

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL**

Leonardo Severo da Costa

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA, ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL E  
ANATOMIA FOLIAR DE *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.**

Santa Maria, RS

2018



**Leonardo Severo da Costa**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA, ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL E ANATOMIA FOLIAR DE *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Engenharia Florestal**.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra Lia Rejane Silveira Reiniger

Santa Maria, RS  
2018

Costa, Leonardo Severo da  
CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA, ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL E  
ANATOMIA FOLIAR DE *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.  
/ Leonardo Severo da Costa.- 2018.  
118 p.; 30 cm

Orientadora: Lia Rejane Silveira Reiniger  
Coorientadores: Valdir Marcos Stefenon, Berta Maria  
Heinzmann

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós  
Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2018

1. Canela-preta 2. Espécie Florestal 3. Biologia  
Molecular 4. Extrativos Vegetais 5. *Nectandra*  
*megapotamica* I. Reiniger, Lia Rejane Silveira II.  
Stefenon, Valdir Marcos III. Heinzmann, Berta Maria IV.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

**Leonardo Severo da Costa**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA, ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL E ANATOMIA  
FOLIAR DE *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Engenharia Florestal**.

**Aprovado em 16 de março de 2018:**

Prof<sup>a</sup>. D<sup>ra</sup>. Lia Rejane Silveira Reiniger (UFSM)  
(Presidente/Orientador)

Prof<sup>a</sup>. D<sup>ra</sup>. Berta Maria Heinzmann (UFSM)

Prof. Dr. Valdir Marcos Stefenon (UNIPAMPA)

Prof. Dr. Diego Pascoal Golle (UNICRUZ)

D<sup>ra</sup>. Caroline Borges Bevilacqua (UFSM)

Santa Maria, RS  
2018.



## AGRADECIMENTOS

À minha família, por acreditar em mim, pelo apoio nos momentos difíceis, pelo carinho, e principalmente pela educação que me proporcionaram, pois foi o que me permitiu chegar até aqui.

À minha esposa Caroline Weimann, pelo apoio e incentivo nos momentos que mais precisei, por compartilhar alegrias e tristezas, por todo carinho, pelo amor, por estar sempre disponível, por abrir mão de oportunidades para encarar o desconhecido ao meu lado.

Aos amigos que acompanharam todo meu crescimento, aos que conheci no decorrer da jornada, todos contribuíram de alguma maneira e com algum ensinamento.

À professora Maria Helena, pela orientação no período de doutorado sanduíche na Universidade de Lisboa, muito obrigado pela disponibilidade, boa vontade e principalmente por todos ensinamentos transmitidos.

À minha orientadora, Professora Lia Rejane Silveira Reiniger, por todo apoio e oportunidades oferecidas que contribuíram para minha formação profissional e crescimento pessoal, pela orientação durante todo período de doutoramento, pela paciência, pela ajuda, e principalmente pela amizade.

Aos colegas de laboratório por toda ajuda na execução dos ensaios deste estudo, pelos momentos de alegria e descontração, pela amizade e carinho.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, por todas as oportunidades oferecidas e pelo conhecimento compartilhado.

Ao CNPq, pela bolsa concedida, que viabilizou a execução deste trabalho.

À toda equipe do Laboratório de Extrativos Vegetais da UFSM, por auxílio, disponibilidade, boa vontade e carinho.

Enfim, agradeço a todas pessoas que me apoiaram, colaboraram e torceram por mim.

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal  
Universidade Federal de Santa Maria

### **CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA, ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL E ANATOMIA FOLIAR DE *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.**

AUTOR: Leonardo Severo da Costa  
ORIENTADORA: Lia Rejane Silveira Reiniger  
Data e local da defesa: Santa Maria, 16 de março de 2018.

*Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. é uma espécie florestal nativa do Brasil que apresenta importância ecológica e farmacológica, devido ao seu grande potencial para desenvolvimento de novos fármacos. Este aspecto tem sido investigado nos últimos anos por alguns pesquisadores, principalmente no que se refere à sazonalidade da produção do óleo essencial da espécie, sendo constatada uma grande variabilidade em sua composição. No entanto, adicionalmente aos efeitos da sazonalidade, devem ser consideradas as características genéticas da espécie, que, aliada aos fatores abióticos, determinam a composição do óleo essencial. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo investigar aspectos relevantes ainda não explorados acerca de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., que contribuam para compreender a biossíntese de óleo essencial na espécie, bem como em espécies congêneres. Primeiramente, foi analisada a estrutura e a diversidade genética de uma população natural, utilizando-se marcadores moleculares RAPD. No que se refere à análise do óleo essencial, foram avaliados os 12 indivíduos integrantes dessa população em duas estações do ano. Posteriormente, visando compreender a relação entre a diversidade genética da espécie e a composição do óleo essencial, foi realizada uma análise de correlação entre estes fatores. Foram também realizados ensaios microscópicos, em que foi avaliada a possibilidade de utilização de amostras foliares congeladas na confecção de lâminas para análise da anatomia foliar. Por fim, foram efetuados experimentos exploratórios visando a identificação de genes responsáveis pela síntese de terpenos, que codificam as terpeno sintases. Os marcadores RAPD permitiram identificar que a população se encontra subdividida em três grupos, sendo verificado elevados níveis de diversidade genética dentro dos *clusters* e alta diferenciação genética entre eles. Devido à grande variabilidade observada, tanto no que diz respeito à genética, evidenciada pelos marcadores RAPD, como à composição do óleo essencial, não foi verificada correlação entre esses componentes. Já no que se refere à análise foliar, foi possível realizar a descrição, bem como identificar estruturas secretoras e de armazenamento do óleo essencial. Nos resultados adicionais, a análise estacional da composição do óleo essencial revelou grande variabilidade, comparado a outros estudos realizados anteriormente com os mesmos indivíduos. Por fim, os ensaios realizados no campo da expressão gênica, permitiram obter a sequência parcial de um possível gene relacionado às terpeno sintases. O conjunto de resultados obtidos poderá contribuir para a continuidade das pesquisas relacionadas à *Nectandra megapotamica* em diversas áreas de conhecimento, as quais ainda não haviam sido exploradas.



