

## Similaridade genética de populações naturais de pimenta-de-macaco por análise RAPD

José Maria D. Gaia<sup>1</sup>; Milton Guilherme da C. Mota<sup>1</sup>; Carmen Célia C. da Conceição<sup>1</sup>; Maria Rosa Costa<sup>2</sup>; José Guilherme S. Maia<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural da Amazônia (FCAP), C. Postal, 917, 66077-530 Belém-PA; E-mail: josegaia@interconect.com.br;

<sup>2</sup>Embrapa Amazônia Oriental, C. Postal 48, 66095-100 Belém-PA, <sup>3</sup>Museu Paraense Emílio Goeldi, C. Postal 399, 66040-170 Belém-PA

### RESUMO

A espécie conhecida como pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L.) possui grande potencial para exploração econômica em função da comprovada utilidade do seu óleo essencial na agricultura e saúde humana. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a diversidade genética de populações naturais dessa planta. Um total de dezoito acessos da planta, provenientes de quatro procedências da Amazônia Brasileira, foi examinado por meio de locos de DNA, gerados por análise RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso). O estudo evidenciou a existência de real diversidade entre as populações examinadas, sendo provável que dentro das localidades investigadas, os padrões da diversidade genética acompanhem os padrões de distribuição geográfica.

**Palavras-chave:** *Piper aduncum* L., óleo, diversidade genética, DNA, germoplasma, domesticação.

### ABSTRACT

**Genetic similarity of natural populations of pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L.) obtained through RAPD analysis**

The species known as pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L.) has great economic exploitation potential based on the proved usefulness of the essential oil in agriculture and human health. The genetic diversity of their natural populations was characterized. A total of eighteen accessions of the plant, obtained from four different origins in the Brazilian Amazon, was examined by means of DNA loci, generated by RAPD analysis. Real genetic diversity was observed between the analyzed populations and it appear that the patterns of the genetic diversity follow the patterns of the geographical distribution.

**Keywords:** *Piper aduncum* L., oil, genetic diversity, DNA, germoplasm, domestication.

(Recebido para publicação em 27 de outubro de 2003 e aceito em 2 de setembro de 2004)

A espécie *Piper aduncum* L. ocorre naturalmente na Amazônia (Mota, *et al.*, 2001a). Conhecida vulgarmente como pimenta-de-macaco, produz um óleo essencial com grande potencial de exploração, uma vez que possui comprovada ação sobre fitopatógenos de culturas tradicionais, como fungos (Bastos, 1997; Morandim *et al.*, 2002), bactérias e moluscos (Orjala *et al.*, 1994), além de comprovada ação analgésica e antiinflamatória com baixos níveis de toxicidade (Monteiro *et al.*, 2001; Fontes Júnior *et al.*, 2002). Estudos da variabilidade fenotípica em populações naturais de pimenta-de-macaco, realizados por Mota *et al.* (2001a, 2001b e 2002), mostraram variação que pode ser aproveitada em programas de melhoramento. A similaridade genética obtida por análise de marcadores de DNA vem sendo usada para estimar a diversidade genética em coleções de germoplasma (Conti *et al.*, 2003). Neste trabalho, foram utilizados loci de DNA como descritores para obter a caracterização da diversidade genética em populações naturais de pimenta-de-macaco, visan-

do a obtenção de cultivares melhoradas, fundamental para a introdução da espécie em sistemas agrícolas da região amazônica.

### MATERIAL E METODOS

Foram analisados 18 acessos de pimenta-de-macaco coletados em quatro municípios da Amazônia Brasileira (Tabela 1). O DNA genômico foi obtido através de folhas recém-coletadas que, após desinfecção, foram maceradas com nitrogênio líquido e, cerca de 200 mg do pó obtido foram transferidos para tubos Eppendorf. Adicionou-se, em seguida, 700 ml de solução extratora. Os tubos foram agitados e colocados em banho-maria a 60°C, durante 60 minutos. O extrato foi misturado com 700 ml de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), para formar uma emulsão. Após centrifugar por 10 minutos a 4°C e 12.000 rpm, o sobrenadante foi cuidadosamente isolado e suspenso em álcool 95% para ocasionar a precipitação do DNA. O material foi colocado em freezer (-20°C) por 20 minutos, sendo,

