UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

DIVERSIDADE DE POPULAÇÕES NATIVAS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi E PROTOCOLO PARA TRANSFORMAÇÃO MEDIADA POR *Agrobacterium rhizogenes*

JANNAÍNA VELASQUES DA COSTA PINTO

DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2015

Diversidade de populações nativas de *Schinus terebinthifolius* Raddi e protocolo para transformação mediada por *Agrobacterium rhizogenes*

JANNAÍNA VELASQUES DA COSTA PINTO
Eng[a]. Agrônoma, MSc Agronomia

ORIENTADORA Prof[a] Dr[a] Maria do Carmo Vieira
CO-ORIENTADORES Prof[a] Dr[a] Alexeia Barufatti Grisolia
Prof Dr Danny Geelen – Universiteit Gent

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Dourados
Mato Grosso do Sul
2015

Diversidade de populações nativas de *Schinus terebinthifolius* Raddi e protocolo para transformação mediada por *Agrobacterium rhizogenes*

JANNAÍNA VELASQUES DA COSTA PINTO

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de

DOUTOR EM AGRONOMIA

Aprovada em _____/_____/_____

Prof[a] Dr[a] Maria do Carmo Vieira **Orientadora – FCA/UFGD**	**Prof[a] Dr[a] Alexéia B. Grisolia** **FCBA/UFGD**
Prof Dr Rodrigo Kelson S. Rezende **FCA/UFGD**	**Prof[a] Dr[a] Silvana de Paula Scalon** **FCA/UFGD**
Prof[a] Dr[a] Marney Pascoli Cereda **CeTeAGRO/UCDB**	**Prof Dr Danny Geelen** **FBW/UGhent**

Ao meu filho querido, luz de meus olhos, Sol nas manhãs tristonhas, razão de minha persistência, ***Diego Velasques de Leglise***,

DEDICO.

“Antes de formá-lo no ventre, eu o escolhi; antes de você nascer, eu o separei”
(Jr 1:5)

AGRADECIMENTOS

Ao Pai, ao Filho e ao Espírito Santo, minha tríade sustentadora, minha fortaleza nos momentos de dificuldade, minha inspiração nos momentos de mansidão.

À minha abuelita, Evanir Velasques, que em sua humildade e limitação sempre me incentivou a estudar, vibrou com cada conquista, animou-me a prosseguir e compartilhou seus recursos para que eu conquistasse esse título.

À minha mãe, Marinalva Velasques, pelas noites em claro ninando e acalentando meu filho. Confortando e acalmando um coração pequenino que não compreendia minha ausência.

Ao pai do meu filho, Olivier Leglise, por ter me acompanhado até onde foi possível, pelos seus sacrifícios pessoais e, sobretudo, por estar sempre ao lado dele durante meus cursos, experimentos, expedições.

Aos meus irmãos, tios e sobrinhos pela compreensão e incentivo.

À minha orientadora, Prof[a] Maria do Carmo Vieira, pela credibilidade, confiança e amizade. Tentei sugar o máximo e espelhar-me em você, embora todo meu esforço ainda seja pouco diante de tanto conhecimento. Tornei-me gota d'água em frente ao Oceano.

Aos meus co-orientadores, Prof[a] Alexéia Grisolia e Prof Danny Geelen, por terem me ensinado muito e acreditado em minha capacidade. Vocês me pegaram pela mão, como criança aprendendo a andar, apresentaram-me um mundo novo, ensinaram-me o be-á-bá e só espero não tê-los desapontado.

Ao Prof Marc van Montagu, pelo voto de confiança e intercessão direta para aceitação de meu projeto pela UGhent, referência mundial em engenharia genética.

Ao meu grande amigo, irmão, braço direito em todos os momentos, Bruno Crispim. Parceiro em todos os experimentos, ensinou-me a utilizar todas as ferramentas necessárias para concretizar este trabalho. Essa conquista é nossa, we've done it man!!! Somos os primeiros em molecular vegetal na UFGD!!!

À minha família moleculeira, *my labteam*, meus chucros por excelência, Danielly, Alexandre, Joyce, Adrielle, André, Andrea, Juliana F., Juliana S., Priscila, Jéssica, Tauane, Thamiris, Sabrina, Camila, Allana. Trabalhar com vocês foi bom demais, cafézinho entre corridas de géis e PCRs e muitos coices como prova de amor.

Ao Prof Leonardo Seno por oferecer seu laboratório e equipamentos.

À Universidade Federal da Grande Dourados pela oportunidade e formação e às agências de fomento à pesquisa nacional, Capes, CNPq e Fundect-MS.

A todos os que direta ou indiretamente contribuíram, colaboraram e torceram por essa conquista,

Meus Sinceros Agradecimentos!!!

BIOGRAFIA

JANNAÍNA VELASQUES DA COSTA PINTO, filha de Marinalva Velasques da Costa Pinto, nasceu em Corumbá-MS, em 08 de outubro de 1977.

Em fevereiro de 1996 ingressou no curso de Engenharia Agronômica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul em Dourados-MS, sendo aprovada em primeiro lugar em processo seletivo de ampla concorrência.

Durante a graduação, foi bolsista de Iniciação Científica, em 1997 trabalhou com produção de hortaliças alternativas sob orientação da Prof[a] Maria do Carmo Vieira, e em 1998, orientada pelo Prof. Honório dos Santos, trabalhou com controle biológico de pragas agrícolas.

Estagiou na EMBRAPA-CNPMA, sob orientação do Dr José Maria Ferraz, avaliando resíduos xenobióticos provenientes de pesticidas agrícolas e seus respectivos impactos ambientais, que resultou em sua Monografia de Bacharel.

Em dezembro de 2000, concluiu sua graduação em Engenharia Agronômica e foi selecionada pelo Ministère Wallon de l'Agriculture et de la Ruralité, Namur-Bélgica, como jovem talento paisagista que resultou em seu primeiro contrato profissional naquele país, responsável pela restauração de parques nacionais e implantação de jardins didáticos.

Retornou ao Brasil em 2003, casando-se com o belga Olivier Leglise, residiram em Vera Cruz-BA onde abriram empresa de implantação e manutenção de jardins residenciais.

Paralelamente, desenvolveu trabalhos voluntários em comunidades carentes onde foram implantadas hortas comunitárias, que levou a uma parceria com a Prefeitura Municipal de Vera Cruz-BA desenvolvendo projetos e implantação de hortas agroecológicas, envolvendo capacitação de mão de obra e logística de distribuição.

Foi convidada a trabalhar como analista ambiental e consultora autônoma das empresas Coopemari ltda, Acquaconsult ltda, Sergil ltda, Grupo Espírito-Santo sa, Fazenda Misericórdia ltda.

Ingressou no corpo docente do CETEB – Centro de Ensino Técnico da Bahia em 2006, onde lecionou Agroecologia, Fitotecnia, Jardinocultura e Paisagismo e Produção Agroenergética.

Em 2009, especializou-se em Botânica de Plantas Ornamentais, pela UFLA.

Em março de 2010, ingressou no Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal pela UFGD e, em setembro, deu à luz Diego Velasques de Leglise, 'filho da Academia', que vem crescendo entre práticas moleculares e trabalhos de campo. Defendeu sua dissertação em fevereiro de 2012.

Neste mesmo ano, foi selecionada para o Doutorado em Agronomia, pelo Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Parte de seus experimentos foi desenvolvida em parceria com a Universidade de Ghent – Belgica, onde fez doutorado sanduíche, entre 2013 e 2014, graças ao programa Ciência sem Fronteiras.

Sua tese, "Diversidade de populações nativas de *Schinus terebinthifolius* Raddi e protocolo eficiente para transformação mediada por *Agrobacterium sp.*", consistindo em três artigos distintos, foi defendida em agosto de 2015.

SUMÁRIO

RESUMO ix

ABSTRACT x

INTRODUÇÃO GERAL 1

REFERÊNCIAS 5

CAPÍTULO 1: DIVERSIDADE DE POPULAÇÕES DE *Schinus terebinthifolius* Raddi NATIVAS EM ECOSSISTEMAS BRASILEIROS 8

1. **Introdução** 11
2. **Material e Métodos** 13
3. **Resultados** 17
4. **Discussão** 21
5. **Referências Bibliográficas** 24

CAPÍTULO 2: POLIMORFISMOS INTRAVARIETAIS EM POPULAÇÕES NATIVAS REVELAM ANCESTRAL COMUM DE *S. terebinthifolius* Raddi 28

1. **Introdução** 31
2. **Material e Métodos** 33
3. **Resultados** 35
4. **Discussão** 39
5. **Referências Bibliográficas** 43

CAPÍTULO 3: PROTOCOLO EFICIENTE PARA TRANSFORMAÇÃO DE *S. terebinthifolius* Raddi MEDIADA POR *Agrobacterium rhizogenes* 47

1. **Introdução** 50
2. **Material e Métodos** 53
3. **Resultados** 59
4. **Discussão** 69
5. **Referências Bibliográficas** 72

CONSIDERAÇÕES FINAIS 77

"... E se clamares por entendimento, e por inteligência alçares a tua voz, se como a prata buscares e como os tesouros escondidos a procurares, então entenderás o temor do Senhor, e acharás o conhecimento de Deus. Porque o Senhor dá a sabedoria; da sua boca vem o conhecimento e o entendimento."

(Pv 2:3-6)

PINTO, JANNAÍNA VELASQUES DA COSTA PINTO. Universidade Federal da Grande Dourados, Agosto de 2015. **Diversidade de populações nativas de *Schinus terebinthifolius* Raddi e protocolo eficiente para transformação mediada por *Agrobacterium sp*.**Orientadora: Prof[a] Dr[a] Maria do Carmo Vieira. Co-orientadores: Prof[a] Dr[a] Alexéia B. Grisólia e Prof Dr Danny Geelen.

Resumo. Desde a inserção da pimenta rosa (Schinus terebinthifolius Raddi – Anacardeaceae) dentre as plantas medicinais de interesse para distribuição através do Sistema Único de Saúde, houve um aumento considerável no número de publicações com a espécie. A maioria dos trabalhos aborda as propriedades farmacológicas de seu óleo essencial e extratos, mas uma parcela significativa tem trabalhado também suas características agronômicas e propagativas, incentivando sua inserção imediata na cadeia produtiva da agricultura familiar. Na contramão desta corrente, pesquisadores do mundo inteiro têm se mobilizado para controlar a dispersão dessa espécie invasora listada entre as cem piores do planeta. Entender seus mecanismos de dispersão e colonização e conhecer sua diversidade genética deveria anteceder qualquer programa de melhoramento e produtividade e evitaria erros ecológicos importantes. Com o objetivo de se iniciar ampla rede de informações da espécie, através do uso padronizado de marcadores microssatélites disponíveis no GenBank, cinco populações nativas de ecossistemas brasileiros (Cerrado, restinga, floresta ombrófila adensada e floresta estacional decidual) foram amostradas e estudadas quanto à sua diversidade genética. Este estudo revelou significativos índices de diferenciação, apresentando populações estruturadas e genotipicamente distintas. Mas também possibilitou perceber um eminente processo de deriva genética e efeito gargalo em população do Cerrado, atribuída à sua drástica diminuição e sua inserção em área circunvizinha a terras agricultáveis submetidas a frequente prática de queimadas. Dando continuidade aos estudos moleculares, a região intergênica do cpDNA dessas amostras foram sequenciadas e alinhadas com sequências previamente depositadas e provenientes de outros países, possibilitando a identificação de polimorfismos intravarietais distinguindo os genótipos e construção de rede de haplótipos que, curiosamente, revelou um ancestral comum capaz de elucidar os processos de colonização da espécie inclusive em regiões temperadas. Como alternativa à continuidade da exploração comercial da pimenta rosa, foi desenvolvido ainda um protocolo para cultivo *in vitro* de *hairy roots*, viabilizando a superexpressão na espécie e induzindo a rota metabolica de terpenos para uma produção metabólita uniforme, limpa, predizível e ambientalmente controlada.

Palavras-chave: pimenta rosa, planta medicinal, genótipos, polimorfismo, haplótipos, *hairy roots*, superexpressão

PINTO, JANNAÍNA VELASQUES DA COSTA PINTO. University of Grande Dourados, August 2015. **Genetic diversity among native populations and efficient protocol for *Agrobacterium sp* mediated transformation of *Schinus terebinthifolius* Raddi**. Promotor Profª Drª Maria do Carmo Vieira. Co-promotors Profª Drª Alexéia B. Grisólia and Prof Dr Danny Geelen.

Abstract. Since the insertion of Brazilian peppertree (Schinus terebinthifolius Raddi - Anacardiaceae) among the medicinal plants of greater interest for distribution through the National Health System, there was a considerable increase in the number of publications with the species. Most of researches concern the pharmacological properties of the essential oil and leaf extracts, but a considerable number has also worked its agronomic and propagative characteristics, encouraging the immediate insertion of the species into the production chain through family farming. Contrary to this current, researchers worldwide are mobilized to control the spread of this invasive species listed among the hundred worst of the planet. To understand the dispersal and colonization mechanisms of the species as to study its genetic diversity should precede any breeding and productivity programs on the aim to avoid major ecological mistakes. In order to start a wide sharing platform with the species data, based on the standardized use of microsatellite markers available on GenBank, five populations native from Brazilian ecosystems (Cerrado, sandbanks, densely rain forest and deciduous forest) were sampled and have been analyzed for their genetic diversity. This study revealed significant levels of differentiation, with structured and genotypically distinct populations. And made it possible to predict an eminent process of genetic drift and bottleneck through Cerrado population, probably due to the recent deforestation and insertion of agricultural practices into surrounding areas as to the annual regimes of fire in this ecosystem. Proceeding with the molecular studies, intergenic regions from cpDNA were sequenced and aligned with others disponible on GenBank and original from other countries. The comparison enabled the identification of intravarietal polymorphisms and helped to distinguish the genotypes. Moreover a haplotypes network was build and curiously revealed a common ancestor in the South of Brazil, this information could help us to elucidate the colonization patterns even into temperate regions. Finally, as a reasonable alternative to commercial yield of metabolites from Brazilian peppertree, the authors have developed a protocol for *in vitro* culture of *hairy roots*, allowing the overexpression and metabolic essays on terpenes biosynthesis, in order to achieve a uniform, clean, predictable and environmentally controlled harvest of metabolites.

Keywords: Brazilian peppertree, medicinal plant, genotypes, polimorphism, haplotypes, *hairy roots*, overexpression

INTRODUÇÃO GERAL

Por suas dimensões continentais e consequente ocorrência diversificada de zonas climáticas e perfis vegetativos, o Brasil faz parte de um seleto grupo de países que juntos detêm 70% da biodiversidade mundial. Além disso, a flora brasileira é considerada a mais diversa do planeta, abrangendo cerca de 20% das espécies. Contando, na atualidade com 46.097 espécies catalogadas, esse patrimônio, se devidamente explorado, pode desempenhar papel significativo para o desenvolvimento do país (CORADIN et al., 2011; REFLORA, 2015)

Dentre as espécies brasileiras hoje conhecidas, em torno de 8% é atribuída alguma propriedade medicinal. Muito desse conhecimento e identificação de espécies medicinais está baseado na medicina tradicional e conhecimento etnobotânico de populações indígenas e nativos de amplo relacionamento com a flora local, passado de geração em geração (ALMASSY JÚNIOR et al., 2010; VÁSQUEZ et al., 2014).

Na década de 70, uma iniciativa da OMS de reconhecimento à relevância do conhecimento etnobotânico e uso de plantas medicinais pela medicina tradicional, sobretudo em países em desenvolvimento, criou subsídios e incentivos a seus Estados membros para a implementação de programas nacionais direcionados à catalogação, pesquisa e divulgação dessas práticas. Desde então, tem-se notado considerável expansão na cadeia produtiva de fitoterápicos, assim como também o aumento de sua aceitação inclusive por mercados mais conservadores (CANTER et al., 2005).

No Brasil, o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos foi criado em 2008, contendo normativas e diretrizes para o desenvolvimento de pesquisas nas mais diversas linhas de produção, em busca de efetiva aplicabilidade e inserção de plantas medicinais no Sistema Único de Saúde. Desde então, mais de 26 milhões de reais foram investidos, especificamente para este setor, com aprovação de 66 projetos até 2014. E mais de 265 artigos foram publicados, isso considerando apenas os periódicos nacionais, sobretudo na área de farmacologia das espécies nativas (BRASIL, 2009; CARNEIRO et al., 2014; MS, 2015).

Dentre as espécies de maior interesse de inserção na cadeia produtiva e distribuição através do SUS está a pimenta rosa, *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardeaceae), também chamada popularmente de aroeirinha, aroeira pimenteira, aroeira da praia, erva de passarinho, falsa pimenteira. Arvoreta nativa de Mata Atlântica, de pequeno a médio porte (3-15 m) e crescimento rápido, pertencente ao grupo das pioneiras. Em seu habitat, ocorre em populações relativamente adensadas, sendo dificilmente observada a ocorrência de um exemplar isolado (LORENZI e MATOS, 2008; CARVALHO et al., 2013).

Perene e perenifólia, sua inflorescência é do tipo paniculada terminal, com flores amarelo-pálido, díclinas em função de redução do gineceu ou androceu. Em razão deste dimorfismo, apenas as plantas femininas frutificam, gerando frutos globulares (drupas) agrupados em cachos, de pericarpo vermelho vivo ou rosa forte, brilhantes e frágeis (CESARIO e GAGLIONE, 2008; PINTO, 2012).

A pimenta rosa é amplamente utilizada pelos povos tradicionais devido a suas propriedades adstringentes, antidiarréicas, anti-inflamatórias, depurativas, diuréticas e febrífugas. Seu uso fora reportado na primeira edição da Farmacopéia Brasileira, em 1926. E, recentemente, pesquisas realizadas com acessos de todo o globo têm comprovado as propriedades farmacológicas de seu óleo essencial, reacendendo o interesse da indústria farmacêutica (DEGÁSPARI et al., 2005; RIBAS et al., 2006; EL-MASSRY et al., 2009; BENDAOUD et al., 2010; FORMAGIO et al., 2011; MATSUO et al., 2011; CARVALHO et al., 2013).

Os resultados positivos de suas prospecções vêm ocasionando também certa euforia dentro do setor produtivo, com recomendações para sua inserção na agricultura familiar e mesmo recuperação de áreas degradadas com a espécie. É bem verdade que sua produção planejada evitaria a exploração extrativista. No entanto, é preciso considerar um outro aspecto importante da pimenta rosa, que a tornou mundialmente conhecida, além de suas propriedades medicinais. A espécie está na relação das cem piores invasoras do globo terrestre, dispersa em praticamente todos os continentes, colonizando diferentes ecossistemas e colocando em risco a flora nativa desses locais. E, apesar de tantas recomendações agronômicas ao seu plantio no Brasil, a pesquisa científica de outros países está muito mais mobilizada em cessar sua dispersão (JOSÉ et

al.; 2005; WILLIAMS et al., 2007; MUKHERJEE et al., 2012; ISSG, 2013; SOUZA et al., 2014).

Diante desse impasse, é relevante afirmar que estamos pulando importantes passos envolvendo estudos de caracterização ecológica da espécie, antes de inserí-la em programas de melhoramento e produção agrícola. Entender seus mecanismos de adaptação, evolução e sobrevivência, conhecer a diversidade genética entre e dentro das populações, elucidar sua estrutura dispersiva e colonização, são fatores que devem anteceder a inserção na cadeia produtiva para que se evite erros na propagação de espécies invasoras de difícil controle.

O primeiro capítulo desta tese apresenta estudos de diversidade em populações nativas de diferentes ecossistemas brasileiros, uma estratégia de identificação e caracterização de genótipos, a fim de gerar informações relevantes a serem utilizados por BAGs em processos de conservação, seleção e pré-melhoramento. Além disso, abrimos a proposta de padronização das futuras caracterizações genotípicas da espécie, utilizando marcadores microssatélites disponíveis no GenBank para facilitar processos de alinhamento, clusters, rede de haplótipos, entre outros. Afinal, apesar da existência de estudos prévios com populações de pimenta rosa, a opção por marcadores dominantes impossibilita a utilização desses dados em efeito comparativo, inviabilizando a construção de uma rede de informações de amplo acesso (WILLIAMS et al., 2002; RUAS et al., 2011; SOUZA et al., 2014).

Dessa maneira, no segundo capítulo, é demonstrada a aplicabilidade e praticidade da padronização do emprego de marcadores moleculares pelos pesquisadores. Utilizando sequências intergênicas da espécie disponíveis no Genbank, foi realizado o alinhamento entre os acessos deste estudo e outros coletados em diferentes países, possibilitando a detecção de polimorfismos intravarietais diferenciando as populações, assim como a construção de uma rede de haplótipos revelando um ancestral comum que pode responder a alguns questionamentos sobre o processo dispersivo e colonizador da pimenta rosa (WILLIAMS et al., 2007; MUKHERJEE et al., 2012).

Finalmente, diante de tantos questionamentos em relação aos riscos ecológicos de se propagar uma espécie invasora, no capítulo três é apresentada uma alternativa à

continuidade da exploração comercial da espécie através do cultivo *in vitro* de *hairy roots*. Uma oportunidade de se atingir um produto final de altíssima qualidade e uniformidade para ser destinado à indústria farmacêutica, ambientalmente controlado em câmaras de crescimento, aumentando a predictabilidade e uniformidade na produção de metabólitos secundários. Para viabilizar esse procedimento, foi desenvolvido um protocolo de transformação mediada por *Agrobacterium rhizogenes*, através da agroinfiltração de folhas jovens da espécie e que também possibilitou a seleção de uma linhagem elite para propagação *in vitro*. Esse protocolo poderá ser amplamente empregue na superexpressão e indução de rotas metabólicas para produção de terpenos e otimizará a rotina laboratorial, pela praticidade de procedimentos e alta frequência de resultados (RAO e RAVISHANKA, 2002; KARUPPUSAMY, 2009).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMASSY JÚNIOR, A.A.; **SILVA, A.F.**; FONSECA, M.C.M. Conhecimento tradicional do uso medicinal das plantas. **Informe Agropecuário,** v.31, p.20-26, 2010.

BARBOSA, L.C.A.; DEMUNER, A.J.; CLEMENTE, A.D.; PAULA, V.F. Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Química Nova**, v.30, p.1959-1965, 2007.

