

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JULIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**  
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL NA**  
**CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Lippia***

**Cyro Bueno Neto**

Biólogo

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JULIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**  
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL NA**  
**CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Lippia***

**Cyro Bueno Neto**

**Orientadora: Profa. Dra. Sonia Marli Zingaretti**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

B928e Bueno Neto, Cyro  
EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL NA CARACTERIZAÇÃO  
DE ESPÉCIES DE *Lippia* / Cyro Bueno Neto. -- Jaboticabal, 2014  
IX 44 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014  
Orientador: Sonia Marli Zingaretti  
Banca examinadora: Bianca Waleria Bertoni, Janete Aparecida  
Desidério  
Bibliografia

1. cDNA-AFLP. 2. Differential Display - PCR. 3. *Lippia*. 4.  
Verbenaceae. 5. Óleos essenciais. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade  
de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:633.88

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e  
Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e  
Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL


### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** "EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL NA CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES  
DE *Lippia*"

**AUTOR:** CYRO BUENO NETO

**ORIENTADORA:** Profa. Dra. SONIA MARLI ZINGARETTI


Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM AGRONOMIA  
(GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. SONIA MARLI ZINGARETTI  
Universidade de Ribeirão Preto / Ribeirão Preto/SP



Profa. Dra. JANETE APARECIDA DESIDERIO  
Departamento de Biologia Aplicada - A Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e  
Veterinárias de Jaboticabal



Profa. Dra. BIANCA WALERIA BERTONI  
Universidade de Ribeirão Preto / Ribeirão Preto/SP

Data da realização: 24 de novembro de 2014.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**Cyro Bueno Neto** – Filho de Cyro Bueno Filho e Isabel Lopes Bueno, nascido no dia 23 de outubro de 1987, na cidade de São Paulo-SP. Biólogo, formado pelo Centro Universitário Barão de Mauá, tendo concluído o curso no mês de dezembro de 2009. Iniciou o curso de Mestrado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV/UNESP), em março de 2012, sendo bolsista do CAPES durante 18 meses.

Dedico esse trabalho aos meus pais  
Cyro Bueno Filho e Isabel  
Lopes Bueno, agradeço por todo  
apoio, incentivo e carinho que vocês  
me deram durante toda minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, irmãos e sobrinha por todo amor, apoio, suporte e incentivo que me deram durante todo esse projeto.

À Professora Dr<sup>a</sup>. **Sonia Marli Zingaretti**, pela paciência, auxílio, suporte e confiança depositados em mim; tornando possível a produção deste projeto.

À todos os amigos que me apoiaram acadêmica e emocionalmente durante esta etapa que me ajudaram a superar todos os desafios.

Aos professores Dr. **Vitor Fernandes Oliveira de Miranda** e Professora Dr<sup>a</sup>. **Janete Aparecida Desidério** pelas enriquecedoras contribuições no exame de qualificação.

À professora Dr<sup>a</sup>. **Bianca Waleria Bertoni** pelo auxílio prestado na produção e interpretação das análises desse estudo.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP Câmpus de Jaboticabal, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), pela oportunidade oferecida para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

À unidade de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto por permitir a utilização dos laboratórios e equipamentos para a execução do projeto.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço a todos vocês por acreditarem em mim mesmo quando eu não acreditava.

**MUITO OBRIGADO!**

## Conteúdo

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
1- Introdução.....	1
2 – Revisão Bibliográfica .....	3
2.1 – Gênero <i>Lippia</i> .....	3
2.2 - Estudos farmacológicos das espécies <i>Lippia</i> .....	4
2.3 – Compostos majoritários .....	7
2.4 – “Differential Display” - PCR .....	9
2.5- AFLP e cDNA-AFLP .....	10
2.6 – Expressão gênica .....	11
3 - Objetivos.....	16
3.1- Objetivos específicos.....	16
4 - Materiais e Métodos .....	16
4.1 – Extração do RNA total.....	18
4.2 – “Differential Display” – DD-PCR.....	19
4.3 – Gel de poliacrilamida.....	20
4.4 – Clonagem dos fragmentos.....	20
4.5 – Extração do DNA plasmidial (MiniPrep).....	21
4.6 – Sequenciamento dos fragmentos clonados.....	22
4.7 – cDNA-AFLP .....	22
4.8 – Dendrograma e análise de coordenadas principais .....	24
5 – Resultados e Discussão.....	25
5.1 – “Differential Display” – DD-PCR .....	25
5.2 – cDNA-AFLP .....	29
6 – Conclusões .....	34
7 – Referências.....	35



## EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL NA CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Lippia*

**RESUMO** - A utilização de plantas na produção de medicamentos deve estar amparada na correta escolha das plantas de onde serão coletados os metabólitos vegetais, isso é de vital importância, posto que a utilização incorreta de uma espécie pode provocar sérios danos à saúde do usuário. Em relação ao gênero *Lippia*, muitas espécies dentro do gênero, produzem metabólitos secundários de inegável importância farmacológica, no entanto apresentam muitas vezes características morfológicas muito similares o que tem concorrido para a identificação errônea da espécie. Nesse trabalho o objetivo foi utilizar técnicas moleculares (Differential Display – PCR e cDNA-AFLP) para auxiliar a identificação dessas espécies através de marcadores moleculares, também se buscou a identificação dos genes que participam nas vias de produção dos metabólitos secundários majoritários dessas espécies. Os resultados obtidos com o Differential Display não detectaram genes envolvidos com a síntese dos metabólitos, porém foram identificadas sequências de microssatélites e transposons que podem ser envolvidas na produção desses compostos. Com o cDNA-AFLP não foi possível separar as espécies em relação aos metabólitos secundários produzidos por ela, o que foi observado é uma grande influência do ambiente, bem como de fatores genéticos na produção desses compostos.

**Palavras chaves:** cDNA-AFLP, Differential Display – PCR, *Lippia*, Verbenaceae, Óleos essenciais

## DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION IN THE CHARACTERIZATION OF *Lippia's* SPECIES

**ABSTRACT** - The use of plants in the production of drugs must be supported in the correct choice of plants from which the plant metabolites will be collected, it is of vital importance, since the misuse of a species can cause serious damage to the user's health. Regarding the genus *Lippia*, many species within the genus, producing secondary metabolites of undeniable pharmacological importance, however they present very similar morphological characteristics which have contributed to the misidentification of species. In this study the objective was to use molecular techniques (Differential Display - PCR and cDNA-AFLP) to assist in identification of these species using molecular markers, also sought to identify genes involved in production routes of the major secondary metabolites of these species. The results obtained by the Differential Display did not detect genes involved in the synthesis of metabolites, however transposons and microsatellites sequences were identified that may be involved in the production of these compounds. The cDNA-AFLP could not separate the species in relation to secondary metabolites produced by the plants, what was observed is a great influence of the environment, as well as genetic factors in the production of these compounds.

**Keywords:** cDNA-AFLP, Differential Display – PCR , *Lippia*, Verbenaceae, Essential oils.

## 1- Introdução

A utilização de plantas no tratamento de doenças acompanha a humanidade ao longo dos séculos por meio de conhecimentos populares passados entre as gerações, porém seu uso diminuiu com o aparecimento dos medicamentos sintéticos e o crescimento da indústria farmacêutica. Na atualidade, no entanto, esta ocorrendo uma inversão, ou seja, uma maior busca por novos tratamentos a base de plantas, esse novo interesse se deve aos elevados custos para o desenvolvimento e produção dos medicamentos sintéticos e da demora na obtenção de novos produtos (FOGLIO et al., 2006). Esse novo aumento na procura por medicamentos originados das plantas levanta algumas questões sobre a segurança dos produtos utilizados, a necessidade de validação científica dos conhecimentos etnofarmacológicos, sobre a existência ou não de efeitos adversos do fitoterápico, sua interação com medicamentos alopáticos entre outras questões. Outro ponto importante a ser considerado em se tratando de fitoterápicos é a necessidade da correta identificação do material vegetal a ser utilizado na produção do medicamento, bem como a sua composição química, representada pelos metabolitos secundários produzidos, que são na realidade os responsáveis pelos efeitos atribuídos a planta.

A produção desses metabolitos secundários acontece em resposta a fatores genéticos e ambientais. Esses fatores, isolados ou em conjunto, alteram a produção dos compostos químicos, podendo ainda intensificar ou inibir a sua produção. Assim, uma grande variação na produção desses compostos, tem sido verificada. Uma mesma planta pode apresentar valores diferentes na concentração dos metabolitos secundários dependendo das condições onde ela se encontra como luminosidade, temperatura, umidade, época de coleta, etc. Assim, dentro de uma mesma espécie podem ser encontrados indivíduos que diferem na composição de seus metabolitos secundários em função das suas variações genéticas associadas aos efeitos ambientais a que estão submetidas.

Essa diferença apresentada na produção dos metabólitos secundários dificulta sua utilização na produção de fitoterápico, para a produção de fármacos a partir das plantas é preciso, além da identificação correta do vegetal, a certeza que aquele indivíduo produz o metabólito secundário exato para o tratamento de determinado tipo de enfermidade.

Técnicas de biologia molecular podem ser utilizadas para facilitar esse trabalho, utilizando essas ferramentas buscamos identificar os genes envolvidos na via de produção dos componentes dos óleos essenciais que possibilitasse o agrupamento filogenético dos indivíduos quanto a sua composição química, viabilizando assim seu uso na produção de fitoterápicos.

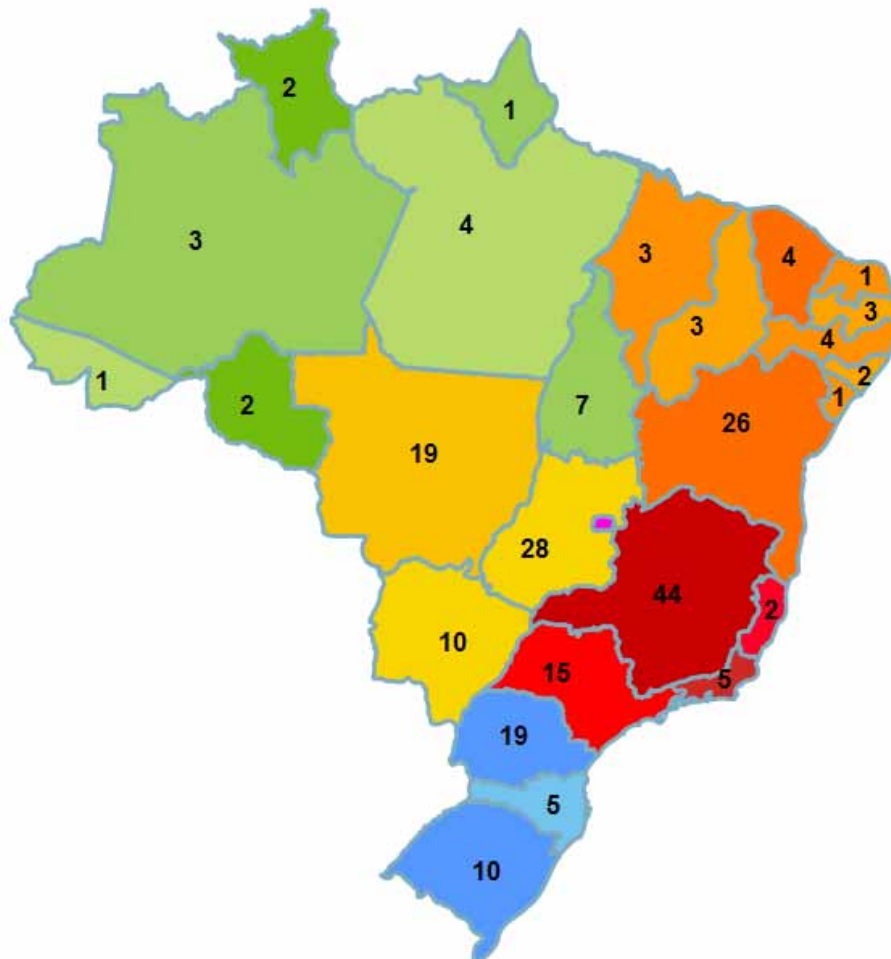
## 2 – Revisão Bibliográfica

### 2.1 – Gênero *Lippia*

A Família Verbenaceae possui 35 gêneros distribuídos pelas regiões tropicais dos continentes Asiático, Africano e Americano (JUDD et al., 2007), um dos gêneros com maior número de espécies dessa família é o *Lippia* L., que possui cerca de 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores geralmente aromáticos, com glândulas nas folhas, apresenta inflorescência em corimbos, racemos, espigas capítulos ou tirso, o cálice é membranáceo 2 labiado ou 2-4 dentado, corola hipocraterimorfa ou infundibuliforme, zigomorfa, limbo 2-labiado, lábio anterior 3-lobado, com estames didpinamos, inclusos. Ovário 2-locular, lóculos 1-seminado e fruto esquizocarpo (SALIMENA; SANTOS SILVA, 2009).

