



## VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE PLANTAS DE *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze

**RODRIGUES, Isabel Corrêa da Silva<sup>1</sup>, BIANCHI, Valmor João<sup>1</sup>, RUBIN Silvia<sup>1</sup>; BANDEIRA, Juliana de Magalhães<sup>1</sup>; PETERS, José Antonio<sup>1</sup> e BRAGA, Eugenia Jacira Bolacel<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas/UFPeI, Campus Universitário – Cx. Postal 354 – CEP 96010-900, Capão do Leão, RS, Brasil. (bebbelzzinha@hotmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

*Alternanthera brasiliana*, popularmente conhecida como “terramicina” ou “penicilina”, é uma planta herbácea pertencente à família Amaranthaceae, amplamente utilizada no tratamento de inflamações, dores e processos infecciosos. Trabalhos recentes relatam os efeitos analgésicos de extratos hidroalcoólicos obtidos de partes aéreas desta espécie, onde análises fitoquímicas preliminares revelaram a presença de terpenos, esteróides e compostos fenólicos, sendo  $\beta$ -sitosterol o constituinte mais importante. Alguns estudos demonstraram que *A. brasiliana* apresenta atividade *in vitro* contra vários vírus, incluindo o do herpes simples (Lagrota et al., 1994).

A distribuição da diversidade genética em espécies de plantas depende de sua evolução em determinados sistemas ecológicos e geográficos, de fatores de seleção e, freqüentemente, de muitos fatores humanos. Muito da diversidade verificada em espécies pode ser encontrada dentro de populações individuais, ou dividida entre várias populações diferentes. Entender melhor a diversidade genética e sua distribuição é essencial para sua conservação e uso, ajudando também na compreensão de taxonomia, origem e evolução de qualquer espécie de planta de interesse e seus parentes selvagens (Rao & Rodgkin, 2002).

A caracterização de germoplasma vegetal com técnicas moleculares tem um papel crescente e importante na administração e utilização de recursos genéticos de plantas. Há muitos marcadores de DNA polimórficos disponíveis para identificação e proteção de genótipos (Xu et al., 2002), dentre eles, estão os marcadores moleculares, baseados na análise direta do DNA, a exemplo da técnica de RAPD (Random Amplified Polimorfic DNA) que tem demonstrado ser efetiva na distinção de gêneros, espécies e cultivares.

RAPD é um marcador dominante, de rápida implementação em laboratório, independente de variações ambientais, podendo portanto ser utilizado para análise de polimorfismo em qualquer fase de desenvolvimento do material vegetal (Rasul et al., 2007).

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de verificar, por meio de marcadores do tipo RAPD, a possível existência de variabilidade entre plantas de

*Altenanthera brasiliana*, oriundas de 10 diferentes localidades da Região Sul do Brasil.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de Botânica, UFPel. Para o experimento foi utilizado um exemplar de cada genótipo de *A. brasiliiana*, totalizando dez genótipos (de G1 a G10), sendo G1 oriundo de Caçara/RS; G2 e G3 de Porto Alegre/RS; G4 de Passo Fundo/RS; G5 de Água Santa/RS; G6 de Santa Maria/RS; G7 e G8 de Joinville/SC; G9 de Palhoça/RS e G10 de Curitiba/PR.

Os exemplares foram plantados em vasos com capacidade de cinco litros, utilizando-se o substrato Plantmax<sup>®</sup>, e mantidos em casa-de-vegetação com umidade relativa de aproximadamente 80% e temperatura controlada de 25 – 30 °C.

Para a extração de DNA, aproximadamente 150 mg de folhas jovens, completamente expandidas, foram coletadas em tubos de polipropileno com capacidade para 2 mL e armazenadas em ultrafreezer à -80 °C.

O DNA genômico foi extraído pelo método CTAB 2% (1% de  $\beta$ -mercaptanol), conforme descrito por Doyle & Doyle (1987). A quantificação do DNA foi realizada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, comparando a intensidade das bandas com marcador  $\lambda$  DNA/*Hind* III, na concentração de 0,5  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  e, posteriormente, diluído em água MilliQ para a concentração de trabalho de aproximadamente 10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , para ser utilizado na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Foram realizadas reações de PCR com 27 *primers* da Operon, a saber: **OPA** (01, 07), **OPB** (01, 04, 06, 08, 18 e 20), **OPAC** (16 e 19), **OPAF11**, **OPF07**, **OPI07** e **OPX** (01, 04, 06, 07, 08, 09, 11, 13, 16, 17, 18, 20); e da British Columbia University – **UBC** (53 e 410). Os *primers* foram selecionados em função da nitidez e número das bandas amplificadas.

As reações de PCRs foram realizadas com 2,5  $\mu\text{L}$  de Tampão 10X (10mM Tris-HCl pH 9,5, 50 mM KCl), 2,0 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 180  $\mu\text{M}$  de cada dNTP, 1,2  $\mu\text{M}$  do *primer*, 1U de *Taq* DNA polimerase –Invitrogen, 20 ng de DNA genômico e água MilliQ esterilizada q.s.p. 25  $\mu\text{L}$ .