BENDAOUD, H.; ROMDHANE, M.; SOUCHARD, J. P.; CAZAUX, S.; BOUAJILA, J. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of Schinus Molle L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. **Journal of Food and Science**, v.75, p.466-72, 2010.

BRASIL. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.** Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Brasília : Ministério da Saúde, 2009. 136p.

BRASIL. **Projetos de plantas medicinais receberão apoio financeiro.** Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. 2014. Disponível em: <http:www.brasil.gov.br/saude/2014/10/projetos-de-plantas-medicinais-receberao-apoio-financeiro>.

CANTER, P.H.; THOMAS, H.; ERNST, E. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v.23, p.180-185, 2005.

CARNEIRO, F.M.; SILVA, M.J.P.; BORGES, L.L.; ALBERNAZ, L.C.; COSTA, J.D.P. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. Revista Sapiência, v.3; p. 44-75, 2014.

CARVALHO, M.G.; MELO, A.G.N.; ARAGÃO, C.F.S.; RAFFIN, F.N.; MOURA, T.F.A.L. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.15, p.158-169, 2013.

CESARIO, L.F.; GAGLIONE, M.C. Biologia floral e fenologia reprodutiva de Schinus terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae) em Restinga do Norte Fluminense. **Acta Botanica Brasilica**, v.22, p.828-833, 2008.

CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro.** Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2011. 934p.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N.; PRADO, M.R.M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebenthifolius* Raddi. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, p.617-622, 2005.

EL-MASSRY, K.F.; EL-GHORAB, A.H.; HAABAN, H.A.; SHIBAMOTO, T. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. **Journal of Agricculture and Food Chemistry**, v. 57, p.5265–5270, 2009.

FORMAGIO, A.S.N.; IRIGUCHI, E.K.K.; ROVEDA, L.M.; VIEIRA, M.C.; CARDOSO, C.A.L.; HEREDIA ZARATE, N.A.H.; TABALDI, L.A.; KASSUYA, C.A.L. Chemical Composition and Anti-Inflammatory Activity of the Essential Oil of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) Fruits. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.30, p.1555-1559, 2011.

GUNDIDZA, M.; GWERU, N.; MAGWA, M..L.; MMBENGWA, V.; SAMIE, A. The chemical composition and biological activities of essential oil from the fresh leaves of *Schinus terebinthifolius* from Zimbabwe. **African Journal of Biotechnology**, v.8, p.7164-7169, 2009.

INVASIVE SPECIES SPECIALIST GROUP. **Global invasive especies database: Hundreds of World's worst invasive alien species.** 2013. Disponível em: <http://www.issg.org/database/species>

JOSÉ, A.C.; DAVIDE, A.C.; OLIVEIRA, S.L. Produção de mudas de aroeira (Schinus terebinthifolius Raddi) para recuperação de áreas degradadas pela mineração de bauxita. **Cerne**, v.11, p.187-196, 2005.

KARUPPUSAMY, S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.13, p.1222-1239, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil**: nativas e exóticas. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2008. 544 p.

MATSUO, A.L.; FIGUEIREDO, C.R.; ARRUDA, D.C.; PEREIRA, F.V.; SCUTTI, J.A.B.; MASSAOKA, M.H.; TRAVASSOS, L.R.; SARTORELLI, P.; LAGO, J.H.G. A-Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.411, p.449–454, 2011.

MUKHERJEE, A.; WILLIAMS, D.A.; WHEELER, G.S.; CUDA, J.P.; PAL, S.; OVERHOLT, W.A. Brazilian peppertree (*Schinus terebinthifolius*) in Florida and South America: evidence of a possible niche shift driven by hybridization. **Biological Invasions**, v.14, p.1415-1430, 2012.

PINTO, J.V.C. **Nitrogenio e fósforo no crescimento inicial e na composição química do óleo essencial de Schinus terebinthifolius Raddi**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Dourados: UFGD, 2012. 38p.

REFLORA. **List of Species of the Brazilian Flora.** Rio de Janeiro Botanical Garden. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>.

SOUZA, D.C.L.; GOMES, L.J.; BLANK, A.F.; GOIS, I.B.; PEREIRA, G.S.; ALVES, P.B.; SILVA-MANN, R. Characterization of wild genotypes of Aroeira: subsidy for plant breeding. **Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development**, v. 6, p.39-49, 2014.

RAO, R.S.; RAVISHANKAR, G.A. Plant tissue cultures; chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v.20, p.101-153, 2002.

RUAS, E.A.; RUAS, C.F.; MEDRI, P.S.; MEDRI, C.; MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J.A.; RODRIGUES, L.A.; RUAS, P.M. Anatomy and genetic diversity of two populations of *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae) from the Tibagi River basin in Paraná, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.10, p.526-536, 2011.

VÁSQUEZ, S.P.F.; MENDONÇA, M.S.; NODA, S.N. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do município de Manacapurú, Amazônia, Brasil. Acta Amazonica, v.44, p.457-472, 2014.

WILLIAMS, D.A.; STERNBERG, L.S.L. AND HUGHES, C.R. Characterization of polymorphic microsatellite loci in the invasive Brazilian pepper, *Schinus terebinthifolius*. **Molecular Ecology Notes**, v.2, p. 231–232, 2002.

WILLIAMS, D.A.; MUCHUGU, E.; OVERHOLT, W.A.; CUDA, J.P. Colonization patterns of the invasive Brazilian peppertree, *Schinus terebinthifolius*, in Florida. **Heredity**, v.98, p.284-293, 2007.

CAPÍTULO I

DIVERSIDADE DE POPULAÇÕES DE *Schinus terebinthifolius* Raddi NATIVAS EM ECOSSISTEMAS BRASILEIROS, BASEADO EM LOCOS MICROSSATÉLITE

DIVERSIDADE DE POPULAÇÕES DE *Schinus terebinthifolius* Raddi NATIVAS EM ECOSSISTEMAS BRASILEIROS, BASEADO EM LOCOS MICROSSATÉLITE

RESUMO: A pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) é uma planta medicinal de considerável ecoplasticidade e sua coleta extrativista é a principal forma de obtenção de matéria-prima para a indústria farmacêutica, resultando em variação significativa na composição e difícil padronização dos fitoterápicos. Considerando a eminente necessidade de caracterização e seleção de genótipos que atendam a expansão da cadeia produtiva e viabilizem um programa pré-melhoramento da espécie, foram utilizados sete marcadores disponíveis no Genbank e avaliada sua aplicabilidade em estudos de diversidade e variação inter e intrapopulações nativas do Cerrado (CER), Restinga (RES), Floresta ombrófila densa (FOD) e estacional semidecidual (FES). Os sete loci empregados foram polimórficos, apresentando em média de oito alelos cada, demonstrando também eficácia na análise de estrutura genética e diversidade das populações. A análise da estrutura populacional revelou diferença entre populações de 37,72% e índices de fixação significativos. Todas as populações estudadas apresentaram altos índices de diversidade genética. A população representativa do CER apresentou os menores índices de riqueza alélica (2,43) e alelos por locus (2,43 ±0,98), possível evidência de efeito gargalo considerando sua inserção em área circunvizinha a terras pastoris e agricultáveis submetidas a frequente prática de queimadas. O estudo de proporções e análise Bayesiana revelam estreita similaridade entre acessos coletados na RES (Vera Cruz-BA) e FES (Santa Maria-RS) e entre CER (Dourados-MS) e RES (Cairú-BA), comprovando que os padrões de distribuição da espécie não se enquadram dentro do isolamento por distância.

Palavras-chave planta medicinal, pimenta rosa, genética de populações, genótipos, pré-melhoramento

POPULATION DIVERSITY OF *Schinus terebinthifolius* Raddi NATIVE FROM BRAZILIAN ECOSYSTEMS, BASED ON MICROSATELLITE LOCI

ABSTRACT: Brazilian peppertree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) is a medicinal plant widely distributed throughout Brazilian ecosystems. Its extractive exploitation is the main route to supply of raw material for the industries which results on significant variation of compounds and difficult standardization of herbal medicines. To assure an increasing expansion of this productive chain it's crucial to start by studying population diversity, their naturally occurring ecosystems and choosing genotypes to enable pre-breeding programs of the species. Therefore we used SSR markers available on GenBank and evaluated its applicability on studies of diversity inter and intrapopulations native from Cerrado (CER), sandbanks (RES), dense rain forest (FOD) and semi-deciduous forest (FES). The seven loci were polymorphic with an average of 8 alleles each and showed effectiveness during studies on genetic structure and diversity of native populations. Analysis on population structure revealed differences among populations (37.72%) and significant fixation rates. All studied populations showed high levels of genetic diversity. The population from CER showed the lowest allelic richness (2.43) and alleles per locus (2.43 ± 0.98), a possible evidence of bottleneck effect if we consider it's surrounded by pastoral and agricultural land subject to annual fire regimes. Pairwise studies and Bayesian analysis reveals close similarity between populations from RES (Vera Cruz-BA) and FES (Santa Maria-RS) and between CER (Dourados-MS) and RES (Cairú-BA), proving that the patterns of distribution for the species do not follow the isolation by distance.

Keywords medicinal plant, Brazilian peppertree, population genetics, genotypes, pre-breeding

1. INTRODUÇÃO

Schinus terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae), comumente conhecida como pimenta rosa (pink pepper), pimenta brasileira (Brazilian pepper), falsa pimenteira (faux poivrier), é uma espécie nativa de Mata Atlântica e de considerável ecoplasticidade. No Brasil, é observável em ecossistemas de restinga ao sul de Pernambuco a florestas semi-deciduais de altitude no Rio Grande do Sul. Arvoreta perene, medindo de 3 a 7 m, adquire características de pioneira em áreas degradadas com rápido e agressivo desenvolvimento, impedindo a regeneração de outras espécies. Apresenta dispersão por praticamente todos os continentes, colonizando áreas de agricultura abandonadas, florestas degradadas, regiões costeiras, áreas inundadas, zonas riparinas, o que influenciou sua classificação entre as 100 piores espécies invasoras do planeta (CUDA et al., 2004; WILLIAMS et al., 2007; LORENZI, 2008; ISSG, 2013).

Por outro lado, a pimenta rosa é reconhecida por suas propriedades medicinais. A casca, as folhas e frutos são amplamente utilizados na medicina tradicional como anti-inflamatório, antipirético, analgésico e agente depurativo (CARVALHO et al., 2013).

Nos últimos anos, um considerável número de estudos farmacológicos vêm comprovando sua atividade antimicrobiana, antioxidante e antitumoral, de maneira a encorajar o Ministério da Saúde no Brasil a incluí-la dentre as espécies de potencial terapêutico a serem distribuídas pelo Sistema Único de Saúde – SUS (DI STASI et al., 2002; AMORIM, 2003; DEGÁSPARI et al., 2005; RIBAS et al., 2006; BRASIL, 2009; EL-MASSRY et al., 2009; BENDAOUD et al., 2010; FORMAGIO et al., 2011; MATSUO et al., 2011).

No entanto, as mesmas prospecções realizadas com extratos e óleo essencial da espécie têm apresentado variações significativas em sua composição, levando à separação de quimiotipos com diferenças inclusive farmacológicas. Este fenômeno leva à reflexão de uma eminente necessidade de caracterização e seleção de genótipos que atendam a expansão da cadeia produtiva e viabilizem um programa pré-melhoramento da espécie antes de sua inserção no mercado. Para agilizar esta etapa do conhecimento, o uso de marcadores moleculares apresenta-se como ferramenta mais adequada aos estudos de diversidade genética e, nesse sentido, o uso de microssatélites vem

substituindo rapidamente outros marcadores devido à sua simplicidade, baixo custo, alta reprodutibilidade, grande poder de resolução, requerendo pequena quantidade de DNA (CAIXETA et al., 2009; GUNDIDZA et al., 2009;).

Além disso, os marcadores do tipo microssatélites possuem características consideradas desejáveis em estudos de genética de populações, como o alto nível de polimorfismo e herança codominante que permite a distinção entre homozigotos e heterozigotos. As sequências de DNA que flanqueiam microssatélites são conservadas, permitindo a seleção de *primers* para a sua amplificação a análise de polimorfismo é baseada nas diferenças de comprimento das sequências devido a diferença no número de motivos repetidos. A variabilidade e taxa de mutação elevada desses marcadores os torna particularmente úteis para estimar os níveis de diversidade genética em populações naturais (ELLEGREN, 2004; ARANGUREN-MÉNDEZ et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006; VÄLI et al., 2008).

Alguns estudos prévios de diversidade e estrutura espacial foram realizados com populações distintas da pimenta rosa. Williams et al. (2005) observaram a ocorrência de maior diversidade genética entre exemplares nativos do Brasil e Argentina, mas também relataram a predominância de déficits de heterozigose nas populações nativas e forte estruturação das mesmas, resultando em aumentos na diferenciação e isolamento por distância entre essas populações. Por outro lado, estudos com populações nativas de regiões riparinas das regiões Sul e Nordeste do Brasil levaram os autores a conclusões distintas sobre padrões de distribuição da espécie devido a menores taxas de diversidade encontradas, mas é preciso ressaltar que nesses trabalhos foram utilizaram marcadores dominantes ISSR (RUAS et al., 2011; SOUZA et al., 2014).

Ainda existem muitas lacunas relacionadas às características de distribuição e dispersão da espécie, sobretudo porque os grupos amostrais em trabalhos anteriores foram sempre restritos a uma pequena região ecogeográfica. Estudar as diversidade entre acessos de ecossistemas distintos é crucial para compreender os mecanismos de adaptação e processos de fragmentação que levariam à distinção de genótipos, antes mesmo da seleção de características fenotípicas para programas de melhoramento.

Neste sentido, o conjunto de objetivos aqui propostos são: 1) avaliar a aplicabilidade de marcadores microssatélites disponíveis no Genbank para estudos de diversidade em populações nativas de diferente ecossistemas brasileiros; 2) determinar os índices de variação inter e intrapopulacionais; 3) fornecer material propagativo e informações relevantes à conservação de genótipos em bancos de germoplasma; 4) contribuir com a identificação e seleção de genótipos para sua inserção na cadeia produtiva e programas de pré-melhoramento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e extração de DNA

Folíolos frescos e saudáveis de acessos nativos de pimenta rosa foram coletados aleatoriamente em plantas de cinco diferentes regiões do Brasil (Tabela 1, Figura 1), a fim de representar diferentes grupos ecogeográficos para estudos de diversidade. Excicatas de acessos coletados em Vera Cruz – BA, Cairú – BA, São Mateus – ES, Santa Maria – RS e Dourados - MS foram depositadas no Herbario da UFGD (DDMS 4872, 4873, 4874, 4875 e 4876, respectivamente).

Tabela 1. Populações de pimento rosa (*S. terebinthifolius)* nativas em ecossistemas brasileiros analisadas com base em locos microssatélites. UFGD, Laboratório de Plantas Medicinais, 2014.

G	Origem	Ecossistema	Latitude S	Longitude O	Altitude (m)	Clima	IP (mm)	T◦C
ES	São Mateus ES	FOD	18º43’00”	39º51’31”	38	Aw	1313	24.1
SM	Santa Maria RS	FED	29º41’02”	53º48’25”	151	Cfa	1617	18.8
ITA	Vera Cruz BA	Restinga	12º57’32"	38º36'16”	13	As	1874	25.1
MSP	Cairú BA	Restinga	13º23’22”	38º54’36”	19	Af	2151	25.3
DDO	Dourados MS	Cerrado	22º13’15”	54º48’21”	430	Cw	1400	23.6

*G *Genótipo*, BA *Bahia*, ES *Espírito Santo*, MS *Mato Grosso do Sul*, RS *Rio Grande do Sul*. FOD *Floresta ombrófila densa* FED *Floresta estacional decidual* IP *Índice Pluviométrico*

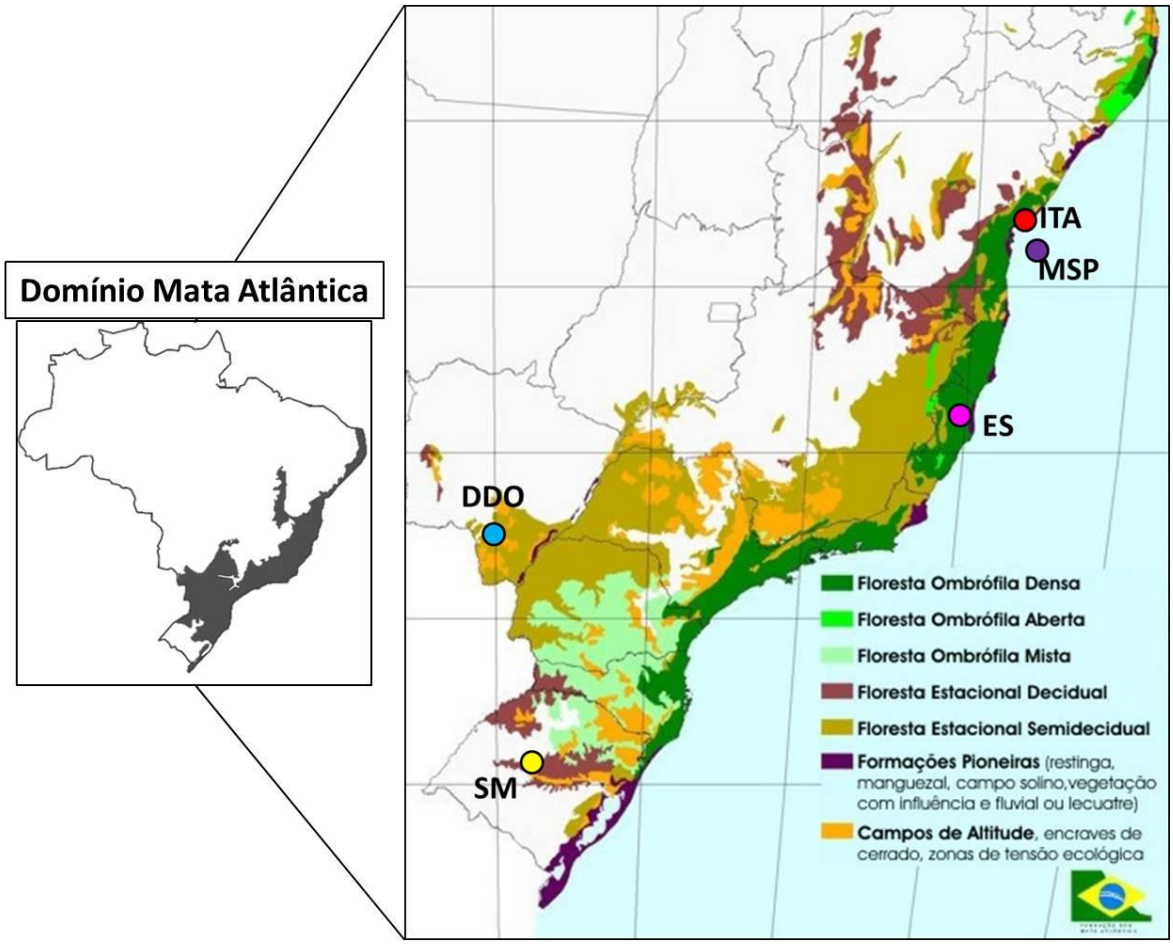

Figura 1. Distribuição das populações de pimenta rosa estudadas em diferentes ecossistemas brasileiros, todos inseridos em bioma Domínio Mata Atlântica. Genótipos ES *São Mateus-ES*, SM *Santa Maria-RS*, ITA *Vera Cruz–BA*, MSP *Cairú–BA*, DDO *Dourados–MS*. UFGD, Laboratório de Plantas Medicinais, 2014. (Mapa Fisionomias Vegetais Originais. Fonte: INPE, http://mapas.sosma.org.br/).

Após coleta, o material foi esterilizado em solução de NaClO (3%) durante 5 minutos, enxaguado, secado, ensacado e estocado a 4ºC, aguardando maceração em nitrogênio líquido. O DNA genômico foi extraído de tecido foliar utilizando protocolo CTAB, descrito por Doyle e Doyle (1990).

Microssatélites

As reações de amplificação foram realizadas utilizando sete microssatélites adaptados de Williams et al., 2002 (StAAT1, StAAT9, StAAT16, StAAT17, StAAT25, StAAT47, StAAT55), no sistema multiplex com dois marcadores por reação (Tabela 2).

O volume final de cada reação foi de 25 µl, contendo: 4,5 µl de água ultrapura, 12,5 µl de master mix para PCR (Thermo Scientific®), 1,0 µl de cada primer, 2U de Tropica Taq DNA Polimerase (Thermo Scientific®) e 2,3 µl de DNA (25-30 ng μl^{-1}).

As reações foram acondicionadas em termociclador (BioRad®) com programação para desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C for 30 segundos, temperatura de anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Ao final de 30 ciclos, foi realizada uma etapa de polimerização a 72 °C por 10 minutos.

Após PCR, os produtos de amplificação foram aliquotados (5 µL) e separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6% submetido a diferença de potencial a 70W por 2 horas. Marcadores de massa molecular de 10pb (Thermo Scientific®) foram aliquotados nos fossos das extremidades das placas como referência ao tamanho dos fragmentos das bandas. Após eletroforese, o gel foi corado com nitrato de prata.

Tabela 2. Marcadores polimórficos utilizados na genotipagem de populações nativas de pimenta rosa. Loci dos microssatélites, sequência dos primers (5' – 3'), temperature de anelamento, número de alelos e número de depósito no GenBank.

Multiplex	Locus	Sequências 5'-3'	T (ºC)	nº alelos	Genbank nº de acesso
M1	*St*AAT25*	ATTTGGAAAATAATAATAATAATA CGTGCAGAACTTCAATTTTGATTG	50º	6	AF404285.1
	*St*AAT55*	AAGGGGTTAAAAAATAATCAAACT TAATAACTATGTTAGGTTAGATAG	50º	10	AF404289.1
M2	*St*AAT16#	AACAGCCCACCATTTTAACAA TGGGTAGGTGATGCAGTTCTA	50º	7	AF404282.1
	*St*AAT47#	CCTCTTAAGGAACTTTTTATTATT TTGCTTTTCATTTGTTTATCTTAC	50º	4	AF404287.1
M3	*St*AAT17*	TTGGGTTAAATTGGTAGGTGTAAT AGGGGAAATGAAATCATCCTTATT	50º	7	AF404283.1
	*St*AAT9#	ATTTGGTGAATAGGAGATGTTTTA ATTGAAATGTTTGGTTCATAGATA	50º	7	AF404280.1
_	*St*AAT1*	AAGGGTGAGAATCTGAAATTTA GGCAAACCCATTAGTGAGTTTA	50º	12	AF404279.1

* Primers redesenhados com base nas sequências publicadas em banco de dados do Genbank, adaptadas a partir de Williams et al., 2002. # Primers desenhados de acordo com Williams et al., 2002.