O gênero apresenta uma ampla distribuição geográfica abrangendo áreas deste o sul dos Estados Unidos chegando até a Argentina (TRONCOSO, 1974). Espécies do gênero também estão presentes em alguns países do continente africano (SALIMENA, 2000). O Brasil possui um dos maiores centros de diversidade do gênero, contendo aproximadamente 70-75% das espécies conhecidas (VICCINI et al., 2006) que se encontram distribuídas por todas as regiões do país, com uma forte presença na região do cerrado. Na Figura 01 está apresentada a distribuição das espécies nos estados brasileiros, bem como o número de espécies identificadas em cada estado (Flora do Brasil, 2014). Distribuídas nos estados da Bahia, Minas gerais, Goiás, são Paulo e Paraná encontram-se aproximadamente 59% das espécies identificadas no Brasil. Somente em Minas Gerais foram identificadas 44 espécies do gênero o que equivale a 19,64% das espécies. Atividades humanas como a exploração agrícola e a mineração nas regiões de endemismo põem em risco diversas espécies do gênero, sendo necessário haver um trabalho de conservação para proteger essas espécies (VICCINI et al., 2006).

**Figura 01** - Distribuição das espécies do gênero *Lippia* pelo território brasileiro.



**Fonte:** Flora do Brasil, 2014.

## 2.2 - Estudos farmacológicos das espécies *Lippia*

O uso de plantas medicinais pela população no tratamento de enfermidades é prática que remonta à antiguidade e tem sido transmitida através das gerações. Em relação às espécies de *Lippia* verifica-se que seu uso está frequentemente associado ao tratamento de alguns tipos de distúrbios. Segundo Rodrigues; Guedes, (2006) a espécie *Lippia alba* N. E. Brown tem sido utilizada, pelos habitantes do Povoado Sapucaia, Cruz das Almas – Bahia, no tratamento de pressão arterial, flatulência, dores em geral,

além de calmante e *L. lucioides* Steud no tratamento de dores de cabeça; enquanto *L. gracillis* H.B.K é utilizada pela comunidade quilombola da Barra II – Bahia no tratamento de pressão e gripe (BARBOSA da SILVA et al., 2012).

Várias pesquisas têm sido realizadas para confirmar o potencial fitoterápico dessas espécies. Esses trabalhos tem demonstrado que o óleo essencial dessas plantas apresenta uma grande variedade de compostos químicos, sendo os majoritários o timol, carvacrol e o endo-fenhol. Esses compostos têm sido associados a uma ampla variedade de ações fitoterápicas. Veras et al. (2013) demonstraram a atividade antimicrobiana do timol, um componente presente no óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham., contra espécies de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Providencia*. Gomide et al. (2013) comprovaram a ação antitumoral de óleos essenciais de duas espécies *L. sidoides* Cham. e *L. salvifolia* Cham. contra a linhagem de células tumorais de rato (CT26.WT) e a linhagem A549 de carcinoma pulmonar humano.

Carmona et al. (2013) comprovaram a eficiência do extrato hidroalcoólico de folhas *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown no tratamento de enxaqueca em mulheres, enquanto Farias et al. (2012), verificaram a eficiência antifúngica de extrato hidroalcoólico de *L. sidoides* contra diversas espécies de *Candida* isoladas de pacientes. Todos os estudos evidenciando o potencial de utilização da *Lippia* na produção de fitofármacos levou o Sistema Único de Saúde (SUS), em 2009, a incluir a espécie *L. sidoides* Cham. no RENISUS (Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde), essa lista contém o nome de 71 espécies da flora brasileira com potencial para utilização no tratamento de doenças pelo SUS (BRASIL, 2009).

Além destas o óleo essencial de plantas deste gênero também apresenta atividades comprovadas como acaricida e antioxidante. Oliveira Cruz et al. (2013) comprovaram a ação acaricida do óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer contra o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, enquanto Teles et al. (2014) demonstraram a ação antioxidante do óleo de *L. origanoides* H.B.K. sobre radicais livres. A ação larvicida do óleo de *L. sidoides* Cham contra larvas do *Aedes aegypti* foi demonstrada por Costa et al. (2005) e

Marino et al. (2012) demonstraram a eficácia do óleo de *L. alba* (Mill.) N.E. Brown no controle do nematóide *Meloidogyne incognita*.

No entanto, o uso destas plantas na geração de fitoterápicos tem encontrado barreiras na identificação precisa das espécies. A taxonomia do gênero *Lippia* é dificultada, pois os caracteres morfológicos utilizados para definir grupos taxonômicos são muitos semelhantes entre algumas espécies do gênero, dificultando sua correta identificação, e com isso o uso fitoterápico de muitas plantas desse gênero fica prejudicado. Um exemplo desta similaridade pode ser observado na Figura 02, onde é possível verificar a semelhança entre as espécies *Lippia organoides*, *L. velutina* e o híbrido *L. organoides* x *velutina*.

**Figura 02** - Similaridade morfológica entre as espécies *Lippia organoides*, *L. velutina* e o híbrido *L. organoides* x *velutina*.



*L. organoides*

*L. organoides* x *L. velutina*.

*L. velutina*

**Fonte:** arquivo pessoal.

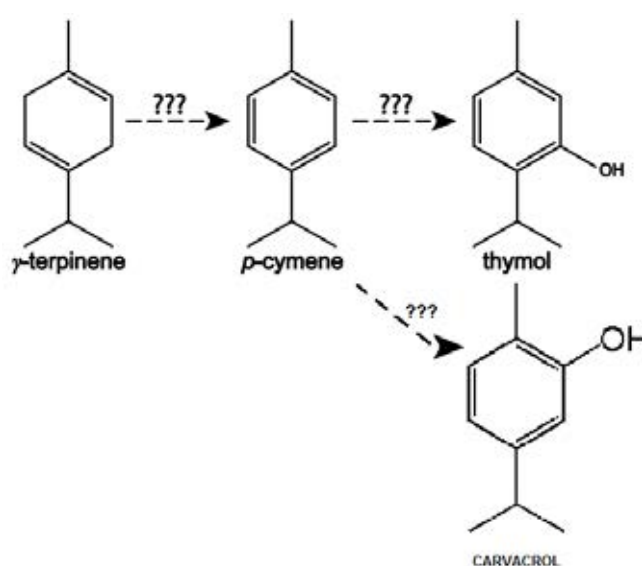


### 2.3 – Compostos majoritários

Em geral o óleo essencial das espécies do gênero contém, como constituintes majoritários, os monoterpenos timol e carvacrol (SOARES; TAVARES-DIAS, 2013), esses dois compostos são isômeros (WATTANASATCHA et al., 2012), diferenciando-se apenas pela posição de um grupo hidroxila ligado a estrutura principal. Vários estudos demonstraram o potencial fitoterápico desses compostos.

A primeira descrição da via de síntese do timol e do carvacrol foi sugerida por Poulouze; Croteau (1978), segundo os autores, ambos os compostos tem como precursor o  $\gamma$ -terpinene, que é aromatizado formando o *p*-cymene, que sofre uma hidroxilação e dependendo da posição da hidroxila, o composto resultante vai ser o carvacrol ou o timol (Figura 03). Crocoll (2011) descreveu a ação de 5 genes do citocromo P450, CYP71D178 até o CYP71D182, na síntese do timol e do carvacrol, no estudo foi demonstrado que o citocromo P450 produz ambos os compostos diretamente a partir do  $\gamma$ -terpinene, tendo o *p*-cymene como produto majoritário, porém, a via metabólica ainda não foi totalmente descrita, necessitando mais estudos para identificar a enzima que atua convertendo o *p*-cymene em timol e carvacrol.

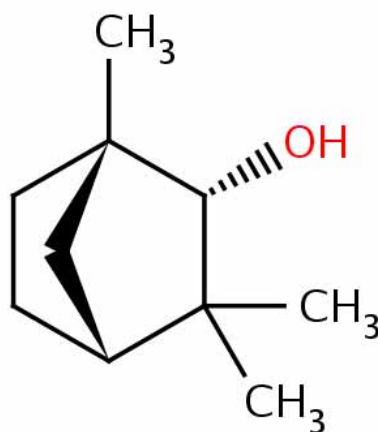
**Figura 03** - Via metabólica da produção de timol e carvacrol.



**Fonte:** Adaptado de Poulouze; Croteau (1978).

Endo-fenchol é um monoterpreno sintetizado pela enzima endo-fenchol cyclase a partir do geranyl pyrophosphate (CROTEAU et al., 1989), é um componente encontrado em várias espécies do gênero *Lippia* (SOARES; TAVARES-DIAS, 2013), na Figura 04 pode-se observar a estrutura do endo-fenchol.

**Figura 04** - Estrutura molecular do endo-fenchol.



**Fonte:** The European Bioinformatics Institute (2014).

Metabólitos secundários são componentes orgânicos produzidos pelas plantas, a produção desses metabólitos é controlada por uma rede complexa de proteínas conhecidas como fatores de transcrição, essas proteínas reconhecem regiões específicas nos promotores dos genes alvos, ao se ligar a essas regiões os fatores de transcrição podem ativar ou inibir a expressão de determinados metabólitos secundários (PATRA et al., 2013), isso pode ocorrer devido ao desenvolvimento da planta ou em resposta a diversos tipos de condições adversas ambientais, como, clima, umidade, metais pesados, temperatura, luz, entre outros, (BERNSTEIN et al., 2009; NASCIMENTO; FETT-NETO, 2010), e atuam protegendo a planta contra a ação dessas condições. Além dos fatores abióticos, a diversidade genética da espécie também atua na produção desses compostos, estando ambos os fatores atuando simultaneamente.

## 2.4 – “Differential Display” – PCR

Uma técnica bastante utilizada para o estudo da expressão gênica é o “Differential Display” – PCR (DD-PCR), nesse procedimento são detectados os genes que são expressos de maneira distinta em células diferentes de um mesmo organismo ou em organismos diferentes (BAUER et al., 1994), dessa forma é possível identificar quais genes estão sendo expressos em cada célula.

A técnica foi inicialmente descrita por Liang; Pardee (1992), e a metodologia utiliza dois tipos de “primers” diferentes, um dos “primers” é um oligo-dT âncora que contem uma sequência de 11 timinas mais uma base aleatória (A, C ou G), complementar a cauda poli-A dos RNAs mensageiros, o segundo “primer” contém uma sequência de 13 bases aleatórias, esses “primers” vão selecionar uma amostra de RNA mensageiro a partir das quase 15.000 sequências de mRNAs produzidos pelas células (ALVES et al., 1998).

O RNA extraído da célula é utilizado na reação de transcrição reversa, nesse procedimento o “primer” âncora é utilizado para a conversão do RNA em cDNAs, esse “primer” seleciona uma amostra do total de RNAs da planta, os cDNAs obtidos são então amplificados utilizando o mesmo “primer” âncora da reação de transcriptase reversa mais um “primer” de 13 bases aleatórias, as amostras obtidas com a amplificação são então separadas utilizando um gel de poliacrilamida desnaturante, com a formação das bandas no gel é possível detectar genes que são diferencialmente expressos em cada célula, as bandas de interesse são retiradas do gel para a recuperação e clonagem dos fragmentos, após a obtenção dos clones é feito o sequenciamento das amostras (ALVES et al., 1998; BAUER et al., 1994; LIANG; PARDEE, 1992). Com base nos dados obtidos no sequenciamento é possível identificar os genes expressos.

É uma técnica rápida, simples e sensível, que permite detectar o nível de expressão de genes ativados ou inativados das células (ZHANG et al., 1998), permitindo comparar células em diferentes tipos de condições. Uma desvantagem apresentada pelo (DD-PCR) é um elevado número de falsos positivos, prejudicando a análise dos dados. Para confirmar se o fragmentos

detectado está sendo diferencialmente expresso ou é apenas um falso positivo é preciso realizar teste para confirmar o resultado, para isso é utilizado o northern blotting (ZHANG et al., 1998) ou o PCR em tempo real (RAJEEVAN et al., 2001).

A técnica também vem sendo utilizada para identificar genes que estão sendo expressos em resposta a determinados tipos de estresse, como por exemplo, ataque de patógenos, estresse abiótico, entre outros. Hafez; Moustafa (2011) utilizaram o “differential display” para estudar plantas de *Solanum lycopersicum* resistentes e suscetíveis ao vírus do enfezamento do tomate, eles conseguiram identificar o gene codificador da enzima citocromo oxidase e genes da família ALY sendo expressos nas plantas infectadas e tendo uma participação no mecanismo de defesa do organismo. Acevedo et al. (2013) submetem indivíduos de *Ilex paraguariensis* St. Hil. a estresse hídrico e um dos fragmentos detectados nas plantas submetidas ao tratamento mostrou um alto índice de similaridade com o gene da enzima succinate dehydrogenase.

## **2.5- AFLP e cDNA-AFLP**

Outras técnicas moleculares têm sido cada vez mais utilizadas para auxiliar na identificação de espécies, dentre essas técnicas os marcadores moleculares se destacam, pois permitem identificar espécies, bem como estimar sua variabilidade genética. Um dos marcadores mais utilizados é o AFLP (“amplified fragment length polymorphism”), descrito inicialmente por Vos et al. (1995).

