B (Itaparica, Espírito Santo e Morro de São Paulo) não puderam ser agrupados com seus respectivos haplótipos em cladogramas distintos provavelmente devido as variações nucleotídicas encontradas entre as sequências dos acessos deste experimento e as sequências do GenBank.

O fato dos acessos de Dourados apresentarem o maior número de variações nucleotídicas em suas sequências em relação às sequências dos demais acessos, nas três regiões intergênicas analisadas, pode indicar que esta tenha sofrido mutações genéticas influenciadas pelas condições ambientais do cerrado e possa constituir uma cultivar diferente, ou que tenha tido origem diferente.

Isso pode estar influenciando na variação na composição química e teores individuais dos compostos majoritários dos óleos essenciais e outras características das plantas.

## CONCLUSÃO

Foi possível investigar variação genética entre acessos de diferentes populações nativas de *Schinus terebinthifolius*, no entanto as regiões trnH-psbA e rpl20-rps12 revelaram pouquíssima variação, e portanto não foram as mais indicadas para este estudo com a espécie em questão. Já a região intergênica trnS-trnG apresentou-se como a mais informativa e útil para análises. Desse modo, os marcadores plastidiais utilizados podem ser aplicados na caracterização e identificação de populações de pimenta-rosa. No entanto, ressalta-se a necessidade de estudos adicionais com outras análises, maior número amostral, e outros marcadores moleculares para confirmar as diferenças e origem das populações.

## REFERÊNCIAS

- BENDAOU, H.; ROMDHANE, M.; SOUCHARD, J.P.; CAZAUX, S.; BOUAJILA, J. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. **Journal of Food and Science**. v.75, p. 466-72, 2010.
- CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, market and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, n.2, p.179-189, 2000.
- CARLINI, E.A.; DUARTE-ALMEIDA, J.M.; RODRIGUES, E.; TABACH, R. Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão). **Revista Brasileira De Farmacognosia**, v.20, n.2, p. 140-146, 2010.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, n.1, p.11-15, 1987.
- GUNDIDZA, M.; GWERU, N.; MAGWA, M.L.; MMBENGWA, V.; SAMIE, A. The chemical composition and biological activities of essential oil from the fresh leaves of *Schinus terebinthifolius* from Zimbabwe. **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.24, p.7164-7169, 2009.
- HAMILTON, M.B. Four primers for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. **Molecular Ecology**, v.8, p.521-523, 1999.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 5.ed. v.1. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 384p.
- PEREIRA, M.G.; PEREIRA, T.N.S.; COSTA, F.R. Marcadores moleculares no pré-melhoramento. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T.(Ed). **Marcadores Moleculares**. Viçosa: UFV, 2. ed., 2009. p.103-127.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.
- SANTOS, A.C.A.; ROSSATO, M.; AGOSTINI, F.; SANTOS, P.L.; SERAFINI, L.A.; MOYNA, P.; DELLACASSA, E. Avaliação química mensal de três exemplares de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.2, p.1011-1013, 2007.
- WILLIAMS, D. A.; OVERHOLT, W. A.; CUDA, J. P.; HUGHES, C. R. Chloroplast and microsatellite DNA diversities reveal the introduction history of Brazilian peppertree (*Schinus terebinthifolius*) in Florida. **Molecular Ecology**, v.14, n. 12, p. 3643-3656, 2005.