

Caracterização molecular (RAPD) de acessos de alecrim-de-tabuleiro (*Lippia gracilis* Schauer)

J. A. O. Pinto; A. F. Blank; E. M. O. Cruz; I. B. Goes; S. S. Fontes; S. A. da Silva; R. S. Mann; M. de F. A. Blank

Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, São Cristóvão-Se, Brasil

(Recebido em 29 de julho de 2011; aceito em 22 de setembro de 2011)

Lippia gracilis (alecrim de tabuleiro) apresenta propriedades medicinais como atividade antimicrobiana, no tratamento de infecções gastrointestinais, respiratórias, cutâneas, e destaca-se por apresentar altos teores de monoterpenos. Este trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar geneticamente, por meio de marcadores RAPD, acessos de *L. gracilis* do Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal de Sergipe. O material vegetal utilizado para a realização das análises foram sete acessos de *L. gracilis*. A extração de DNA foi feita por meio do protocolo CTAB. As reações de RAPD foram realizadas utilizando 14 primers (IDT). Com a utilização de marcadores moleculares foi possível quantificar a similaridade genética existente entre os acessos de *L. gracilis*, e assim inferir que os sete acessos estudados são geneticamente diferentes.

Palavras chave: *Lippia gracilis*, planta medicinal e aromática, marcador RAPD, similaridade genética.

Lippia gracilis (alecrim-de-tabuleiro) has medicinal properties as antimicrobial activity in the treatment of gastrointestinal infections, respiratory, skin, and stands out for having high levels of monoterpenes. This work was carried out in order to characterize genetically through RAPD, accessions of *L. gracilis* from the Active Germplasm Bank of the Federal University of Sergipe. The plant materials used for the analysis were seven accessions of *L. gracilis*. CTAB protocol was used for DNA extraction. The reactions were performed using 14 RAPD primers (IDT). Using molecular markers it was possible to quantify the genetic similarity between the accessions of *L. gracilis*, and thus infer that the seven accessions are genetically different.

Keywords: *Lippia gracilis*, medicinal and aromatic plant, RAPD marker, genetic similarity.

1. INTRODUÇÃO

O *Lippia gracilis* pertence à família Verbenaceae [1] e é conhecida popularmente como alecrim-de-tabuleiro [2]. É uma espécie endêmica da região Nordeste e distribui-se amplamente dentro da caatinga [3]. A espécie apresenta propriedades medicinais como atividade antimicrobiana, no tratamento de infecções gastrointestinais, respiratórias, cutâneas, e destaca-se por apresentar altos teores de monoterpenos [4]. Estes podem reduzir a ocorrência de insetos em produtos armazenados, afetando o crescimento, desenvolvimento e reprodução de alguns insetos herbívoros [5].

A variabilidade genética entre as espécies constitui a fonte primária dos estudos genéticos e sem ela não seria possível ocorrer processos naturais como adaptação e evolução das espécies; e o melhoramento genético. Portanto, o sucesso de qualquer programa de melhoramento depende, fundamentalmente, da variabilidade genética dos progenitores envolvidos. Esta variabilidade é gerada por recombinação, mutação e hibridação. Estudos sobre a identificação e caracterização da variabilidade genética em plantas medicinais concentram-se em aspectos fenotípicos, tais como os caracteres morfológicos; aspectos do DNA e seus fragmentos, genes mutantes, cromossomos e, finalmente, marcadores genéticos, como por exemplo: Isoenzimas, PCRs, RAPDs, RFLPs, AFLPs, SCARs e Microsatélites [6].

A técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) é uma técnica relativamente barata, frente à quantidade de informações genéticas obtidas em curto prazo, podendo ser aplicada a qualquer espécie, envolvendo amostragens não-destrutivas e gerando informações interpretáveis geneticamente, atendendo de forma rápida às demandas existentes em programas de conservação de espécies ameaçadas [7]. Esta já foi usada em análise genética de diversas

plantas medicinais, tais como *Lippia* sp. [8], *Lippia alba* [9], *Oreganum* sp. [10], permitindo uma boa discriminação dos materiais estudados.

Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar geneticamente, por meio de marcadores RAPD, acessos de *Lippia gracilis* Schauer.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal utilizado para a realização das análises de RAPD foram os acessos: LGRA-106, LGRA-107, LGRA-108, LGRA-109, LGRA-110, LGRA-201, LGRA-202 de *Lippia gracilis* Schauer coletados do Banco Ativo de Germoplasma da Fazenda Experimental “Campus Rural” (Universidade Federal de Sergipe - UFS, São Cristóvão-SE). Foram coletadas folhas tenras de cada acesso, acondicionadas em gaze, mantidas a baixas temperaturas e transportadas ao Laboratório de Cultura de Tecidos e Melhoramento Vegetal da UFS, onde foram mantidas em freezer (-20°C) até o momento da sua extração.