A técnica apresenta como vantagem a reprodutibilidade, alto nível de detecção de polimorfismo, marcadores distribuídos por todo genoma e não necessita conhecimento prévio do genoma a ser estudada (MUELLER & WOLFENBARGER, 1999). Devido a essas características essa técnica se tornou muito popular entre os pesquisadores. Wu et al., (2011) utilizaram o AFLP para estimar a diversidade genética em coleções de germoplasma de *Curcubita moschata* Duchesne ex Lam., Zhao et al., (2012) estudaram a

diversidade genética de populações selvagens de 5 espécies do gênero *Rhododendro*.

Uma variação dessa técnica é o cDNA-AFLP, que utiliza cDNA, produzido a partir do RNA mensageiro, e não DNA genômico como material genético a ser avaliado. Sua utilização permite avaliar a diversidade dos indivíduos quanto aos genes transcritos, uma vez que o material analisado é um cDNA, originado a partir dos genes transcritos de cada indivíduo. O polimorfismo detectado utilizando o cDNA-AFLP se deve a diferentes padrões de expressão nas células estudadas, os organismos ao sofrerem a ação de um determinado tipo de estresse, promovem alterações na sua expressão genética, ativando ou inativando genes, respondendo, assim, a essas condições adversas, fatores abióticos (SHINOZAKI et al., 2003) e fatores bióticos (KUSHALAPPAGUNNAIAH, 2013) promovem esse tipo de alteração.

Zhang et al. (2012) utilizaram essa metodologia para comparar a expressão diferencial de dois genótipos de *Gossypium hirsutum* L. resistentes e suscetíveis em resposta à infecção por *Verticillium dahliae*; da mesma forma Wang et al. (2011) identificaram genes expressos em híbridos de *Populus simonii* × *Populus nigra* em resposta a estresse de NaCl. Feng et al. (2010) utilizaram o cDNA-AFLP para comparar indivíduos de *Carthamus tinctorius* L. produtores e não produtores de Hydroxysafflor yellow A, no estudo eles conseguiram identificar 3 fragmentos, presentes apenas em indivíduos produtores, que estão relacionados com a produção desse metabolito.

## 2.6 – Expressão gênica

A expressão de genes em plantas está sujeita a influência de diferentes tipos de estímulos, ambientais (KUHLEMEIER et al., 1987) e genéticos (GEMAYELL et al., 2010; LISCH, 2013), esses estímulos promovem a ativação ou inativação de alguns genes específicos. Essas alterações na expressão são uma resposta das plantas aos estímulos que elas estão recebendo. O indivíduo busca assim responder da melhor forma a essas alterações, buscando

minimizar os efeitos morfológicos e fisiológicos consequência dos diferentes estímulos.

Fatores ambientais ou abióticos (luz, temperatura, umidade, solo, etc) e bióticos (ataque de parasitas, espécies invasoras, etc), atuam sobre os organismos induzindo alterações na expressão dos genes da planta. A planta ao perceber a ação desses fatores induz uma transdução de sinal, através de segundos mensageiros que leva essas informações ao núcleo da célula que ativa seus mecanismos de resposta promovendo alterações nas suas vias bioquímicas e metabólicas, para responder a essas mudanças, isso por sua vez acaba resultando na ativação ou inativação de determinados genes (TAIZ; ZEIGER, 2010).

Fatores genéticos também atuam no controle da expressão, os microsatélites, que são sequências de nucleotídeos repetidas em tandem, e os transposons, que são sequências capazes de se deslocar pelo genoma do organismo, agem de diversas formas na expressão gênica. Essas sequências são encontradas em abundância pelo genoma dos organismos eucariontes (MUÑOZ-LÓPES; GARCÍA-PÉREZ, 2010), ocupando uma grande parte do genoma, 12% em *Caenorhabditis elegans* (STEIN et al., 2003), 10% em espécies de peixe (MUÑOZ-LÓPES & GARCÍA-PÉREZ, 2010) e mais de 80% do genoma de algumas plantas, como o milho (SANMIGUEL et al., 1996).

Os transposons são divididos em duas classes, a primeira é composta pelos retrotransposons, é a classe mais comum encontrada nas plantas (LISCH, 2013), essa classe utiliza o mecanismo “copia e cola” no qual um RNA do transposon é convertido em cDNA pela reação de transcrição reversa e depois essa copia é integrada a uma nova posição no genoma. Alguns transposons, chamados de autônomos, apresentam os genes para produzir as enzimas necessárias para realizar esse processo, outros, chamados de não autônomos, não apresentam esses genes, dependendo dos autônomos para realizar esse processo. A segunda classe consiste de transposons que utilizam o mecanismo “corta e cola” no qual o transposon é clivado do DNA para em seguida ser reintegrado em um novo local, nesse caso também existem

transposons autônomos e não autônomos (REBOLO et al., 2012; LISCH, 2013).

Por apresentarem a capacidade de se deslocar pelo genoma os transposons podem gerar diversos tipos de mutações, deleção, inserção, inversão, duplicação (LÖNNING; SAEDLER, 1997), todos esses eventos podem provocar diversos efeitos deletérios nos organismos como, por exemplo, podem desregular genes (CALLINAN; BATZER, 2006), promover eventos recombinantes adversos (HEDGES; DEININGER, 2007), interferir na expressão gênica (MATZKE et al., 2000; LERMAN; FEDER, 2005), levando à diversidade genética das espécies.

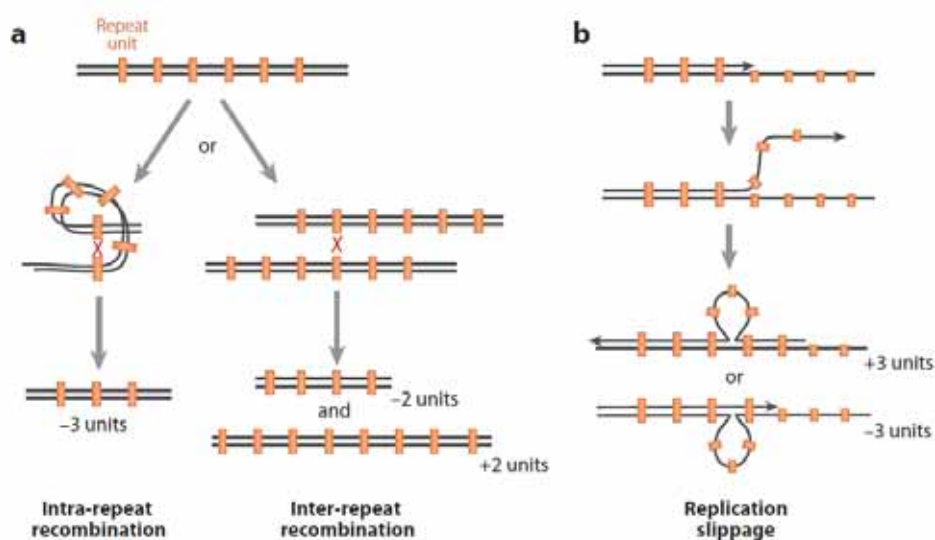
A atuação dos transposons na expressão gênica ocorre ao inibir ou estimular a expressão de um gene. Ao ser inserido em uma nova região do genoma o transposon pode interromper a sequência de um exon, provocando uma falha durante a transcrição, ele também pode inibir a expressão ao ser inserido dentro da região promotora. Em contrapartida também podem estimular a expressão gênica se inseridos dentro da região regulatória do gene, isso faz com que a expressão do gene aumente (REBOLO et al., 2012; LISCH, 2013).

Sequências repetidas em tandem são partes do DNA não codificantes onde uma sequência é repetida varias vezes em sequência, originadas a partir de duplicações locais (GEMAYEL et al., 2010), com até 9 pares de bases elas são conhecidas como minissatélites, de 10 até 99 pares são chamadas de microssatélites e acima de 100 pares de bases são conhecidas como macrossatélites (RICHARD et al., 2008).

As repetições em tandem (RT) são originadas a partir de dois eventos, “strand slippage replication” e recombinação. “Strand slippage replication” é um tipo de erro que pode acontecer durante a replicação onde ocorre um erro no pareamento entre a fita molde do DNA e a fita que está sendo sintetizada. Neste caso um loop é formado em uma das fitas, se o loop se formar na fita molde ocorre uma contração no tamanho da repetição, se o loop acontecer na fita que está sendo sintetizada ocorre uma expansão no tamanho da repetição

(PAQUES et al., 1998; VERSTREPEN et al., 2005). Eventos recombinantes, como “crossing-over” desigual ou conversão gênica podem causar contração ou expansão da repetição (PAQUES et al., 1998; VERSTREPEN et al., 2000). Na Figura 06 observa-se um esquema de como funcionam esse dois eventos.

**Figura 06** – Eventos de contração e expansão das repetições. (a) Recombinação: pareamento dentro do cromossomo pode causar contração da sequência, enquanto que “crossing-over” desigual pode expandir ou contrair a sequência. (b) “Strand slippage replication”: mau pareamento entre a fita molde e a fita nova leva a formação de um loop, na fita molde causa ocorre contração, se ocorrer na fita nova ocorre expansão.



**Fonte:** GEMAYEL et al., 2010.

A estabilidade das repetições em tandem é baixa, a taxa de mutação varia entre  $10^{-3}$  e  $10^{-6}$  por geração celular (VERSTREPEN et al., 2005). A instabilidade da fita, e conseqüentemente a frequência na taxa de mutação é devido ao tamanho da repetição e a sua pureza. Quanto maior e mais pura a fita, maior vai ser a frequência de mutação, ao contrario quanto menor a fita e mais impurezas elas apresentarem menor será sua taxa de mutação (RICHARD & PAQUES, 2000; GEMAYEL et al., 2012). O número de repetições também atua na estabilidade da repetição, sendo mais importante do que a pureza ou o tamanho da sequência (LEGENDRE et al., 2007).



As repetições em tandem são encontradas principalmente no DNA não codificante, onde não provocam efeitos para o organismo (GEMAYEL et al., 2012), porém eles também são encontrados em regiões importantes como regiões reguladoras, codificadoras e promotores, nesses casos, instabilidade nas repetições podem provocar alterações na expressão gênica (LEGENDRE et al., 2007), nessas regiões alterações de adição ou remoção de tri ou hexanucleotídeos são mais comuns, devido a seleção contra mutações “frameshift”, que ocorrem quando as repetições não contêm nucleotídeos múltiplos de 3 (METZGAR et al., 2002).

O grande número de repetições em tandem encontradas em regiões reguladoras sugere que essas sequências estão envolvidas no controle da expressão gênica (GEMAYEL et al., 2012), essas sequências atuam de diversas formas no controle da expressão.

Quando se encontram na região promotora do gene as repetições em tandem funcionam como sítios de ligação para os fatores de transcrição e para a enzima RNA polimerase, permitindo a expressão gênica. Quando ocorrem mutações nessas sequências o número de repetições muda, se ocorrer uma deleção vai diminuir o número de sítios de ligação, reduzindo a expressão, se por outro lado o número de sítios aumentarem ocorrerá um aumento da taxa de expressão (MARTIN et al., 2005). Isso também ocorre dentro das regiões codificadoras, onde a sequência correta das repetições codifica uma proteína funcional, enquanto que alterações geram uma proteína não funcional (GEMAYEL et al., 2012).

A fita de DNA fica enovelada em estruturas chamadas de nucleossomos, que por sua vez se ligam a octâmeros de histonas para formar a cromatina, essa estrutura atua no controle da expressão gênica, pois o complexo de histonas afeta a acessibilidade dos fatores de transcrição, regiões ricas em repetições em tandem inibem a formação do nucleossomo, estimulando a expressão dos genes (IYER; STRUHL, 1995).

As repetições em tandem também afetam a forma do DNA, a molécula de DNA normalmente é encontrada na forma B-DNA (conformação para a

direita), em raras ocasiões ele pode existir como Z-DNA (conformação para a esquerda), essa conformação bloqueia a ligação dos fatores de transcrição, estudos tem demonstrado que as sequências em tandem atuam para essa formação (NAYLOR; CLARCK, 1990).

### **3 - Objetivos**

Estudar espécies do gênero *Lippia* com base na expressão diferencial de seus genes.

#### **3.1- Objetivos específicos**

- Utilizar técnicas de expressão gênica para auxiliar a identificação das espécies.
- Agrupar os indivíduos por níveis de expressão.

### **4 - Materiais e Métodos**

Foram utilizadas inicialmente amostras de 30 indivíduos do gênero *Lippia*, das *Lippia salvifolia*, híbridos *L. origanoides* x *L. velutina*, *Lippia velutina*, *L. sidoides* e *L. origanoides* coletados em Jardinópolis-SP (21°04´S - 47°44´W), *L. origanoides* e híbridos *L. origanoides* x *L. velutina* coletadas na Universidade de Ribeirão Preto-SP (21°10´S - 47°48´W). A produção de exsiccatas foi realizada para cada indivíduo, as plantas foram identificadas pela Dra. Fátima Salimena da Universidade de Juiz de Fora (MG) e depositadas no herbário da Universidade de Ribeirão Preto-SP (UNAERP).