em seguida, centrifugado por 10 minutos a 4°C e 12.000 rpm, lavado com 1000 ml de etanol 70%, para remover sais e, posteriormente, seco à temperatura ambiente, por aproximadamente 12 horas. O DNA foi ressuspenso com 300 ml RNase/TE (10 µg.ml<sup>-1</sup>). A concentração de DNA foi estimada em gel de agarose 1,0%, pela comparação do DNA total com três concentrações do DNA íntegro de bacteriófago Lambda. As amostras utilizadas no RAPD, após a quantificação total, partiram de diluições da amostra total em água estéril, de modo a conter 5 ng/ml de DNA. As alíquotas foram armazenadas a -20°C.

Após testes iniciais com 100 primers (kits da Operon Technologies), foram selecionados os mais polimórficos: OPO12, OPO15, OPO20, OPTO1, OPTO2, OPTO6, OPT20, OPAW04, OPAW08, OPAW09, OPAW11, OPAW18,

As reações foram desenvolvidas de acordo com o protocolo de Williams *et al.* (1990), com pequenas modificações, num volume final de 13 ml, contendo água destilada autoclavada, 20 mM Tris-

**Tabela 1.** Matriz de similaridade de locos RAPD de acessos de pimenta-de-macaco originários de municípios da amazônia brasileira, mantidos no banco de germoplasma da Universidade Federal Rural da Amazônia. Belém, FCAP, 2002.

Origem		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18
Marabá PA	P1	1,00																	
Manaus AM	P2	0,65	1,00																
Manaus AM	P3	0,66	0,89 (a)	1,00															
Manaus AM	P4	0,64	0,90 (a)	0,91 (a)	1,00														
Manaus AM	P5	0,60	0,87(a)	0,87(a)	0,86(a)	1,00													
Marabá PA	P6	0,68	0,69	0,69	0,66	0,65	1,00												
Goianésia PA	P7	0,69	0,68	0,70	0,70	0,64	0,85(a)	1,00											
Goianésia PA	P8	0,62	0,60	0,58	0,58	0,58	0,65	0,62	1,00										
Goianésia PA	P9	0,49 (b)	0,62	0,59	0,57	0,57	0,68	0,56	0,81(a)	1,00									
Moju PA	P10	0,65	0,63	0,69	0,67	0,57	0,51	0,76 (a)	0,53	0,58	1,00								
Moju PA	P11	0,56	0,55	0,60	0,58	0,49 (b)	0,59	0,67	0,47 (b)	0,47 (b)	0,76	1,00							
Marabá PA	P12	0,62	0,64	0,68	0,66	0,63	0,72	0,73	0,61	0,60	0,80(a)	0,70	1,00						
Moju PA	P13	0,68	0,60	0,68	0,66	0,58	0,70	0,77(a)	0,58	0,55	0,82(a)	0,79(a)	0,84 (a)	1,00					
Marabá PA	P14	0,45 (b)	0,51	0,50 (b)	0,53 (b)	0,45 (b)	0,51	0,54	0,39 (b)	0,40 (b)	0,64	0,61	0,62	0,57	1,00				
Goianésia PA	P15	0,55	0,60	0,60	0,58	0,58	0,66	0,65	0,77(a)	0,72	0,59	0,48 (b)	0,59	0,59	0,45 (b)	1,00			
Marabá PA	P16	0,72	0,60	0,59	0,58	0,59	0,66	0,69	0,61	0,53	0,71	0,65	0,72	0,74	0,47 (b)	0,62	1,00		
Marabá PA	P17	0,51	0,39 (b)	0,42 (b)	0,36 (b)	0,42 (b)	0,51	0,50 (b)	0,36 (b)	0,32 (b)	0,47 (b)	0,53	0,39 (b)	0,53	0,36 (b)	0,44 (b)	0,59	1,00	
Manaus AM	P18	0,42 (b)	0,71	0,71	0,71	0,74	0,55	0,55	0,45 (b)	0,50 (b)	0,60	0,41	0,56	0,50 (b)	0,46 (b)	0,55	0,55	0,42 (b)	1,00

HCl (pH 8,0), 50 mM KCl, 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM de cada dNTP, BSA purificada (2,5 mg/ml), 1,3 mM primer arbitrário, 1 U.I. Taq DNA polimerase e 15 ng de DNA genômico, cobertas com duas gotas de óleo mineral.