**Palavras-chave:** Canela-preta. Biologia molecular. Terpeno sintases. Extrativos vegetais. Metabolismo secundário. Cavidades secretoras.

## ABSTRACT

Doctor Thesis  
Post-Graduation Course in Forest Engineering  
Universidade Federal de Santa Maria  
Date and Place of defense: Santa Maria, RS, March 16<sup>th</sup>, 2018.

### **GENETIC CHARACTERIZATION, ESSENTIAL OIL ANALYSIS AND FOLIAR ANATOMY of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.**

AUTHOR: Leonardo Severo da Costa  
ADVISOR: Lia Rejane Silveira Reiniger

*Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. is a forest species native to Brazil, which presents ecological and pharmacological importance, due to its great potential for the development of new drugs. This aspect has been investigated in recent years by some researchers, mainly in relation to the seasonality of the production of the essential oil of the species, being a great variability in its composition. However, in addition to the effects of seasonality, the genetic characteristics of the species, which together with the abiotic factors determine the composition of the essential oil should be considered. In this sense, the present study had the objective to investigate relevant aspects not yet explored about *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. that contribute to understand the biosynthesis of essential oil in the specie, as well as in congeners. First, the structure and genetic diversity of a natural population were analyzed using RAPD molecular markers. Regarding the analysis of essential oil, the 12 individuals belonging to this population were evaluated in two seasons of the year. Subsequently, to understand the relationship between the genetic diversity of species and essential oil composition, the correlation between these factors was performed. Tests were carried out in the field of microscopy, in which the possibility of using frozen leaf samples was evaluated in the preparation of leaf samples for leaf anatomy analysis was verified. Also, an analysis was performed of the essential oil composition in two seasons. Finally, exploratory experiments were carried out to identify the genes responsible for the synthesis of terpenes, which encode terpene synthases. The RAPD markers allowed to identify that the population is subdivided in three clusters, being verified high levels of genetic diversity within the clusters and high genetic differentiation between them. Due to the great variability observed, both with respect to genetics, evidenced by RAPD markers, and to the essential oil composition, no correlation between these components was verified. Regarding the foliar analysis, it was possible to perform the description, as well as to identify secretory and storage structures. In the additional results, the seasonal analysis of the essential oil composition revealed great variability in oil composition, compared to other studies performed previously with the same individuals. Finally, the tests performed in the field of gene expression, allowed to obtain the partial sequence of a possible gene related to terpene synthases. The set of results obtained could contribute to the continuity of the researches related to *Nectandra megapotamica* in several areas of knowledge, which had not yet been explored.

**Keywords:** Canela-preta. Molecular Biology. Terpene synthases. Plant extracts. Secondary metabolism. Secretory cavities.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação do mapa do estado do Rio Grande do Sul com área de ocorrência de *Nectandra megapotamica* Mez. Fonte: (REITZ et al., 1989). ...22

### ARTIGO 1

Figure 1.  $\Delta K$  likelihood distribution (A). Estimated population structure (B). Each individual is represented by a vertical column, which is partitioned into segments of different shades of grey that represent the individual estimated membership fractions in k clusters. ....33

Figure 2. Genetic relationship among 12 *Nectandra megapotamica* individuals as determined by principal coordinate analysis (PCoA). Axis 1 accounts for 38.80% and axis 2 for 12.23% of the variation in the data. ....34

### ARTIGO 2

Figure 1. In front view, adaxial face of epidermis of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. A) Image taken in fluorescence microscope with visible light; B) Image taken with a fluorescence microscope with UV filter. ....42

Figure 2. In front view, abaxial face of epidermis of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., image obtained by SEM. A) Abaxial face of epiderms. B) Stoma in the abaxial face. ....43

Figure 3. Leaf blade of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. (transversal section) obtained by fluorescence microscopy: ADE (adaxial epidermis), ABE (abaxial epidermis), PP (palisade parenchyma), SP (spongy parenchyma), SC (secretory cavity), VB (vascular bundle). ....45

Figure 4. A) Aspect of leaf blade in frontal view; B) Aspect of the leaf blade with emphasis on the secretory cavity. ADE (adaxial epidermis), ABE (abaxial epidermis), PP (palisade parenchyma), SP (spongy parenchyma), SC (secretory cavity). ....46

Figure 5. Leaf blade of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. (transversal section), with focus on the secretory cavity and its surrounding, obtained by SEM. ADE (adaxial epidermis), PP (palisade parenchyma), SC (secretory cavity). ....47

Figure 6. Transversal section of the central vein of leaf tissues of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. A) Aspect of the central vein in optic microscopy; B) Aspect of the central vein in fluorescence microscopy with UV filter. AE (adaxial epidermis), P (phloem), X (xylem), SP (spongy parenchyma), CO (collenchyma). ....48

Figure 7. Transverse section of the central vein of leaf tissues of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. A) Aspect of the central vein obtained by SEM; B) Aspect of central vein angled. ADE (adaxial epidermis), P (phloem), X (xylem), SP (spongy parenchyma), CO (collenchyma). ....49

### ARTIGO 3

Figure 1. Geographical location of the 12 individuals of *N. megapotamica* in Itaara, Rio Grande do Sul, Brazil. ....56

Figure 2. Cluster analysis of 12 *Nectandra megapotamica* individuals as determined by principal coordinate analysis (PCoA). Axis 1 accounts for 38.80% and axis 2 for 12.23% of the variation in the data. Font: Costa et al., 2015. ....59

Figure 3. Principal components analysis of the volatile oils chemical components from the 12 individuals *Nectandra megapotamica* in summer 2015 (A) and summer 2016 (B). For the analysis, six components present in percentages  $\geq 10\%$  in, at least, one oil sample, were considered. ....63

## RESULTADOS ADICIONAIS I

Figura 1 - Localização geográfica dos 12 indivíduos de *N. megapotamica* em Itaara, Rio Grande do Sul, Brasil.....69

## RESULTADOS ADICIONAIS II

Figura 1 – Localização dos indivíduos de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.. .....69

Figura 2 – RNA total isolado de 12 genótipos de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.....86