Análise de dados

A frequência alélica foi estimada através de contagem direta. Os parâmetros relacionados à diversidade dos loci foram estimados considerando todos os microssatélites, em todas as populações, utilizando o programa CERVUS 3.0 (KALINOWSKI et al., 2007). Os parâmetros estimados foram: heterozigoze esperada (He) e observada (Ho), conteúdo de informação polimórfica (PIC) e equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE).

A riqueza alélica (RA) e índices de fixação de Wright (F_{IT}, F_{IS} E F_{ST}) foram calculados com o programa FSTAT, com valores de P ajustados pela correção de Bonferroni (GOUDET, 2002).

As estruturas populacionais foram avaliadas através da análise de variância molecular (AMOVA) utilizando o programa ARLEQUIN (SCHNEIDER et al., 2000),

revelando a diversidade dentro e entre populações. O dendrograma foi construído considerando análise dos clusters através do método Neighbor-Net com ajuda do programa SLIPTREE, com base nos cálculos de distância de Reynold (F_{ST}) utilizando FSTAT.

De acordo com a frequência alélica encontrada para cada loci microssatélite, os acessos foram agrupados em populações e probabilisticamente marcados em grupos inferidos pela análise Bayesiana utilizando o programa STRUCTURE (PRITCHARD et al., 2000). Os testes foram realizados considerando modelo misto em relação à frequência alélica. Para selecionar o número apropriado de populações inferidas, foram realizadas diferentes análises com k (número de populações) variando de 2 a 6, considerando 30.000 interações (burn-in de 3000) e três replicações independentes para cada análise. Os valores reais de K foram inferidos dentro da magnitude de ΔK e em função de K, com ajuda do programa Structure Harvester (EARL e VON HOLDT, 2012) seguindo modelo de Evanno et al. (2005).

3. RESULTADOS

A análise da estrutura populacional revelou diferença entre populações de 37,72% (Tabela 3) e índices de diferenciação significativos com base no F_{ST} (P<0,001).

Tabela 3. Análise de Variância Molecular (AMOVA) inter e entre populações nativas de pimenta rosa. UFGD, Laboratório de Plantas Medicinais, 2014.

Fonte de variância	GL	Variação (%)	IF
Interpopulações	4	37,72	F_{ST} = 0,37717*
Intrapopulação	145	62,68	

* P <0.001 GL *grau de liberdade*; IF *índice de fixação.*

Os parâmetros avaliados para a caracterização genotípica dos acessos de cinco populações, baseado em sete loci microssatélites, estão descritos na Tabela 4. A população ES (São Mateus-ES) apresentou maior número de alelos por locus (5,14) e maior riqueza alélica (4,98); no entanto, a maior diversidade foi apresentada pela população de SM (Santa Maria-RS) (0,53). A população DDO (Dourados-MS)

apresentou menor número de alelos (2,43) e riqueza alélica (2,43); mas a menor diversidade genética (0,44) foi observada em MSP (Cairú-BA).

Tabela 4. Caracterização da variabilidade genética entre populações nativas de pimento rosa, baseada em loci microssatélites. UFGD, Laboratório de Plantas Medicinais, 2014.

População	N	NA	Heterozigose		RA	DG	F	Loci em HWE
			observada	esperada				
ES	30	5.14±3.24	0.52 ± 0.03	0.64 ± 0.07	4.98	0.52	0.184	4
SM	31	4.29± 1.25	0.57 ± 0.03	0.53 ± 0.08	4.06	0.53	-0.067	3
ITA	26	3.71 ± 1.38	0.52 ± 0.04	0.51 ± 0.04	3.70	0.51	-0.022	2
MSP	28	3.14 ± 1.77	0.39 ± 0.04	0.43 ± 0.07	3.10	0.44	0.114	3
DDO	30	2.43± 0.98	0.58 ± 0.03	0.46 ± 0.09	2.43	0.47	-0.224	4

ES *São Mateus-ES*; SM *Santa Maria-RS*; ITA *Vera Cruz-BA*; MSP *Cairú-BA*; DDO *Dourados-MS*; N *numero de acessos*; NA *numero médio de alelos*; RA *riqueza alélica*; D *diversidade genética;* F *índice de endogamia;* HWE *numero de loci em equilíbrio de Hardy-Weinberg*.

Quando todas as populações foram analisadas juntas, todos os loci microssatélites apresentavam-se dentro do equilíbrio Hardy-Weinberg. No entanto, ao se avaliar as populações separadamente, os loci em eqHW foram: ES (*St*AAT01, *St*AAT09, *St*AAT17, *St*AAT55); SM (*St*AAT01, *St*AAT16, *St*AAT55); ITA (*St*AAT01, *St*AAT09); MSP (*St*AAT01, *St*AAT09, *St*AAT17) e DDO (*St*AAT01, *St*AAT16, *St*AAT17, *St*AAT55).

Pela matriz de diferenciação entre populações, com base nos índices F_{ST}, observou-se que o maior índice de diferenciação foi apresentados pela população de DDO, seguido por MSP (Tabela 5).

Tabela 5. Divergência genética par a par entre populações nativas de pimenta rosa. (ES – São Mateus; SM – Santa Maria; ITA - Itaparica; MSP – Morro de São Paulo). UFGD, Laboratório de Plantas Medicinais, 2014.

	ES	**SM**	**ITA**	**MSP**	**DDO**
ES					
SM	0.31566				
ITA	0.32214	0.16418			
MSP	0.44273	0.38543	0.37128		
DDO	0.42734	0.43038	0.45056	0.36869	

Análise Neighbor-Net confirma maior proximidade entre as populações SM e ITA, revelando também considerável distância entre esta última e a de MSP, apesar de estarem inferidas no mesmo grupo ecogeográfico (Figura 2).

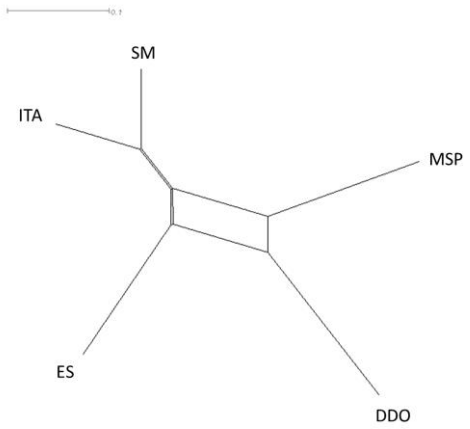

Figura 2. Dendograma Neighbor-Net baseado na distância de Reynold (F_{ST}) de sete loci microssatélites. O gráfico apresenta as relações de proximidade gênica entre as cinco populações estudadas. *ES *São Mateus-ES* SM *Santa Maria-RS* ITA *Vera Cruz-BA* MSP *Cairú-BA* DDO *Dourados-MS*. UFGD, Laboratório de Plantas Medicinais, 2014.

A Tabela 6 apresenta as proporções de cada população estudada associadas aos cinco grupos inferidos pelo programa STRUCTURE. O Cluster 1 representa a população de São Mateus-ES único grupo a apresentar alocação correta de seus indivíduos dentro de sua respectiva população com índice de alocação de 98,3%.

Tabela 6. Número de indivíduos (N) por população e associação proporcional de cada população em cada grupo inferido pelo programa STRUCTURE. Associações superiors a 0.5 estão em negrito. UFGD, Laboratório de Plantas Medicinais, 2014.

Populations	Inferred clusters					
	1	2	3	4	5	N
ES	**0.983**	0.007	0.004	0.002	0.003	30
SM	0.012	0.057	**0.920**	0.004	0.006	28
ITA	0.005	**0.921**	0.065	0.004	0.006	26
MSP	0.003	0.009	0.006	0.018	**0.964**	28
DDO	0.002	0.003	0.003	**0.987**	0.005	30

Cluster 1 *São Mateus-ES* Cluster 2 *Santa Maria-RS* Cluster 3 *Vera Cruz-BA* Cluster 4 *Cairú-BA* Cluster 5 *Dourados-MS*

A estrutura das populações foi analisada através do método Bayesiano utilizando o programa STRUCTURE. O grupamento k = 5 (Figura 3) corresponde ao k real, seguindo metodologia proposta por Evano (2005), sendo possível observar complexos padrões de miscigenação entre as populações estudadas apesar da representação de cada população em grupo distinto no diagrama.

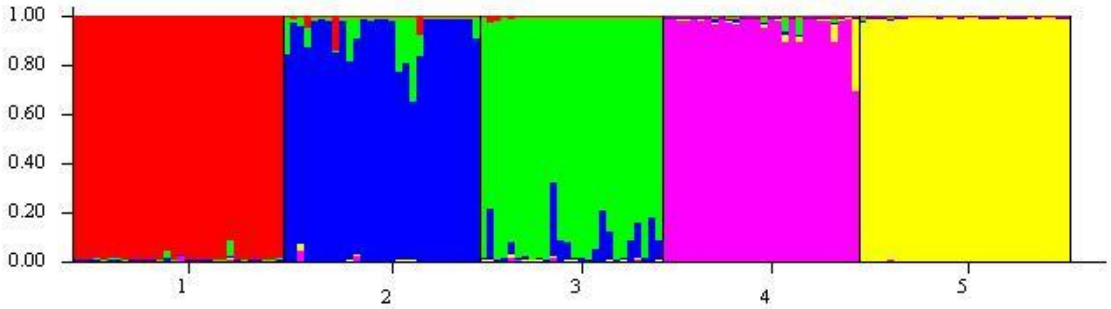

Figura 3. Grupamento de 142 acessos de cinco populações nativas de pimenta rosa, analisados pelo método Bayesiano através do programa STRUCTURE. Cada indivíduo é representado por uma linha vertical dividida em cores, baseado na semelhança genotípica em relação às populações inferidas pelo programa. *1- *São Mateus-ES*; 2- *Santa Maria-RS*; 3- *Vera Cruz-BA*; 4- *Cairú-BA*; 5- *Dourados-MS*. UFGD, Laboratório de Plantas Medicinais, 2014.

4. DISCUSSÃO

Considerando a caracterização dos microssatélites, todos os sete loci empregados neste estudo foram polimórficos, apresentando em média de 8 alelos cada (Tabela 2); assim como todos os acessos resultaram produtos amplificados para os diferentes loci, comprovando que os primers de Williams et al. (2002) podem ser aplicados de maneira eficaz na análise de estrutura genética e diversidade de populações nativas de pimenta rosa, independente de sua localização, desde que realizadas as adaptações apresentadas na tabela 2.

Como esperado para uma espécie de polinização cruzada, visto que a dioicia é uma de suas características, os índices de endogamia (Tabela 4) foram baixos, um indicativo de que mesmo em populações de tamanho finito como MSP (coletada na localidade de Morro de São Paulo, Ilha de Cairú – BA) os cruzamentos mantêm níveis satisfatórios de aleatoriedade.

A endogamia refere-se a um sistema onde indivíduos relacionados cruzam a uma taxa maior do que a esperada, levando a reduções na heterozigosidade e perdas do vigor reprodutivo, aumentando os riscos de extinção. Apesar de a pimenta rosa ser uma planta colonizadora agressiva, é importante estudar os índices de ocorrência de endogamia em populações nativas estruturadas da espécie pois, sob o ponto de vista etnofarmacológico, importantes quimiotipos podem ocorrer de maneira endógena e o reconhecimento dos padrões evolutivos da espécie facilitariam a implantação de planos de proteção aos mesmos (FRANKHAM et al., 2008).

Para as populações nativas de Santa Maria-RS (Floresta estacional decidual) e Dourados-MS (Cerrado), os valores negativos e significativamente diferentes de zero, nos respectivos índices de endogamia podem revelar um aumento recente na heterozigosidade. Se for considerado que ambos locais de coleta encontram-se em áreas classificadas recentemente como ‘Zona de Tensão Ecológica’ situadas em interfaces de diferentes ecossistemas devido a pressões antrópicas (desmatamento, queimadas, povoamento, etc.), pode-se inferir que esteja ocorrendo um rompimento no isolamento das populações e esta abertura talvez venha facilitando cruzamentos interpopulacionais próximos devido à ampliação do raio de acesso de agentes polinizadores. Esta hipótese

pode também ser sustentada pelos valores de heterozigose observada (0,57 e 0,58) superiores aos esperados (0,53 e 0,46, respectivamente).

Todas as cinco populações estudadas apresentaram altos índices de diversidade genética (Tabela 4), demonstrando que sequer o tempo ou pressão antrópica foram suficientes para perturbar seus padrões de distribuição. Possivelmente graças à alta densidade espacial e aos mecanismos eficientes de dispersão de sementes, que permitiram à espécie intensa troca gênica e consequente recombinação genotípica, aumentando seu potencial evolutivo e capacidade de adaptação.

A população SM apresentou a maior diversidade genética (0,53), no entanto sem diferenças estatísticas em relação aos índices apresentados por ES (0,52) e ITA (0,51). A maior riqueza alélica (4,98) e número de alelos por loci (5,14) foram obtidos pela população ES, coincidentemente região ecogeográfica de maior preservação em comparação às demais (Floresta ombrófila densa). No entanto, essa mesma população também apresentou índice de heterozigosidade esperada (0,64) superior à observada (0,52), um possível indício de aumento recente na endogamia que poderia resultar em deriva genética e perda de alelos.

Interessantemente, apesar de manter sua diversidade genética (0,47) equiparável às outras, a população DDO foi a que apresentou os menores índices de riqueza alélica (2,43) e alelos por locus (2,43). Se avaliarmos esses resultados observando que esta população está inserida dentro do bioma Cerrado, em área circunvizinha a terras pastoris e agricultáveis submetidas a frequente prática de queimadas, além da recente expansão demográfica, seria relevante considerar a hipótese de um efeito gargalo eminente, uma vez que a perda do número médio de alelos por locus está intrinsicamente relacionada à deriva genética aleatória recorrente em populações que têm seu tamanho efetivo reduzido drasticamente. Sob esta ótica, a ausência de grande variação a nível de diversidade desta população comparada às demais pode ser explicada pelo pequeno número de gerações que transcorreram desde o início da fragmentação. Quando uma população nativa é submetida a drástica redução, mesmo que o número de alelos também seja reduzido, o grau de heterozigosidade e diversidade podem permanecer inalterados por determinado número de gerações (FUTUYMA, 2009; SILVA, 2010).

Foi detectada uma alta diferenciação entre populações (37,72%), com índice de fixação elevado (F= 0,38*), resultado esperado considerando a distância que separa as regiões ecogeográficas onde as amostras foram coletadas (Tabela 1, Figura 1). A análise Bayesiana (Figura 3) corrobora com esses resultados, ao delimitar claramente as populações com base em suas informações genotípicas; o que nos leva a concordar com Williams et al. (2005) sobre a existência de populações bem estruturadas em seu habitat nativo e que nos auxiliaram na classificação de cinco genótipos bem distintos.

Sabe-se que o grau de diferenciação genética entre populações tem uma íntima relação com seus processos evolutivos - mutação, migração e deriva genética. Dessa maneira, em populações onde ocorram maiores taxas de migração existe uma tendência natural a pouca diferenciação; enquanto que pequenas populações tendem a ser altamente diferenciadas, como também mais propensas à fragmentação e perda de adaptabilidade, especialmente espécies alógamas. Esse fenômeno torna-se evidente no estudo de divergência par a par entre as populações, quando os maiores índices de diferenciação são obtidos, respectivamente por DDO e MSP, populações distintas estabelecidas em área de extensão territorial restrita e geograficamente isoladas (FRANKHAM *et al*., 2008; HOLSINGER e WEIR, 2009).

Além disso, o estudo de proporções de cada população associada aos cinco grupos distintos, revelou estreita similaridade entre acessos de DDO e MSP e entre SM e ITA, também observável no dendograma baseado na distância de Reynold (F_{st}) (Figura 2). Comprovando o que Ruas et al. (2011) já haviam inferido sobre os padrões de distribuição da espécie que não se enquadram dentro do isolamento por distância; contudo, considerando que cada população aqui estudada representa um ecossistema distinto, com características edafoclimáticas distintas, não é possível concluir, como no estudo dos autores, que a similaridade entre as populações seja resultante de condições ambientais equivalentes, parecendo mais relevante a teoria de dispersão estratificada, uma vez que a espécie é muito apreciada por pássaros e roedores (SUAREZ et al., 2001; WILLIAMS et al., 2007). Neste sentido, sugerimos que estudos mais detalhados de distribuição de haplótipos, baseados em regiões conservadas do cpDNA, sejam realizados para melhor elucidação de suas características de filogenia e fragmentação.

O material propagativo coletado, assim como as informações resultantes deste estudo serão destinadas ao Banco Ativo de Germoplasma do Grupo de Pesquisa em Olericultura e Plantas Medicinais da UFGD.

AGRADECIMENTOS À Capes, ao CNPq e à FUNDECT - MS pelo financiamento do projeto e concessão de bolsas.

5. REFERÊNCIAS

AMORIM, M.M.R. Tratamento da vaginose bacteriana com gel vaginal de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Ensaio Clínico Randomizado. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.25, p.95-102, 2003.

ARANGUREN-MÉNDEZ, J.A.; ROMÁN-BRAVO, R.; ISEA, W.; VILLASMIL, Y. AND JORDANA, J. Los microsatélites (STR´s), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. **Arch. Latinoam. Prod. Anim**., v.13, p.1-6, 2005.

BENDAOUD, H.; ROMDHANE, M.; SOUCHARD, J. P.; CAZAUX, S.; BOUAJILA, J. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of Schinus Molle L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. **Journal of Food and Science**, v.75, p.466-72, 2010.

BRASIL. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.136 p.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. **Tipos de marcadores moleculares**. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (eds). Marcadores moleculares. 2.ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009. p.11-93.

CARVALHO, M.G.; MELO, A.G.N.; ARAGÃO, C.F.S.; RAFFIN, F.N.; MOURA, T.F.A.L. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.15, p.158-169, 2013.

CUDA, J.P.; HABECK, D.H.; HIGHT, S.D.; MEDAL, J.C.; PEDROSA-MACEDO, J.H. (2004). **Brazilian peppertree, *Schinus terebinthifolius*: Sumac family-Anacardiaceae**. In: COOMBS, E.; CLARK, J.; PIPER, G.; COFRANCESCO, A. (eds). Biological Control of Invasive Plants in the United States. Corvallis: Oregon State University Press. 2004. p.439–441.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N.; PRADO, M.R.M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebenthifolius* Raddi. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29,

p.617-622, 2005.

DI STASI, L.C.; OLIVEIRA, G.P.; CARVALHAES, M.A.; QUEIROZ-JR, M.; TIEN, O.S.; KAKINAMI, S.H.; REIS, M.S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v.73, p.69-91, 2002.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

EARL, D.A.; VONHOLDT, B.M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetic Resources**, v.4, p.359–361, 2012.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, v.5, p.435-445, 2004.

EL-MASSRY, K.F.; EL-GHORAB, A.H.; HAABAN, H.A.; SHIBAMOTO, T. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. **Journal of Agricculture and Food Chemistry**, v. 57, p.5265–5270, 2009.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v.14, p.2611–2620, 2005.

FORMAGIO, A.S.N.; IRIGUCHI, E.K.K.; ROVEDA, L.M.; VIEIRA, M.C.; CARDOSO, C.A.L.; HEREDIA ZARATE, N.A.H.; TABALDI, L.A.; KASSUYA, C.A.L. Chemical Composition and Anti-Inflammatory Activity of the Essential Oil of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) Fruits. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.30, p.1555-1559, 2011.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de Genética da Conservação.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 2008. 280p.

FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**. 3.ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 2009. 830p.

GOUDET, J. **FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices** (version 2.9.3.2). Lausanne: University of Lausanne, Department of Ecology & Evolution. 2002. Disponível em: http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm

GUNDIDZA, M.; GWERU, N.; MAGWA, M..L.; MMBENGWA, V.; SAMIE, A. The chemical composition and biological activities of essential oil from the fresh leaves of *Schinus terebinthifolius* from Zimbabwe. **African Journal of Biotechnology**, v.8, p.7164-7169, 2009.

HOLSINGER, K. E; WEIR, B. S. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting FST. Nature Reviews Genetics, v.10, p.639-650, 2009.

INVASIVE SPECIES SPECIALIST GROUP. **Global invasive especies database: Hundreds of World's worst invasive alien species.** 2013. Disponível em: <http://www.issg.org/database/species>

KALINOWSKI, S.T.; TAPER, M.L.; MARSHALL, T.C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v.16, p.1099-1106, 2007.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 5.ed. v.1. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2008. 384p.

MATSUO, A.L.; FIGUEIREDO, C.R.; ARRUDA, D.C.; PEREIRA, F.V.; SCUTTI, J.A.B.; MASSAOKA, M.H.; TRAVASSOS, L.R.; SARTORELLI, P.; LAGO, J.H.G. A-Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.411, p.449–454, 2011.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENVOVSKY, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.294-307, 2006.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v.155, p.945–959, 2000.

RIBAS, M.O.; SOUSA, M.H.; SARTORETTO, J.; LANZONI, T.A.; NORONHA, L.; ACRA, L.A. Efeito da *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre o processo de reparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato. **Revista Odonto Ciência**, v.21, p.245-252, 2006.

RUAS, E.A.; RUAS, C.F.; MEDRI, P.S.; MEDRI, C.; MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J.A.; RODRIGUES, L.A.; RUAS, P.M. Anatomy and genetic diversity of two populations of *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae) from the Tibagi River basin in Paraná, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.10, p.526-536, 2011.

SOUZA, D.C.L.; GOMES, L.J.; BLANK, A.F.; GOIS, I.B.; PEREIRA, G.S.; ALVES, P.B.; SILVA-MANN, R. Characterization of wild genotypes of Aroeira: subsidy for plant breeding. **Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development**, v. 6, p.39-49, 2014.