A reprodutibilidade dos produtos de amplificação foi testada duas vezes utilizando DNA proveniente de duas extrações distintas para cada um dos genótipos analisados.

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5%, a 65V por cerca de 90 min. Após a eletroforese, o gel foi imerso em brometo de etídeo (5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) durante 30 min e, em seguida, visualizado na luz UV e fotodocumentado com auxílio de um sistema de fotodocumentação modelo E-BOX-100 – marca Vilber Lourmat.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 27 *primers* RAPD utilizados produziram um total de 280 bandas que foram 100% monomórficas, ou seja, não detectaram polimorfismo entre os 10 genótipos de *A. brasiliiana* provenientes das diferentes localidades (Figura 1).

Resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho foram encontrados por Wang et al. (2005), em sete populações de *Alternanthera philoxeroides*, não detectando nenhum polimorfismo entre estas populações, empregando 28 *primers* de RAPD e 23 de ISSR.

A não detecção de polimorfismo entre os diferentes acessos pode estar relacionada à baixa taxa de fecundação cruzada dentro da espécie, uma vez que se

trata de uma planta autógama e, sendo assim, possivelmente existe alto grau de homozigose dentro da espécie.

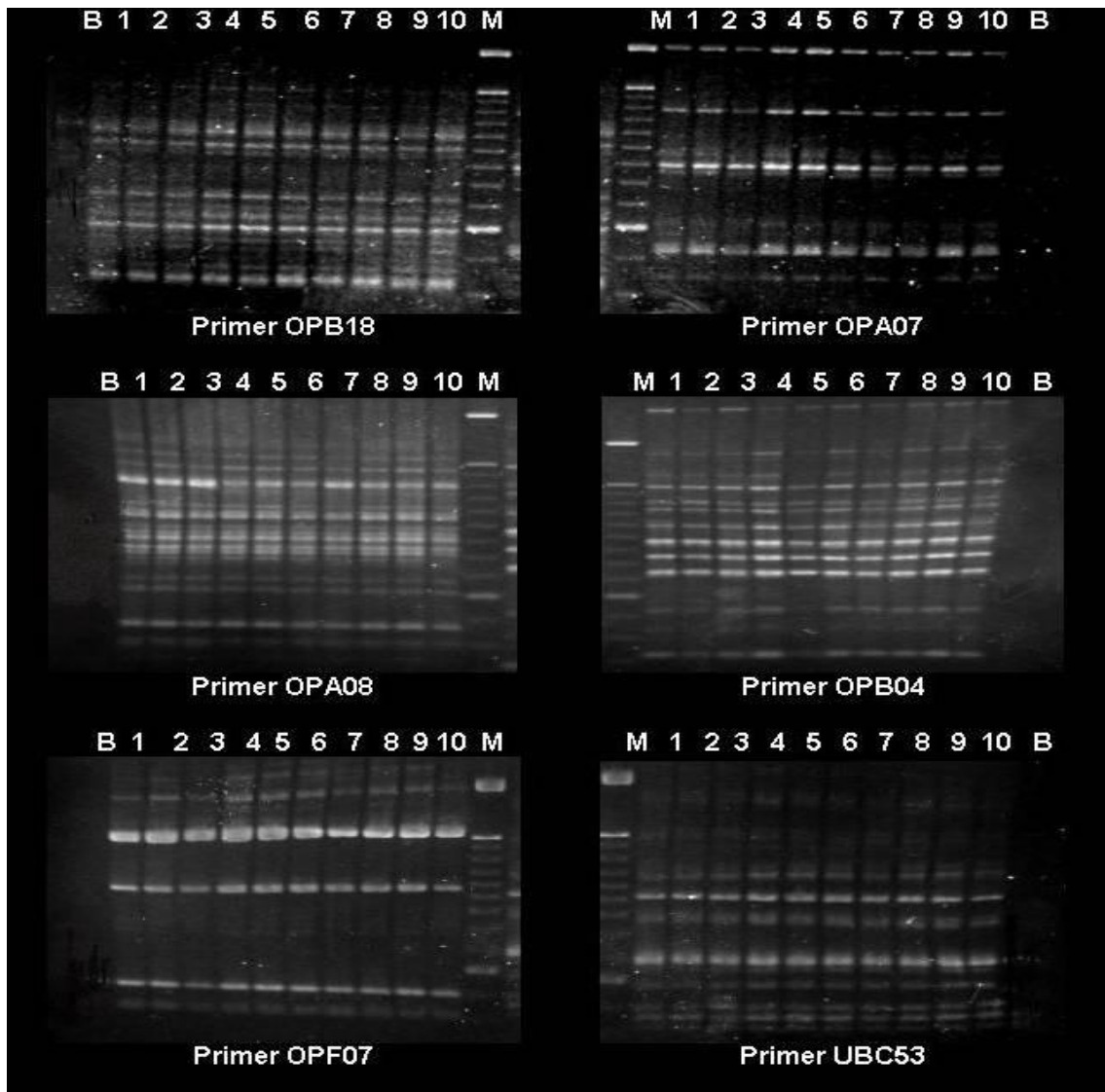


Figura 1 – Produtos da amplificação com marcadores do tipo RADP em exemplares de *Alternanthera brasiliana* gerados pelos *primers* OPB18, OPA07, OPA08, OPB04, OPF07 e UBC53, respectivamente, onde se observa completo monomorfismo entre os genótipos. B – amostra em branco (sem adição de DNA); M – DNA Ladder 100pb. As numerações de 1 a 10 referem-se aos genótipos: G1 (Caiçara/RS); G2 (Porto Alegre/RS - Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul); G3 (Porto Alegre/RS-Faculdade de Agronomia); G4 (Passo Fundo/RS); G5 (Água Santa/RS); G6 (Santa Maria/RS); G7 (Joinville/SC - Univille); G8 (Joinville/SC); G9 (Palhoça/SC); G10 (Curitiba/PR).

Considerando que existem diferenças fenotípicas entre os acessos analisados, como observado na coloração das folhas (Figura 2) e dos caules, isso leva a sugerir que a técnica de RAPD pode não ter sido eficiente em detectar o polimorfismo ao nível de DNA.