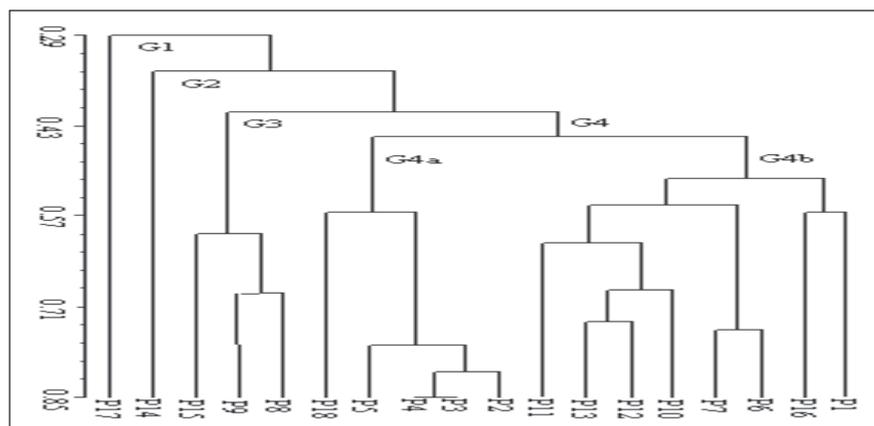
As amplificações foram realizadas em termociclador de DNA Thermolyne Amplitron II modelo DB.80225, sendo realizados 40 ciclos de 1' a 94°C, 1' a 37°C e 2' a 72°C, seguidos de mais 7 minutos a 72°C, para a completa extensão dos produtos amplificados. O método utilizado para separação dos produtos amplificados foi eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio 1 mg/ml. Utilizou-se 13 ml de cada reação, acrescido de 2 ml de uma solução de azul de bromofenol (40%), mais sacarose. Foi utilizado TBE (Trizma base 0,1 M; ácido bórico 1 M e EDTA 0,5 M), como tampão do gel e de corrida. Aplicou-se

um ladder de 1 Kb no início e no final do gel para definir o tamanho aproximado dos fragmentos gerados nas PCRs. Após a eletroforese, os géis foram visualizados e fotografados em equipamento de foto documentação por transiluminação em ultravioleta. Foi construída uma matriz para os fragmentos polimórficos amplificados codificada em sistema binário, atribuindo-se (1) para presença e (0) para ausência de banda. Somente foram consideradas as bandas que não davam margens a dúvidas. Bandas muito fracas, de difícil resolução, não foram incluídas. Para análise dos dados, utilizou-se o NTSYS-pc, versão 2.02. A similaridade entre as amostras foi estimada pelo coeficiente de Jaccard, que gerou a matriz de similaridade. A partir dessa matriz, foi gerado o cluster, pelo método UPGMA, que foi expresso na forma de um dendrograma.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 120 marcadores RAPD, com tamanhos variando de 300 pb a 2200 pb, foram amplificados pelos 12 primers utilizados, dos quais 109 eram polimórficos, gerando 90,83% de polimorfismo. O número de bandas amplificadas variou de 3 (OPAW18) a 16 (OPT02, OPT20) de onde foram observados fragmentos polimórficos variando de 24 (OPAW18) a 160 (OPT02).

A análise da matriz de similaridade, vista na Tabela 1, indicou que os acessos mais divergentes em relação ao conjunto considerado foram P17 e P18. O acesso P17 teve maior similaridade com o acesso P16 (ao nível de 59%) e menor similaridade com o acesso P9 (ao nível de 32%) e o acesso P18 teve maior similaridade com o acesso P5 (ao nível de 74%) e menor similaridade com os



**Figura 1.** Agrupamento de 18 acessos de pimenta-de-macaco originários de quatro municípios da Amazônia Brasileira. Belém, FCAP, 2002.

acessos P1, P11 e P17, respectivamente ao nível de 42%; 41% e 42%.