Figura 3 – Teste com iniciadores desenvolvidos para *Solanum tuberosum* (18S ST), *Pinus pinaster* e *Pinus pinea* (18S PP) e *Thymus caespitius* (EF) com cDNA de quatro genótipos de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.....86

Figura 4 – Teste com iniciador desenvolvido para *Solanum tuberosum* com cDNA de 12 genótipos de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.....87

Figura 5 – Esquema das terpeno sintases. a.a., aminoácidos. Fonte: Bohlmann et al. (1998b).....89

Figura 6 – Alinhamento das sequências de *Laurus nobilis* e *Litsea cubeba*. Em destaque, o motivo conservado DDXD. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.....90

Figura 7 – Sequências obtidas com o genótipo 9 de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez, com destaque para os ruídos no início e final (destaque em preto). Santa Maria, RS, UFSM, 2018.....93

Figura 8 – Sequências obtidas com o genótipo 9 de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez, após processamento no ‘software Geneious’, em que os ruídos do início e final foram eliminados. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.....94

Figura 9 – Sequência consenso gerada pelo ‘software Geneious’ para o fragmento obtido com o emprego dos iniciadores Fw\_4-Rv\_5 no genótipo 9 de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2018. ....95

Figura 10 – Alinhamento da sequência obtida para *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. com os iniciadores Fw\_4 – Rv\_5, com as sequências utilizadas para o desenho dos iniciadores. Destacado em vermelho o motivo conservado DDXD. Santa Maria, RS, UFSM, 2018. ....97

Figura 11 – Sequências obtidas com o genótipo 9 de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez, com destaque para os ruídos no início e final (destaque em preto). Santa Maria, RS, UFSM, 2018. ....98

Figura 12 – Sequências obtidas com o genótipo 9 de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez, após processamento no ‘software Geneious’, em que os ruídos do início e final foram eliminados. Santa Maria, RS, UFSM, 2018. ....99

Figura 13 – Sequência consenso gerada pelo ‘software Geneious’ para o fragmento obtido com os iniciadores Fw\_1\_1 – Rv\_4 com o genótipo 9 de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2018. ....100

Figura 14 - Alinhamento da sequência obtida para *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. com os iniciadores Fw\_1\_1 – Rv\_4, com as sequências utilizadas para o desenho dos iniciadores. Destacado em vermelho a sequência conservada DDXD. Santa Maria, RS, UFSM, 2018. ....101

Figura 15 - Sequência consenso gerada pelo ‘software Geneiou’s para o fragmento obtido com os iniciadores Fw\_4 – Rv\_5 e Fw\_1\_1 – Rv\_4 com o genótipo 9

	de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2018. .....	103
Figura 16 -	Alinhamento da sequência consenso gerada a partir das sequências obtidas com os iniciadores Fw_4 – Rv_5 e Fw_1_1 – Rv_4 para <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez., com as sequências utilizadas para o desenho dos iniciadores. Destacado em vermelho a sequência conservada DDXXD. Santa Maria, RS, UFSM, 2018. ....	104
Figura 17 -	Sequências obtidas com o genótipo 9 (repetição c) de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez, com destaque para os ruídos no início e final (destaque em preto). Santa Maria, RS, UFSM, 2018. ....	106
Figura 18 -	Sequências obtidas com o genótipo 9 (repetição c) de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez, após processamento no ‘software Geneious1. Santa Maria, RS, UFSM, 2018. ....	106
Figura 19 -	Sequências obtidas com o genótipo 9 (repetição e) de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez, com destaque para os ruídos no início e final (destaque em preto). Santa Maria, RS, UFSM, 2018. ....	107
Figura 20 -	Sequências obtidas com o genótipo 9 (repetição e) de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez, após processamento no ‘software Geneious’. Santa Maria, RS, UFSM, 2018. ....	107
Figura 21 –	Sequência consenso gerada pelo ‘software Geneious’ para o fragmento obtido com os iniciadores Fw_4 – Rv_6 com o genótipo nove (repetições 9c e 9e) de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.....	108
Figura 22 -	Alinhamento da sequência obtida para <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez. com os iniciadores Fw_4 – Rv_6, com as sequências utilizadas para o desenho dos iniciadores. Destacado em vermelho o motivo conservado DDXXD. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.....	109
Figura 23 -	Sequência consenso gerada pelo ‘software Geneious’ para todos os fragmentos obtidos com o genótipo 9 de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.....	110

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

Table 1. Coordinates and elevation of the collection area (Itaara, Rio Grande do Sul, Brazil) of the 12 <i>Nectandra megapotamica</i> individuals (N1–N12) used in this study.....	31
Table 2. Selected Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) primers used in this study for the genetic analysis of 12 <i>Nectandra megapotamica</i> individuals along with the number of obtained bands, number of polymorphic bands, and percentage of polymorphic bands.....	32
Table 3. Number of individuals (N) and genetic parameters of the three clusters ( $K = 3$ ), as determined by STRUCTURE (Pritchard et al., 2000) and principle coordinates analysis, of a natural population of 12 <i>Nectandra megapotamica</i> individuals. ....	34

### ARTIGO 3

Table 1. RAPD primers sequence used for the screening of the 12 individuals of <i>Nectandra megapotamica</i> .....	56
Table 2. Selected Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) primers used in this study for the genetic analysis of 12 <i>Nectandra megapotamica</i> individuals along with the number of obtained bands, number of polymorphic bands, and percentage of polymorphic bands.....	58
Table 3. Relative amounts (%) of summer 2015 samples of components $\geq 10\%$ in, at least, one oil sample and of the grouped components in the volatile oils from the 12 individuals (A1-A12) of <i>Nectandra megapotamica</i> .....	60
Table 4. Relative amounts (%) of components $\geq 10\%$ in of summer 2016 samples, one oil sample and of the grouped components in the volatile oils from the 12 individuals of <i>Nectandra megapotamica</i> . ....	61