SILVA, M.C. **Diversidade genética, sistema de reprodução, estrutura genética espacial e fluxo gênico em Tabebuia aurea (Silva Manso) Benth. & Hook. f. ex S.**

Moore no Cerrado. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba. 2010. 162p.

SHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin: a software for population genetics data analysis.** User manual ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva. 2000.

SUAREZ, A.V.; HOLWAY, D.A.; CASE, T.J. (2001). Patterns of spread in biological invasions dominated by long-distance jump dispersal: insights from Argentine ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.98, p.1095–1100, 2001.

VÄLI, U.; EINARSSON, A.; WAITS, L.; ELLEGREN, H. To what extent do Microsatellite markers reflect genome-wide genetic diversity in natural populations? **Molecular Ecology**, v.17, p.3808-3817, 2008.

WILLIAMS, D.A.; STERNBERG, L.S.L. AND HUGHES, C.R. Characterization of polymorphic microsatellite loci in the invasive Brazilian pepper, *Schinus terebinthifolius*. **Molecular Ecology Notes**, v.2, p. 231–232, 2002.

WILLIAMS, D.A.; OVERHOLT, W.A.; CUDA, J.P.; HUGHES, C.R. Chloroplast and microsatellite DNA diversities reveal the introduction history of Brazilian peppertree (*Schinus terebinthifolius*) in Florida. **Molecular Ecology**, v.14, p.3643-3656, 2005.

WILLIAMS, D.A.; MUCHUGU, E.; OVERHOLT, W.A.; CUDA, J.P. Colonization patterns of the invasive Brazilian peppertree, *Schinus terebinthifolius*, in Florida. **Heredity**, v.98, p.284-293, 2007.

CAPÍTULO II

POLIMORFISMOS INTRAVARIETAIS EM POPULAÇÕES NATIVAS REVELAM ANCESTRAL COMUM DE *Schinus terebinthifolius* Raddi

POLIMORFISMOS INTRAVARIETAIS EM POPULAÇÕES NATIVAS REVELAM ANCESTRAL COMUM DE *Schinus terebinthifolius* Raddi

RESUMO: *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) é uma arboreta perene nativa da Mata Atlântica, de alta ecoplasticidade e amplamente usada na medicina tradicional. Em razão dos últimos relatórios promissores sobre a sua bioatividade, a planta foi incluída entre as espécies de grande interesse de distribuição através do Sistema Único de Saúde (SUS) e, como resultado, inúmeras pesquisas estão sendo realizadas afim de guiar sua cadeia produtiva. Este trabalho envolveu estudos de diversidade e filogenia entre populações nativas de diferentes ecossistemas no Brasil: Cerrado (Dourados-MS), restinga (Vera Cruz-BA e Cairú-BA), floresta ombrófila adensada (São Mateus-ES) e estacional decidual (Santa Maria-RS). As regiões intergênicas do cpDNA rpl20-5'-rps12, trnH-psbA e trnS-trnG foram sequenciadas e submetidas ao alinhamento Blastn. Devido à falta de fragmentos disponíveis para comparação, somente a região trnS-trnG foi informativa, apresentando variações dentro e entre populações com polimorfismos intravarietais, sendo capaz de distinguir 3 haplótipos (HpSM, HpNE e HpDDO), uma vez que as populações do NE (BA e ES) agruparam-se. As sequencias de HpSM, HpNE and HpDDO retornaram grande similaridade com os haplótipos A (AY928398.1), B (AY928399.1) e C (AY928400.1), respectivamente. Uma rede haplotípica foi construída através do método Median-joining entre os haplótipos nativos e outros 10 disponíveis no Genbank, revelando o HpSM como população ancestral de todos os outros haplogrupos. HpDDO apresentou mais mutações e retornou grande similaridade com haplogrupos da Argentina. Embora também possa ser interpretado como hibridização, acredita-se que os SNPs sejam resultado de mecanismos de adaptação a eventos recentes como desflorestamento, queimadas, aumento de temperaturas e seca que levaram à transição da vegetação de Mata Atlântica para Cerrado. Certamente, estudos filogeográficos mais precisos devem ser realizados, mas os resultados já revelam grupos elegíveis a diferentes condições climáticas, passo importante para programas de pré-melhoramento antes do cultivo à campo.

Palavras-chave pimenta rosa, planta medicinal, haplótipos, genética de populações

INTRAVARIETAL POLYMORPHISMS AMONG NATIVE POPULATIONS REVEALS COMMON ANCESTOR OF Schinus terebinthifolius Raddi

ABSTRACT: *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) is a woody perennial native from Atlantic forest of high ecological plasticity and largely used in traditional medicine. Based on latest promising reports concerning its bioactivity, the plant was included among the species of great interest of distribution through the National Health System (SUS) therefore several researches to guide its productive chain are being performed. This work involved studies on diversity and phylogenetic relationships among native populations from different Brazilian ecosystems: Cerrado (Dourados-MS), sandbanks (Vera Cruz-BA and Cairú-BA), dense rain forest (São Mateus-ES) and semi-deciduous forest (Santa Maria-RS). We sequenced the intergenic regions rpl20-5'-rps12, trnH-psbA and trnS-trnG from cpDNA and submitted the sequences to local alignment tool Blastn. Due to a lack of fragments available on Genbank for comparison, only region trnS-trnG was informative, showing variations among and within populations with intravarietal polymorphisms and distinguished 3 haplotypes (HpSM, HpDDO, HpNE), once populations from NE (BA and ES) clustered together. The sequences from HpSM, HpNE and HpDDO returned greater similarity to the haplotypes A (AY928398.1), B (AY928399.1) and C (AY928400.1), respectively. A network was built by Median-joining method among native haplotypes and the 10 available on Genbank and revealed HpSM as origin of all other haplogroups. HpDDO showed more mutations than others and was closely related to haplogroups from Argentina. Although it could be an indicative of hybridization, we believe the SNPs were a response of adapting mechanisms due to events such deforestation, fire regime, rising temperature and drought periods during transition period from Atlantic forest to Cerrado. We surely recommend more detailed phylogeographical studies, but results already point eligible groups for distinct climates as an important step for pre-breeding programs before field propagation.

Keywords Brazilian peppertree, medicinal plant, haplotypes, population genetics

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos países de maior biodiversidade do planeta. Com cerca de 55.000 espécies vegetais catalogadas, sua complexidade florística relevante impede o conhecimento preciso de suas riquezas naturais. Considerando as espécies medicinais nativas, o cenário é ainda mais paradoxal uma vez que, apesar do conhecimento e uso pelos povos tradicionais, poucas foram verdadeiramente investigadas quanto à sua potencialidade terapêutica . Se o foram, são quase nulos estudos relacionados à diversidade genética, padrões de dispersões, diferenças quimiotípicas, dentre outros que auxiliem na seleção de genótipos para programas de pré-melhoramento e efetiva inclusão na cadeia produtiva (ALBUQUERQUE et al., 2007; KINNUP e BARROS, 2012; RIBEIRO et al., 2014).

Em resposta, o Ministério da Saúde instituiu o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e, numa estratégia para incentivar pesquisas direcionadas à prospecção e inserção de plantas medicinais na agricultura familiar, elaborou uma lista de 71 espécies de interesse ao Sistema Único de Saúde. Dentre as espécies, citou-se a pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi – Anacardiaceae), arboreta nativa de Mata Atlântica que se distribui em várias formações vegetais do sul de Pernambuco até o Rio Grande do Sul, ocorrendo naturalmente também no Uruguai, Paraguai e norte da Argentina (EWEL et al., 1982; WILLIAMS et al., 2005; LORENZI, 2008; BRASIL, 2009).

Planta dióica, seus principais agentes polinizadores são himenopteros e alguns dipteras. Seus frutos abundantes, de vermelho vibrante e adocicados, são apreciados por pássaros e mamíferos roedores que desempenham importante papel em sua dispersão. Sua casca, folhas e frutos são utilizados por populações tradicionais como anti-inflamatório, antipirético, analgésico e agente depurativo. Devido à sua ecoplasticidade, a espécie atravessou as fronteiras de seu habitat e encontra-se largamente distribuída por diversas regiões do globo (LENZI et al., 2003; LENZI e ORTH, 2004; JESUS e MONTEIRO FILHO, 2007; SUHS et al., 2009; CARVALHO et al., 2013; CESÁRIO e GAGLIANONE, 2013).

Os padrões de dispersão da pimenta rosa, ainda não elucidados, tem separado a espécie em raças químicas com diferenças inclusive farmacológicas e

dificultado a seleção de genótipos aptos ao cultivo e que mantenham sua ação biológica para atender à indústria farmacêutica (BARBOSA *et al*., 2007; SANTOS *et al*., 2007; GUNDZIZA *et al*., 2008).

A dispersão das espécies é um fator determinante na dinâmica de populações. O sistema de dispersão por sementes em árvores tropicais é sensível a fatores ecológicos, favorecendo sua agregação em estrutura de família. Sabe-se que oscilações climáticas decorridas durante o terciário afetaram significativamente a distribuição das espécies e, nos últimos anos a filogeografia tem ajudado a elucidar os efeitos dessas mudanças sobre a estrutura genética das plantas (HARDY et al., 2006; AVISE, 2009).

A filogeografia possibilita estudar as correlações existentes entre a distribuição geográfica de haplótipos e suas relações genealógicas; isso, baseando-se em estudos de variabilidade de áreas conservadas do genoma de herança uniparental, com baixos índices de mutação e nula recombinação. Nessa linha, o emprego de ferramentas moleculares auxilia na percepção de movimentos e padrões de dispersão das espécies colonizadoras. Para espécies arbóreas, p.ex., o estabelecimento de colônias pioneiras ocorre através de dispersão de sementes e este processo deixa pegadas genéticas ou ‘manchas’ de linhagens maternas que podem ser detectadas usando marcadores genéticos de herança materna. Os cloroplastos das angiospermas são organelas de herança materna, dispersos através de sementes mas não pelo pólen e sua estrutura genética está fortemente influenciada pelo histórico de fluxo gênico entre populações e por eventos geológicos como mudanças climáticas e eras glaciais (CRANDALL et al., 2000; PETIT et al., 2004; HASTINGS et al., 2005).

Os cloroplastos são considerados também de alta heterogeneidade genética. Sítios polimórficos podem ser encontrados quando se realiza a análise de sequências de cpDNA, assim como observado nos genomas mitocondriais. As variações no cpDNA pode ser classificadas em polimorfismos intravarietais, isto é, variações nas sequências dentro de uma variedade, cultivar ou subespécie; e polimorfismos inter-subespecíficos, que são as variações encontradas entre as diferentes variedades de uma espécie. Esses polimorfismos podem ser separados em genótipos principais e secundários dentro de uma montagem de genoma plastidial nos dados de sequenciamento e, posteriormente,

caracterizados quando um dos alelos for único para uma determinada variedade ou subespécie (TANG et al., 2004; YANG et al., 2010; KHAN e AZIM, 2011).

Há necessidade de disponibilizar informações relevantes à seleção de genótipos de pimenta rosa para programas de pré-melhoramento e na definição de estratégias para programas de conservação de germoplasmas. Com base nisso, foram determinados os principais objetivos deste trabalho: 1) caracterizar polimorfismos intravarietais entre as populações sequenciadas; 2) estudar e caracterizar a diversidade e diferenciação existente entre populações; 3)) revelar grupos haplotípicos em função de diferentes ecossistemas brasileiros; 4) construir rede haplotípica envolvendo também sequências disponibilizadas no Genbank em busca de conexões ancestrais que ajudem na elucidação dos padrões de dispersão da espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e extração de DNA

Foram escolhidos casualmente cinco acessos representativos de cinco regiões ecogeográficas brasileiras (Tabela 1). O DNAtotal foi extraído a partir de amostras foliares criopreservadas, previamente coletadas *in situ* e pertencentes ao Laboratório de Plantas Medicinais da Faculdade de Ciências Agrárias – UFGD, utilizando metodologia de Doyle e Doyle (1991) com adaptações.

Tabela 1. Populações de *S. terebinthifolius*, nativas em ecossistemas brasileiros, amostradas para estudo de filogenia baseado em polimorfismos de regiões intergênicas.

G	Origem	Ecossistema	Latitude S	Longitude O	Altitude (m)	Clima	IP (mm)	T◦C
ES	São Mateus ES	FOD	18º43’00”	39º51’31”	38	Aw	1313	24.1
SM	Santa Maria RS	FED	29º41’02”	53º48’25”	151	Cfa	1617	18.8
ITA	Vera Cruz BA	Restinga	12º57’32"	38º36'16”	13	As	1874	25.1
MSP	Cairú BA	Restinga	13º23’22”	38º54’36”	19	Af	2151	25.3
DDO	Dourados MS	Cerrado	22º13’15”	54º48’21”	430	Cw	1400	23.6

***G** *Genótipo*, **BA** *Bahia*, **ES** *Espírito Santo*, **MS** *Mato Grosso do Sul*, **RS** *Rio Grande do Sul*. **FOD** *Floresta ombrófila densa* **FED** *Floresta estacional decidual* **IP** *Índice Pluviométrico*

Marcadores de cpDNA

Foram utilizados três marcadores moleculares de DNA plastidial das regiões intergênicas trnH (GUG) – psbA, trnS (GCU) – trnG (UCC) e rpl20 – 5' rps 12, a partir de sequências iniciadoras publicadas por Hamilton (1990) (Tabela 2).

Tabela 2. Primers utilizados nas reações de amplificação, tamanho esperado dos fragmentos em pares de bases (pb) e temperatura de anelamento por marcador intergênico em estudos de polimorfismo em *S. terebinthifolius*.

Região	Primer (5' – 3')	Fragmento (bp)	T°C
trnH (GUG) – psbA	F: ACTGCCTTGATCCACTTGGC R: CGAAGCTCCATCTACAAATGG	495	56
trnS (GCU) – trnG (UCC)	F: GCCGCTTTAGTCCACTCAGC R: GAACGAATCACACTTTTACCAC	844	52
Rpl20 – 5' rps 12	F: TTTGTTCTACGTCTCCGAGC R: GTCGAGGAACATGTACTAGG	884	50

Após padronização, as reações em cadeia de polimerase (PCRs) foram realizadas em um volume final de 25 µL (Tabela 3).

Tabela 3. Volume de reagentes utilizados em PCR, para cada marcador de região intergênica aplicado aos estudos de polimorfismo de *S. terebinthifolius*.

Reagente	TrnH – psbA	trnS – trnG	Rpl20 – rps 12
		volume (uL)	
Primer F	1,5	1,0	1,5
Primer R	1,5	1,0	1,5
PCR Master Mix	12,5	12,5	12,5
Taq DNA polimerase	0,2	0,2	0,2
$MgCl_2$	0,3	-	-
Água ultra-pura	7,0	8,3	7,3
DNA	2 ,0	2,0	2,0

As PCRs das regiões trnH-psbA e trnS-trnG constituíram de desnaturação inicial de 95ºC por 3 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95ºC por 30 segundos, temperatura de anelamento (Tabela 2) por 1 minuto e extensão a 72ºC por 1 minuto, com extensão final a 72ºC por 10 minutos. Já, a reação da região rpl20-5'rps12 constituiu de desnaturação inicial de 96ºC por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 96ºC por 45 segundos, anelamento a 50ºC por 1 minuto e extensão a 72ºC por 30 segundos,

com extensão final a 72ºC por 10 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. A purificação dos fragmentos amplificados foi realizada seguindo protocolo fenol-clorofórmio.

Sequenciamento e análise de dados

O sequenciamento dos fragmentos foi realizado no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) da UNESP, Jaboticabal-SP, utilizando sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems®) e os primers originais.

As sequências foram avaliadas quanto à qualidade dos eletroferogramas e editadas no software BioEdit. As sequências consenso foram obtidas usando o software CAP3. Foi realizado o alinhamento local (Blastn) das sequências utilizando o banco de dados NCBI para identificar sequências similares. O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado utilizando o ClustalW, e utilizou-se o MEGA 6.0 software para calcular a distância genética e construir o dendograma pelo método *neighbor-joining* com o modelo de substituição *p-distance*. As sequências obtidas foram caracterizadas em termos do número de haplótipos e diversidade de haplótipos e diversidade de nucleotídeos, dentro e entre populações.

3. RESULTADOS

O sequenciamento das regiões intergênicas utilizando os marcadores plastidiais de Hamilton et al. (1990) possibilitou investigar variações entre os acessos de populações nativas de *S. terebinthifolius*, sendo encontrados polimorfismos entre populações e também diferenças quando comparadas com as sequências depositadas no GenBank. O total de acessos, por local de coleta, amplificados para os diferentes marcadores está exposto na Tabela 4.

Tabela 4. Número de acessos, por local de coleta, amplificados para cada marcador intergênico de DNA plastidial de *S. terebinthifolius*.

LOCAL	Acessos/Marcador		
	trnH-psbA	**trnS-trnG**	**rpl20-5'rps12**
Dourados (MS)	3	3	3
Vera Cruz (BA)	4	4	5
Cairú (BA)	4	3	4
Santa Maria (RS)	4	4	4
São Mateus (ES)	5	5	5
TOTAL	20	19	21

Os fragmentos amplificados da região trnH – psbA resultaram em sequências de 473 pares de bases. As sequências de acessos coletados em Vera Cruz-BA, Cairú-BA, Santa Maria-RS e São Mateus-ES, apresentaram-se totalmente idênticas. Já, os acessos de Dourados-MS revelaram um polimorfismo inter-subespecífico [SNP tipo A (G)] na posição 341 (Figura 1a). Quando submetidas ao alinhamento local no Blastn, todas as sequências retornaram maior similaridade (99%) com a sequência de *S.terebinthifolius* contendo a região trnH - psbA depositada no GenBank (GU135324.2). Sendo então, em comparação a essa sequência, encontrado um polimorfismo do tipo A (G) na posição 460 em todas as sequências nativas e, ainda, as sequências de Dourados também apresentaram o polimorfismo da posição 341.

Os fragmentos sequenciados da região rpl20 - rps12 resultaram em 785 pares de bases. As sequências obtidas para as diferentes populações foram idênticas entre si, exceto pelos acessos de Dourados-MS, que apresentaram um polimorfismo inter-subespecífico [SNP tipo A (C)] na posição 235 (Figura 1 b). Quando submetidas ao alinhamento local no Blastn, todas sequências retornaram maior similaridade (97%) com sequências de *Mangifera indica* para esse marcador (FJ937751.1 e FJ937752.1), não havendo até o momento sequências depositadas de *S. terebinthifolius* para essa região.

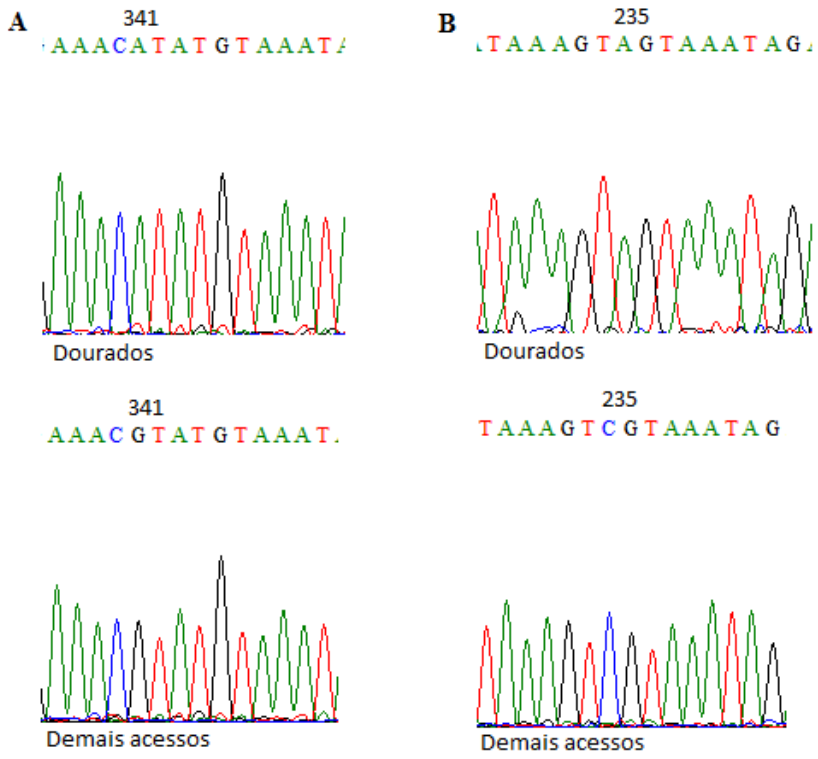

Figura 1. Eletroferogramas demonstrando SNPs. **A.** Polimorfismo inter-subespecífico [SNP tipo A (G)] na posição 341 da região trnH – psbA. **B.** Polimorfismo inter-subespecífico [SNP tipo A (C)] na posição 235 da região rpl20 - rps12.

O sequenciamento da região intergênica trnS – trnG resultou em sequências de 736 pb para os acessos de Santa Maria, e 739 pb para os demais acessos. As sequências foram submetidas ao alinhamento local utilizando a ferramenta Blastn e retornaram maior similaridade aos haplótipos A (AY928398.1), B (AY928399.1) e C (AY928400.1) de *S. terebinthifolius* depositados por Williams et al. (2005). As sequências dos acessos de Dourados apresentaram maior similaridade (99%) com o haplótipo C; os de Santa Maria, com o haplótipo A (99%) e os demais acessos com o haplótipo B (99% de similaridade).

Ao serem comparadas com as depositadas por Williams et al. (2005), todas as sequências apresentaram duas inserções/deleções de citocinas nas mesmas posições (entre 253 e 255) e também apresentaram um polimorfismo na posição 293 do tipo A (G). Além dessas três variações nucleotídicas, as sequências de Vera Cruz-BA, São

Mateus-ES e Cairú-BA, de maior similaridade com o haplótipo B, quando comparadas a este, apresentaram também um polimorfismo do tipo T (G) na posição 30 e outro do mesmo tipo na posição 243.

A comparação entre as sequências da região trnS-trnG demonstrou importantes variações entre as populações e dentro de algumas populações. Os acessos de Santa Maria-RS, quando comparados às demais populações apresentaram três deleções de adeninas entre as posições 233 e 234, e um polimorfismo do tipo T (C) na posição 459. Já os acessos de Dourados-MS apresentaram polimorfismos do tipo A (C) na posição 259, T (A) na posição 369, C (A) na posição 567, G (T) na posição 597 e T(C) na posição 691. Quanto às variações intravarietais, dois acessos de São Mateus-ES apresentaram uma deleção de adenina na posição 236 das sequências dos outros três acessos dessa população; e um acesso de Itaparica apresentou uma inserção de adenina na posição 237.