Os valores de similaridade observados na matriz podem ser divididos em três grupos, conforme mostra a Tabela 1, do seguinte modo: grupo I: de 75% a 100% (os mais similares) (letra a); grupo II: de 50% a 75% (intermediário) e, Grupo III: de 0% a 50% (os menos similares) (letra b).

Os maiores valores de similaridade envolveram os acessos P2, P3, P4 e P5 e também os acessos P10, P11, P12 e P13, sendo que os maiores valores foram observados nos pares P3 e P4 (91%) e P2 e P4 (90%). O grupo intermediário abrangeu 70,6% dos pares considerados na matriz de similaridade.

Considerando os acessos P2, P3 e P4 (com níveis de ligação próximos de 90%) como os mais representativos do conjunto examinado, podemos sugerir, em relação a eles, cruzamentos de genótipos contrastantes, tal como o cruzamento de P4 e P17 (em relação a P3) ou o cruzamento de P3 com o P17 (em relação a P4), muito embora os marcadores moleculares não forneçam nenhuma informação sobre o potencial agrônomo dos descendentes dos referidos cruzamentos, a não ser que tais progenitores apresentem genes marcadores contidos nos locos de DNA analisados ligados a algum caráter agrônomo desejável, que no caso da pimenta-de-macaco é a produção de óleo essencial, ou a caracteres correlacionados. Tais dados informam o grau de semelhança genética entre os pares de acessos das procedências exa-

minadas. Neste caso, tal informação pode ser utilizada em programas de melhoramento genético para produção de óleo essencial e caracteres correlacionados. Espécies domesticadas, devido à seleção artificial direcionada para um dado caráter desejável, podem ser prejudicadas na expressão de outro caráter, também desejável, se tais caracteres se apresentarem correlacionados negativamente, já que o melhoramento de um caráter pode causar mudanças simultâneas em outro (Falconer, 1987). Na hipótese de haver genes marcadores, eles podem auxiliar na seleção para o caráter de maior interesse, como a produção de óleo essencial, no caso da pimenta-de-macaco.

A Figura 1 mostra o agrupamento das 18 procedências de pimenta-de-macaco pela utilização do coeficiente de similaridade de Jaccard. O dendrograma pode ser dividido em quatro grupos: O grupo G1 é o mais dissimilar em relação ao conjunto e está constituído por um único acesso (P17), ligado ao conjunto no nível de 29% de similaridade. O segundo grupo mais dissimilar (G2), igualmente, está constituído por um único acesso (P14), ligado ao conjunto no nível de, aproximadamente 32% de similaridade. O terceiro grupo está constituído por três acessos (P15, P9, P8) ligados ao conjunto no nível de aproximadamente 41% de similaridade. Finalmente, o quarto grupo (G4) se encontra dividido em dois subgrupos (G4a e G4b) ligados entre si ao nível de 44% de similaridade.

No conjunto, os acessos mais divergentes entre si foram os pares: P17 e P4;

P17 e P3; P17 e P2, seguido dos pares P14 e P4; P14 e P3; P14 e P2. Os pares P9 e P8; P4 e P3; P12 e P13; P7 e P6; e P16 e P1 estão no mesmo nível de similaridade no dendrograma, apresentando, portanto, identidade genética.

Considerando a origem geográfica dos acessos (Tabela 1) e o agrupamento gerado no dendrograma (Figura 1), notamos que o subgrupo G4a está constituído por todos os acessos procedentes do Estado do Amazonas (Manaus), sendo, pois, estes acessos similares entre si e dissimilares em relação aos demais acessos, procedentes de municípios do estado do Pará. Estes, por sua vez, não apresentaram uma nítida separação, estando presentes nos demais grupos, com destaque para o subgrupo G4b, onde observamos acessos de todos os três municípios do Pará. Neste subgrupo figuraram quatro acessos do município de Marabá (P1, P16, P6 e P12), os três do município de Moju (P10, P13 e P11) e um do município de Goianésia (P7).