A extração de DNA [11] foi realizada utilizando 1g de folhas. Estas foram maceradas em almofariz contendo 10mL de tampão CTAB 2% [Cetil trimetil brometo de amônio; Cloreto de sódio (NaCl) 1,4mM; Tris 1mM pH 8,0; Polivinilpirrolidona (PVP) 1%] e 20µL de β-mercaptoetanol. Posteriormente, este material foi levado ao banho-maria por 60 minutos a 65°C. Após o período de incubação, as amostras passaram por um processo de purificação, onde 1.000µL de cada amostra foram colocadas em tubos tipo eppendorf contendo 1.000µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). As amostras foram homogeneizadas por meio de lentas inversões e centrifugada a 13.200 rpm por 30 minutos.

O sobrenadante obtido foi coletado e removido, com o auxílio de uma micropipeta, para um tubo contendo 750µL de álcool:acetato de amônio. As amostras foram mantidas em freezer por 24 horas para a precipitação do DNA. Após, estas foram centrifugadas a 13.200 rpm por 10 minutos e ao precipitado foram adicionados 200µL de etanol, deixando-se mais 10 minutos em temperatura ambiente e uma nova centrifugação foi realizada. Em seguida, o álcool foi descartado e o precipitado colocado para secar. Depois, o DNA foi solubilizado em 50µL de TE (Tris HCL 10mM, pH 8,0; EDTA 1mM).

A avaliação da qualidade do DNA foi realizada em gel de agarose a 1% em TBE 0,5X (Tris – Borato – EDTA). O gel foi submetido à eletroforese por 60 minutos e em seguida corado em Brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizado sob luz ultra-violeta.

As reações de RAPD foram realizadas utilizando 14 primers (oligonucleotídeos) da marca IDT (Integrated DNA Technologies). Estas foram conduzidas em termociclador Uniscience Biometra Tpersonal, em um volume de 13µL (2,92µL de água ultra-pura; 1,30µL de tampão PCR 10X; 1µL de cloreto de magnésio 50mM; 1,04µL de dNTP 2,5mM; 1,04µL de BSA - Soro Albumina Bovina; 0,2µL da enzima Taq DNA polimerase; 2,5µL do oligonucleotídeo iniciador e 3µL do DNA genômico) e submetidas a 45 ciclos de amplificação após a desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos. Cada ciclo foi constituído de três temperaturas: 15 segundos para desnaturação a 94°C, 30 segundos para anelamento do oligonucleotídeo a 42°C, e 30 segundos para a extensão da fita de DNA a 72°C. Ao final dos 45 ciclos foi realizada uma extensão final de 2 minutos a 72°C.

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em cuba horizontal, utilizando-se gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X, a 100V por 60 minutos. Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5µg/mL) por 10 a 15 minutos e os produtos da amplificação visualizados e fotografados sob luz ultravioleta.

Nas avaliações visuais dos géis, a presença (1) e a ausência de bandas (0) foram usadas para a construção de uma matriz binária. A partir desta foi calculada a porcentagem de polimorfismo obtido com cada oligonucleotídeo utilizado, por meio da fórmula:

$$P = nbp/nbt \times 100$$

onde:

P = porcentagem de polimorfismo (ou taxa de polimorfismo);

nbp = número de bandas polimórficas;

nbt = número de bandas total.

A estimativa de similaridade genética (Sg_{ij}), entre cada par de indivíduos de *Lippia gracilis* foi calculada por meio do coeficiente de Jaccard empregando o programa NTSYS pc 2.1 [12]. As similaridades obtidas foram calculadas empregando-se a seguinte expressão:

$$Sg_{ij} = a/a + b + c$$

Onde:

a = número de casos em que ocorre a presença da banda em ambos os indivíduos, simultaneamente;

b = número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo i ;

c = número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo j .

Os erros associados a cada distância ($1 - Sg_{ij}$) foram estimados segundo [13], pela seguinte expressão:

$$V = n.d(1-d)/n-1$$

Onde:

V = Variância da distância genética entre cada par de indivíduo;

n = número total de bandas utilizadas na estimativa da distância genética;

d = distância genética entre cada par de indivíduo. O erro padrão foi estimado pela expressão $(V/n)^{1/2}$.

A representação simplificada das similaridades foi realizada pela construção de dendrogramas pelo método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Arithmetic Average) [14], utilizando o programa NTSYS pc2.1 [12].