As plantas coletadas fazem parte de uma coleção de plantas medicinais coletadas em diferentes regiões do país. O número de identificação das plantas, o voucher juntamente com a procedência e localização geográfica de cada indivíduo estão descritos na Tabela 01.

Tabela 01 - Identificação e procedência das plantas utilizadas.

<b>Código</b>	<b>Classificação Taxonômica</b>	<b>Procedência</b>	<b>Coordenadas Geográficas</b>	<b>Voucher</b>
31	<i>L. organoides</i>	Bahia	11°42'31,9" – 39°31'10,5" 222m	2014
49	<i>L. organoides</i>	Bahia	11°42'31,9" – 39°31'10,5" 222m	2023
51	<i>L. organoides</i>	Bahia	11°42'31,9" – 39°31'10,5" 222m	2024
62	<i>L. velutina</i>	Bahia	11°42'31,9" – 39°31'10,5" 222m	2095
70	<i>L. organoides</i>	Bahia	10°33'38,1" – 40°16'37,7" 489m	2032
75	<i>L. organoides</i>	Bahia	10°33'38,1" – 40°16'37,7" 489m	2035
81	<i>L. orig. x velut.</i>	Bahia	10°33'38,1" – 40°16'37,7" 489m	2083
98	<i>L. organoides</i>	Bahia	10°33'38,1" – 40°16'37,7" 489m	2049
107	<i>L. velutina</i>	Bahia	10°33'38,1" – 40°16'37,7" 489m	2093
110	<i>L. organoides</i>	Bahia	10°33'38,1" – 40°16'37,7" 489m	2055
114	<i>L. organoides</i>	Bahia	10°33'38,1" – 40°16'37,7" 489m	2058
117	<i>L. organoides</i>	Bahia	10°33'38,1" – 40°16'37,7" 489m	2061
119	<i>L. organoides</i>	Bahia	10°33'38,1" – 40°16'37,7" 489m	2063
123	<i>L. organoides</i>	Bahia	10°33'38,1" – 40°16'37,7" 489m	2067
131	<i>L. organoides</i>	Bahia	11°11'25,5" – 39°25'39,5" 344m	2075
133	<i>L. organoides</i>	Bahia	11°11'25,5" – 39°25'39,5" 344m	2076
134	<i>L. sidoides</i>	São Paulo	21°11'55,5" – 47°44'08,8" 566m	2091
135	<i>L. sidoides</i>	São Paulo	21°11'55,5" – 47°44'08,8" 566m	2092
136	<i>L. salvifolia</i>	Minas Gerais	19°36'49,9" – 42°08'20,8" 929m	2110
RJ2	<i>L. orig. x velut.</i>	Bahia	11°42'31,9" – 39°31'10,5" 222m	1366
RJ4	<i>L. orig. x velut.</i>	Bahia	11°42'31,9" – 39°31'10,5" 222m	1368
RJ6	<i>L. orig. x velut.</i>	Bahia	11°42'31,9" – 39°31'10,5" 222m	1370
RJ7	<i>L. orig. x velut.</i>	Bahia	11°42'31,9" – 39°31'10,5" 222m	1371
RJ9	<i>L. orig. x velut.</i>	Bahia	11°42'31,9" – 39°31'10,5" 222m	1373
RJ10	<i>L. orig. x velut.</i>	Bahia	11°42'31,9" – 39°31'10,5" 222m	1374
RJ11	<i>L. orig. x velut.</i>	Bahia	11°42'31,9" – 39°31'10,5" 222m	1375
RJ15	<i>L. orig. x velut.</i>	Bahia	11°42'31,9" – 39°31'10,5" 222m	1379
SL13	<i>L. organoides</i>	Bahia	11°11'25,5" – 39°25'39,5" 344m	1362
SL14	<i>L. organoides</i>	Bahia	11°11'25,5" – 39°25'39,5" 344m	1363
MS1	<i>L. orig. x velut.</i>	Bahia	10°31'14,8" – 40°13'57,7" 594m	1364

#### 4.1 – Extração do RNA total

Amostras de folhas jovens de todas as 30 plantas foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenadas em freezer -80°C para posterior extração do RNA. O RNA total das plantas foi extraído a partir de 100 mg de folhas utilizando o “kit Sygma-Aldrich® Spectrum Plant Total RNA” (St. Louis, Missouri, USA). As folhas de cada indivíduo foram maceradas em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino, que foi colocado em microtubos de 1,5 mL contendo 500 µL de solução de lise acrescido de 5 µL de 2-mercaptoetanol. O material foi homogeneizado em vortex e incubado à 56°C por 5 minutos.

Após esse período as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 21130 x g, para retirada dos resíduos foliares. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo microtubo com uma coluna de filtração e submetido à nova centrifugação por 1 minuto a 21130 x g. Ao filtrado, aproximadamente 300 µL, foram adicionados 500 µL de solução de ligação, a mistura foi transferida para um novo microtubo contendo membrana de ligação e novamente centrifugado por 1 minuto a 21130 x g.

A coluna de ligação foi submetida ao procedimento de lavagem iniciada pela adição de 500 µL da solução de lavagem 1, seguida de centrifugação por 1 minuto a 21130 x g. O filtrado foi descartado e à coluna foram adicionados 500 µL da solução de lavagem 2, o conjunto foi centrifugado por 30 segundos a 21130 x g, o filtrado descartado e o processo foi repetido mais uma vez.

A coluna então foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL, 30 µL de solução de eluição foram adicionados diretamente na coluna, que foi centrifugada por 1 minuto a 21.130 x g, o RNA eluído da coluna foi armazenado em freezer -80°C.

Após a extração as amostras de RNA foram visualizadas em gel de agarose (1%) desnaturante para verificar a integridade do material e quantificadas em espectrofotômetro P360® (Implen).

## 4.2 – “Differential Display” – DD-PCR

A síntese da primeira fita do cDNA foi realizada utilizando-se RNA total e o kit “RevertAid First Strand cDNA Synthesis” (Thermo Scientific®) (Waltham, Massachusetts, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Na reação de síntese foram utilizados, 5 µg de RNA total, 1 µL do “primer” oligo(dT) âncora (10 µM), 4 µL do tampão de reação 5x, 1 µL do inibidor de RNase (20 U/µL), 2 µL mix dNTP (10 mM), 1 µL transcriptase reversa RevertAid M-MuLV (200 U/µL) e água deionizada para um volume final de 20 µL. A reação se processou por 60 minutos a 42°C, e foi encerrada aquecendo o tubo a 70°C por 5 minutos. Para cada amostra a reação foi realizada três vezes, utilizando três “primers” diferentes, cada um contendo o oligo(dT) acrescido de uma base diferente (A, C, ou G). A primeira fita do cDNA foi mantida em freezer -20°C para posterior amplificação com “primers” aleatórios 13 pares de bases descritos anteriormente (LIANG et al., 1994), a sequência dos “primers” está descrita na Tabela 02. Cada amostra de cDNA dos indivíduos foi amplificada utilizando os três “primers” aleatórios totalizando 9 reações de amplificação por indivíduo analisado. Na Tabela 02 estão apresentadas as sequências dos “primers” utilizados.

Tabela 02 - Sequência dos “primers” aleatórios utilizados no “differential display”.

<b>“Primer”</b>	<b>Sequência</b>
Aleatório 1 (AL1)	5'-AAGCTTGATTGCC-3'
Aleatório 2 (AL2)	5'-AAGCTTCGACTGT-3'
Aleatório 3 (AL3)	5'-AAAGCTTTGGTCA-3'
Âncora 1 (ANC 1)	5'-TTTTTTTTTTTA-3'
Âncora 2 (ANC 2)	5'-TTTTTTTTTTTC-3'
Âncora 3 (ANC 3)	5'-TTTTTTTTTTTG-3'

Nas reações de amplificação para produção da segunda fita do cDNA foi utilizada a enzima “KAPA2G Robust HotStart ReadyMix (2x)” (Kapa Biosystems®) (Wilmington, Massachussettes, USA) e 10 ng da primeira fita anteriormente produzida, seguindo as recomendações do fabricante. A reação ocorreu com uma desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 35

ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos e 72°C, terminando com uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

### 4.3 – Gel de poliacrilamida

A separação dos fragmentos amplificados foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, em tampão TBE 1X, 2500 V constantes por 4 horas, com posterior coloração por prata para visualização, seguindo o protocolo descrito por Creste et al; (2001).

### 4.4 – Clonagem dos fragmentos

Após a eletroforese os fragmentos de interesse foram retirados do gel com o auxílio de um bisturí, colocadas em 100 µL de tampão da *Taq* DNA polimerase (Promega®) (Madison, Wisconsin, USA) e aquecidos a 95°C por 10 minutos para eluição do fragmento de DNA amplificado. Uma alíquota do fragmento eluído foi utilizada em uma nova amplificação por PCR utilizando a combinação de “primers” utilizada para a geração do fragmento, após essa amplificação o material foi visualizado em gel de agarose para confirmar a presença dos fragmentos.

O fragmento isolado foi inserido no vetor “pGEM®-T Easy Vector Systems” (Promega®) (Madison, Wisconsin, USA), seguindo recomendações do fabricante. Para a clonagem dos fragmentos foram utilizadas células competentes da linhagem DH10B

Para a reação de ligação do fragmento com o vetor de clonagem foi utilizado 5 µL do tampão da enzima T4 DNA ligase (2x), 1 µL do “pGEM®-T Easy Vector” (50 ng), 2 µL de cDNA (50 ng), 1 µL da enzima T4 DNA Ligase e 1 µL de água deionizada. A reação foi incubada durante a noite a 4°C.

O vetor de clonagem com o fragmento foi inserido nas células competentes por eletroporação, os 10 µL da reação de ligação foram misturados em 50 µL de células competentes, o volume final foi transferido

para uma cubeta para a eletroporação com os seguintes parâmetros: 1,5 KV, 50  $\mu$ F e 200  $\Omega$ .

Após a eletroporação as células foram misturadas com 1 mL de meio SOC (1 mL de meio SOB e 40  $\mu$ L de glicose 20%) (meio SOB, 1 litro, 20 g de triptona, 5 g extrato de levedura e 0,58 g de cloreto de potássio, pH 7,5) e deixadas sob agitação por 1 hora a 150 rpm. Após o tempo de agitação 100  $\mu$ L de células transformadas foram plaqueadas em meio 2xTY solido contendo estreptomicina (30  $\mu$ g/mL), ampicilina (100  $\mu$ g/mL), 100  $\mu$ L de IPTG (100 mM) e 20  $\mu$ L de X-Gal (50 mg/mL), as placas foram incubadas a 37°C durante a noite.

Da placa transformada foi selecionada uma colônia branca que foi estriada em uma nova placa de petri contendo meio 2xTY solido contendo estreptomicina (30  $\mu$ g/mL), ampicilina (100  $\mu$ g/mL) e incubadas a 37°C por 12 horas, uma colônia isolada foi selecionada para a extração do DNA plasmidial.

#### 4.5 – Extração do DNA plasmidial (MiniPrep)

A extração do DNA plasmidial foi feita inoculando uma colônia transformada em 5mL de meio LB liquido, para 100mL 1g de triptona, 0,5g de extrato de levedura e 1g de NaCl, contendo estreptomicina (30 $\mu$ g/mL), ampicilina (100 $\mu$ g/mL), o meio foi incubado a 37°C por uma noite.

O meio líquido foi centrifugado em tubo tipo eppendorf (2 mL) a 18407 x g para a formação do pellet de bactérias, o sobrenadante foi removido e o pellet foi ressuscitado em 100  $\mu$ L de solução um [50 mM de glicose, 25 Mm de tris HCl (pH 8) e 10 mM de EDTA (pH 8)]. Após a completa ressuspensão das bactérias foram adicionados 200  $\mu$ L de solução 2, solução de lise, (0,2 N de NaOH e SDS 1%) a mistura, e o conteúdo foi novamente agitado vigorosamente sendo a seguir deixado em gelo por 5 minutos. A seguir adicionou-se 150  $\mu$ L de solução 3 (60 mL de acetato de sódio 5 M, 11,5 mL de ácido acético glacial e 28,5 mL de água deionizada), o tubo foi novamente vigorosamente agitado para precipitação da matéria orgânica, a reação foi incubada no gelo por 5 minutos.

O tubo foi centrifugado por 5 minutos a 18000 x g, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o precipitado descartado, ao sobrenadante foi adicionado um volume de 400 µL de solução de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (1:1:1), a solução foi misturada ao sobrenadante e centrifugada por 5 minutos a 18000 x g.

A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e 400 µL de etanol 100% foi adicionado à mistura, a reação foi incubada em gelo por 3 minutos, sendo em seguida novamente centrifugada por 15 minutos a 18000g.

O sobrenadante foi removido, 1 mL de etanol 70% foi adicionado ao tubo que foi agitado vigorosamente, sendo em seguida centrifugado por 10 minutos a 18000 x g. O pellet foi ressuspensionado em 40 µL de água ultra pura.