Dentre os acessos do Estado do Pará, os de Marabá, em número de seis, foram os mais dissimilares entre si, separando-se em três grupos: um no grupo G1 (P17), um no grupo G2 (P14) e quatro no subgrupo G4b. Os acessos procedentes de Goianésia, em número de quatro, separaram-se no grupo G3 (P8, P9 e P15) e um no subgrupo G4b (P7). Os acessos procedentes de Moju, em número de três, foram os mais similares entre si, estando todos no subgrupo G4b (à esquerda).

Os grupos que apresentaram maior divergência genética foram G1, G2 e G3, todos eles apresentados somente acessos do estado do Pará. Observou-se, portanto, que existe mais diversidade no Pará do que no Amazonas, uma vez que os acessos do Pará estão distribuídos em diversos grupos e subgrupos, enquanto que os acessos do Amazonas separaram-se num só grupo (G4a), muito embora esta diversidade encontrada no Pará possa ser devida ao uso de acessos de origens diferentes, enquanto que os acessos do Amazonas são somente de uma origem, porém o fato dos acessos originários dos municípios de Marabá e Goianésia (Pará) se apresentarem em grupos diferentes pode ser indicio de haver, de fato, maior diversi-

dade no Pará, além de que os números de acessos por origem serem próximos (Marabá: seis, Manaus: cinco e Goianésia: três). No caso de Goianésia, houve diversidade de grupos mesmo com um número menor de acessos em relação a Manaus.

A separação dos acessos de Manaus em relação aos acessos dos municípios paraenses concorda relativamente com certas diferenças botânicas, como a cor dos ramos ortotrópicos, podendo até mesmo constituir variedades diferentes. Gottlieb (1981), investigando óleos essenciais em plantas amazônicas, distinguiu duas variedades de pimenta-de-macaco, a variedade *cordulatum*, encontrada no estado do Amazonas e a variedade *aduncum*, encontrada no estado do Pará.

Redig *et al.* (2001), investigando caracteres relacionados com a germinação de sementes de pimenta-de-macaco de diferentes procedências, detectaram variabilidade entre elas, e Redig *et al.* (2002), investigando clones de uma mesma procedência, não detectaram variabilidade genética nos caracteres morfológicos e fitoquímicos tomados para análise, indicando a presença de variabilidade genética entre diferentes localidades, variando provavelmente com sua distribuição geográfica. Fatos que foram também observados neste trabalho, uma vez que acessos de uma mesma localidade separaram-se num mesmo grupo (G4a) no dendrograma.

Deste modo, podemos concluir que, considerando a matriz de similaridade, as quatro populações investigadas mostraram uma ampla faixa de variabilidade genética, oscilando de 0,32 a 0,91 e os acessos investigados foram divididos em três grupos, enquanto que, pelo dendrograma, os acessos formaram quatro grupos. Os acessos mais divergen-

tes foram P17 e P14 e os mais similares foram P3 e P4, pela matriz de similaridade e, pelo dendrograma, os grupos G1, G2 e G3 foram os mais divergentes. Ainda pelo dendrograma, foi observada uma tendência para os acessos de uma mesma localidade participarem do mesmo grupo de similaridade, com destaque para os acessos de Manaus e Moju e que os acessos originários do estado do Pará apresentaram diversidade genética potencial a ser explorada em programas de melhoramento genético.