Uma análise comparativa entre os três haplótipos de *S. terebinthifolius* encontrados neste estudo (Figura 2) e outra entre eles em relação aos depositados por Williams et al. (2005) foi realizada através da construção de rede de haplótipos (Figura 3) utilizando o programa Network v.4.1.1.2, pelo método Median-joining.

Figura 2. Rede de haplótipos baseada na região intergênica trnS-trnG de cloroplastos de acessos nativos de *S. terebinthifolius*. ***HpITA*** (Vera Cruz-BA); ***HpMSP*** (Cairú-BA); ***HpES*** (São Mateus-ES); ***HpSM*** (Santa Maria-RS) e ***HpDDO*** (Dourados-MS).

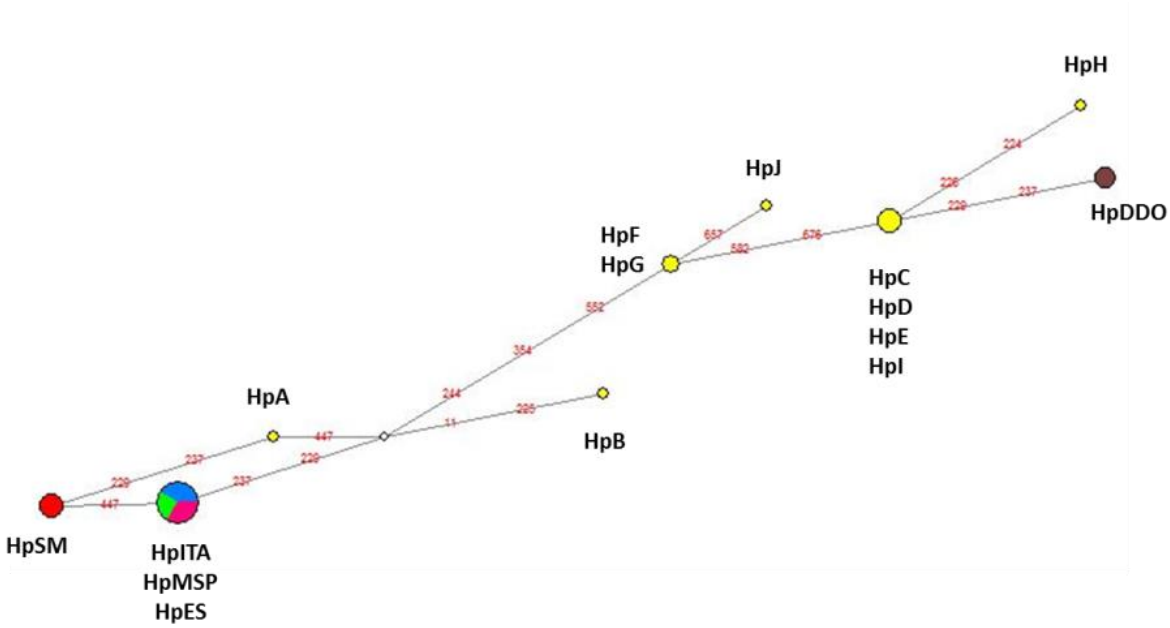

Figura 3. Network baseada em três haplótipos de região intergênica trnS-trnG de acessos nativos de *S. terebinthifolius* comparativo aos haplótipos de Williams et al. (2005).

4. DISCUSSÃO

A análise dos sequenciamentos de amostras de *S.terebinthifolius* utilizando marcadores plastidiais possibilitou a identificação de variações genéticas entre populações nativas de diferentes ecossistemas, sendo encontrados polimorfismos entre as populações estudadas e diferenças relevantes quando comparadas com algumas sequências disponíveis no GenBank.

A similaridade (99%) encontrada entre fragmentos amplificados da região intergênica trnH – psbA das populações nativas, exceto as de Dourados-MS (Figura 1a), com sequência depositada e proveniente da Flórida-EUA (GU135324.2, Abbott et al., 2013) pode ser mais um indicativo de ancestral colonizador. Em efeito, em estudos anteriores, Williams et al. (2005) já haviam determinado a ancestralidade de dois grupos haplotípicos, originários respectivamente das regiões Sul e Nordeste do Brasil. Mesmo

tendo utilizado outro marcador, a congruência dos resultados abre precedentes para estudos mais aprofundados e comparativos entre as regiões intergênicas, no intuito de compreender os padrões de dispersão da espécie naquele país, onde tornou-se principal invasora de campos agricultáveis (WILLIAMS et al., 2005; CUDA et al., 2006; MUKHERJEE et al., 2012).

Os fragmentos sequenciados da região rpl20 - rps12 resultaram em sequências idênticas para as diferentes populações estudadas; no entanto, os acessos de Dourados-MS - ecossistema Cerrado, apresentaram polimorfismo inter-subespecífico (Figura 1 b). Para efeito comparativo, não existem sequências disponíveis de *S. terebinthifolius* para esse marcador e os fragmentos amplificados neste estudo serão os primeiros a serem depositadas no Genbank.

Coincidentemente, o alinhamento local no Blastn retornou alta similaridade (97%) com sequências de outra Anacardiaceae, *Mangifera indica* (FJ937751.1 e FJ937752.1; KHAN e AZIM, 2011); o que, do ponto de vista evolutivo, pode representar importante região conservada para estudos de diversificação entre espécies da mesma família. No entanto, neste estudo, este marcador não apresentou muitas informações quanto a polimorfismos inter-subespecíficos e não revelou variações intravarietais.

As sequências obtidas para fragmentos trnS-trnG foram as mais relevantes para este estudo, possibilitando a identificação de três haplótipos distintos e direcionando inclusive conclusões do ponto de vista filogeográfico.

Ao serem comparadas com sequências disponíveis, retornaram grande similaridade com haplótipos encontrados por Williams et al. (2005). De fato, os autores já haviam sugerido uma correlação ancestral entre os haplótipos A e B, encontrados na Flórida-EUA, com amostras provenientes do Brasil. A falta de amostras nativas impedira os autores de rastrear a população de origem do haplótipo B; mas os resultados deste estudo possibilitam inferir que seu ancestral encontra-se na região Nordeste do Brasil dada sua similaridade com sequências obtidas de Vera Cruz e Cairú, Bahia.

A rede de haplótipos construída (Figura 3) entre os grupos encontrados neste estudo e aqueles disponíveis no Genbank para essa região intergênica sugere Santa Maria-RS (HpSM) como possível população de origem, ancestral comum a todas

as demais até então estudadas. Do ponto de vista evolutivo, essa informação contribui para compreender a recente dispersão e adaptação da espécie em regiões do hemisfério norte, onde as médias térmicas estão abaixo das ocorridas no Brasil.

O isolamento geográfico de uma população é geralmente decorrente de eventos históricos, mas o âmbito de uma espécie muda se os membros dela se moverem no espaço caracterizando o processo de dispersão. As espécies normalmente mantém seu 'foothold' inicial quando introduzidas dentro de um mesmo nicho climático. Após um período de mudanças evolutivas, começam a se propagar em novas zonas climáticas (RIDLEY, 2006; JIMENEZ-VALVERDE et al. 2011; THOMPSON et al. 2011).

Curiosamente, as populações coletadas na Bahia e Espírito Santo agruparam-se num único haplótipo (HpNE) e de maior proximidade genotípica com o HpSM, apesar de inseridos em regiões ecogeográficas distintas e de apresentarem consideráveis divergências edafoclimáticas. Esses resultados corroboram com a hipótese de dispersão estratificada, envolvendo tanto propagação local em torno de populações já estabelecidas como também de saltos a longa distância. A essa combinação de dispersões é atribuída o aumento consideravelmente da distância de expansão, e tem servido de base para entendimento do rápido avanço de espécies arbóreas após a última glaciação (PETIT et al., 2004; WILLIAMS et al., 2007).

De fato, a pimenta rosa é muito apreciada por aves e roedores e alguns estudos já notificaram um aumento significativo nos índices de germinação de suas sementes após ingestão, representando fortes indícios de sua contribuição na dispersão. No entanto, estamos muito aquém de elucidar a decorrência desses saltos e ainda explicar o processo evolutivo que levou a tamanha ecoplasticidade, sendo recomendável estudos ecogeográficos mais detalhados ampliando o grupo amostral (MANDON-DALGER et al., 2004; WILLIAMS et al., 2007; JESUS e MONTEIRO FILHO, 2007).

Talvez, a maior contribuição ao acessar a população de origem neste estudo seja elucidar a resistência da espécie inclusive a baixas temperaturas devido à existência de um ancestral comum em ecossistema caracterizado como floresta estacional decidual, de clima subtropical, média térmica anual de 18,8^{o}C e durante o inverno de 6,9^{o}C. Esses resultados elucidam os dados obtidos recentemente por Mukherjee et al. (2012) que encontraram uma tendência estatística da espécie a colonizar inclusive áreas com

temperaturas inferiores nos EUA e contrariando a teoria de Gioeli e Langeland (2009) ao afirmarem que a espécie possui limitações de tolerância ao frio (STRECK et al., 2011).

O haplótipo estudado que mais se distanciou dos demais foi o encontrado em Dourados-MS (HpDDO) (Figura 3), apresentando dez pontos mutacionais e um vetor mediano desde a população de origem (HpSM); este haplótipo aproximou-se dos demais originários do norte da Argentina e caracterizados por Williams et al. (2005). Apesar de coletados em área representativa do Cerrado, uma análise histórica demonstra que essa mesma região já esteve sob domínio de Mata Atlântica há não mais de um século. Com isso, é possível levantar duas hipóteses, sendo a primeira de ocorrência de hibridização intraespecífica, que só poderia ser comprovada com análises moleculares mais detalhadas e desenvolvimento de marcadores microssatélites obtidos de sequências parentais; a segunda, de que os pontos mutacionais foram surgindo como mecanismo de adaptação às mudanças nessa zona de tensão ecológica, sobretudo durante períodos de transição da vegetação característica de Mata Atlântica para Cerrado, como também em resposta à elevação térmica decorrente do desmatamento e queimadas periódicas da vegetação e consequente diminuição no regime hídrico.

Devido à sua natureza sedentária, as plantas podem ser fortemente influenciadas pela seleção local, o que muitas vezes resulta em adaptação. Essa seleção divergente também pode resultar em isolamento reprodutivo e especiação ecológica. Apesar de suas bases genéticas não estarem completamente esclarecidas, uma adaptação local poderia ser resultante de trocas ocorridas em loci chaves, onde alelos ancestrais apresentariam vantagens em seu ambiente de origem (pleiotropia antagonista). Alternativamente, múltiplos loci independentes poderiam interagir e induzir adaptação local a nível de organismo, como por exemplo, se alelos de determinados loci são benéficos num ambiente específico, mas neutro em ambientes contrastantes e alelos em outros loci apresentarem padrão oposto (LEIMU e FISCHER, 2008; BOMBLIES, 2010; ANDERSON et al., 2011).

Finalmente, concordamos com Mukherjee et al. (2011), que a distribuição dos grupos haplotípicos no Brasil apresentam padrões de nicho realizado com competição intraespecífica entre os indivíduos, onde gupos específicos são melhor adaptados às condições ambientais de sua área endêmica. Sugerimos experimentos a

campo, em diversas áreas de endemismo, comparando os diferentes grupos em cada área, afim de melhor compreender as limitações que essas adaptações impuseram e, consequente, seleção de genótipos para trabalhos de melhoramento da espécie.

AGRADECIMENTOS À Capes, CNPq e Fundect-MS pelas bolsas e financiamento da pesquisa.

5. REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, U.P; MEDEIROS, P.M.; ALMEIDA, A.L.; MONTEIRO, J.M.; LINS NETO, E.M.F.; MELO, J.G.; SANTOS, J.P. Medicinal plants of the caatinga (semiarid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v.114, p.325-354, 2007.

ANDERSON, J.T.; WILLIS, J.H.; MITCHELL-OLDS, T. Evolutionary genetics of plant adaptation. **Trends in Genetics**, v.27, p.258-266, 2011.

AVISE, J.C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography** , v.36, p.3-15, 2009.

BARBOSA, L.C.A.; DEMUNER, A.J.; CLEMENTE, A.D.; PAULA, V.F. (2007). Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Quimica Nova** 30: 1959-1965.

BOMBLIES, K. Doomed lovers: mechanisms of isolation and incompatibility in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.61, p.109-124, 2010.

BRASIL. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Ministério da Saúde, Brasília. 2009. 136p.

CARVALHO, M.G.; MELO, A.G.N.; ARAGÃO, C.F.S.; RAFFIN, F.N.; MOURA, T.F.A.L. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.15, p.158-169, 2013.

CESÁRIO, L.F.; GAGLIANONE, M.C. Polinizadores de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) em formações vegetacionais de restinga no norte do estado do Rio de Janeiro. **Bioscience Journal**, v.29, p.458-467, 2013.

CUDA, J.P.; FERRITER, A.P.; MANRIQUE, V.; MEDAL, J.C. **Florida's Brazilian peppertree management plan**. Recommendations from the Brazilian peppertree task force and Florida exotic pest plant council. 2006. Disponível em: http://www.fleppc.org/Manage_Plans/2006BPmanagePlan5.pdf.

GIOELI, K.; LANGELAND, K. **Brazilian pepper-tree control**. University of Florida, Cooperative Extension Service. Institute of Food and Agricultural Sciences, SS-AGR-17. 2009. Disponível em: http://edis.ifas.ufl.edu/aa219.

GUNDIDZA, M.; GWERU, N.; MAGWA, M.L.; MMBENGWA, V.; SAMIE, A. The chemical composition and biological activities of essential oil from the fresh leaves of *Schinus terebinthifolius* from Zimbabwe. **African Journal of Biotechnology**, v.8, p.7164-7169, 2009.

HAMILTON, M.B. Four primers for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. **Molecular Ecology**, v. 8, p.521-523, 1999.

HARDY, O.J.; MAGGIA, L.; BANDOU, E.; BREYNE, P.; CARON, J.; CHEVALLIER, M.H.; DOLIGEZ, A.; DUTECH, C.; KREMER, A.; LATOUCHE-HALLÉ, C.; TROISPOUX, V.; VERON, V.; DEGEN, B. Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 neotropical tree species. **Molecular Ecology**, v.15, p.559-571, 2006.

HASTINGS, A.; CUDDINGTON, K.; DAVIES, K.F.; DUGAW, C.J.; ELMENDORF, S.; FREESTONE, A. et al. The spatial spread of invasions: new developments in theory and evidence. **Ecology Letters**, v.8, p.91-101, 2005.

JESUS, S.; MONTEIRO-FILHO, E.L.A. Frugivoria por aves em *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae) e *Myrsine coriacea* (Myrsinaceae). **Revista Brasileira de Ornitologia,** v.5, p.585-591, 2007.

JIMENEZ-VALVERDE, A.; PETERSON, A.T.; SOBERON, J.; OVERTON, J.M.; ARAGON, P.; LOBO, J.M. Use of niche models in invasive species risk assessments. **Biological Invasions**, v.13, p.2785-2797, 2011.

KHAN, I. A.; AZIM, M. K. (2011). Variations in intergenic spacer rpl20-rps12 of mango (*Mangifera indica*) chloroplast DNA: implications for cultivar identification and phylogenetic analysis. **Plant Systematics and Evolution** 292: 249-255.

KINUPP, V.F.; BARROS, I.B.I. AGROBIODIVERSIDADE NATIVA, UMA RIQUEZA NEGLIGENCIADA. IN: MING, L.C.; AMOROZO, M.C. M.; KFFURI, C.W. **Agrobiodiversidade no Brasil**: experiências e caminhos da pesquisa. Recife: NUPPEA, p.181-203, 2012.

LEIMU, R.; FISCHER, M. A meta-analysis of local adaptation in plants. **PLoS One**, v.3, e4010, 2008.

LENZI, M.; ORTH, AI. Caracterização funcional do sistema reprodutivo da aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi), em Florianópolis-SC, Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, p.198-201, 2004.

LENZI, M.; ORTH, A.I.; LAROCA, S. Associação das abelhas silvestres (Hym., Apoidea) visitantes das flores de *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae), na Ilha de Santa Catarina (sul do Brasil). **Acta Biológica Paranaense**, v.32, p.107-127, 2003.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 5.ed. v.1. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2008. 384p.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil**: nativas e exóticas. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2008. 544 p.

MANDON-DALGER, I.; CLERGEAU, P.; TASSIN, J.; RIVIERE, J.N.; GATTI, S. (2004). Relationships between alien plants and an alien bird species on Reunion Island. **Journal of Tropic Ecology** 20: 635-642.

MUKHERJEE, A.; WILLIAMS, D.A.; WHEELER, G.S.; CUDA, J.P.; PAL, S.; OVERHOLT, W.A. Brazilian peppertree (*Schinus terebinthifolius*) in Florida and South America: evidence of a possible niche shift driven by hybridization. **Biological Invasions**, v.14, p.1415-1430, 2012.

PETIT, R.J.; BIALOZYT, R.; GARNIER-GERE, P.; HAMPE, A. (2004). Ecology and genetics of tree invasions: from recent introductions to Quaternary migrations. **Forest Ecology and Management**, v.197, p.117–137, 2004.

RIBEIRO, D.A.; MACEDO, D.G.; OLIVEIRA, L.G.S.; SARAIVA, M.E.; OLIVEIRA, S.F.; SOUZA, M.M.A.; MENEZES, I.R.A. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.16, p.912-930, 2014.

RIDLEY, M. **Evolução**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed. 2006. 752p.

SANTOS, A.C.A.; ROSSATO, M.; AGOSTINI, F.; SANTOS, P.L.; SERAFINI, L.A.; MOYNA, P.; DELLACASSA, E. Avaliação química mensal de três exemplares de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, p.1011-1013, 2007.

SHAW, J.; LICKEY, E. B; BECK, J. T.; FARMER, S. B.; WUSHENG LIU, MILLER, J.; SIRIPUN, K. C; WINDER, C. T.; SCHILLING, E. E.; SMALL, R. L. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. **American Journal of Botany**, v.92, p.142–166, 2005.

STRECK, N.A.; GABRIEL, L.F.; HELDWEIN, A.B.; BURIOL, G.A.; PAULA, G.M. Minimum temperature over short grass in Santa Maria, RS: climatology, interannual variability, and historical trend. **Bragantia**, v.70, p.696-706, 2011.

SÜHS, R.B.; SOMAVILLE, A.; KÖHLER, A.; PUTZKE, J. Vespídeos (Hymenoptera, Vespidae) vetores de pólen de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae), Santa Cruz do Sul, RS, **Brasil. Revista Brasileira de Biociências**, v.7, p.138-143, 2009.

TANG, J.; XIA, H.; CAO, M.; ZHANG, X.; ZENG, W.; HU, S.; TONG, W.; WANG, J.; WANG, J.; YU, J.; YANG, H.; ZHU, L. A comparison of rice chloroplast genomes. **Plant Physiology**, v.135, p.412-420, 2004.

THOMPSON, G.D.; ROBERTSON, M.P.; WEBBER, B.L.; RICHARDSON, D.M.; LE ROUX, J.J.; WILSON, J.R.U. (2011). Predicting the subspecific identity of invasive species using distribution models: *Acacia saligna* as an example. **Diversity and Distributions Journal**, v.17, p.1001-1014, 2011.

WILLIAMS, D.A.; OVERHOLT, W.A.; CUDA, J.P.; HUGHES, C.R. Chloroplast and microsatellite DNA diversities reveal the introduction history of Brazilian peppertree (*Schinus terebinthifolius*) in Florida. **Molecular Ecology**, v.14, p.3643-3656, 2005.

WILLIAMS, D.A.; MUCHUGU, E.; OVERHOLT, W.A.; CUDA, J.P. Colonization patterns of the invasive Brazilian peppertree, *Schinus terebinthifolius*, in Florida. **Heredity**, v.98, p.284-293, 2007.

YANG, M.; ZHANG, X.; LIU, G.; YIN, Y.; CHEN, K. ET AL. The Complete Chloroplast Genome Sequence of Date Palm (*Phoenix dactylifera L.*). **PLoS ONE**, v.5, e12762, 2010.

CAPÍTULO III

AGROINFILTRAÇÃO: PROTOCOLO EFICIENTE PARA TRANSFORMAÇÃO DE *Schinus terebinthifolius* Raddi MEDIADA POR *Agrobacterium rhizogenes*.

AGROINFILTRAÇÃO: PROTOCOLO EFICIENTE PARA TRANSFORMAÇÃO DE *Schinus terebinthifolius* Raddi MEDIADA POR *Agrobacterium rhizogenes*.

RESUMO: Um protocolo eficiente de transformação mediada por *Agrobacterium* foi desenvolvido para a planta medicinal pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi). Três métodos distintos de infecção foram testados, considerando diferentes genótipos da espécie nativa de ecossistemas brasileiros. O plasmídeo escolhido para os testes de expressão transiente carregava um construtor com proteína de fluorescência verde nuclear (EgfpEp) que possibilitou a estimativa rápida de frequência de transformação. A determinação da metodologia mais eficiente baseou-se na comparação de produção de raízes transformadas e frequência de transformação dos explantes, considerando os genótipos e dias pós infecção. A agroinfiltração de tecidos foliares com solução de *Agrobacterium rhizogenes* resultou em maiores produção de raízes e frequências de transformação, precedida da formação espontânea de *calli* que se regeneraram em *hairy roots* sem adição hormonal. O genótipo DDO (Cerrado, Brasil) apresentou superioridade significativa para transformação, independente da metodologia aplicada e, quando agroinfiltrados, obtiveram 100% de frequência, originando raízes mais espessas e de crescimento mais agressivo, oferecendo subsídios para sua escolha como linhagem elite. Este protocolo será utilizado na superexpressão de proteínas pertencentes à biossíntese de terpenos dessa promissora espécie medicinal.

Palavras-chave: pimenta rosa, planta medicinal, óleo essencial, terpenos, *hairy roots*

AGROINFILTRATION: AN EFFICIENT PROTOCOL FOR *Agrobacterium rhizogenes* MEDIATED TRANSFORMATION OF *Schinus terebinthifolius* Raddi.