#### **4.6 – Sequenciamento dos fragmentos clonados.**

O sequenciamento dos fragmentos polimórficos foi realizado no aparelho 4300 DNA Analyser LI-COR® (Lincoln, Nebraska, USA), utilizando kit “USB® Thermo Sequenase™ Cycle Sequencing” (Affymetrix, Inc, Cleveland, USA), a partir do DNA plasmidial extraído, seguindo as recomendações do fabricante. Os fragmentos obtidos foram analisados através do software para a análise de similaridade das sequencias.

#### **4.7 – cDNA-AFLP**

Para o cDNA-AFLP foram selecionados 18 indivíduos dos 30 originalmente selecionados, o critério de escolha desses indivíduos foi a concentração dos compostos majoritários de cada um deles, carvacrol, timol ou endo-fenhol.

Na Tabela 03 estão descritos os indivíduos utilizados bem como a composição química dos constituintes majoritários presentes em seus óleos essenciais, a constituição química do óleo essencial foi determinada por cromatografia gasosa (PINA, 2010; HERNANDES, 2013). O número de identificação das plantas, o “Voucher” juntamente com a procedência e



localização geográfica de cada indivíduo estão descritos na Tabela 01 na seção Materiais e Métodos.

Tabela 03 - Composição química dos óleos essenciais dos indivíduos utilizados.

Código	Classificação taxonômica	Composição química (%)		
		Carvacrol	Endo-Fenchol	Timol
107	<i>L.velutina</i>	53,00	0,00	0,00
133	<i>L.origanoides</i>	52,70	0,00	0,00
49	<i>L.origanoides</i>	52,50	0,00	0,00
70	<i>L.origanoides</i>	46,00	0,00	0,00
51	<i>L.origanoides</i>	0,00	54,80	0,00
SL13	<i>L.origanoides</i>	45,07	4,17	3,75
SL14	<i>L.origanoides</i>	38,56	3,68	5,09
134	<i>L.sidooides</i>	45,50	0,00	0,00
135	<i>L.sidooides</i>	19,30	0,00	13,5
136	<i>L.salvifolia</i>	0,00	0,00	55,46
RJ2	<i>L. orig x vel</i>	39,89	0,00	3,77
RJ6	<i>L. orig x vel</i>	43,19	0,00	4,50
RJ7	<i>L. orig x vel</i>	38,75	0,00	5,45
RJ9	<i>L. orig x vel</i>	41,33	0,00	0,00
RJ10	<i>L. orig x vel</i>	39,54	0,00	0,00
RJ11	<i>L. orig x vel</i>	41,10	0,00	0,00
RJ15	<i>L. orig x vel</i>	42,24	0,00	0,00
MS1	<i>L. orig x vel</i>	37,86	2,62	3,65

**Nota** - 0,0 significa que a porcentagem do composto foi inferior a 1%.

A síntese da primeira fita do cDNA foi realizada utilizando-se 5µg de RNA total e o kit “RevertAid First Strand cDNA Synthesis” (Thermo Scientific®) (Waltham, Massachusetts, USA), seguindo as recomendações do fabricante, na reação foi utilizado, 1 µL do “primer” oligo(dT) (10 µM), 4 µL do tampão de reação 5x, 1 µL do inibidor de RNase (20 U/ µL), 2 µL mix dNTP (10 mM), 1 µL transcriptase reversa RevertAid M-MuLV (200 U/ µL), 5 µg de RNA total e água deionizada para um volume final de 20 µL de reação, os reagentes foram misturados e incubados por 60 minutos a 42°C, a reação foi encerrada aquecendo a 70°C por 5 minutos. O cDNA pronto foi armazenado em freezer - 20°C.

A seguir 200 ng de cDNA foram digeridos com 1 µL da enzima *MseI* (5 U), 0,4 µL da enzima *EcoRI* (5 U), na reação também foi utilizado 0,5 µL de tampão BSA (100X), 5 µL de tampão OPA (10X), e água deionizada para

volume final de 50  $\mu\text{L}$ . A reação foi incubada inicialmente a uma temperatura de 37°C por 3 horas, sendo a seguir inativada por 15 minutos a 70°C.

Ao produto da digestão foram adicionados 6,7  $\mu\text{L}$  de água deionizada, 1  $\mu\text{L}$  do tampão 10x da DNA ligase, 0,33  $\mu\text{L}$  de T4 DNA ligase (3 U/  $\mu\text{L}$ ) e 1  $\mu\text{L}$  dos adaptadores *EcoRI*, reverse 5'- AATTGGTACGCAGTCTAC - 3' e "forward" 5' - CTCGTAGACTGCGTACC - 3', e *MseI*, "reverse" 5' - TACTCAGGACTCAT - 3' e forward 5'- GACGATGAGTCCTGAG - 3', na concentração de 500 ng/  $\mu\text{L}$ , totalizando 60  $\mu\text{L}$ .

Os fragmentos ligados foram pré-amplificados usando 0,5  $\mu\text{L}$  dos "primers" *EcoRI* +1 (25 ng/ $\mu\text{L}$ ) (5'-GACTGCGTACCAATTCA-3') e *MseI* +1 (25 ng/ $\mu\text{L}$ ) (5'-GATGAGTCCTGAGTAACT-3'), 2  $\mu\text{L}$  do tampão da *Taq* DNA polimerase, 0,6  $\mu\text{L}$  de cloreto de magnésio (25 mM), 0,4  $\mu\text{L}$  mix dNTP (10 mM), *Taq* DNA polimerase (3 U/ $\mu\text{L}$ ) e 3,2  $\mu\text{L}$  água deionizada, a reação ocorreu em 26 ciclos de 94°C por 1 min, 56°C por 1 min, 72°C por 1 min seguidos de uma amplificação final a 72°C por 5min.

A amplificação seletiva foi realizada com 6 combinações de "primers" *EcoRI* +3 e *MseI* +3 utilizando a ciclagem de: desnaturação a 94°C por 2 min., seguidos por 12 ciclos de 94°C por 30s, 65°C por 30s, 72°C por 1 min., e 23 ciclos de 94°C por 30s, 56°C por 30s, 72°C por 1 min., com uma amplificação final a 72°C por 2 min.

#### 4.8 – Dendrograma e análise de coordenadas principais

Os fragmentos foram visualizados e codificados como presente (1) ou ausente (0) numa matriz binária a partir da qual foi gerada uma matriz de dissimilaridade entre os indivíduos utilizando-se o programa FreeTree v.0.9.1.50. Um dendrograma apresentando as relações genéticas foi gerado no programa TreeViewX. Para a obtenção da medida de dissimilaridade genética foi calculado o complemento aritmético do Índice de Jaccard, como a seguir:

Índice de Jaccard =  $(1-a)/(a+b+c)$ ; onde, “a” representa o número de concordância positiva do tipo 1-1, “b” é o número de discordância 1-0 e, “c” é o número de discordância do tipo 0-1.

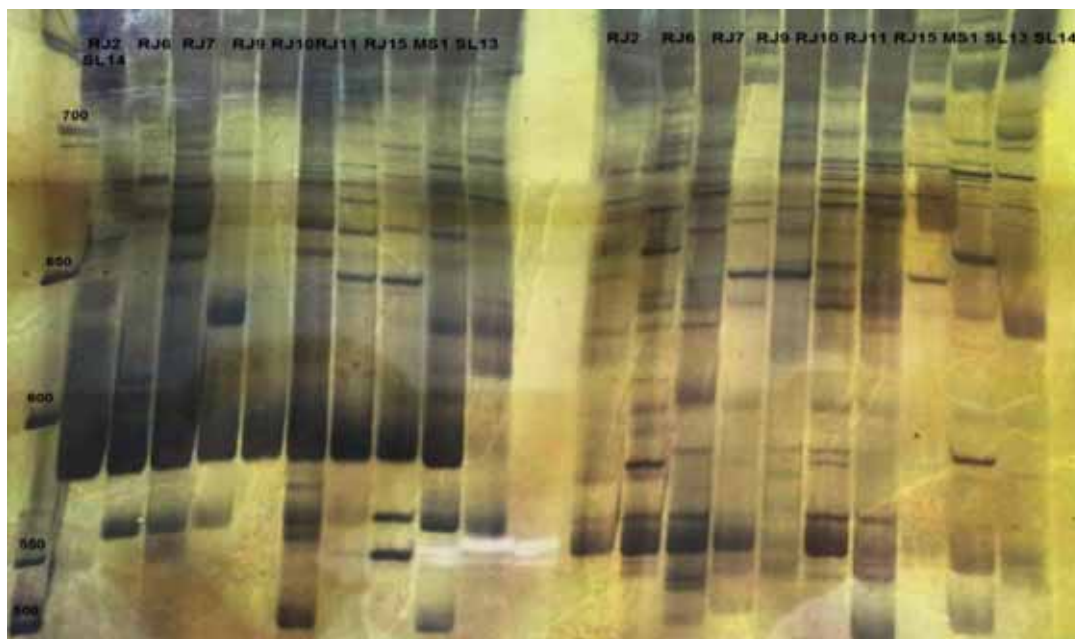
O agrupamento baseou-se no modelo UPGMA e a consistência dos ramos foi obtida com bootstrap de 1000 réplicas. A estrutura genética dos genótipos foi analisada através da Análise em Coordenadas Principais (PCoA), pelo programa GenAlEx v.6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2006).

## 5 – Resultados e Discussão

### 5.1 – “Differential Display” – DD-PCR

As combinações de “primer” do “differential display” foram testadas em 30 indivíduos, ao todo foram obtidos 66 fragmentos diferencialmente expressos, o tamanho dos fragmentos obtidos variou entre 200 e 800 pares de bases. A Figura 05 mostra a imagem de uma das reações do “differential display”. É possível observar a ocorrência de bandas diferencialmente expressas entre os indivíduos.

**Figura 05** – Gel de poliacrilamida com as combinações de “primers” ANC 1 + AL1 e ANC 2 + AL 2.



Fonte: arquivo pessoal.

Dos fragmentos amplificados e selecionados 8 foram sequenciados, 4 oriundos da planta RJ15, híbrido de *L. origanoides* e *L. velutina*, com tamanhos similares variando de 625 a 787 pares de base; dois da planta SL13, *L. origanoides*, com tamanho determinado de 345 e 646 pares de base e um da planta MS1, também um híbrido. As sequências de nucleotídeos obtidos foram analisadas utilizando o programa BLAST®, que busca similaridade de sequências e compara a sequência obtida com outras existentes nos bancos de dados.

Dos fragmentos sequenciados 5 apresentaram similaridade com sequências de microssatélites e transposons de diversas espécies, *Cycas taitungensis*, uma planta ornamental, *Lathyrus sativus* uma leguminosa, utilizada na Ásia na alimentação humana e *Entandrophragma cylindricum* uma arbórea utilizada na África na produção de madeira. Informações sobre o tamanho dos fragmentos, similaridade e *e-value* são encontradas na Tabela 04. Outros três fragmentos apresentaram similaridade com a enzima fosfolipase de *Glycine Max*, *Vitis vinífera*.

**Tabela 04** - Fragmentos identificados e similaridade.

<b>Planta</b>	<b>Tamanho do fragmento</b>	<b>Similaridade</b>	<b>Organismo</b>	<b>e-Value</b>	<b>Acesso</b>
RJ15	707	Microsatelite	<i>Cycas taitungensis</i>	1e-49	HE8022 28.1
RJ15	707	Transposon	<i>Arabidopsis lyrata</i>	1e-49	EU5585 34.1
RJ15	787	Microsatelite	<i>Lathyrus sativus</i>	4e-55	KC5372 91.1
RJ15	707	RNAm (hpt2 gene)	<i>Populus x canadensis</i>	9e-40	AJ8417 94.1
RJ15	620	Phosphoinositide-specific phospholipase C 2-Like	<i>Glycine max</i>	8e-76	NM_001 24838.1
MS1	671	Microsatelite	<i>Camellia sinensis</i>	7e-42	HE5865 63.1
133	783	Phosphoinositide-specific phospholipase C 2-Like	<i>Vitis vinifera</i>	4e-129	XM_003 633389. 1
SL13	355	Phosphoinositide-specific phospholipase C 2-Like	<i>Vitis vinifera</i>	6e-50	XM_003 633389. 1
SL13	646	Microsatelite	<i>Entandrophragma cylindricum</i>	2e-47	AJ4208 93.1

Da planta RJ15 (híbrido) foram isolados dois fragmentos diferencialmente expressos com homologia à sequência de microssatélite e transposon (Tabela 04). Esses fragmentos foram detectados apenas na planta RJ15, estando ausentes na planta MS1, também um híbrido. Analisando os compostos majoritários presentes no óleo essencial extraído destas plantas (Tabela 03), verifica-se que RJ15 produz apenas carvacrol enquanto que MS1 produz carvacrol, timol e endo-fenchol. A produção de metabólitos secundários é altamente influenciada por diversos fatores, tanto ambientais como genéticos (BERNSTEIN et al., 2009). Transposons e microssatélites tem uma grande participação no controle da expressão de muitos genes (GEMAYELL et al., 2010; LISCH, 2013), dependendo do região onde eles estão inseridos pode ocorrer inibição ou um aumento na expressão de alguns genes. Baseados na identificação, na planta RJ15, de fragmentos referentes às sequencias notadamente associadas à regulação de expressão, como o são os microssatélites e os transposons, pode-se inferir que esses fragmentos possam estar atuando na regulação dos genes envolvidos na produção dos compostos timol e endo-fenchol.