### RESULTADOS ADICIONAIS I

Tabela 1 – Quantidade de material vegetal utilizado de cada um dos 12 indivíduos de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez., coletado no verão e inverno de 2015, utilizando hidrodestilação como método para obter o óleo essencial.....	70
Tabela 2 - Composição química do óleo essencial de folhas de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez. coletadas no Verão de 2015. Santa Maria, RS, UFSM, 2018. ....	72
Tabela 3 - Composição química do óleo essencial de folhas de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez. coletadas no Inverno de 2015. Santa Maria, RS, UFSM, 2018. ....	75

### RESULTADOS ADICIONAIS II

Tabela 1 – Genes de referência testados com cDNA obtido de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2018. ....	75
Tabela 2 - Perfis térmicos testados com os iniciadores desenvolvidos para <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2018. ....	75
Tabela 3 - Valores de absorvância no comprimento de onda de 260 (A260) e 280 nm (A280), razão A260/A280 e concentração (ng $\mu\text{L}^{-1}$ ) de RNA total isolado de 12 genótipos de <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2018. ....	75

Tabela 4 – Resultado do BLAST realizado no ‘GenBank’. Santa Maria, RS, UFSM, 2018. ....	75
Tabela 5 – Iniciadores desenhados para <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2018. ....	91
Tabela 6 – Resultado do BLAST realizado no ‘GenBank’ a partir de uma sequência obtida para <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2018. ....	96
Tabela 7 – Resultado do BLAST realizado no ‘GenBank’ a partir de uma sequência obtida para <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2018. ....	101
Tabela 8 – Resultado do BLAST realizado no ‘GenBank’ a partir de uma sequência obtida para <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2018. ....	104
Tabela 9 - Resultado do BLAST realizado no ‘GenBank’ a partir de uma sequência obtida para <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2018. ....	108

## SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO .....	18
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. OBJETIVOS .....	26
2.1. OBJETIVO GERAL .....	26
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
3. ARTIGO 1 - GENETIC DIVERSITY AND STRUCTURE OF A NATURAL POPULATION OF <i>NECTANDRA MEGAPOTAMICA</i> (SPRENG.) MEZ. USING RAPD MARKERS.....	27
ABSTRACT.....	29
INTRODUCTION.....	30
MATERIAL AND METHODS .....	30
PLANT MATERIAL AND DNA EXTRACTION .....	30
RAPD REACTIONS.....	31
DATA ANALYSIS.....	32
RESULTS AND DISCUSSION.....	32
ACKNOWLEDGMENTS .....	35
REFERENCES.....	35
4. ARTIGO 2 - USE OF FROZEN LEAVES FOR MORPHO-ANATOMICAL CHARACTERIZATION OF <i>NECTANDRA MEGAPOTAMICA</i> (SPRENG.) MEZ., LAURACEAE.....	38
INTRODUCTION.....	39
MATERIAL AND METHODS .....	41
RESULTS AND DISCUSSION.....	41
CONCLUSION .....	49
REFERENCES.....	50
5. ARTIGO 3 - LEAF VOLATILE OIL ANALYSIS AND RAPD MARKERS: A COMBINED APPROACH FOR THE STUDY OF <i>NECTANDRA MEGAPOTAMICA</i> (SPRENG.) MEZ. ....	53
INTRODUCTION.....	54
MATERIALS AND METHODS.....	55
PLANT MATERIAL .....	55
DNA EXTRACTION AND RAPD AMPLIFICATION.....	56
EXTRACTION OF VOLATILE OILS AND IDENTIFICATION OF CONSTITUENTS.....	57
DATA ANALYSIS.....	57
RESULTS AND DISCUSSION.....	57
MOLECULAR ANALYSIS .....	57
VOLATILE OIL ANALYSIS .....	59



<b>REFERENCES.....</b>	<b>64</b>
<b>6. RESULTADOS ADICIONAIS I .....</b>	<b>68</b>
<b>ANÁLISE ESTACIONAL DA COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE UMA POPULAÇÃO DE <i>NECTANDRA MEGAPOTAMICA</i> (SPRENG.) MEZ. ....</b>	<b>68</b>
<b>OBJETIVO .....</b>	<b>68</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>68</b>
Material vegetal .....	68
Extração de óleo essencial e identificação de constituintes .....	69
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>70</b>
Análise do óleo essencial .....	71
<b>7. RESULTADOS ADICIONAIS II .....</b>	<b>78</b>
<b>IDENTIFICAÇÃO DE GENES DAS TERPENO SINTASES EM <i>NECTANDRA MEGAPOTAMICA</i> (SPRENG.) MEZ. ....</b>	<b>78</b>
<b>OBJETIVO .....</b>	<b>78</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>78</b>
Obtenção do material botânico.....	78
Extração de RNA total, síntese de cDNA e teste com genes de referência .....	79
Desenho dos iniciadores .....	81
Sequenciamento dos produtos de PCR .....	82
Amplificação rápida de extremidades de cDNA (RACE – Rapid Amplification of cDNA Ends).....	83
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>83</b>
Extração de RNA total e síntese de cDNA .....	83
Desenho dos iniciadores .....	87
Sequenciamento dos produtos de PCR .....	91
Amplificação rápida das extremidades do RNA (RACE – ‘Rapid Amplification of cDNA Ends’).....	110
<b>8. CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>111</b>
<b>9. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>113</b>

## APRESENTAÇÃO

O presente estudo é composto pela apresentação e discussão dos resultados dos experimentos que compõem a Tese de Doutorado em Engenharia Florestal. Primeiramente, é apresentada uma introdução geral sobre o tema, fornecendo informações sobre o contexto histórico e caracterizando a espécie florestal em estudo, descrevendo seus usos e potenciais de exploração. Adicionalmente, é descrito o estado da arte da espécie, de modo a fornecer subsídios que permitam compreender o conjunto de informações e resultados já obtidos. Esta etapa é fundamental no processo de evolução da ciência, pois permite identificar o que já foi realizado, determinando a presença de contradições, lacunas e vieses. Assim, surge a oportunidade da integração de diferentes áreas do conhecimento, contribuindo com informações ainda desconhecidas, e complementando o conhecimento já construído.