ABSTRACT

An efficient method has been developed to genetically transform the medicinal plant Brazilian peppertree (*Schinus terebinthifolius* Raddi). Initially, we tested the best conditions for transient expression considering three different methods of infection in native genotypes from Brazilian ecosystems. The plasmid carried a nuclear-target GFP construct (EgfpEp) which allowed a fast quantification of transformation frequency. The election of the most efficient protocol was based on the number of hairy roots and transformation frequency of the explants, as a function of genotypes and days after infection. Agroinfiltration of leaf tissue with *A. rhizogenes* resulted on higher yield of hairy roots as on higher transformation frequency after spontaneous induction of *calli* which regenerated hairy roots with no hormone addition. Genotype DDO, from Cerrado ecosystem, showed statistical superiority for transgenic expression, regardless the methodology. However, when agroinfiltrated, the DDO explants showed 100% frequency with thicker and aggressive roots, providing subsides to elect it as elite line. This transformation protocol will be used to introduce overexpression into S. terebinthifolius that may interfere with terpenes biosynthesis of this promising medicinal plant.

Keywords: Brazilian peppertree, medicinal plant, essential oil, terpenoids, hairy roots

1. INTRODUÇÃO

O consumo de fitoterápicos como importante alternativa aos medicamentos alopáticos está difundido por todo o globo, não somente entre populações tradicionais e de amplo conhecimento etnobotânico, mas tem ressurgido sobretudo entre habitantes dos grandes centros urbanos em países altamente industrializados. Durante a segunda metade do século passado, o desenvolvimento da engenharia genética e domínio das técnicas biomoleculares permitiram o aparecimento e o melhoramento de plantas medicinais, assim como o aumento considerável em termos de produtividade de fitoterápicos, o que ajudou a estabelecer essa tendência alternativa (CHRISTOU e TWYMAN, 2004; CANTER et al., 2005; NAVARRO-MASTACHE, 2007).

Não obstante, é preciso reconhecer que nenhum desses avanços seria possível sem o emprego das técnicas de cultivo *in vitro*, utilizando tecido vegetal, que forneceram as ferramentas necessárias para a seleção de plantas hospedeiras dos genes de interesse, além de permitirem a introdução de nova informação genética, ao mesmo tempo que possibilitaram uma multiplicação rápida e massal dos genótipos aptos à introdução nos diversos sistemas de produção (PAREEK, 2005; KARUPPUSAMY, 2009; GARCIA-GONZÁLES et al. 2010).

O cultivo *in vitro* de tecidos vegetais tornou-se ferramenta indispensável para experimentos relacionados à transformação genética, fusão de protoplastos e investigações relacionadas à expressão gênica na biossíntese de metabólitos secundários. Em diversos casos, o cultivo de tecidos e células é destinado à produção de importantes compostos utilizados pela indústria farmacêutica, como ocorreu com *Catharantus roseus* cujo cultivo de *hairyroots* é destinado à coleta de alcalóides vinblastina e vincristine, de *Taxus spp* para a trodução de taxol, os três compostos quimioterápicos, e de *Maesa lanceolata* para produção de saponinas triterpenóides (DEBNATH et al., 2006; VONGPASEUTH e ROBERTS, 2007; ATAEI-AZIMI et al., 2008; FAIZAL et al., 2011; LAMBERT et al., 2011).

Existe um consenso ao se afirmar que o cultivo de *hairyroots* geneticamente transformadas é preferível em relação às outras técnicas envolvendo tecidos e células, devido sobretudo à sua estabilidade genética e bioquímica. Além disso, *hairyroots* acumulam maior teor de metabólitos secundários e sua tecnologia de extração, uma vez

padronizada, é mais rápida e eficiente do que em espécies in vivo (GEORGIEV et al., 2007; CHANDRA e CHANDRA, 2011; ONO e TIAN, 2011).

Na natureza, a produção de *hairyroots* ocorre em plantas infectadas pela bactéria gram-negativa, *Agrobacterium rhizogenes*, presente no solo. Quando infectadas, plantas suscetíveis produzem substâncias fenólicas capazes de induzir o gene de virulência (*vir*) na bactéria, responsável pela transferência de fragmentos do T-DNA, indutor de raízes (*Ri*), dos plasmídeos para a célula vegetal, resultando na proliferação neoplásica de raízes em forma de cabeleira. Desde a padronização em laboratório da utilização dos plasmídeos como vetores de genes de interesse, mais de 400 espécies de plantas tiveram sua transformação mediada por *Agrobacterium* bem sucedida (ONO e TIAN, 2011).

A pimenta rosa, *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae), é uma planta medicinal nativa de Mata Atlântica, amplamente utilizada na medicina tradicional por suas propriedades adstringentes, antidiarréicas, anti-inflamatórias, depurativas, diuréticas e febrífugas. Numa estratégia de incentivo a pesquisas envolvendo bioatividade e processos produtivos da espécie, o Ministério da Saúde no Brasil chegou a incluí-la entre as espécies medicinais de interesse para distribuição através do SUS – Sistema Único de Saúde, mas a maior dificuldade encontrada está relacionada à padronização na composição química (MATOS, 2002; BRASIL, 2009; CARVALHO et al., 2013; PINTO et al., 2015).

O óleo essencial de suas folhas e frutos é rico em monoterpenos e sesquiterpenos e muitos estudos relacionados às suas propriedades farmacológicas têm revelado atividade anti-inflamatória, antioxidante e antitumoral (DEGÁSPARI et al., 2005; EL-MASSRY et al., 2009; BENDAOUD et al., 2010; RITCHER et al., 2010; FORMAGIO et al., 2011; MATSUO et al., 2011).

Os terpenos compõem a maior classe de metabólitos secundários produzidos pelas plantas, são mais de 30.000 variações estruturais, e participam de numerosos processos vitais, tais como a respiração, fotossíntese, reprodução, desenvolvimento, adaptação, defesa, etc (MAHMOUD e CROTEAU, 2002; GERSHENZON e DUDAREVA, 2007).

Apesar de encontrado por toda natureza, os terpenos são conhecidos sobretudo como componentes de óleos essenciais, fragrâncias e resinas, e muito utilizados pela indústria como agentes aromatizantes, perfumes, inseticidas e medicamentos tópicos. O apelo comercial e importância ecológica dos terpenos torna sua engenharia metabólica um tópico muito interessante a ser investigado e a modificação de rotas de produção em plantas medicinais poderiam ainda contribuir na elucidação de sua biossíntese e regulação (PICHERSKY e GERSHENZON, 2002; DEGENHARDT et al., 2003; AHARONI et al., 2005; AHARONI et al.; 2006).

Nos últimos anos, a *Mentha* x *piperita* vem se destacando como planta modelo em estudos de metabolismo e engenharia de terpenos, grande parte devido à complexidade química do seu óleo essencial. Manipulações na expressão da desoxixilulose-5-fosfato (DXP), responsável por abastecer os plastídeos com isopentenil-difosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil-difosfato (DMAPP), ambos precursores de terpenos, resultaram no aumento de 50% na produção final de óleo essencial pelas plantas transgênicas. Assim como a alteração na rota metabólica da limoneno-3-hidroxilase, amentou em mais de 80% o teor de limoneno total comparado com a espécie selvagem, sem alterações metabólicas adversas. E, mais recentemente, a superexpressão de isoprenil-difosfato-sintases (IDS), situada em diversos pontos da rota biossintética dos terpenos e responsável por produzir os percursores de diferentes classes de terpenos, também aumentou significativamente o rendimento do óleo essencial. (MAHMOUD e CROTEAU, 2001; MAHMOUD et al., 2004; AHARONI et al., 2006; NAGEL et al., 2014).

A grande maioria dos experimentos envolvendo espécies medicinais para produção de metabólitos tem utilizado a superexpressão ou co-superessão de genes e/ou enzimas envolvidos nas rotas do Mevalonato ou do 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP), para a padronização dos metabólitos coletados. Essa revisão, foi fator determinante na escolha do vetor utilizado durante o desenvolvimento deste protocolo com a pimenta rosa – pK7FWGF2. Considerando que a maior dificuldade para otimização do tempo e rotina laboratorial está relacionada ao emprego de protocolos eficientes e específicos, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma plataforma de transformação mediada por *Agrobacterium rhizogenes* específica para *Schinus*

terebinthifolius, já prevendo futuros ensaios de engenharia envolvendo a rota dos terpenos desta promissora espécie medicinal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e propagação

Foram coletadas aleatoriamente sementes de acessos representativos de três regiões ecogeográficas brasileiras, conforme Autorização de Acesso e de Remessa de Amostra de Componente do Patrimônio Genético nº 010220/2015-1 – CNPq/CGEN/MMA (Tabela 1). Exsicatas de acessos coletados em São Mateus – ES, Santa Maria – RS e Dourados - MS foram depositadas no Herbário da UFGD (DDMS 4874, 4875 e 4876, respectivamente).

Tabela 1. Populações de *S. terebinthifolius*, nativas em ecossistemas brasileiros, amostradas para estudo de filogenia baseado em polimorfismos de regiões intergênicas.

G	Origem	Ecossistema	Latitude S	Longitude O	Altitude (m)	Clima	IP (mm)	T◦C
ES	São Mateus ES	FOD	18º43’00”	39º51’31”	38	Aw	1313	24.1
SM	Santa Maria RS	FED	29º41’02”	53º48’25”	151	Cfa	1617	18.8
DDO	Dourados MS	Cerrado	22º13’15”	54º48’21”	430	Cw	1400	23.6

***G** *Genótipo*, **ES** *Espírito Santo*, **MS** *Mato Grosso do Sul*, **RS** *Rio Grande do Sul*. **FOD** *Floresta ombrófila densa* **FED** *Floresta estacional decidual* **IP** *Índice Pluviométrico*

As sementes foram transportadas para o Laboratório de Biologia In Vitro, Universidade de Ghent – Bélgica, com devida autorização do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente.

Propagação in vitro e ex vitro

De cada genótipo, foram selecionadas cinquenta drupas, decorticadas e colocadas em tubos falcon de 15 mL contendo Etanol 70% e agitados continuamente por 1 minuto. Depois desse período, drenado o etanol, os tubos receberam solução de NaClO

6% e uma gota de Tween 20, sendo então encaminhados ao agitador rotativo por 30 minutos a 70 rpm. Os recipientes foram, então, removidos a uma câmara de fluxo horizontal onde tiveram a solução drenada e as sementes triplamente enxaguadas com água destilada e esterilizada, em intervalos de um minuto e agitação manual contínua.

Depois de drenadas, o excesso de água era removido em papel filtro esterilizado e as sementes colocadas em placas de Petri descartáveis contendo meio de cultivo K1 (2,154 g MS sem vitaminas; 10,000 g sacarose; 0,100 g myo-inositol; 0,500 g MES; 8,00 g L^{-1} e pH 5,7) e encaminhadas a câmaras de crescimento a 25° C e regime de luminosidade 16/8 h.

As placas eram checadas diariamente para evitar contaminação e em média após três semanas as sementes começaram a germinar (Figura 2).

Foram feitas observações diárias das placas para evitar contaminação e, em média, após três semanas, as sementes começavam a germinar.

Uma vez completamente germinadas, parte das plântulas foram repicadas para recipientes maiores contendo meio de cultivo suplementado para espécies lenhosas - 2,463g McCown Woddy Plant com vitaminas (Duchefa Biochemie ®); 20,000 g sacarose; 0,500 g MES, 7,500 g ágar e pH 5,8. Foram submetidas à repicagem, à medida de seu desenvolvimento, para recipientes maiores contendo o mesmo meio.

Outra parte das plântulas foi repicada em bandejas contendo substrato turfoso comercial e acondicionadas em câmaras de crescimento para espécies ex vitro, a 25°C e regime de luminosidade 16/8 horas, irrigadas manualmente. À medida de seu desenvolvimento, as plantas eram transplantadas para potes individuais e maiores.

Seleção de plasmídeo e cultivo de agrobactéria

Considerando o objetivo inicial deste trabalho em padronizar um protocolo para superexpressão de enzima IDS na pimenta rosa e aumentar a produção de terpenos, foi escolhido o vetor binário de superexpressão pK7FWGF2: NLS-GFP (Karimi et al., 2002).

A espinha dorsal do vetor é o plasmídeo pPZP200 (6.7kb) que possui origem de replicação em *Agrobacterium* (pVS1) e genes de resistência à estreptomicina e à espectinomicina que permitem sua seleção em bactéria.

Neste vetor, o fragmento de interesse é inserido entre o promotor e o terminador do 35S do CaMV (altamente ativo na maioria das células vegetais). As bordas do T-DNA são obtidas do plasmídeo pTiT37, contendo repetição de 25bp e bordas sem sequências inseridas. O vetor também apresenta um marcador *nptII* (neomicina fosfotransferase II) que confere resistência à canamicina e um gene repórter que codifica uma proteína de fluorescência (GFP), cuja expressão é controlada pelo promotor *rol*D, ligado ao sinalizador do retículo endoplasmático *EgfpER* (Figura 1).

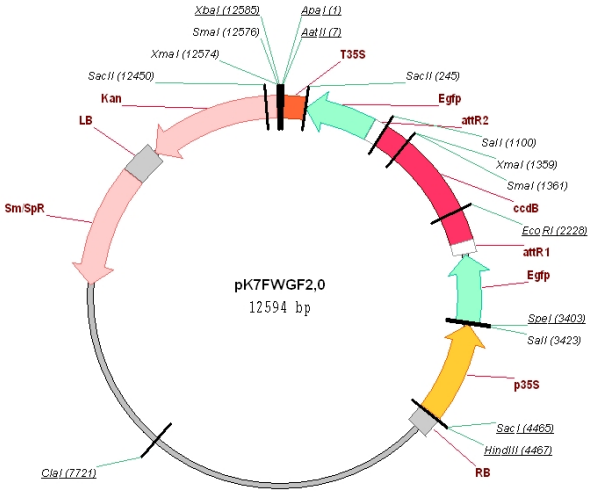

Figura 1. Vetor de superexpressão pK7WGF2,0. O gene de interesse é inserido entre os sítios attR1 e attR2 por recombinação homóloga e sua expressão é controlada pelo promotor 35S. Os genes de resistência a antibióticos estão representados em rosa: estreptomicina (*Sm*) e espectinomicina (*Sp*) para bactérias recombinantes e canamicina (*Kan*) em planta. O gene repórter *Egfp* (verde) é expresso sob o controle do promotor *rol*D. RB e LB (cinza) representam as bordas direita e esquerda do T-DNA. Fonte: http://www.psb.ugent.be/gateway/

Uma vez determinado o vetor utilizado na transformação, foram iniciadas as culturas de *Agrobacterium rhizogenes* a partir de cepas criopreservadas da coleção do Laboratório de Biologia In Vitro da Universidade de Ghent.

As cepas foram colocadas em tubos falcon contendo 3,00 mL de meio líquido YEB (5,00 g extrato de carne; 1,00 g extrato de levedura; 5,00 g peptona; 5,00 g

sacarose; 2,00 g 1M $MgSO_2.7H_2O$ e pH ajustado a 7,2); estreptomicina (300 mg L^{-1}), espectinomicina (100 mg L^{-1}) e rifampicina (100 mg L^{-1}); acondicionadas em agitador rotativo a 220 rpm, em sala escura com temperatura ambiente de 28°C durante 48 horas.

Em seguida, 48 uL da pré-cultura foram aliquotados em novo tubo falcon com 15 mL de YEB líquido contendo os mesmos antibióticos e 5 uL de acetoseringona. Essa solução foi acondicionada em agitador rotativo, sob as mesmas condições ambientes, por mais 24 horas antes dos procedimentos de transformação.

Momentos antes dos procedimentos de transformação, os tubos contendo cultura de agrobactéria foram centrifugados a 7000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante descartado e os pellets lavados três vezes com buffer (500 uL 1M MgCl2.6H2O; 1000 uL 0,5M MES (pH 5.6) e 48,5 mL mQH_2O) e centrifugação nas condições anteriores entre lavagens.

Transformação de plantas in vitro e ex vitro por imersão

In vitro

Numa câmara de fluxo horizontal, folhas jovens completamente expandidas de cada genótipo foram excisadas sem comprometimento das matrizes, utilizando pinças e bisturis esterilizados. As folhas foram, então, dispostas sobre papel filtro esterilizado e tiveram seu lado abaxial levemente arranhados com bisturi em sentido transversal à nervura central. Em seguida, esses explantes foram imersos em solução de *Agrobacterium* por dois minutos e cuidadosamente dispostos com parte abaxial para cima, em placas de Petri descartáveis contendo meio de cultivo sólido (McCown Woody Plant com vitaminas) preparado com acetoseringona (100 uL L^{-1}) e AVG – amino-etoxivinilglicina (100 uL L^{-1}). As placas foram seladas com fita microporosa e acondicionadas em sala escura a 28°C, por 72 horas.

Depois desse período de pré-cultivo, em câmara de fluxo, os explantes foram cuidadosamente lavados em solução de Timentin (250 mg L^{-1}) e água esterilizada, para remoção do excesso de *Agrobacterium*. Foram dispostos em novas placas contendo meio de cultivo sólido (McCown Woody Plant com vitaminas) preparado com Salicilato 1M (100 uL L^{-1}), Tiosulfato de Prata 0,02M (3 mL L^{-1}) e Timentin (150 mg L^{-1}). As placas foram acondicionadas sob as mesmas condições do pré-cultivo e observadas diariamente

para evitar contaminações e crescimento excessivo do *Agrobacterium*, por tempo necessário ao aparecimento de *hairy roots* que foram finalmente separadas dos explantes e colocadas em mesmo meio de cultivo livre de hormônios para crescer independentemente. O controle de hairy roots transformadas foi realizado de maneira visual através do diagnóstico de expressão da proteína de fluorescência no núcleo vegetal (GFP:NLS) em microscópio de fluorescência.

Ex vitro

Folhas jovens e completamente expandidas de cada genótipo foram coletadas individualmente em recipientes contendo água destilada para remoção de impurezas suspensas. Depois de manualmente agitadas, as folhas foram transferidas para outros recipientes contendo solução de água destilada autoclavada (180 mL), HazTab (20 mL de solução previamente dissolvida, 1 cápsula L^{-1}) e uma gota de Tween 20 e levadas ao agitador rotativo a 150 rpm durante 30 minutos.

Em seguida, os recipientes foram abertos dentro de câmara de fluxo horizontal e os explantes transferidos para recipientes com água destilada autoclavada e agitados manualmente por um minuto para enxágue, repetindo o procedimento três vezes para completa remoção de detergentes da superfície dos explantes. Uma vez esterilizadas, as folhas foram colocadas sobre papel filtro para remoção do excesso de água e suas bordas removidas com auxílio de pinça e bisturi. Cada folha foi então cortada em discos foliares (em média 1 cm^2) preservando a nervura central que foi levemente arranhada com bisturi antes de sua imersão em solução de agrobacteria por 2 minutos (Figura 2).

Figura 2. Etapas durante infecção de *S. terebinthifolius* com *A. rhizogenes*. **A** esterilização, triplo enxágue dos explantes; **B** excisão das bordas e ferimento nas nervuras antes da imersão em solução de *Agrobacterium*; **C** explantes já infectados, dispostos em placas com meio pré-cultivo. UGhent, Laboratory of In Vitro Biology, 2014.

Depois de infectados, os explantes foram dispostos em placas de Petri contendo meio pré-cultivo descrito no item anterior (*in vitro*)**.** Todos os procedimentos empregados a partir desta etapa foram idênticos aos detalhados com explantes *in vitro*.

Transformação de plantas ex vitro por agroinfiltração

Folhas jovens e completamente expandidas tiveram região entre nervuras aleatoriamente infiltradas com solução tampão contendo *Agrobacterium rhizogenes* utilizando seringas de 5 mL. A área infiltrada fora cuidadosamente demarcada para identificação durante procedimento de excisão de explantes.

Três dias após procedimentos de agroinfiltração, as folhas infectadas foram coletadas e esterilizadas seguindo protocolo anteriormente descrito. A excisão de discos foliares (1 cm^2) para produção de *hairy roots* foi realizada de maneira a preservar pelo menos duas áreas entre nervuras infectadas por disco que também foram cuidadosamente arranhados no sentido transversal à nervura central.

O explantes foram então dispostos em placas de Petri contendo apenas meio sólido para espécies lenhosas e armazenados em quarto escuro, a 28°C, aguardando o desenvolvimento de *hairy roots*. Nesse período, os explantes eram observados diariamente para evitar qualquer proliferação de contaminação e/ou crescimento excessivo da agrobactéria.

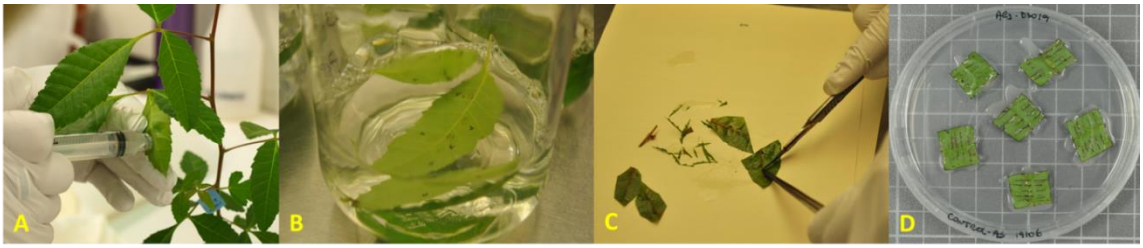

Figura 3. Etapas durante infecção por agroinfiltração com *A. rhizogenes* em *S. terebinthifolius*. **A-** procedimento de agroinfiltração em folhas jovens e expandidas; **B-** esterilização das folhas em solução contendo Tween 20 e Haztab; **C-** preparo dos explantes foliares; **D-** explantes três dias após pré-cultivo apresentando supercrescimento do *Agrobacterium*. UGhent, Laboratory of In Vitro Biology, 2014.

Análise de dados

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com vinte e cinco repetições cada, analisados como parcela subdividida no tempo.

A análise de dados ocorreu através do aplicativo SISVAR (Programa de Análises Estatísticas v.5.3. UFLA, MG). As variáveis foram submetidas à análise de variância e, quando significativas pelo teste F, comparadas pelo teste de médias Tukey, a 5% de probabilidade. Às médias coletadas em função do tempo decorrido pós-infecção, foram ajustadas equações de regressão.