## LITERATURA CITADA

- BASTOS, C.N. Efeito do óleo de *P. aduncum* sobre *Crinipellis pernicioso* e outros fungos fitopatogênicos. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.3, n.22, p.441-443, 1997.
- CONTI, J.H.; MINAMI, K.; GOMES, L.H.; TAVARES, F.C.A. Estimativa da similaridade genética e identificação de cultivares do morangueiro por análise de RAPD. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.20, n.2, p.145-152, 2002.
- FALCONER, D.S. Introdução à genética quantitativa. Viçosa: UFV, 1987. 279 p.
- FONTES JÚNIOR, E.A.; SOUSA, P.J.C.; SOUSA, R.C.; MAIA, J.G.S.; SANTOS, A.M.S. Atividade antiinflamatória e analgésica do óleo essencial de *Piper aduncum* In: Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 17. 2002. Salvador-Ba: FESBE 2002. Salvador-Ba: Mix Tecnologia Digital, 2002. p.66.
- GOTTLIEB, O.R.; KOKETSU, M.; MAGALHÃES, M.T.; MAIA, J.G.S.; MENDES, P.H.; ROCHA, A.I.; SILVA, M.L.; VILBERG, V.C. Óleos essenciais da Amazônia VII. *Acta Amazônica*, Manaus, v.11, n.1, p.143-148, 1981.
- MAIA, J.G.S.; ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A. *Plantas aromáticas na Amazônia e seus óleos essenciais*. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2000, 186 p. p.123-127. (Coleção Adolpho Ducke).
- MONTEIRO, G.M.; LIRA, D.S.; MAIA, J.G.S.; BARROS, C.A.L.; SOUSA, P.J.C. Acute and subacute toxicity of the essential oil of *Piper aduncum* In: Congresso Internacional de Ciências Farmacêuticas, 3. Águas de Lindóia. 2001. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.13. p.S153, 2001.

MORANDIM, A.A.; NAVICKIENE, H.M.D.; REGASINI, L.O.; TELASCREE, M.; AGRIPINO, D.; FIRRI, A.F.; CAVALHEIRO, A.J.; KATO, M.J.; MARQUES, M.O.M.; BOLZANI, V.S.; YOUNG, M.C.M.; FURLAN, M. Comparação da composição química e atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Piper aduncum* L., *P. arboreum* AUBLET. e *P. tuberculatum* JACQ. In: Simpósio de plantas medicinais do Brasil, 17. [CD-ROM]. Cuiabá: CBO, 2002. (Anais/Resumos).

MOTA, M.G.C.; COSTA, C.C.C.; MAIA, J.G.S.; GAIA, J.M.D. Coleta de germoplasma e distribuição geográfica de *Piper aduncum* L. na Amazônia Brasileira. In: Simpósio de recursos genéticos da América Latina e Caribe, 3. Resumos. Londrina-PR: III SIRGEALC, 2001a.

MOTA, M.G.C.; CONCEIÇÃO, C.C.C.; MAIA, J.G.S.; GAIA, J.M.D. Variabilidade fenotípica em populações naturais de *Piper aduncum*. In: Simpósio de recursos genéticos da América Latina e Caribe, 3. Resumos. Londrina: III SIRGEALC, 2001b.

MOTA, M.G.C.; CONCEIÇÃO, C.C.C.; GAIA, J.M.D.; MAIA, J.G.S. Variabilidade fenotípica para o rendimento em óleo essencial e teor de dilapiol em populações naturais de pimenta-de-macaco na Amazônia Brasileira. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.20, n.2, 2002. Suplemento 2.

MUKERJEE, S.K.; SAXENA, V.S.; TOMAR, S.S. *Journal of Agricultural Food Chemistry* v.27, p.1209, 1979.

ORJALA, J.; WRIGHT, A.D.; BEHREND, H.; FOLKERS, G.; STICHER, O.; RUEGGGER, H.; RALI, T. *Journal Nat. Prod.*, v.56, p.18, 1994.

REDIG, M.S.F.; MOTA, M.G.C.; CONCEIÇÃO, C.C.C.; RODRIGUES, V.L.F.; GAIA, J.M.D. Estimativas de parâmetros genéticos para a germinação de sementes de *Piper aduncum* L. (pimenta-de-macaco). In: Seminário de iniciação científica da FCAP, 12. Anais. Belém, 2002.

REDIG, M.S.F.; MOTA, M.G.C.; CONCEIÇÃO, C.C.C.; RODRIGUES, V.L.F.; GAIA, J.M.D. Estimativas de parâmetros genéticos de clones de *Piper aduncum* L. (pimenta-de-macaco). In: Seminário de iniciação científica da FCAP, 12. Anais. Belém, 2002.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, v.18, p.6531-6535, 1990.