Os resultados estão organizados na forma de artigos científicos, com formatação específica, sendo que o primeiro já foi publicado e os demais serão submetidos a periódicos especializados. Também foi incluída a seção intitulada “resultados adicionais”, que não está apresentada na forma de artigo científico. O primeiro artigo contempla a análise da diversidade e estrutura genética de uma população natural de *Nectandra megapotamica*. Encontra-se publicado no volume 14 número 4 do periódico *Genetics and Molecular Research* (GMR). O segundo artigo relata a caracterização morfo-anatômica da espécie, descrevendo sua anatomia foliar e identificando, pela primeira vez na literatura, estruturas secretoras e de armazenamento dessa espécie e que foi realizado com o emprego de material vegetal congelado, aspecto inédito e de grande importância para estudos de microscopia. O terceiro artigo apresenta uma abordagem multidisciplinar, em que foi realizada uma análise combinada de marcadores moleculares tipo RAPD e a composição química do óleo essencial da espécie, objetivando avaliar se a diversidade na composição do óleo volátil poderia estar relacionada à variabilidade genética revelada pelos marcadores de DNA.

Nos “resultados adicionais”, inicialmente é apresentada a análise da composição do óleo essencial em duas estações do ano e a seguir, uma análise de

correlação com variáveis climáticas. Após, são apresentados dados obtidos em ensaios pioneiros referentes à identificação de genes das terpenos sintases, responsáveis pela biossíntese de óleos essenciais. Por fim, é apresentada a conclusão geral e as referências bibliográficas.

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a utilização de extratos vegetais se deu desde o período pré-colonial, onde as populações nativas eram detentoras de um vasto conhecimento tradicional sobre o uso destes extratos, tanto para alimentação quanto para saúde. Tal conhecimento foi proporcionado pela interação da população nativa com a grande riqueza das florestas brasileiras. No entanto, desde a descoberta do Brasil até o período colonial, as populações nativas brasileiras foram exterminadas, levando consigo o conhecimento dos inúmeros usos e benefícios da floresta ao homem.

Após a descoberta do Brasil, assim como as populações indígenas, a Mata Atlântica sofreu fortes impactos, pois ocupava praticamente toda a extensa faixa litorânea e começou a passar por um intenso processo de exploração, principalmente para extração de madeira e corante do Pau-Brasil, fato que posteriormente levou à extinção da espécie. Nos dias atuais, a Mata Atlântica é representada por apenas 7% da sua área original, sendo considerado um dos mais importantes biomas do mundo e, ao mesmo tempo, um dos mais ameaçados, principalmente pelo elevado grau de espécies endêmicas e ameaçadas de extinção (CAMPANILI, 2006).

Os remanescentes deste bioma abrigam um dos mais importantes conjuntos de biodiversidade do planeta, considerado '*hotspots*' de biodiversidade, pelo fato de apresentar aproximadamente 20 mil espécies de plantas vasculares, das quais 8 mil são endêmicas (MITTERMEIER et al., 1998). Porém, mesmo tendo conhecimento de tamanha riqueza e potencial das espécies nativas, são poucos os esforços direcionados para a pesquisa visando o melhor aproveitamento desta biodiversidade.

Essa grande diversidade de espécies, aliada à imensa variabilidade genética encontrada nas populações naturais, constituem uma ampla riqueza de recursos genéticos que pode ser explorada de forma controlada, por meio da domesticação, permitindo um melhor planejamento e coleta destes recursos.

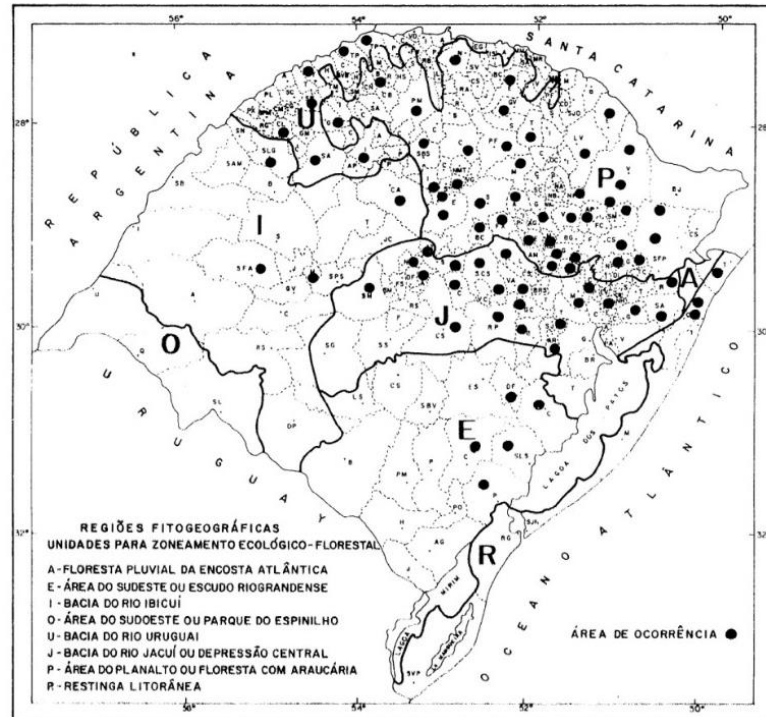
A utilização dos produtos florestais não madeireiros, sobretudo dos óleos essenciais apresentou crescimento acelerado nos últimos anos, devido à alta demanda de produtos naturais de origem vegetal. Estes, por sua vez, são

empregados nas indústrias de perfumaria, aromas, fármacos, alimentos, agricultura, entre outros. Apesar das espécies florestais nativas apresentarem grande potencial para a exploração de óleos essenciais, a obtenção desses produtos no Brasil ainda é pequena. No caso da Mata Atlântica, apenas algumas espécies foram estudadas quanto à presença desses extrativos, sendo necessárias mais pesquisas para verificar o potencial desse importante Bioma, particularmente nesse aspecto.

Neste contexto, encontra-se a espécie florestal *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., conhecida popularmente como canela-preta (Lauraceae). A família Lauraceae pertence à divisão Magnoliophyta, sendo composta por cerca de 52 gêneros e 3 mil espécies. Ocorre predominantemente em regiões tropicais e subtropicais, sendo excepcionalmente encontrada em regiões temperadas (BARROSO, 2002; RIBEIRO et al., 1999; ROHWER, 1993; WERFF & RICHTER, 1996). No Brasil, é representada por 22 gêneros e cerca de 400 espécies que habitam na sua maior parte as florestas pluviais, restingas e cerrados (LORENZI & SOUZA, 2008).