3. RESULTADOS

Imersão de explantes cultivados *in vitro*

Os discos foliares de explantes cultivados *in vitro* iniciaram a formação de *hairy roots* por volta do décimo primeiro dia após infecção por imersão (Figura 4). A maior produção de raízes transformadas ocorreu por volta do 30º dia após infecção; no entanto, não houve interação significativa entre os genótipos e tempo de coleta das raízes (dias após infecção) (Tabela 2).

Figura 4. Desenvolvimento de hairy roots em explantes de *S. terebinthifolius* imersos em solução de *A. rhizogenes*, 21 DAI. UGhent, Laboratory of In Vitro Biology, 2014.

Tabela 2. Resumo da análise de variância do número de *hairy roots* e *hairy roots* expressando GFP provenientes de explantes de *S. terebinthifolius* cultivados *in vitro* após infecção por imersão em solução de *A. rhizogenes*. UGhent, Laboratory of In Vitro Biology, 2014.

		Quadrado Médio	
FV	GL	Hairy Roots	Hairy Roots GFP
Repetições	24	14.6933	4.0492
Genótipos	2	121.1200**	41.4533**
Erro A	48	8.3005	3.0737
DAI	2	48.8533**	9.6533**
Gen*DAI	4	10.2733**	1.2067ns
Erro B	96	0.9956	0.7298
C.V.1 (%)		42.04	64.72
C.V.2 (%)		43.41	71.82
Média Geral		2.37	1.32

significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F; **ns não significativo

O genótipo DDO apresentou significativa aptidão à regeneração e produção de raízes transformadas (68% dos discos foliares aos 45 dias), seguido por ES (56%) e SM (32%), respectivamente (Figura 5).

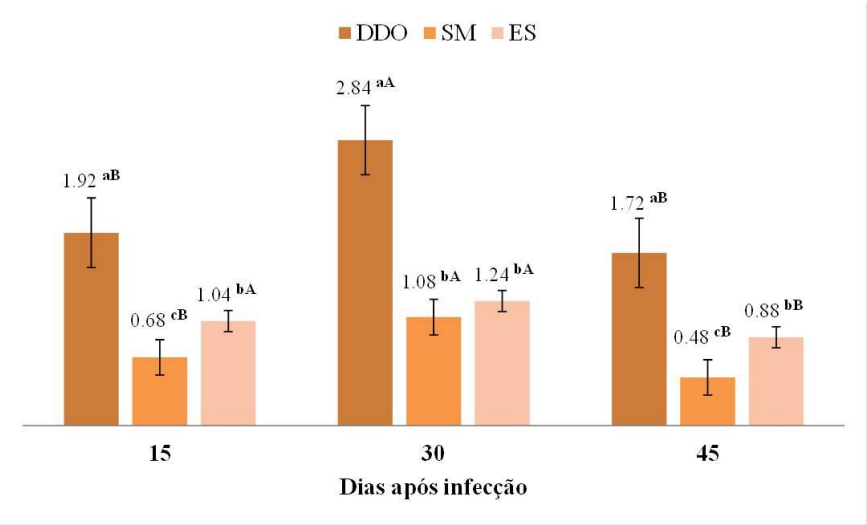

Figura 5. Comparação entre médias de raízes expressando GFP por disco foliar dos genótipos de *S. terebinthifolius* cultivados *in vitro*, em função dos dias após infecção por imersão em solução de *A. rhizogenes*. *Médias seguidas pela mesma letra minúscula não apresentaram diferença estatística em função do genótipo; médias seguidas pela mesma letra maiúscula não apresentaram diferença estatística em função de DAI, segundo Tukey 5%. UGhent, Laboratory of In Vitro Biology, 2014.

Imersão de explantes cultivados *ex vitro*

Os explantes provenientes de plantas cultivadas ex vitro apresentaram diferenças significativas na produção de raízes transformadas em função do genótipo e tempo decorrido pós infecção (DAI), havendo interação entre os fatores (Tabela 3).

Tabela 3. Resumo da análise de variância do número de hairy roots e hairy roots expressando GFP provenientes de explantes de *S. terebinthifolius* cultivados *ex vitro* após infecção por imersão em solução de *A. rhizogenes*. UGhent, Laboratory of In Vitro Biology, 2014.

		Quadrado Médio	
FV	GL	Hairy Roots	Hairy Roots GFP
Repetições	24	23.0174	8.9025
Genótipos	2	171.4444**	68.9911**
Erro A	48	16.9629	6.9587
DAI	2	18.8577**	8.4044**
Gen*DAI	4	2.0644**	1.5244*
Erro B	96	0.5274	0.6725
C.V.1 (%)		24.80	46.02
C.V.2 (%)		32.96	39.00
Média Geral		2.93	1.78

**significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F; *significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F

Todos os genótipos avaliados apresentaram raízes com maior expressão de GFP aos 30 DAI. O genótipo DDO apresentou superioridade significativa à transformação (76% dos discos foliares aos 30 dias), não sendo observada diferença estatística para transformação entre os genótipos ES e SM , independente do período de avaliação (Figura 6).

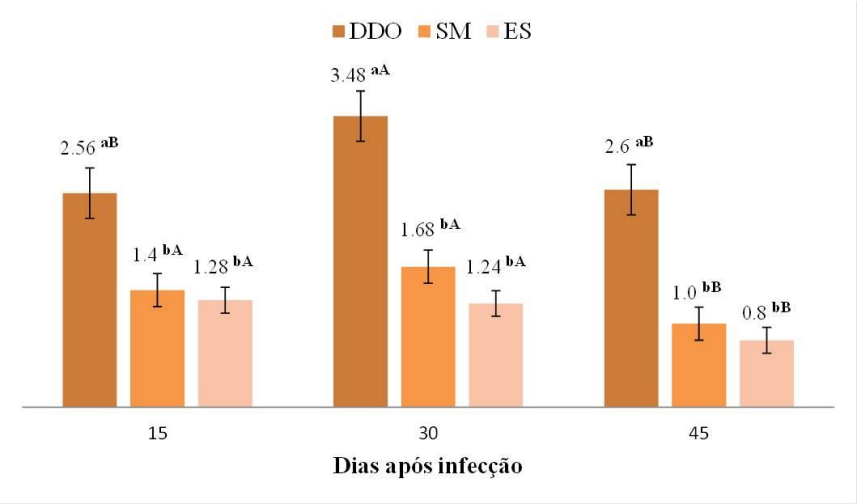

Figura 6. Comparação entre médias de raízes expressando GFP por disco foliar dos genótipos de *S. terebinthifolius* cultivados *ex vitro*, em função dos dias após infecção por

imersão em solução de *A. rhizogenes*. *Médias seguidas pela mesma letra minúscula não apresentaram diferença estatística em função do genótipo; médias seguidas pela mesma letra maiúscula não apresentaram diferença estatística em função de DAI, segundo Tukey 5%. UGhent, Laboratory of In Vitro Biology, 2014.

Agroinfiltração

A análise de variância de *hairy roots* e *hairy roots* transformadas resultantes de agroinfiltração em folhas expandidas de *S. terebinthifolius* apresentou diferenças significativas em função dos genótipos e dos dias após infecção (DAI), com interação entre os mesmos (Tabela 4).

Tabela 4. Resumo da análise de variância do número de hairy roots e hairy roots expressando GFP provenientes de explantes de *S. terebinthifolius* cultivados *ex vitro* após infecção por agroinfiltração com solução de *A. rhizogenes*. UGhent, Laboratory of In Vitro Biology, 2014.

		Quadrado Médio	
FV	GL	Hairy Roots	Hairy Roots GFP
Repetições	24	8.4844	4.6362
Genótipos	2	660.2711**	389.0978**
Erro A	48	8.5627	5.1162
DAI	2	317.1377**	86.4578**
Gen*DAI	4	110.8778**	62.4044**
Erro B	96	1.2875	1.2771
C.V.1 (%)		27.69	41.21
C.V.2 (%)		27.57	39.69
Média Geral		4.10	2.74

**significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F

Curiosamente, os discos de explantes submetidos à agroinfiltração com solução de *Agrobacterium* apresentaram indução espontânea de *callus* com subsequente diferenciação de raízes sem adição de hormônios em meio de cultivo (Figura 7).

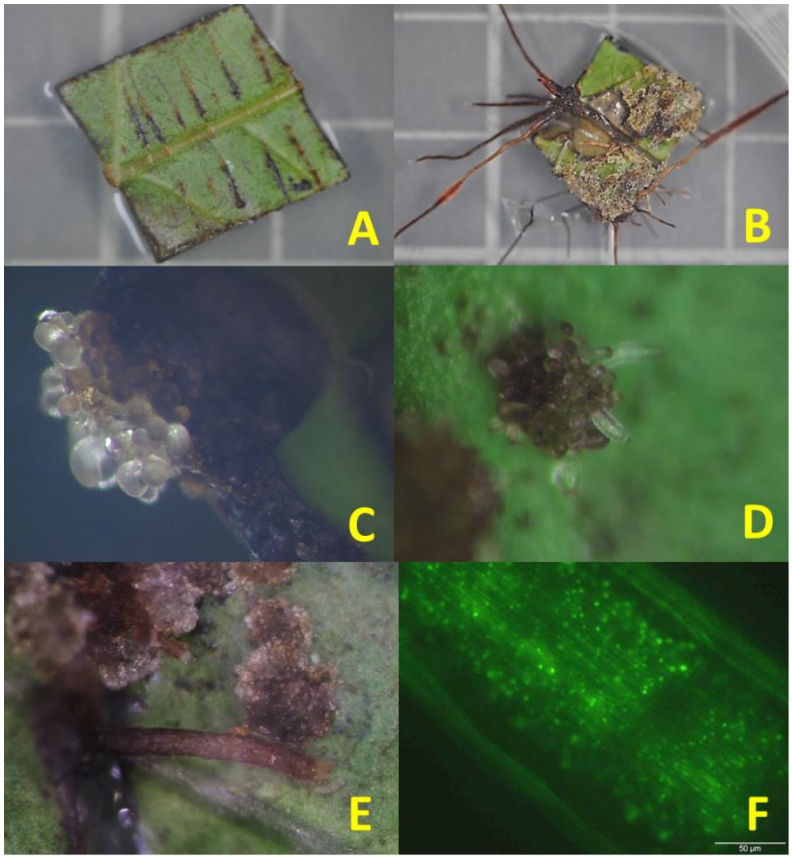

Figura 7. Indução espontânea de *callus* em explantes de *S. terebinthifolius* após agroinfiltração com solução de *A. rhizogenes* e diferenciação em raízes expressando GFP sem adição de hormônios. **A-** explante DDO com formação de *callus* em regiões seccionadas 7 DAI; **B-** diferenciação de *hairy roots* em explante DDO sem adição de hormônios 30 DAI; **C-** indiferenciação tecidual em áreas seccionadas 7 DAI; **D-** início de diferenciação tecidual em raízes 10 DAI; **E-** diferenciação de *hairy roots* 15 DAI; **F-** expressão de proteína de fluorescência verde em núcleos de raízes diferenciadas. UGhent, Laboratory of In Vitro Biology, 2014.

O teste de médias evidencia, mais uma vez a superioridade do genótipo DDO para transformação mediada por *Agrobacterium*, com maior expressão de GFP aos 30 dias (78% das raízes) e também estabilidade compara aos demais genótipos (Figura 8).

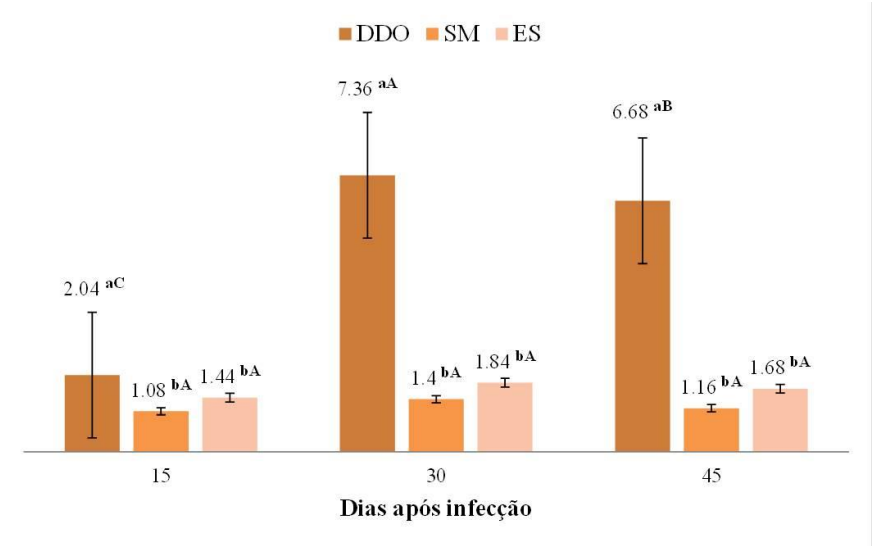

Figura 8. Comparação entre médias de raízes expressando GFP por disco foliar dos genótipos de *S. terebinthifolius* cultivados *ex vitro*, em função dos dias após infecção por agroinfiltração de solução contendo *A. rhizogenes*. *Médias seguidas pela mesma letra minúscula não apresentaram diferença estatística em função do genótipo; médias seguidas pela mesma letra maiúscula não apresentaram diferença estatística em função de DAI, segundo Tukey 5%. UGhent, Laboratory of In Vitro Biology, 2014.

Uma comparação visual entre os genótipos submetidos à agroinfiltração também ajudou a reconhecer diferenças nas respostas à metodologia aplicada (Figura 9).

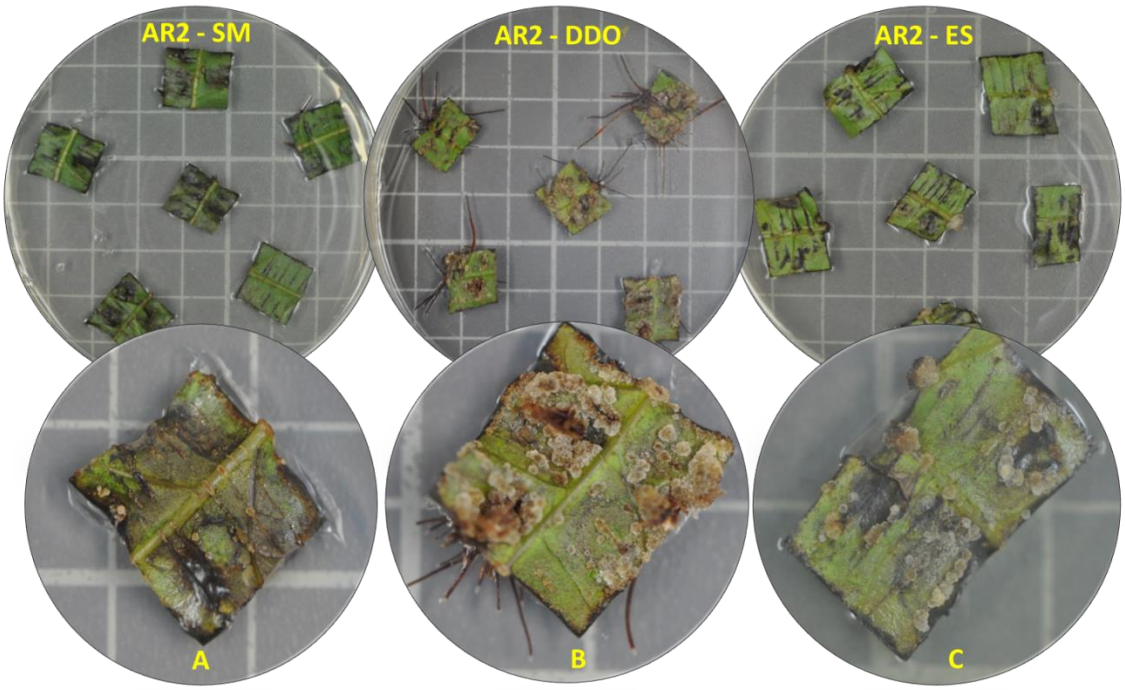

Figura 9. Comparação visual entre genótipos de *S. terebinthifolius*, três semanas após agroinfiltração com solução de *A.rhizogenes*. **A-** formação espontânea de *calli* em genótipo SM, com excesso de escurecimento tecidual no explante; **B-** diferenciação de *hairy roots* em genótipo DDO com massiva produção de *calli* sem adição de hormônio; **C-** formação espontânea de *calli* em genótipo ES com moderado escurecimento tecidual. UGhent, Laboratory of In Vitro Biology, 2014.

A comparação entre análises de regressão das diferentes formas de infecção empregadas em função dos dias pós infecção ajudaram a evidenciar a superioridade do genótipo DDO, independente da metodologia empregada (Figura 10).

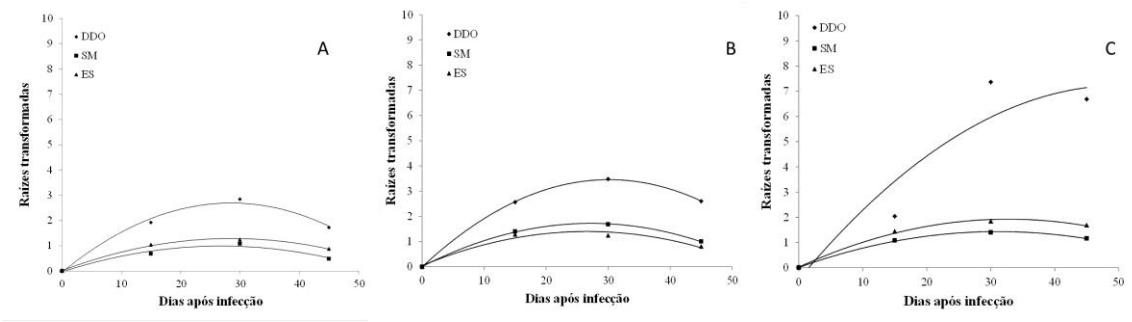

Figura 10. Número médio de raízes expressando GFP por disco foliar dos genótipos, em função de dias após infecção com *A. rhizogenes*. **A-** *In Vitro* DDO = -0.052+0.1925x-0.0034x^2, R² = 0.9872; SM = -0.036+0.0763x-0.0014x^2, R² = 0.9571; ES = 0.014+0.0889x-0.0016x^2, R² = 0.9956; **B-** *Ex Vitro* DDO = -0.008+0.2301x-0.0038x^2, R² = 0.9998; SM =0.008+0.1259x -0.0023x^2, R² = 0.9992; ES =0.046+0.1017x -0.0019x^2, R² = 0.9601; **C-** *Agroinfiltração* DDO = -0.464+0.3051x-0.003x^2, R² = 0.8876; SM = 0.01+0.0913x-0.0015x^2, R² = 0.9983; ES =0.024+0.1163x -0.0018x^2, R² = 0.9946. UGhent, Laboratory of In Vitro Biology, 2014.

A comparação visual entre as formas de infecção para um mesmo genótipo (DDO) também ressaltou a diferença dos métodos empregados para infecção dos explantes (Figura 11).

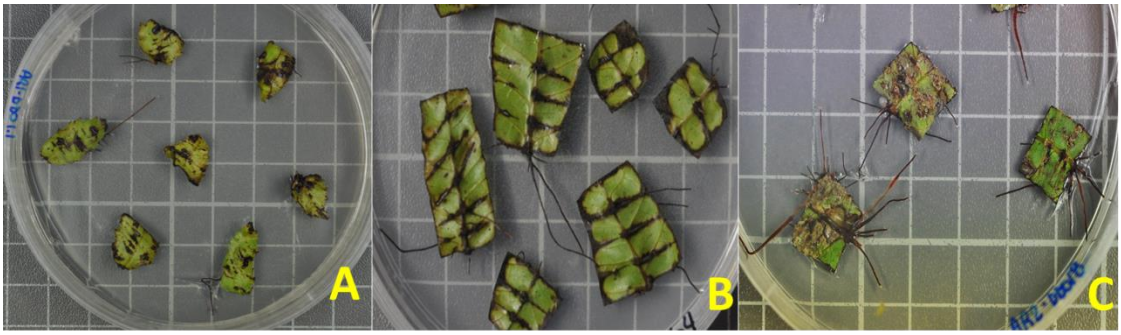

Figura 11. Respostas do genótipo DDO a diferentes metodos de infecção por *A. rhizogenes*. **A-** *hairy roots* em discos foliares de plantas in vitro submetidos à imersão; **B-** *hairy roots* em discos de plantas cultivadas ex vitro submetidas à imersão; **C-** *hairy roots* em discos de plantas ex vitro submetidas à agroinfiltração. UGhent, Laboratory of In Vitro Biology, 2014.

Reforçando as conclusões induzidas pela comparação visual, a análise de regressão comparativa entre diferentes métodos de infecção para o genótipo DDO também demonstra significativa diferença e melhores resultados a partir da agroinfiltração (Figura 12).

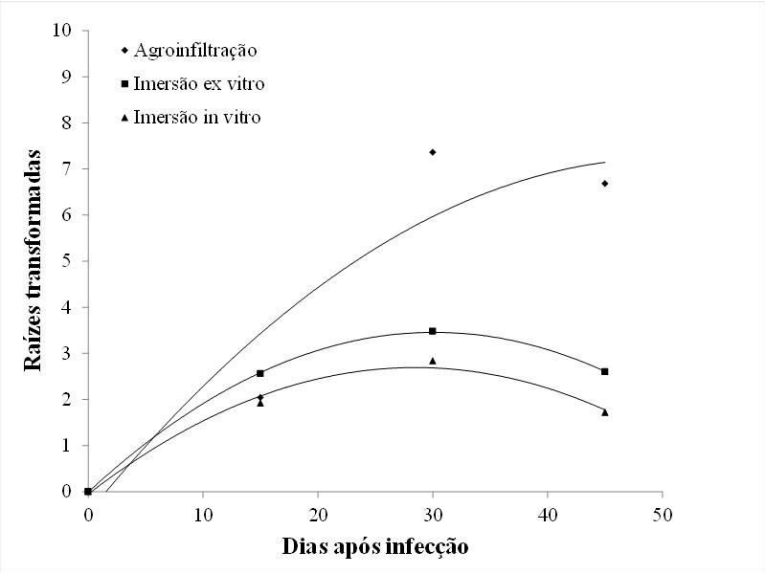

Figura 12. Número de raízes transformadas (expressando GFP) ao longo do tempo, em função do método de infecção empregado em explantes de *S. terebinthifolius*, genótipo DDO. UGhent, Laboratory of In Vitro Biology, 2014.