Os indivíduos geneticamente diferentes foram identificados a partir da estimativa do valor mínimo de similaridade, valor acima do qual os indivíduos são considerados geneticamente iguais (Sgm). O Sgm foi estimado por meio do teste t (0,1% de probabilidade), utilizando-se a seguinte expressão [15]:

$$Sgm = 1 - (t \cdot \bar{Ssg})$$

Onde:

t = valor tabelado de t com $n-2$ graus de liberdade,

\bar{Ssg} = erro médio das comparações consideradas no dendrograma.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização genética de *Lippia gracilis* Schauer foi realizada com a utilização de 13 oligonucleotídeos. No total foram gerados 69 produtos de amplificação, com uma média de 4,9 fragmentos por oligonucleotídeo. Destes, 48 fragmentos foram polimórficos, ou seja, 69,5% de polimorfismo (Tabela 1), resultado semelhante ao observado por [9] estudando a espécie *Lippia alba* (70,5%). Caracterizando 27 acessos desta mesma espécie [16] constataram valor de polimorfismo superior (86,8%) ao encontrado nestes trabalhos.

O número de fragmentos polimórficos variou de 0 a 6, sendo o oligonucleotídeo que apresentou maior número de fragmentos polimórficos o IDT 13 (6) e o que apresentou menor o IDT 9 (0).

Tabela 1: Relação do número de produtos amplificados para cada oligonucleotídeo (NTB), número de fragmentos polimórficos (NFP) e porcentagens de polimorfismo (%P), em análise de RAPD, em acessos de *Lippia gracilis* Schaeur.

Oligonucleotídeos	Sequência 5' -3'	<i>Lippia gracilis</i> Schauer		
		NTB	NBP	%P
IDT 1	CAG GCC CTT C	5	3	60,0
IDT 2	TGC CGA GCT G	6	2	33,3
IDT 3	GTT TCG CTC C	7	5	71,4
IDT 4	TGA TCC CTG G	3	3	100,0
IDT 5	TTC GAG CCA G	3	3	100,0
IDT 6	GTG AGG CGT C	6	3	50,0
IDT 7	ACC GCG AAG G	5	3	60,0
IDT 8	GGA CCC AAC C	4	4	100,0
IDT 9	CCC AAG GTC C	1	0	0,0
IDT 10	GGT GCG GGA A	4	3	75,0
IDT 12	GAG GAT CCC T	6	5	83,3
IDT 13	CTA CGG AGG A	6	6	100,0
IDT 14	GGC ACT GAG G	7	3	42,8
IDT 18	GGA GGA GAG G	6	5	83,3
Total	-	69	48	69,5

A similaridade média entre os acessos foi de 44,22%, o erro padrão médio foi de 6% e a amplitude das similaridades variou de 15,15 a 75,47%. Os acessos mais semelhantes foram: LGRA-109 e LGRA-201 ($75,47 \pm 0,06$); e os mais divergentes: LGRA-108 e LGRA-110 (Tabela 2).

Tabela 2: Matriz de similaridade genética (abaixo da diagonal) e erro padrão estimado (acima da diagonal) entre os 7 acessos de *Lippia gracilis* Schauer.

	LGRA – 106	LGRA – 107	LGRA – 108	LGRA – 109	LGRA – 110	LGRA – 201	LGRA – 202
LGRA – 106		0,07	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07
LGRA – 107	42,50		0,06	0,07	0,07	0,07	0,07
LGRA – 108	30,55	24,32		0,06	0,05	0,06	0,07
LGRA – 109	52,66	50,00	23,68		0,07	0,06	0,07
LGRA – 110	32,43	45,45	15,15	44,11		0,07	0,07
LGRA – 201	53,84	59,45	22,50	75,47	59,37		0,06
LGRA – 202	47,61	52,50	34,21	55,00	39,47	68,42	

A avaliação da linha de corte (0,89) realizada por meio do teste t de Student a 1% de probabilidade, denominado valor mínimo de similaridade (Figura 1), acima do qual os indivíduos são considerados geneticamente semelhantes [15], permite inferir que os indivíduos analisados são divergentes, confirmando os dados de similaridade genética.