Também é possível verificar que existe diferença entre os fragmentos amplificados das plantas SL13 (*L. origanoides*), produtoras dos três compostos majoritários e RJ15, híbrido que produz apenas carvacrol. O fragmento amplificado para a planta SL13 foi similar a microssatélite. A atuação dessas sequências, mais a ação do ambiente, podem explicar a grande diferença na produção dos metabólitos secundários encontrada nas espécies do gênero *Lippia*, bem como as diferenças dentro de uma única espécie.

Fragmento com expressiva similaridade à enzima Phosphoinositide-specific phospholipase C 2-Like foi identificado nas plantas RJ15, SL13 e 133. Essa enzima pertence a uma família de genes, cuja ação esta associada a resposta das plantas a diferentes situações de estresse. Em *Arabidopsis thaliana* já foram identificados 9 genes que compõem a família (MUELLER-ROEBER; PICAL, 2002). A enzima phospholipase C atua hidrolisando o phospholipid phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP<sub>2</sub>) presente na membrana em inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) (GONORAZKY et a; 2014), o IP<sub>3</sub>

se difunde para outras partes da célula mobilizando o cálcio intracelular para o citosol, que atua em diversas respostas ao estresse de sal e hídrico (KNIGHT et al., 1997).

## 5.2 – cDNA-AFLP

No total 10 combinações de “primers” foram testadas, porem apenas seis delas foram selecionadas devido sua maior eficiência. A partir das combinações selecionadas foram obtidas 294 bandas, destas 222 (89,80%) foram polimórficas. A sequência de nucleotídeos das combinações utilizadas, bem como o número de amplificações por combinação e o tamanho do maior e do menor fragmento, identificado por combinação, estão apresentados na Tabela 05.

**Tabela 05** - Combinações de “primers” utilizadas, número de bandas e tamanho dos fragmentos.

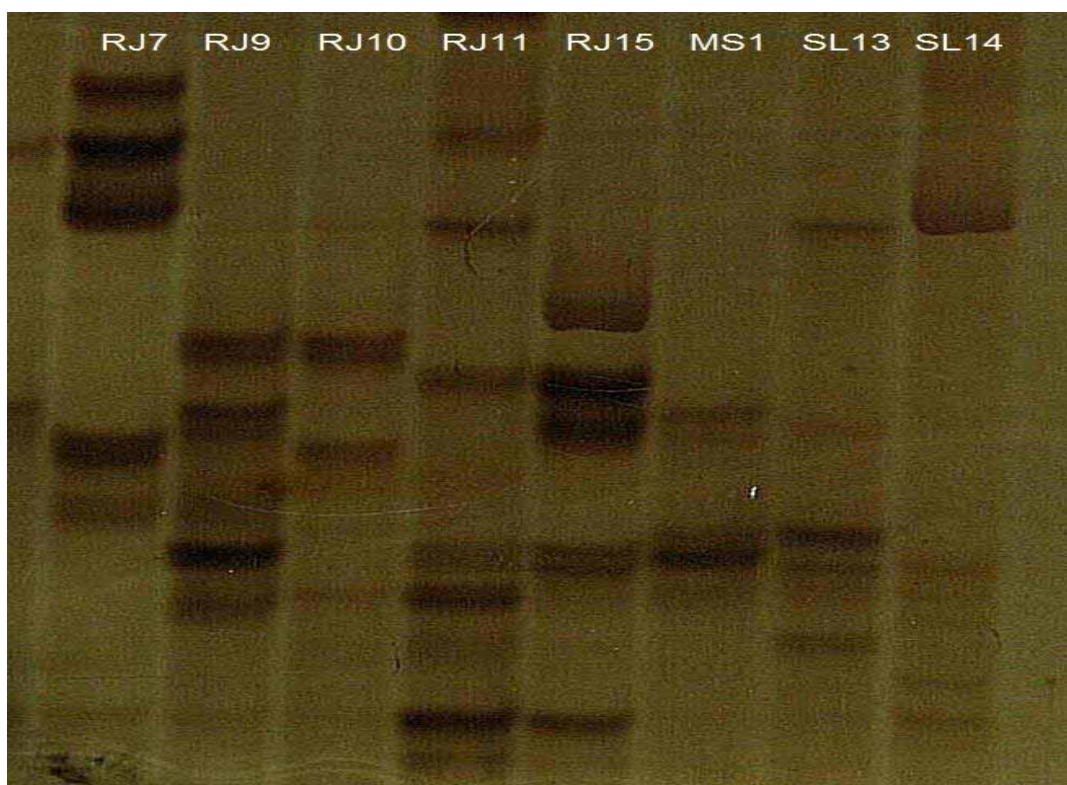
Combinação <i>EcoRI/MseI</i>	Fragmentos polimórficos	Fragmentos monomórficos	% Fragmentos polimórficos	Tamanho dos fragmentos
3 – ATT/TAA	28	3	90,32%	450-28
2 – AGT/TTC	78	0	100%	1000-100
3 – AGA/TCG	50	3	94,33%	954-90
4 – AAT/ATA	34	8	80,95%	1175-90
5 – AGT/AGG	33	15	68,75%	1229-90
6 – ACA/ACG	32	10	76,19	1187-90

**Nota:** E =*EcoRI*, M =*MseI*.

Verificou-se que os fragmentos amplificados variaram pouco em tamanho entre as combinações avaliadas, ficando a maioria dos fragmentos entre 1200 e 90 pares de base, a exceção dos fragmentos amplificados com a combinação 1 (E+ATT- M+TAA) que gerou fragmentos de 450 a 28pb. O número de bandas polimórficas por combinação ficou próximo dos valores encontrados por WU et al., (2011) e por ZHAO et al., (2012), o tamanho dos fragmentos obtidos no entanto foi superior aos encontrados nesses dois trabalhos. Na Figura 07 é possível ver o gel de poliacrilamida da combinação dois (E+AGT- M+TTC), na imagem é possível observar o grande número de bandas polimórficas entre os indivíduos. Apesar do grande número de fragmentos polimórficos obtidos e utilizados para gerar o dendrograma, apresentado na Figura 8, não foi possível separar os indivíduos em grupos

distintos em relação aos compostos majoritários produzidos, o polimorfismo detectado, embora tenha atingido quase que 90% das bandas, não estão relacionados com metabólitos secundários produzidos pelas plantas, sendo então outros fatores a causa dessa elevada taxa de polimorfismo.

**Figura 07** - Gel de poliacrilamida da combinação 2 (*E*+AGT- *M*+TTC).



**Fonte:** arquivo pessoal. **Nota:** M= Marcador, pb= pares de bases.

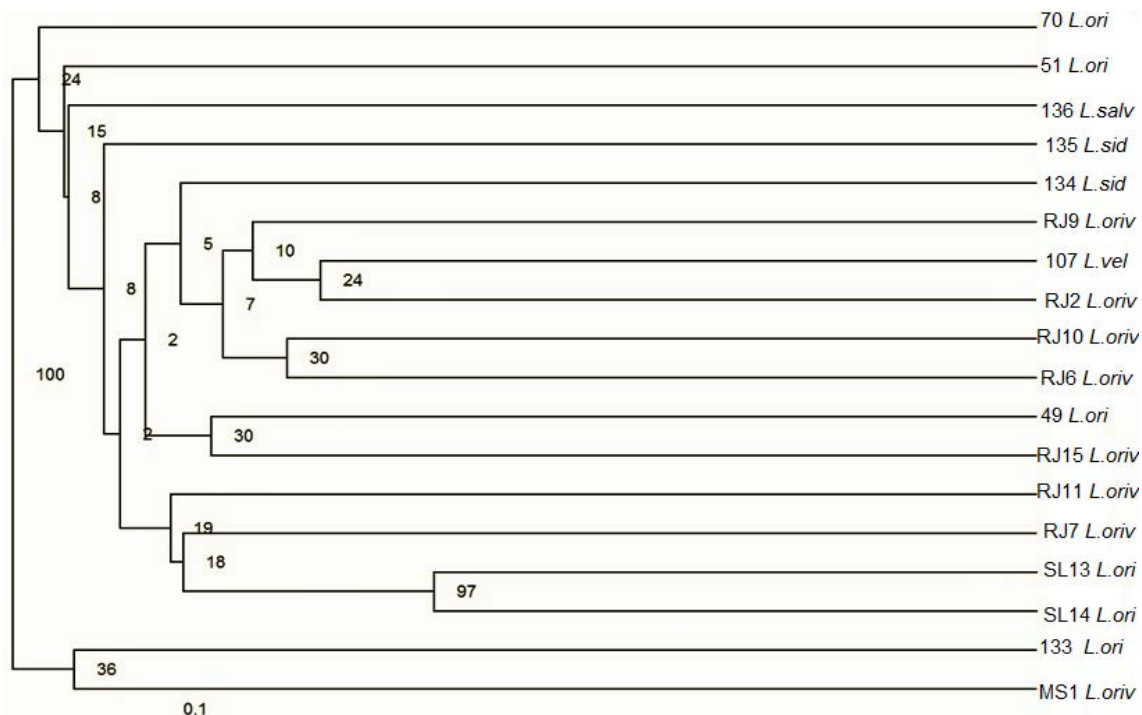
A análise apresentada no dendrograma (Figura 08) mostra que não foi possível agrupar os indivíduos em grupos distintos em relação aos compostos majoritários. O grande número de fragmentos polimórficos amplificados indica que diferentes genes estão sendo produzidos pelas plantas avaliadas, no entanto, essas diferenças não foram suficientes para sua separação.

No dendrograma porém, é possível observar que ocorreu a formação de alguns grupos, os indivíduos SL13 e SL14 aparecem agrupados e muito próximos, com um alto valor de bootstrep, no centro do dendrograma também é possível observar que os indivíduos 134, RJ9, 107, RJ2, RJ10, RJ6, 49, RJ15



ficaram em um grupo próximo, os indivíduos 133 e MS1 ficaram afastados das outras plantas.

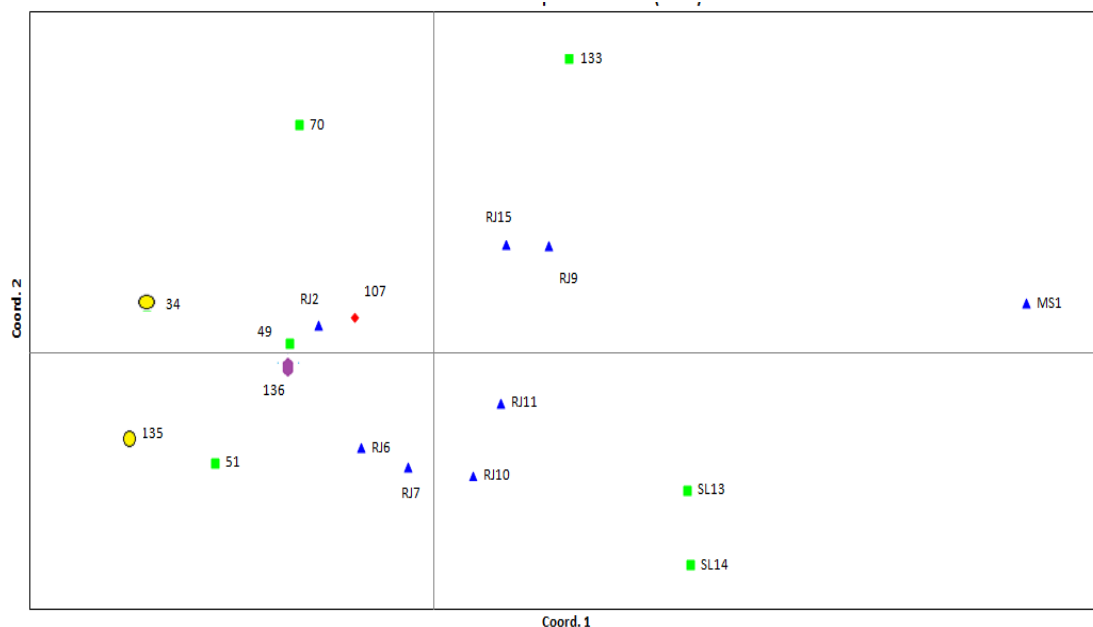
**Figura 08** – Agrupamento de indivíduos identificados taxonomicamente como *Lippia origanoides*, híbridos *L. origanoides* x *velutina*, *L. salvifolia*, *L. velutina* e *L. sidoides*







**Nota:** Indivíduos marcados com *L.ori* correspondem a *Lippia origanoides*, Indivíduos marcados com *L.salv* correspondem a *L. salvifolia*, Indivíduos marcados com *L. sid* à *L. sidoides*, Indivíduos marcados com *L.vel* correspondem a *L. velutina* e Indivíduos marcados com *L.oriv* à híbridos.

Esses resultados são reforçados com as análises de coordenadas principais (PCoA) em relação às espécies (Figura 09).