A comparação visual entre raízes transformadas pela técnica de imersão e pela infiltração (Figura 13) demonstra que raízes provenientes da segunda metodologia são anatomicamente diferentes, mais expessas, avermelhadas e cheias de pêlos absorventes, com crescimento rápido e agressivo após excisão dos discos foliares.

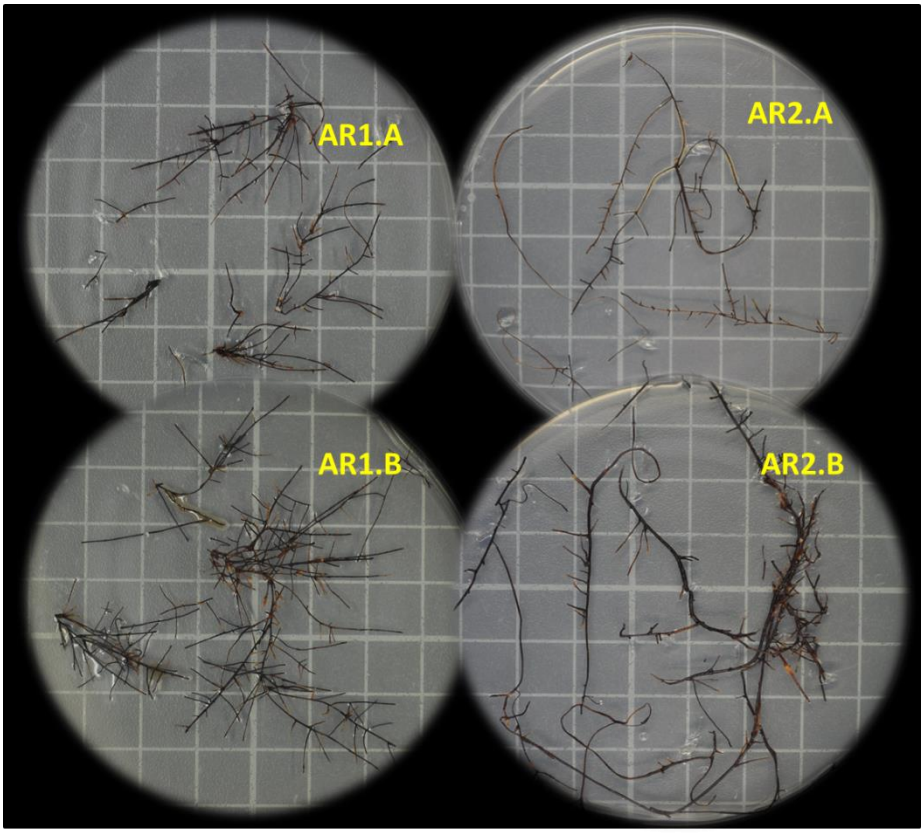

Figura 13. Comparação visual entre *hairy roots* excisadas de *S. terebinthifolius*, genótipo DDO. **AR1.A** *hr* de explantes imersos em *A.rhizogenes* após 15 dias de excisão; **AR2.A** *hr* de explantes agroinfiltrados com *A.rhizogenes* após 15 dias de excisão; **AR1.B** *hr* de explantes imersos após 30 dias de excisão; **AR2.B** *hr* de explantes agroinfiltrados após 30 dias de excisão. UGhent, Laboratory of In Vitro Biology, 2014.

4. DISCUSSÃO

A indução de hairy roots a partir do plasmídeo *Ri* (root inducing) do *Agrobacterium rhizogenes* tem sido amplamente utilizada há mais de uma década, na produção de compostos aromáticos e farmacêuticos de diversas espécies medicinais, como a *Ruta graveolens*, *Plumbago indica*, *Pueraria phaseoloides*, *Gossypium barbadense*, *Pelargonium sp*. Mas esta é a primeira vez que um protocolo para transformação eficiente de *Schinus terebinthifolius* é estabelecido (SHI e KINTZIOS 2003; SAXENA et al., 2007; FRANKFATER et al., 2009; SIDWA-GORYCKA et al. 2009; GANGOPADHYAY et al., 2010).

Os resultados demonstram a sucetibilidade da espécie ao *A. rhizogenes*. Antes do desenvolvimento da metodologia empregada para transformação, foram realizados testes preliminares com *A. tumefasciens* sem êxito, sendo provável que os genótipos cultivados já tinham resistência adquirida por sua proveniência nativa.

As menores frequências de transformação ocorreram quando foram utilizados explantes cultivados in vitro, sendo 68%, 32% e 56% para os genótipos DDO, SM e ES, respectivamente, aos 30 DAI. Os maiores problemas relacionados a esse procedimento foram escurecimento dos discos foliares após infecção, crescimento excessivo do *Agrobacterium*, mesmo em meio contendo antibióticos e silenciamento de expressão da GFP por volta dos 45 dias.

O escurecimento em explantes de plantas medicinais é muito comum no cultivo *in vitro* devido à produção acentuada de substâncias fenólicas que atuam como cicatrizadoras teciduais uma vez que alguma lesão é sinalizada. Ao mesmo tempo, uma vez que a planta é infectada por um patógeno, ocorre o ‘engatilhamento’ da rota para secreção de etileno, aumentando o processo oxidativo dos explantes (ROUT et al., 2000; WANG et al., 2002; JÁCOBO-VELÁZQUEZ e CISNEROS-ZEVALLOS, 2012).

Ao meio de cultivo foram adicionados três compostos químicos que atuam na recepção e intercepção do etileno. O primeiro, muito comum em meios de cultivo, foi o tiosulfato de prata que atua como receptor, provocando a precipitação e diminuindo a concentração externa do etileno. O segundo, também consagrado, foi o salicilato que inibe EFE, enzima terminal na rota biossintética do etileno. E, por último, o AVG, reconhecido como importante inibidor da ACC sintase, bloqueando a síntese do substrato precursor do etileno (STEINITZ et al., 2010; JÁCOBO-VELÁZQUEZ e CISNEROS-ZEVALLOS, 2012; NAJEEB et al., 2015).

No entanto, é preciso ressaltar que os explantes cultivados *in vitro* não apresentavam o mesmo desenvolvimento nem a mesma plasticidade das folhas *ex vitro*, dificultando inclusive a excisão de discos foliares. Talvez, a menor espessura e falta de aparatus fotossintético tenha estimulado a constante recidiva de supercrescimento do *Agrobacterium* em sua superfície, estimulando a cada vez maior estresse oxidativo dos explantes. Da mesma maneira, o silenciamento do *EgGFP* deve estar relacionado a um mecanismo adaptativo e também de defesa (WATERHOUSE et al., 2001).

Explantes cultivados *ex vitro*, também submetidos à imersão, tiveram produção de *hairy roots* potencializada em relação aos *in vitro*, sobretudo o genótipo DDO com média de produção de 3,48 raízes transformadas aos 30 dias (76% frequência de transformação por explante). Apesar do processo laborioso de esterilização dos explantes *ex vitro* antes de sua infecção por *Agrobacterium*, as diferenças de ordem morfológica em relação aos *in vitro* fazem com que a rotina de procedimentos de excisão e infecção sejam mais rápidas e eficientes. Os genótipo SM não apresentaram aumento significativo na produção média de raízes e, ainda, repetiram os sintomas prévios de supercrescimento de *Agrobacterium* em explantes com mais de 30 DAI.

O maior tempo de incubação de explantes para obtenção de *hairy roots* nem sempre resulta em aumentos na frequência de transformação; do contrário, favorece o supercrescimento da bactéria. O número de células de *Agrobacterium* tem sido considerado um fator crítico na eficiência da transformação, pois sua presença em excesso faz com que se comporte como parasita da célula vegetal, roubando as fontes de nutrientes necessários à regeneração tecidual (MANNAN et al., 2009; LIU et al., 2014).

Problemas relacionados ao supercrescimento de bactéria não foram identificados quando empregada metodologia de agroinfiltração nos explantes, sendo possível cultivá-las em meio sem adição de antibióticos. A agroinfiltração consiste em forçar a suspensão de *Agrobacterium* através das aberturas estomatais da planta, podendo apresentar limitações em função da arquitetura foliar e variando inclusive em função do genótipo da espécie transformada (WROBLEWSKI et al., 2005; MANAVELLA e CHAN, 2009).

A *S. terebinthifolius* respondeu bem ao tratamento, não apresentando necroses em regiões infiltradas, como é recorrente em algumas espécies. Apenas as folhas mais velhas apresentavam resistência à injeção da solução; por isso, é recomendável a escolha de folhas jovens, maleáveis, mas completamente expandidas.

O resultado mais surpreendente do emprego dessa técnica foi a indução de *calli* em todos os genótipos, antes do aparecimento de *hairy roots*. Não foram encontrados relatos semelhantes na literatura consultada para comparação ou elucidação dessa desdiferenciação; por isso, recomenda-se investigar os fenômenos fisiológicos decorrentes deste procedimento na espécie. As *hairy roots* regeneradas a partir dos *calli*

apresentaram 98% de frequência de transformação, aos 30 DAI, para o genótipo DDO, que também obteve a maior média de raízes transformadas por explante (7,36).

Novamente, os genótipos SM e ES não responderam bem à metodologia aplicada. Mesmo apresentando os mesmos sintomas de indução de *calli* nas regiões seccionadas, o genótipo SM manifestou escurecimento e necrose tecidual antes mesmo da diferenciação de raízes, na maioria dos discos foliares. O número de raízes diferenciadas por disco foliar, de ambos genótipos, foi semelhante aos procedimento anterior, o que leva à sua exclusão na seleção de linhagens elite à transformação.

A introdução transgênica utilizando a agroinfiltração tem demonstrado ser um método rápido, barato e facilmente adaptável quando se persegue o aumento da expressão de genes transientes. Inicialmente desenvolvida para *Nicotiana benthamiana*, hoje é rotineiramente empregada em diferentes espécies vegetais (MARION et al., 2008; WROBLEWSKI et al., 2009; CHEN et al., 2010; KING et al., 2015).

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que o protocolo de modificação por agroinfiltração é o mais eficiente para *Schinus terebinthifolius*. Neste trabalho, seu emprego não somente possibilitou a produção e expressão transiente massal em *hairy roots*, como viabilizou a escolha do genótipo DDO como linhagem elite à transformação mediada por *Agrobacterium rhizogenes*. Espera-se, com isso, facilitar e otimizar os trabalhos vindouros na engenharia metabólica de terpenos e, dessa forma, ampliar a cadeia produtiva de compostos desta promissora espécie medicinal.

AGRADECIMENTOS Ao Prof Marc van Montagu por ter se empenhado pessoalmente no aceite deste projeto; à Universidade de Ghent pela parceria bilateral e disponibilização de suas instalações e laboratórios; ao Programa Ciência sem Fronteiras, através da Capes, por possibilitar a realização deste doutorado sanduíche através da concessão de bolsa e taxa de bancada necessária ao desenvolvimento desta pesquisa.

5. REFERÊNCIAS

AHARONI, A.; JONGSMA, M.A.; BOUWMEESTER, H.J. Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. **Trends in Plant Science**, v.10, p.594-602, 2005.

AHARONI, A.; JONGSMA, M.A.; KIM, T.; GIRI, A.P.; VERSTAPPEN, F.W.; SCHWAB, W.; BOUWMEESTER, H.J. Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. **Phytochemistry Reviews**, v.5, p.49-58, 2006.

ATAEI-AZIMI, A.; HASHEMLOIAN, B.D.; EBRAHIMZADEH, H.; MAJD, A. High *in vitro* production of anti canceric indole alkaloids from periwinkle (*Catharanthus roseus*) tissue culture. **African Journal of Biotechnology**, v.7, p.2834-2839, 2008.

BENDAOUD, H.; ROMDHANE, M.; SOUCHARD, J. P.; CAZAUX, S.; BOUAJILA, J. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of Schinus Molle L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. **Journal of Food and Science**, v.75, p.466-72, 2010.

CANTER, P.H.; THOMAS, H.; ERNST, E. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v.23, p.180-185, 2005.

CARVALHO, M.G.; MELO, A.G.N.; ARAGÃO, C.F.S.; RAFFIN, F.N.; MOURA, T.F.A.L. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.15, p.158-169, 2013.

CHANDRA, S.; CHANDRA, R. Engineering secondary metabolite production in hairy roots. **Phytochemistry Reviews**, v.10, p.371-395, 2011.

CHEN, X.; EQUI, R.; BAXTER, H.; BERK, K.; HAN, J.; AGARWAL, S.; ZALE, J. A high-throughput transient gene expression system for switchgrass (*Panicum virgatum* L.) seedlings. **Biotechnology for Biofuels**, v.3, p.9, 2010.

CHRISTOU, P.; TWYMAN, R.M. The potential of genetically enhanced plants to ardes food insecurity. **Nutrition Research Reviews**, v.17, p.23-42, 2004.

DEBNATH, M.; MALIK, C.P.; BISEN, P.S. Micropropagation: A tool for the production of high quality plant-based medicines. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.7, p.33-49, 2006.

DEGENHARDT, J.; GERSHENZON, J.; BALDWIN, I.T.; KESSLER, A. Attracting friends to feast on foes: engineering terpene emission to make crop plants more attractive to herbivore enemies. **Current Opinion in Biotechnology**, v.14, p.169-176, 2003.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N.; PRADO, M.R.M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebenthifolius* Raddi. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, p.617-622, 2005.

EL-MASSRY, K.F.; EL-GHORAB, A.H.; HAABAN, H.A.; SHIBAMOTO, T. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples

prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.5265–5270, 2009.

FAIZAL, A.; LAMBERT, E.; FOUBERT, K.; APERS, S.; GEELEN, D. In vitro propagation of four saponin producing *Maesa* species. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.106, p.215-223, 2011.

FORMAGIO, A.S.N.; IRIGUCHI, E.K.K.; ROVEDA, L.M.; VIEIRA, M.C.; CARDOSO, C.A.L.; HEREDIA ZARATE, N.A.H.; TABALDI, L.A.; KASSUYA, C.A.L. Chemical composition and anti-inflammatory activity of the essential oil of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) Fruits. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.30, p.1555-1559, 2011.

GARCÍA-GONZÁLES, R.; QUIROZ, K.; CARRASCO, B.; CALIGARI, P.D.S. Plant tissue culture: current status, opportunities and challenges. **Ciencia e Investigatión Agraria**, v.37, p.5-30, 2010.

GEORGIEV, M.I.; PAVLOV, A.I.; BLEY, T. Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.74, p.1175-1185, 2007.

GERSHENZON, J.; DUDAREVA, N. The function of terpene natural products in the natural world. **Nature Chemical Biology**, v.3, p.408-414, 2007.

JÁCOBO-VELÁZQUEZ, D.A.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. An alternative use of horticultural crops: stressed plants as biofactories of bioactive phenolic compounds. **Agriculture**, v.2, p.259-271, 2012.

KARUPPUSAMY, S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.13, p.1222-1239, 2009.

KING, J.L.; FINER, J.J.; McHALE, L.K. Development and optimization of agroinfiltration for soyben. **Plant Cell Reports**, v. 34, p.133-140, 2015.

LAMBERT, E.; FAIZAL, A.; GEELEN, D. Modulation of triterpene saponin production: in vitro culture, elicitation, and metabolic engineering. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.164, p.220-237, 2011.

LIU, B.L.; YANG, X.; LIU, J.; DONG, Y.; WANG, Y.Z. Characterization, efficient transformation and regeneration of *Chirita pumila* (Gesneriaceae), a potential evo-devo model plant. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.118, p.357-371, 2014.

MAHMOUD, S.S.; CROTEAU, R.B. Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate

reductoisomerase and menthofuran synthase. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v.98, p.8915-8920, 2001.

MAHMOUD, S.S.; CROTEAU, R.B. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. **Trends in Plant Science**, v.8, p.366-373, 2002.

MAHMOUD, SS.; WILLIAMS, M.; CROTEAU, R.B. Cosuppression of limonene-3-hydroxylase in peppermint promotes accumulation of limonene in the essential oil. **Phytochemistry**, v.65, p.547-554, 2004.

MANAVELLA, P.A.; CHAN, R.L. Transient transformation of sunflower leaf discs via an *Agrobacterium*-mediated method: applications for gene expression and silencing studies. **Nature Protocols**, v.4, p.1699–1707, 2009.

MANNAN, A.; SYED, T.N.; MIRZA, B. Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Artemisia absinthium* L. **Pakistan Journal of Botany**, v.41, p.3239-3246, 2009.

MARION, J.; BACH, L.; BELLEC, Y.; MEYER, C.; GISSOT, L.; FAURE, J.D. Systematic analysis of protein subcellular localization and interaction using high-throughput transient transformation of Arabidopsis seedlings. **Plant Journal**, v.56, p.169–179, 2008.

MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais:** sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades. 4.ed. Fortaleza: UFC, 2002. 257p.

MATSUO, A.L.; FIGUEIREDO, C.R.; ARRUDA, D.C.; PEREIRA, F.V.; SCUTTI, J.A.B.; MASSAOKA, M.H.; TRAVASSOS, L.R.; SARTORELLI, P.; LAGO, J.H.G. A-Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.411, p.449–454, 2011.

NAGEL, R.; BERASATEGUI, A.; PAETZ, C.; GERSHENZON, J.; SCHMIDT, A. Overexpression of an isoprenyl diphosphate synthase in spruce leads to unexpected terpene diversion products that function in plant defense. **Plant Physiology**, v.164, p.555-569, 2014.

NAJEEB, U.; ATWELL, B.J.; BANGE, M.P.; TAN, D.K.Y. Aminoethoxyvynilglycine (AVG) ameliorates waterlogging-induced damage in cotton by inhibiting ethylene shintesis and sustaining photosynthetic capacity. **Plant Growth Regulation**, v.76, p.83-98, 2015.

NAVARRO-MASTACHE, L.C. Large scale commercial micropropagation in Mexico: the experience of Agromod, S.A. de C.V. **Acta Horticulturae (ISHS)**, v.748, p.91-94, 2007.

ONO, N.N.; TIAN, L. The multiplicity of hairy root cultures: Prolific possibilities. **Plant Science**, v.180, p.439-446, 2011.

PAREEK, L.K. **Trends in plant tissue culture and biotechnology**. 2 ed. Jodhpur: Agrobios. 2005. 334p.

PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Current Opinion on Plant Biology**, v.5, p.237-243, 2002.

PINTO, J.V.C.; FORMAGIO, A.S.N.; CARVALHO, C.A.L.; CARNEVALI, T.O.; SOUZA, P.H.N.; VIEIRA, M.C. Effect of soil Nitrogen and Phosphorus on early development and essential oil composition of *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Journal of Essencial Oil Bearing-Plants**, 2015 (in press).

RICHTER, R.; VON REUß, S.H.; KÖNIG, W.A. Spirocyclopropane-type sesquiterpene hydrocarbons from *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Phytochemistry**, v.71, p.1371-1374, 2010.

ROUT, G.R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnoly Advances**, v.18, p.91-120, 2000.

STEINITZ, B.; BARR, N.; TABIB, Y.; VAKNIN, Y.; BERNSTEIN, N. Control of in vitro rooting and plant development in *Corymbia maculata* by silver nitrate, silver thiosulfate and thiosulfate ion. **Plant Cell Reports**, v. 29, p.1315–1323, 2010.

VONGPASEUTH, K.; ROBERTS, S.C. Advancements in the understanding of paclitaxel metabolism in tissue culture. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.8, p.219-236, 2007.

WANG, K.; LI, H.; ECKER, J.R. Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks. **The Plant Cell**, Supplement, p.131-151, 2002.

WATERHOUSE, P.M.; WANG, M.B.; LOUGH, T. Gene silencing as an adaptative defense gainst viruses. **Nature**, v. 411, p.834-842, 2001.

WROBLEWSKI, T.; TOMCZAK, A.; MICHELMORE, R. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato, and *Arabidopsis*. **Plant Biotechnology Journal**, v.3, p.259–273, 2005.

WROBLEWSKI, T.; CALDWELL, K.S.; PISKUREWICZ, U.; et al. Comparative large-scale analysis of interactions between several crop species and the effector repertoires from multiple pathovars of *Pseudomonas* and *Ralstonia*. **Plant Physiology**, v.150, p.1733–1749, 2009.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A maior riqueza de uma nação é o seu patrimônio natural e genético e, apesar de o Brasil deter 20% da biodiversidade mundial, muito pouco se conhece sobre sua flora medicinal. É preciso um amplo comprometimento com a estruturação de um banco de dados sobre nossas espécies nativas, não apenas para finalidade de conhecimento e ensino, mas sobretudo para conservação e proteção de nosso patrimônio.

As espécies medicinais têm sido alvo de grande interesse pelas indústrias na atualidade e a comunidade científica tem direcionado maior parte seus estudos na comprovação de suas atividades farmacológicas. Mas é preciso ir além, visionar a cadeia produtiva também implica na seleção de genótipos apropriados, quimiotipos específicos, linhagens elite para produção de metabólitos. E todo esse trabalho é precedido por estudos de diversidade genética das espécies em seus locais de ocorrência natural. Compreender sua evolução, adaptação, distribuição de nichos e dispersão também são ferramentas indispensáveis para se evitar equívocos de estratégia produtiva como ocorrido no passado com a pimenta rosa.

O uso de ferramentas biotecnológicas deveria ser um aliado regular, mas ainda é fortemente influenciado pela percepção e receptividade popular que associa a produção de plantas medicinais ao selo ‘natural’, que, para a maioria das pessoas, conflitua com as práticas moleculares e biotecnológicas. Mesmo a legislação brasileira impõe práticas de cultivo dentro do conceito de produção orgânica que limita o setor à agricultura familiar e inviabiliza sua produção em larga escala para o preparo de fitoterápicos.

Enquanto isso, em países desenvolvidos, a implantação de biofábricas expande-se a passos largos, otimizando a produção de metabólitos através da engenharia genética de espécies nativas dos trópicos e que, ironicamente, servirão para a composição de medicamentos alopáticos consumidos pelos países detentores da matéria prima vegetal. É preciso ampliar o debate, mas sobretudo ampliar o conhecimento e quebrar conceitos equivocados que impedem o desenvolvimento.