Trata-se de uma espécie arbórea nativa da Floresta Atlântica (Floresta Ombrófila Densa), Floresta Ombrófila Mista e Floresta Estacional Semidecídua e Decídua, de ocorrência natural nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, além de Paraguai e Argentina (MARCHIORI, 1997). Destaca-se por ser uma das espécies mais frequentes e características da floresta latifoliada do Alto Uruguai e da floresta que se estende ao longo da Serra Geral do Rio Grande do Sul (Figura 1) (REITZ et al., 1989).

Figura 1 - Representação do mapa do estado do Rio Grande do Sul com área de ocorrência de *Nectandra megapotamica* Mez. Fonte: (REITZ et al., 1989).



É uma árvore de grande porte, varia de 15 a 30 m de altura e 40 a 80 cm de diâmetro, apresenta tronco um pouco tortuoso, casca áspera e escura. Distingue-se das demais canelas por apresentar folhas mais estreitas, medindo de 7 a 15 cm de comprimento e 2 a 4 cm de largura, subcoriáceas, sem domácias e cheiro característico menos intenso que as demais (LORENZI, 1998; MARCHIORI, 1997; REITZ et al., 1989). Floresce a partir de junho, prolongando-se até outubro e amadurecimento dos frutos de dezembro até abril.

A madeira é adequada para construção civil, esquadrias e tábuas em geral (LORENZI, 1998). Devido as excelentes características xilotecnológicas, assim como todas as canelas, sua madeira poderia ter numerosas aplicações, no entanto, tem sido relegada para segundo plano devido ao cheiro desagradável, que pode voltar, quando está em lugares úmidos.

A espécie apresenta algumas propriedades indicadas pela medicina tradicional, tais como antirreumática, anti-inflamatória e analgésica, as quais foram constatadas por estudos fitoquímicos que revelaram a presença de fenilpropanóides (GARCEZ et al., 2009), lignanas tetrahidrofurânicas e alcaloides (SANTOS FILHO, 1975). Segundo Apel et al. (2006), os óleos essenciais de *Nectandra megapotamica*

possuem atividade anti-microbiana contra *Staphylococcus aureus*, atividade anti-inflamatória e antitumoral indicando potencial farmacológico para este óleo essencial.

Os óleos essenciais de *Nectandra megapotamica* são constituídos principalmente por fenilpropanoides, monoterpenos e sesquiterpenos, sendo os dois últimos os constituintes majoritários. Dentre os metabólitos secundários produzidos pelas plantas, os terpenoides constituem o grupo mais complexo e diversificado, e o segundo maior grupo em termos de importância farmacológica (RAVEN, 2001; VERPOORTE & ALFERMANN, 2000). No entanto, mesmo com grande potencial para produção de óleos essenciais, espécies como a *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. e outras do gênero são pouco estudadas (da SILVA FILHO et al., 2008; ROMOFF, 2010).

Em um estudo anterior sobre composição química dos óleos voláteis da canela-preta, realizado por Melo (2006), foi verificada uma variação na composição química de indivíduos coletados em diferentes regiões. Além desta variação devido à localização dos indivíduos, foi detectada uma variação sazonal, em que amostras coletadas em diferentes períodos do ano apresentam variação na sua composição. Mais recentemente, Amaral e colaboradores avaliaram a influência da sazonalidade na concentração e composição química do óleo essencial da espécie, tendo sido observada uma grande variabilidade na composição nas diferentes estações analisadas (AMARAL et al., 2015a; AMARAL et al., 2015b).

Alguns desses estudos avaliaram a composição dos óleos essenciais e sua produção nas diferentes estações do ano. Entretanto, foram realizados a partir de amostras de indivíduos em seu habitat natural, estando à mercê das variações ambientais com flutuações de temperatura, luminosidade, intensidade de chuvas, entre outros fatores, o que dificulta a identificação de condições ótimas a fim de otimizar a produção de metabólitos secundários de interesse.

Adicionalmente a estes fatores, a composição química dos óleos essenciais é determinada fundamentalmente por fatores genéticos. Nesse sentido, o conhecimento da estrutura genética, padrão de fluxo gênico, estimativa de parâmetros genéticos, identificação de genótipos elite até análise da expressão gênica, são informações que podem facilitar a compreensão da interação entre todos fatores envolvidos na biossíntese dos óleos essenciais.

Atualmente, no campo da biologia molecular encontra-se apenas dois estudos com *Nectandra megapotamica*. Costa e colaboradores (2015), avaliaram a diversidade genética e a estrutura de uma população natural de 12 indivíduos (Artigo 1). Em Costa et al. (2016), é apresentada uma análise comparativa de cinco protocolos de isolamento de DNA, buscando otimizar um método de isolamento específico para a espécie. Nesse sentido, é evidente a necessidade da continuidade de estudos moleculares, contribuindo com o estado da arte para a espécie, bem como expandindo os conhecimentos adquiridos para outras congêneres.

Seguindo a linha de fatores envolvidos e compreensão da biossíntese de óleos essenciais, o conhecimento sobre a anatomia foliar da espécie em estudo, especificamente no que se refere a estruturas secretoras e/ou de armazenamento de óleos voláteis, é fundamental para compreender a biossíntese desses metabólitos *in vivo*, bem como para definição da técnica mais adequada a ser utilizada com o intuito de otimizar a biossíntese desses metabólitos *in vitro*.

Especificamente no que se refere à microscopia, a literatura especializada apresenta somente o estudo realizado por Souza e Moscheta (2000), que trata da morfoanatomia e a biologia floral de *Nectandra megapotamica*. Nesse sentido, ensaios microscópicos podem fornecer informações inéditas, permitindo uma caracterização anatômica da folha, bem como identificação de estruturas secretoras e/ou de armazenamento de óleos essenciais.