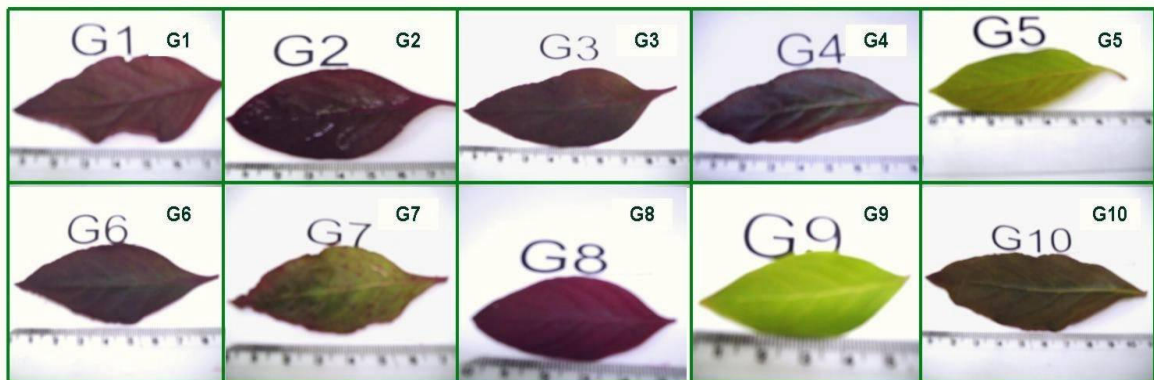


Figura 2 – Detalhes das folhas de *Alternanthera brasiliana*, onde se observam diferenças morfológicas entre os genótipos: G1 (Caiçara/RS); G2 (Porto Alegre/RS - Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul); G3 (Porto Alegre/RS-Faculdade de Agronomia); G4 (Passo Fundo/RS); G5 (Água Santa/RS); G6 (Santa Maria/RS); G7 (Joinville/SC - Univille); G8 (Joinville/SC); G9 (Palhoça/SC); G10 (Curitiba/PR).

#### 4. CONCLUSÕES

Com este resultado, verifica-se que o emprego de um maior número de *primers* RAPD ou de outro sistema de marcadores moleculares, com maior potencial de revelar polimorfismo, como AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), seja opção viável para detectar o polimorfismo ao nível molecular entre as plantas desta espécie. Desta forma, poderia facilitar a discriminação de genótipos de diferentes procedências e a identificação dos mesmos para a seleção dos detentores de variabilidade intraespecífica significativa, de modo a compor um banco de germoplasma mais representativo da espécie.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.
- LAGROTA, M. H. C.; WIGG, M. D.; SANTOS, M. M. G.; MIRANDA, M. M. F.S.; CAMARA, F. P.; COUCEIRO, J. N. S. S.; COSTA, S. S. Inhibitory Activity Of Extracts Of *Alternanthera Brasiliana* (Amaranthaceae) Against The Herpes Simplex Virus. **Phytotherapy Research**. 8:358-361; 1994.
- NEI, M.; LI, W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceeding of National Academy Science**. v. 76, n. 10, p. 5269-5273, 1979.
- RAO, V.R; HODGKIN, T. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 68, p. 1–19, 2002.
- RASUL, M.G.; HIRAMATSU, M.; OKUBO, H. Genetic relatedness (diversity) and cultivar identification by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in teasle gourd (*Momordica dioica* Roxb.). **Scientia Horticulturae**, v. 111, p. 271–279, 2007.
- WANG, B.; LI, W.; WANG, J. Genetic diversity of *Alternanthera philoxeroides* in China. **Aquatic Botany**, v. 81, p. 277–283, 2005.
- XU, H.; FABRICANT, D.S.; PIERSEN, C.E.; BOLTON, J.L.; PEZZUTO, J.M.; FONG, H.; TOTURA, S.; FARNSWORTH, N.R.; CONSTANTINOU, A. A preliminary RAPD-PCR analysis of *Cimicifuga* species and other botanicals used for women’s health. **Phytomedicine**, v. 9, p. 757–762, 2002.