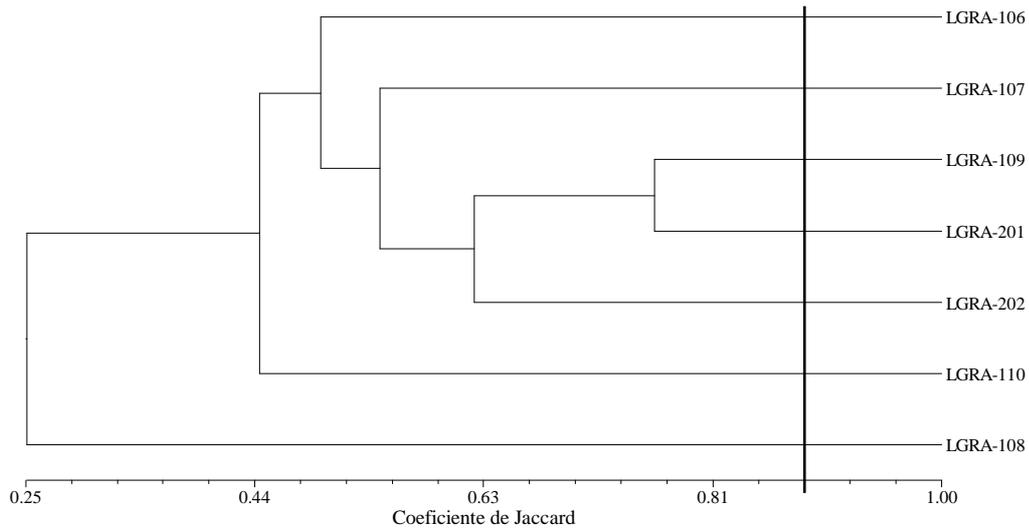


Figura 1: Dendrograma da similaridade genética entre 7 acessos de *Lippia gracilis* Schauer.

4. CONCLUSÃO

Com a utilização de marcadores moleculares RAPD foi possível quantificar a similaridade genética existente entre os acessos de *Lippia gracilis* Schauer, e assim inferir que os sete acessos estudados são geneticamente diferentes.

1. CALVACANTI, V.O. *Atividade antimicrobiana do óleo essencial de Lippia gracillis* Shauer, Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal de Pernambuco, 71 p. (2006).
2. LORENZI, H; MATOS, F.J.A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Farmacologia*. Nova Odessa, 615p. (2002).
3. MARCELINO-JR., C. A. C.; BARBOSA, R. M. N. ; CAMPOS, A. F.; SANTOS, A. P.; LACERDA, C. C.; SILVA, CARLOS, E. G. Utilizando uma cuscuzeira extração de óleo essencial do alecrim-da-chapada (*Lippia gracillis*), uma planta da caatinga. *Química Nova Na Escola*. 22, (2005).
4. ALBUQUERQUE, C. C.; CAMARA, T. R.; MARIANO, R. L. R.; WILLADINO, L.; JÚNIOR, C. M.; ULISSES, C. Antimicrobial Action of the Essential Oil of *Lippia gracilis* Schauer. *Brazilian Archives Of Biology And Technology*, 49(4): 527-535, (2006).
5. OLIVEIRA, J.E.Z.; AMARAL, C.L.F.; CASALI, V.W.D. *Recursos genéticos e perspectivas do melhoramento de plantas medicinais*. Disponível em: <http://www.cpsa.embrapa.br/catalogo/livrorg/medicinaismelhoramento.pdf>. Data de acesso: 11 de Janeiro, (2011).
6. RESTELLO, R.M., MENEGATT, C., MOSSI, A. J. Efeito do óleo essencial de *Tagetes patula* L. (Asteraceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 53(2): 304–307, (2009).
7. MELO L.Q.; CIAMPI, A.Y.; VIEIRA, R.F. Análise da variabilidade genética de arnica (*Lychnophora ericoides* Less. - Asteraceae) usando marcadores RAPDs. *Acta bot. bras.* 23(1): 259-266, (2009).
8. VICCINI, L.F., SOUZA DA COSTA, D. C., MACHADO M. A., CAMPOS, A. L. Genetic diversity among nine species of *Lippia* (Verbenaceae) based on RAPD Markers. *Plant Syst. Evol.* 246: 1–8, (2004).
9. PIERRE, PATRÍCIA M.O. et al . Karyotype analysis, DNA content and molecular screening in *Lippia alba* (Verbenaceae). *An. Acad. Bras. Ciênc.*, (2011).

10. MARIESCHI M., TORELLI A., POLI F., SACCHETTI G., BRUNI R. RAPD-Based Method for the Quality Control of Mediterranean Oregano and Its Contribution to Pharmacognostic Techniques. *J. Agric. Food Chem.* 57: 1835–1840, (2009).
11. NIENHUIS, J.; TIVANG, J.; SCKROCH, P.; SANTOS, J. B. Genetic relationships among cultivars and lines of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 120(2): 300-306, (1995).
12. ROHLF, F. J. *Numerical taxonomy and multivariate analysis system*. Version 2.1. Exeter Software, 38p, (2000).
13. SKROCH, P. W.; TIVANG, J.; NIENHUIS, J. Analysis of genetic relationship using RAPD marker data. In: Iufro International Conference: “*Breeding tropical trees*” Section 202-08, Proceedings... 26-30, (1992).
14. SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. *Numerical Taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. W. H. Freeman, (1973).
15. CASTANHEIRA, A. L. M. *Marcadores RAPD na avaliação do potencial de métodos de condução de população segregante de feijão*. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas), Universidade Federal de Lavras, 76p, (2001).
16. MANICA-CATTANI, M.F. et al. Genetic variation among South Brazilian accessions of *Lippia alba* Mill. (Verbenaceae) detected by ISSR and RAPD markers. *Braz. J. Biol.*, 69(2), (2009).