**Figura 09** - Análise de coordenadas principais (PCoA) das espécies.



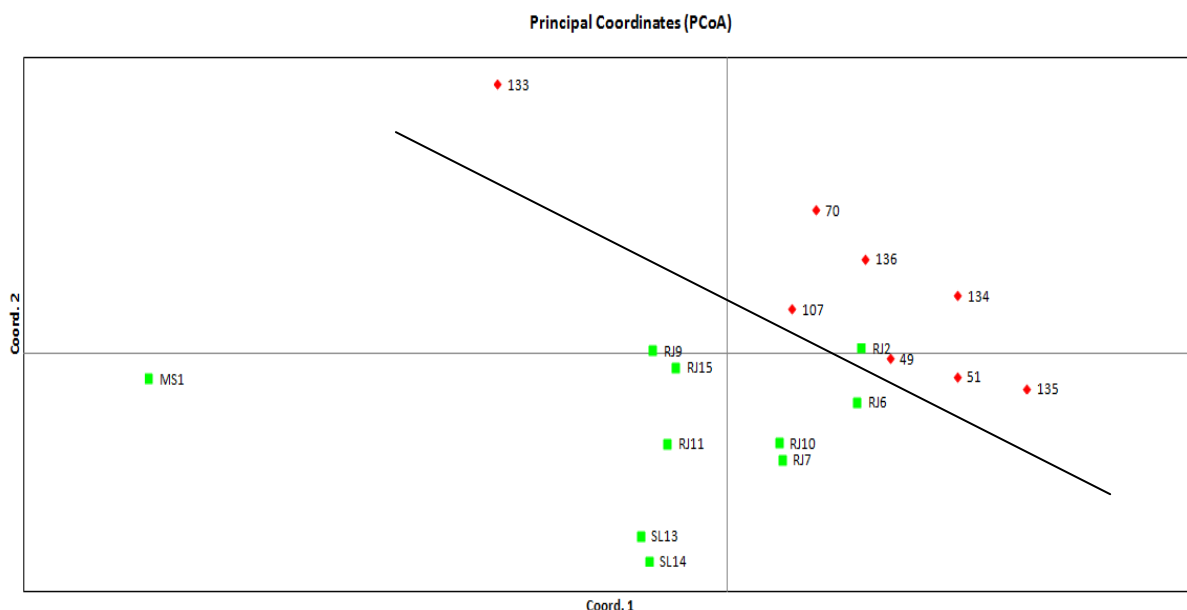
**Nota:** Em vermelho,  estão representados os indivíduos da espécie *Lippia velutina*, em (verde) são os indivíduos *L. origanoides*, em azul, , estão representados os híbridos *L. origanoides* x *L. velutina*, em amarelo, , os indivíduos *L. sidoides* e em roxo, , os indivíduos *L. salvifolia*.

Nesta figura é apresentada a correlação das plantas em relação às espécies, *Lippia origanoides*, híbrido *L. origanoides* x *velutina*, *L. velutina*, *L. salvifolia* e *L. sidoides*. É possível observar que não houve separação dos indivíduos em relação às espécies, nem em relação aos compostos majoritários, porém é possível observar que os híbridos, com exceção do indivíduo MS1, estão agrupados no centro do gráfico, esse padrão também foi observado no dendrograma. Também é possível notar que dois indivíduos da espécie *L. origanoides* (SL13 e SL14) ficaram próximos entre si embora distantes dos outros membros da espécie, isso também é observado no dendrograma da Figura 07, onde ambos ficaram próximos. Esses indivíduos produzem dois outros compostos Timol e endo-fenhol o que pode explicar esse distanciamento dos demais indivíduos da espécie (Tabela 3).

Também foram analisadas as coordenadas principais em relação aos locais de coleta, e neste caso verificou-se a separação em dois grupos, um envolvendo os indivíduos coletados em Jardimópolis e outro envolvendo os indivíduos da população de Ribeirão Preto, Figura 10.

Considerando que os locais de coleta são bastante próximos com coordenadas geográficas bastante similares, diferindo apenas em altitude, Jardimópolis localiza-se a 552m de altitude enquanto Ribeirão Preto esta a 545m, não podemos atribuir essas diferenças apenas a esses fatores havendo que se considerar também as condições de clima e solo. As variações nas condições ambientais provocam respostas nas plantas, e em função disso passam a expressar genes diferentes para cada tipo de situação, se adaptando a cada tipo de condição, por isso indivíduos da mesma espécie, em locais diferentes, podem apresentar padrões de expressos diferenciados, em resposta as condições climáticas locais, fatores como luminosidade (HATA et al., 2012), estresse hídrico e estresse de sal (BAYRAMOV; GULIYEV, 2014), falta de nitrogênio e temperatura (LØVDAL et al., 2010) e tipo de solo (AFZAL et al., 2011) são alguns dos fatores que alteram a expressão gênica das plantas.

**Figura 10** - Análise de coordenadas principais dos locais de coleta.



**Nota:** Indivíduos verdes, ■, coletados em Ribeirão Preto, indivíduos vermelhos, ◆, coletados em Jardimópolis.

Nesse gráfico é possível observar que dois grupos se formaram cada um em relação ao local da coleta, a exceção é o indivíduo RJ2 que embora tenha sido coletado em Ribeirão Preto ficou agrupado com a população de Jardinópolis. Também é possível observar que ambas as populações apresentaram um indivíduo que se agrupou mais distante do resto do grupo, em Ribeirão Preto foi o indivíduo MS1, enquanto que em Jardinópolis foi o 133.

Embora um grande número de fragmentos polimórficos tenha sido obtido, como pode ser visualizado na Tabela 05, aqueles que foram sequenciados não representam genes envolvidos diretamente na produção dos compostos majoritários presentes no óleo essencial destas plantas. No entanto são sequências de nucleotídeos com alta similaridade a sequências de transposons, microssatélites que são diretamente envolvidos no controle de expressão de genes (PAQUES et al., 1998; VERSTREPEN et al., 2005; REBOLO et al., 2012; LISCH, 2013). Além disso, deve-se considerar que a produção do óleo essencial está sujeita a interferência de diversos fatores, como: temperatura, umidade, luminosidade, horário, entre outros, pois são resultantes de processos metabólicos secundários onde a influência do ambiente é crucial (BERNSTEIN et al., 2009; MORAIS, 2009), estudos que envolvam a expressão gênica da produção do óleo essencial devem levar em consideração esses fatores, realizando a coleta das amostras durante as condições ideais de síntese dos compostos majoritários, para assim ser possível detectar os genes envolvidos na via de produção desses compostos.

## **6 – Conclusões**

Pelos resultados do cDNA-AFLP não foi possível agrupar os indivíduos em relação aos compostos majoritários presentes no óleo essencial, os resultados indicam que o alto nível de polimorfismo detectado entre os indivíduos se deve a influência do ambiente. A ação de diversos fatores ambientais interfere na síntese de metabolitos secundários, afetando sua produção. Isso se confirma se considerarmos que foram detectados sequências similares a transposons e microssatélites, elementos reguladores da expressão gênica nos experimentos de differential display.

## 7 – Referências

ACEVEDO, R.M.; MAIALE, S. J.; PESSINO, S. C.; BOTTINI, R.; RUIZ, O. A.; SANSBERRO, P. A. A succinate dehydrogenase flavoprotein subunit-like transcript is upregulated in *Ilex paraguariensis* leaves in response to water deficit and abscisic acid. **Plant Physiol. Biochem.**, 65:48-54, 2013.

AFZAL, M.; YOUSAF, S.; REICHENAUER, T. G.; KUFFNER, M.; SESSITSCH, A. Soil type affects plant colonization, activity and catabolic gene expression of inoculated bacterial strains during phytoremediation of diesel. **J. Hazard. Mater.**, 186:1568–1575, 2011.

ALVES, J. D.; TOAI, T. V. T.; KAYA, N. Differential Display: A Novel PCR-Based Method for Gene Isolation and Cloning. **Res. Bras. Fisio. Vegetal**, 10(2):161-164, 1998.

BARBOSA DA SILVA, N. C.; DELFINO REGIS, A. C.; ESQUIBEL, M. A.; ESPIRITO SANTO SANTOS, J.; ALMEIDA, M. Z. Uso de plantas medicinais na comunidade quilombola da Barra II – Bahia, Brasil. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**. 11(5):435-453, 2012.

BAUER, D.; WARTHOF, P.; ROHDE, M.; STRAUSS, M. Detection and Differential Display of Expressed Genes by DDRT-PCR. **Genome Res.**, 4:97-108, 1994.

BAYRAMOV, S.; GULIYEV, N. Changes in Rubisco activase gene expression and polypeptide contenting *Brachypodium distachyon*. **Plant Physiol. Biochem.**, 81:61-66, 2014.

BERNSTEIN, N.; KRAVCHIK, M.; DUDAI, N. Salinity-induced changes in essential oil, pigments and salts accumulation in sweet basil (*Ocimum basilicum*), in relation to alterations of morphological development. **Ann. Appl. Biol.**, 156:167-177, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Direção de Administração e Finanças. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. 2009. 1p.

CARMONA, F.; ANGELUCCI, M. A.; SALES, D. S.; CHIARATTI, T. M.; HONORATO, F. B.; BIANCHI, R. V.; PEREIRA, A. M. S. *Lippia Alba* (Mill.) N.E. Brown hydroethanolic extract of the leaves is effective in the treatment of migraine in women. **Phytomedicine**, 20:947-950, 2013.

CALLINAN, P. A.; BATZER M. A. Retrotransposable elements and human disease. **Genome Dyn.** 1:104–15, 2006.

COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; SILVA, M. R.; MOTA, M. L.; SANTOS, N. K. A.; CARDOSO, A. L. H.; LEMOS, T. L. G. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, 15(4):304-309, 2005.

CRESTE, S; TULMANN NETO, A; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Mol. Bio. Rep.**, 19:299-306, 2001.

CROCOLL, C. **Biosynthesis of the phenolic monoterpenes, thymol and carvacrol, by terpene synthases and cytochrome P450s in oregano and thyme.** 2011. 151 f. Tese (Doutorado) - Friedrich-Schiller-Universität, Jena. 2011.

CROTEAU, R.; MIYAZAKI, J. H.; WHEELER, C. J. Monoterpene biosynthesis: Mechanistic evaluation of the geranyl pyrophosphate: (-)-endo-fenchol cyclase from fennel (*Foeniculum vulgare*). **Arch. Bioche. Biophys.**, 269(2):507-516, 1989.

FARIAS, E. M; F; G; XIMENES, R. M.; MAGALHÃES, L. P. M.; CHIAPPETA, A. A.; SENA, K. X. F. R.; ALBUQUERQUE, J. F. C. Antifungal activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) against clinical isolates of *Candida* species. **J. Herbal Medicine**, 2:63-67, 2012.

FENG, N.; LI. Y.; TANG, J.; WANG, Y.; GUO, M. cDNA-AFLP analysis on transcripts associated with *hydroxysafflor yellow A*(HSYA) biosynthetic pathway in *Carthamus tinctorius*. **Biochem. Syst. Ecol.**, 38:971-980, 2010.

FLORA DO BRASIL: LISTA DE ESPÉCIES DA FLORA DO BRASIL. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/PrincipalUC/PrincipalUC.do>. Acesso em: 23 set. 2014.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUZA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um modelo Multidisciplinar. **Multidisciplinar (UNICAMP)**, 7, 2006.

GEMAYEL, R.; VINCES, M. D.; LEGENDRE, M.; VERSTREPEN, K. J. Variable tandem repeats accelerate evolution of coding and regulatory sequences. **Annu. Rev. Genet.** 44:445-477, 2010.

GEMAYEL, R.; CHO, J.; BOEYNAEMS, S.; VERSTREPEN, K. J. Beyond junk-variable tandem repeats as facilitators of rapid evolution of regulatory and coding sequences. **Genes**, 3:461-480, 2012.

GOMIDE, M. S.; LEMOS, F. de O.; LOPES, M. T. P.; ALVES, T. M. A.; VICCINI, L. F.; COELHO, C. M. The effect of the essential oils from five different *Lippia* species on the viability of tumor cell lines. **Rev. Bras. Farmacogn.**, 23:895-902, 2013.

GONORAZKY, G.; RAMIREZ, L.; ABD-EL-HALIEH, A.; VOSSEN, J. H.; LAMATTINA, L.; HAVE, A.; JOOSTEN, M. H. A. J.; LAXALT, A. M. The tomato phosphatidylinositol-phospholipase C2 (*S/PLC2*) is required for defense gene induction by fungal elicitor xylanase. **J. Plant Physiol.**, 171:959-965, 2014.

HAFEZ, E. E.; MOUSTAFA, M. F. M. Differential expression of cytochrome oxidase and ALY-family genes in resistant and susceptible tomato cultivars (*Solanum lycopersicum*) inoculated with *tomato bushy stunt virus*. **Genet. Eng. Biotechnol. J.**, 9:43-49, 2011.

HATA, N.; HAYASHI, Y.; OKAZAWA, A.; ONO, E.; SATAKE, H.; KOBAYASHI, A. Effect of photoperiod on growth of the plants, and sesamin content and CYP81Q1 gene expression in the leaves of sesame (*Sesamum indicum* L.). **Environ. Exp. Bot.**, 75:212-219, 2012.