Considerando a complexidade dos mecanismos envolvidos na biossíntese dos óleos essenciais *in vivo*, uma alternativa potencial seria o emprego de técnicas de cultura de tecidos, as quais poderiam viabilizar a modulação da biossíntese *in vitro* de compostos e/ou moléculas específicas de interesse e, simultaneamente, fornecer material vegetal adequado (clones) para pesquisa subsequente utilizando técnicas de biologia molecular aplicadas à genômica e transcriptômica para, por exemplo, identificar genótipos elite bem como genes candidatos.

A aplicação de determinadas técnicas de biologia molecular permite a identificação de genótipos elite e genes candidatos responsáveis pela síntese de determinadas substâncias ativas de interesse econômico e ambiental. Nesse contexto, a análise da expressão gênica por meio da técnica de Transcriptase Reversa (RT-PCR) fornece informações sobre os genes que estão sendo expressos preferencialmente sob a influência de condições do ambiente, bem como dependente do tecido de coleta, da época e estágio de desenvolvimento.



Considerando que o óleo essencial de *Nectandra megapotamica* é composto majoritariamente por terpenoides, a compreensão básica das vias bioquímicas e a identificação dos genes e enzimas envolvidas na síntese de compostos terpênicos é essencial.

Esta classe de metabólitos secundários contribui principalmente para o arsenal químico das plantas e micro-organismos, com papéis na defesa das plantas contra estresses bióticos e abióticos, atração de polinizadores e sinalização para outras plantas (EHRlich, 1964; HARBORNE, 1993; SINGH, 2015). Com relação a sua origem, os terpenoides são sintetizados por uma classe específica de enzimas, que, após a formação de determinados precursores, uma variedade imensa de substâncias pode ser gerada, pela ação de uma grande família de enzimas, conhecida como terpeno sintases (TRAPP, 2001; DUDAREVA et al., 2006; NAGEGOWDA, 2010).

A biossíntese de terpenos é mediada pelas terpeno sintases e regulada por fatores ambientais e de desenvolvimento (THOLL, 2006). Os voláteis das plantas são regulados espacialmente e temporariamente, são biosintetizados e emitidos a partir de tecidos vegetais específicos em um determinado momento, indicando que a biossíntese dos terpenoides voláteis é principalmente regulada no nível de transcrição (DUDAREVA et al., 2006; NAGEGOWDA, 2010). A síntese de voláteis aumenta durante os estágios iniciais do desenvolvimento e, em seguida, permanece relativamente constante ou diminui ao longo do período de vida (BOUWMEESTER et al., 1998; DUDAREVA, 2000; GERSHENZON et al., 2000).

No que se refere à identificação de genes das terpeno sintases, o presente estudo com *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. será pioneiro com a espécie e para o gênero *Nectandra*. Na família Lauraceae, a única espécie investigada nesse sentido é *Aniba rosaeodora* Ducke, popularmente conhecida como pau-rosa, em que a identificação de genes envolvidos na biossíntese de terpenos encontra-se, segundo informações da literatura, em andamento (MELLO, 2008). A obtenção de tais informações permitirá a realização de futuros estudos relacionados à biossíntese *in vitro* e, simultaneamente, a modulação de compostos bioativos de interesse.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Conhecer a variabilidade genética de uma população natural de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez, as estruturas secretoras e/ou de armazenamento de óleos essenciais, a correlação entre a variabilidade genética e a biossíntese de óleos essenciais, bem como entre a sazonalidade e os genes nela envolvidos.

### 2.2. Objetivos específicos

- Analisar a diversidade e estrutura genética de uma população natural de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez, por meio de marcadores moleculares RAPD;
- Avaliar o potencial do uso de amostras foliares armazenadas em ultrafreezer para o uso em ensaios microscópicos;
- Estudar a anatomia foliar de canela-preta, de modo a identificar estruturas secretoras e/ou de armazenamento presentes na espécie;
- Verificar a relação existente entre a diversidade na composição do óleo essencial com a variabilidade genética da população natural estudada;
- Analisar a variabilidade da composição do óleo essencial em duas estações do ano e sua correlação com variáveis climáticas;
- Identificar genes que codificam as enzimas responsáveis pela síntese de terpenos, denominadas terpeno sintases (TPS).

### **3. ARTIGO 1 - Genetic diversity and structure of a natural population of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. using RAPD markers**

COSTA, L.S.; REINIGER, L.R.S.; HEINZMANN, B.M.; AMARAL, L.P.; SERROTE, C.M.L. Genetic diversity and structure of a natural population of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. using RAPD markers. *Genetics and Molecular Research*, v. 14 (4), 18407-18413, 2015.

**Genetic diversity and structure of a natural population of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. using RAPD markers**

**Running title:** Population study of *Nectandra megapotamica* with RAPDs

L.C. Costa<sup>1</sup>, L.R.S. Reiniger<sup>1\*</sup>, B.M. Heinzmann<sup>2</sup>, L.P. Amaral<sup>2</sup> and C.M.L. Serrote<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

<sup>2</sup> Laboratório de Extrativos Vegetais, Departamento de Ciências Florestais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

\*Corresponding author: LRS Reiniger, Av. Roraima, 1000, Campus Universitário, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil, 97105900, +55532208900, [liarsr@ufsm.br](mailto:liarsr@ufsm.br)

## ABSTRACT

*Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. is a tree species that naturally occurs in the Atlantic Forest, Brazil. The aim of this study was to evaluate the genetic diversity and structure of a natural population of 12 *N. megapotamica* individuals using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. Eleven primers were used in this study, producing 81 bands, of which 98.99% were polymorphic. Analysis using STRUCTURE defined three different clusters ( $K = 3$ ), results that were consistent with those of principal coordinates analysis (PCoA). Both Nei's genetic diversity ( $h = 0.33$ ) and Shannon's diversity index ( $I = 0.49$ ) were relatively high. Analysis of molecular variance (AMOVA) indicated that 24.89% of the genetic variability was among clusters, while the remaining 75.11% was within clusters. The Mantel test showed a weak correlation between genetic and geographic distances ( $r = 0.25$ ,  $P = 0.105$ ). Overall, the results revealed high levels of genetic diversity within clusters and high genetic differentiation among clusters without any spatial pattern of genetic variability. In addition, gene flow was independent of the geographical distribution and was compatible with the hierarchical island model.