HEDGES, D. J.; DEININGER, P. L. Inviting instability: transposable elements, double-strand breaks, and the maintenance of genome integrity. **Mutat. Res.** 616:46–59, 2007.

HERNANDES, C. **Avaliação do potencial antimicrobiano de óleos essenciais como conservantes em produtos farmacêuticos e alimentícios.** 2013. Tese de Doutorado. Curso de pós-graduação em biotecnologia, Universidade de Ribeirão Preto.

IYER, V.; STRUHL, K. Poly (dA:dT), a ubiquitous promoter element that stimulates transcription via its intrinsic DNA structure. **EMBO J.** 14:2570-2579, 1995.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. DONOGHUE, M. J. *Plant Systematic: a Phylogenetic Approach.* Terceira edição. Sunderland. Sinauer Associates: 2007. 565 p.

KNIGHT, H.; TREWAVAS, A. J.; KNIGHT, M. R. Calcium signaling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. **Plant j.** 12(5):1067-1078, 1997.

KUHLEMEIER, C.; GREEN, P. J.; CHUA, N. H. Regulation of gene expression in higher plants. **Ann. Rev. Plant. Physiol.** 38:221-257, 1987.

KUSHALAPPA, A. C.; GUNNAIAH, R. Metabolo-proteomics to discover plant biotic stress resistance genes. **Trends Plant Sci.**, 18(9):522-531, 2013.

LEGENDRE, M.; POCHET, N.; PAK, T.; VERSTREPEN, K. J. Sequence-based estimation of minisatellite and microsatellite repeat variability. **Genome Res.**, 17:1787-1796, 2007.

LERMAN, D. N.; FEDER, M. E. Naturally occurring transposable elements disrupt hsp70 promoter function in *Drosophila melanogaster*. **Mol. Biol. Evol.** 22(3):776-783, 2005.

LIANG, P.; PARDEE, A. B. Differential Display of Eukaryotic Messenger RNA by Means of the Polymerase Chain Reaction. **Science**, 257:967-971, 1992.



LIANG, P.; ZHU, W.; ZHANG, X.; GUO, Z.; O'CONNELL, R. P.; AVERBOUKH, L.; WANG, F.; PARDEE, A. B. Differential display using one-based anchored oligo-dTprimers. **Nucleic Acids Res.**, 22(25):5763-5764, 1994.

LISCH, D. How important are transposons for plant evolution? **Nature**, 14, 49-61, 2013.

LÖNNING, W. E.; SAEDLER, H. Plant transposons: contributors to evolution? **Gene**, 205:245-253, 1997.

LØVDAL, T.; OLSEN, K. M.; SLIMESTAD, R.; VERHEUL, M.; LILLO, C. Synergetic effects of nitrogen depletion, temperature, and light on the content of phenolic compounds and gene expression in leaves of tomato. **Phytochemistry**, 71:605–613, 2010.

MARINO, R. H.; GOMES, L. A. A.; CRUZ, E. M. O.; SILVA, A. C.; BIANCHINI, F. G.; MENESES, T. N.; SANTOS, H. R.; BLANK, A. F. Controle de *Meloidogyne incognita* raça 1 com óleo essencial de *Lippia Alba*. **Scientia Plena**, 8(4):4, 2012.

MARTIN, P.; MAKEPEACE, K.; HILL, S. A.; HODD, D. W.; MOXON, E. R. Microsatellite instability regulates transcription factor binding and gene expression. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 102:3800-3804, 2005.

MATZKE, M.A.; METTE, M. F.; MATZKE, A. J. Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. **Plant Mol. Biol.** 43:401–15, 2000.

METZGAR, D.; LIU, L.; HANSEN, C.; DYBVIG, K.; WILLS, C. Domain-level differences in microsatellite distribution and content result from different relative rates of insertion and deletion mutations. **Genome Res.**, 12:408–413, 2002.

MORAES, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Hortic. Bras.**, 27(2) 2009.

MUELLER-ROEBER, B.; PICAL, C. Inositol phospholipid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. Characterized and putative isoforms of inositol

phospholipid kinase and phosphoinositide-specific phospholipase C. **Plant Physiol.** 130(1):22-46, 2002.

MUELLER, U. G.; WOLFENBARGER, L. L. AFLP Genotyping and fingerprinting. **Trends Ecol. Evol.** 14:189-394, 1999.

MUÑOZ-LÓPEZ, M.; GARCÍA-PÉREZ, J. L. DNA Transposons: Nature and applications in genomics. **Curr. Genomics**, 11:115-128, 2010.

NASCIMENTO, N. C.; FETT-NETO, A. G. Plant secondary metabolism and challenges in modifying its operation: an overview. **Methods Mol. Biol.** 643:1–13. 2010.

NAYLOR, L. H.; CLARCK, E. M. d(TG)n.d(CA)n sequences upstream of the rat prolactin gene form Z-DNA and inhibit gene transcription. **Nucleic Acids Res.** 18:1595-1601, 1990.

OLIVEIRA CRUZ, E. M.; COSTA-JUNIOR, L. M.; OLIVEIRA, J. A. P.; ALEXANDRIA, D. S.; ARAUJO, S. A.; ARRIGONI-BLANCK, M. F.; BACCI, L.; BARRETO, P. A.; CAVALCANTI, S. C. H.; BLANK, A. F. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Vet. Parasitol.**, 195:198-202, 2013.

PAQUES, F.; LEUNG, W. Y.; HABER, J. E. Expansions and contractions in a tandem repeat induced by double-strand break repair. **Mol. Cell. Biol.** 18:2045-2054, 1998.

PATRA, B.; SCHLUTTENHOFER, C.; WU, Y.; PATTANAIK, S.; YUAN, L. Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants. **Biochim. Biophys. Acta**, 1829:1236-1247, 2013.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E., M Genealex 6.5: genetic analysis in Excel population genetic software for teaching and research. **Mol. Ecol. Notes**, 6:288-295, 2006.

PINA, E. S. **Atividade antimicrobiana de plantas do cerrado**. 2010. Dissertação de mestrado. Curso de pós-graduação em Biotecnologia, Universidade de Ribeirão Preto.

POULOSE, A. J.; CROTEAU, R. Biosynthesis of Aromatic Monoterpenes. **Arch. Biochem. Biophys.** 187:307-314, 1978.

RAJEEVAN, M. S.; RANAMUKHAARACHCHI D. G.; VERNON, S. D.; UNGER, E. R. Use of Real-Time Quantitative PCR to Validate the Results of cDNA Array and Differential Display PCR Technologies. **Methods**, 25:443-451, 2001.

REBELLO, R.; ROMANISH, M. T.; MAGER, D. L. Transposable Elements: An abundant and natural source of regulatory sequences for host genes. **Annu. Rev. Genet.** 46:21–42, 2012.

RICHARD, G. F.; PAQUES, F. Mini- and microsatellite expansions: The recombination connection. **EMBO Rep.**, 1:122-126, 2000.

RICHARD, G. F.; KERREST, A.; DUJON, B. Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 72:686–727, 2008.

RODRIGUES, A. C. C.; GUEDES, M. L. S. Utilização de plantas medicinais no Povoado Sapucaia, Cruz das Almas – Bahia. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, 8(2):1-7, 2006.

SALIMENA, F.R.G. **Revisão taxonômica de *Lippia* sect. *Rhodolippia* Schauer (Verbenaceae)**. 2000. Tese de Doutorado – Curso de pós-graduação em ciências Biológicas, Universidade de São Paulo.

SALIMENA, F. R. G.; SANTOS SILVA, T. R. Flora de Grão-Mogol, Minas Gerais: Verbenaceae. **Bol. Bot. Univ. São Paulo**, 27(1):119-120, 2009.

SANMIGUELI, P.; TIKHONOV, A.; Jin, Y. K.; Motchoulskaia, N.; Zakharov, D.; Melake-Berhan, A.; SPRINGER, P. S.; EDWARDS, K. J.; LEE, M.; AVRAMOVA, Z.; BENNETZEN, J. L. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. **Science**, 274(5288):765-768, 1996.

STEIN, L. D.; BAO, Z.; BLASIAR, D.; BLUMENTHAL, T.; BRENT, M. R.; CHEN, N.; CHINWALLA, A.; CLARKE, L.; CLEE, C.; COGHLAN, A.; COULSON, A.; D'EUSTASHIO, P.; FITCH, D. H.; FULTON, L. A.; FULTON, R. E.; GIFFITHS-JONES, S.; HARRIS, T. W.; HILLIER, L. W.; KAMATH, R.; KUWABARA, P. E.;

MARDIS, E. R.; MARRA, M. A.; MINER, T. L.; MINX, P.; MULLINKIN, J. C.; PLUMB, R. W.; ROGERS, J.; SCHEIN, J. E.; SOHRMANN, M.; SPIETH, J.; STAJICH, J. E.; WEI, C.; WILLEY, D.; WILSON, R. K.; DURBIN, R.; WATERSTON, R. H. The genome sequence of *Caenorhabditis briggsae*: a platform for comparative genomics. **PLoS. Biol.**, 1(2):45, 2003.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUSHI-SHINOZAKI, K.; SEKI, M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 6:410-417, 2003.

SILVIA, T. R. S.; SALIMENA, F. R. G. Novas combinações e novos sinônimos em *Lippia* e *Lantana* (Verbenaceae). **Darwiniana**, 40:57-59, 2002.

SOARES, B. V.; TAVARES-DIAS, M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Bio. Amaz.**, 3(1):109-123, 20013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Plant Physiology. In: 5<sup>th</sup> ed.; Sinauer Associates, Inc.; 2010. Chapter 14, Gene expression and signal transduction; p. 403-421.

TELES, S.; PEREIRA, J. A.; OLIVEIRA, L. M.; MALHEIRO, R.; MACHADO, S. S.; LUCCHESI, A. M.; SILVA, F. Organic and mineral fertilization influence on biomass and essential oil production, composition and antioxidant activity of *Lippia origanoides* H.B.K. **Ind. Crop. Prod.**, 59:169-176, 2014.

The European Biotechnology Institute. 2014. 1p. Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/chebi/advancedSearchFT.do?searchString=endo-fenchol&queryBean.stars=2>. Acesso em: 21 set. 2014.

TRONCOSO, N. S. Los géneros de Verbenaceae de Sudamerica extra-tropical (Argentina, Chile, Bolívia, Paraguay, Uruguay y sur de Brasil). **Darwiniana**, 18:195-412, 1974.

UPTMOOR, R.; WENZEL, W.; FRIEDT, W.; DONALDSON, G.; AYISI, K.; ORDON, F. Comparative analysis on the genetic relatedness of *Sorghum bicolor* accessions from Southern Africa by RAPDs, AFLPs and SSRs. **Theor. Appl. Genet.**, 106:1316-1325, 2003.

VERAS, H. N. H.; RODRIGUES, F. F. G.; BOTELHO, M. A.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M. Enhancement of aminoglycosides and b-lactams antibiotic activity by essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and the Thymol. **Arabian J. Chem.** (2013),

VERSTREPEN, K. J.; JANSEN, A.; LEWITTER, F.; FINK, G. R. Intragenic tandem repeats generate functional variability. **Nat. Genet.** 37:986-990, 2005.

VICCINI, L. F.; PIERRE, P. M. O.; PRAÇA, M. M.; SOUZA da COSTA, D. C.; da COSTA ROMANEL, E.; de SOUZA, S. M.; PEREIRA PEIXOTO, P. H.; SALIMENA, F. R. G. Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Pl. Syst. Evol.**, 256:171-178, 2006.

VOS, P.; HOGERS.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res.**, 23(21):4407-4414. 1995.

WANG, L.; ZHOU, B.; WU, L.; GUO, B.; JIANG, T. Differentially expressed genes in *Populus simonni* x *Populus nigra* in response to NaCl stress using cDNA-AFLP. **Plant Science**, 180:796-801, 2011.

WATTANASATCHA, A.; RENGPIPAT, S.; WANICHWECHARUNGRUANG, S. Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent. **Int. J. Pharm.**, 434:360–365, 2012.

WU, J.; CHANG, Z.; WU, Q; ZHAN, H.; XIE, S. Molecular diversity of Chinese *Curcubita moschata* germplasm collections detected by AFLP markers. **Sci. Hort.**, 128:7-13, 2011.

ZHANG, J. S.; DUNCAM, E. L.; CHANG, A. C. M.; REDDEL, R. R. Differential Display of mRNA. **Mol. Biotechnol.**, 10(2):155-165, 1998.

ZHANG, W. W.; WANG, S. Z.; NING, K. L.; SI, N.; QI, F. J.; JIAN, G. L. Comparative expression analysis in susceptible and resistant *Gossypium hirsutum* responding to *Verticillium dahlia* infection by cDNA-AFLP. **Physiol. Mol. Plant P.**, 80:50-57, 2012.

ZHAO, B.; YIN, Z.; XU, M.; WANG, Q. AFLP analysis of genetic variation in wild populations of five *Rhododendron* species in Qinling mountains in China. **Biochem. Syst. Ecol.**, 45:198-205, 2012.