**Key words:** PCR; Genetic parameters; Forestry species

## INTRODUCTION

The Atlantic Forest biome is one of the world's major hotspots of biodiversity. Previous studies indicated that the flora of this biome consists of approximately 20,000 known species, including about 8,000 endemic species (Mittermeier et al., 1998). Among the native species of the Atlantic Forest, those belonging to the Lauraceae family are all woody plants with high economic value for timber and essential oils.

*Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. (Lauraceae), commonly known as canelapreta, is found in the south, southeast, and central regions of Brazil. This species is widely used in folk medicine for its antirheumatic, anti-inflammatory, and analgesic properties. As previous phytochemical studies have shown, these properties are due to the presence of phenylpropanoids (Garcez et al., 2009), tetrahydrofuran lignans, and alkaloids (Dos Santos and Gilbert, 1975). Additionally, Apel et al. (2006) suggested that the essential oils of *N. megapotamica* have pharmacological potential due to their antitumor activity and antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*. Environmental factors such as seasonality, temperature, water availability, radiation, nutrient availability, altitude, and atmospheric pollution can significantly alter the biological activity of various extractives; however, the chemical composition of essential oils is mainly determined by genetic factors (Gobbo-Neto and Lopes, 2007).

Molecular markers are an important tool for evaluating genetic diversity within and among species and populations. Compared to other polymerase chain reaction (PCR) markers, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers have several advantages; they are easy, affordable, quick to assay, and require only small amounts of DNA (Bered et al, 1997). The assessment of genetic diversity in natural populations is important for the study of speciation in the tropical forests and the conservation of genetic resources (Buckley et al., 1988). The objective of the present study was to assess the diversity and characterize the genetic structure of a natural *N. megapotamica* population from the central region of Rio Grande do Sul state, Brazil, using RAPD markers.

## MATERIAL AND METHODS

### Plant material and DNA extraction

A total of 12 individual samples of *N. megapotamica* were collected in Itaara, Rio Grande do Sul, Brazil (Table 1) and dried at room temperature. DNA was extracted from dry leaves as described by Dellaporta et al. (1983).

**Table 1.** Coordinates and elevation of the collection area (Itaara, Rio Grande do Sul, Brazil) of the 12 *Nectandra megapotamica* individuals (N1–N12) used in this study.

Sample	Latitude	Longitude	Elevation (m)
N1	29 40' 10.10" S	53 46' 19.01" W	232.28
N2	29 40' 12.05" S	53 46' 18.60" W	230.36
N3	29 40' 12.62" S	53 46' 18.87" W	239.01
N4	29 40' 12.01" S	53 46' 18.84" W	230.84
N5	29 40' 12.82" S	53 46' 19.20" W	237.09
N6	29 40' 12.70" S	53 46' 18.41" W	242.86
N7	29 40' 12.49" S	53 46' 18.19" W	244.30
N8	29 40' 12.19" S	53 46' 17.66" W	240.93
N9	29 40' 11.89" S	53 46' 17.32" W	245.98
N10	29 40' 11.83" S	53 46' 17.23" W	247.18
N11	29 40' 11.84" S	53 46' 17.70" W	242.38
N12	29 40' 12.22" S	53 46' 19.42" W	230.60

#### RAPD reactions

The primers were selected according to the results obtained by Hanai et al., (2010) using *Ocotea catharinensis* (Lauraceae). A total of 11 primers were selected, based on their high polymorphic profile and good reproducibility of the generated fragments (Table 2). The amplification reactions were performed in an AmpliTherm TX96 Plus™ thermocycler (AmpliTherm Thermal Cycler, Madison, WI, USA). Each amplification reaction (25 µL) contained 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 0.25 µM RAPD primer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 20 ng DNA, 1.5 U/µL Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and ultra-pure water. The thermal profile consisted of an initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 45 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 35°C for 1 min, and elongation at 72°C for 2 min, with a final extension at 72°C for 6 min. Amplification products were resolved by electrophoresis on 1.5% agarose gel.

**Table 2.** Selected Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) primers used in this study for the genetic analysis of 12 *Nectandra megapotamica* individuals along with the number of obtained bands, number of polymorphic bands, and percentage of polymorphic bands.

Primer	Sequence	Number obtained bands	of Number of polymorphic bands	of Polymorphic bands (%)
OPA-02	5'-TGCCGAGCTG-3'	2	2	100
OPA-04	5'-AATCGGGCTG-3'	11	11	100
OPA-10	5'-GTGATCGCAG-3'	3	3	100
OPA-11	5'-CAATCGCCGT-3'	9	9	100
OPA-12	5'-TCGGCGATAG-3'	6	6	100
OPA-13	5'-CAGCACCCAC-3'	11	11	100
OPA-15	5'-TTCCGAACCC-3'	4	4	100
OPA-18	5'-AGGTGACCGT-3'	6	6	100
OPD-05	5'-TGAGCGGACA-3'	10	10	100
OPD-07	5'-TTGGCACGGG-3'	10	10	100
OPD-08	5'-GTGTGCCCCA-3'	9	8	88.89
Overall		81	80	98.99

### Data analysis

Fragment data were scored for the presence ("1") or the absence ("0") of a band using PyElph (Pavel and Vasile, 2012). The number of genetic clusters ( $K$ ) in the population was defined by software STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000) using the admixture model default and correlated allele frequencies. Each run had a burn-in length of 500,000 followed by 500,000 Markov Chain Monte Carlo (MCMC) repetitions with 20 iterations per  $K$  from  $K = 1$  to 12. The optimal number of clusters was determined using the  $\Delta K$  method (Evanno et al., 2005). Genetic variation was calculated by Nei's genetic distance ( $h$ ) and Shannon's information index ( $I$ ) using POPGENE (Yeh et al., 1997). The analysis of molecular variance (AMOVA) was calculated using Arlequin 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010), and principal coordinates analysis (PCoA) was performed using GenAlEx 6.5 (Peakall and Smouse, 2006) to visualize the genetic relationship between clusters. The Mantel test was applied to estimate the correlation between genetic distance and geographic distance among clusters.

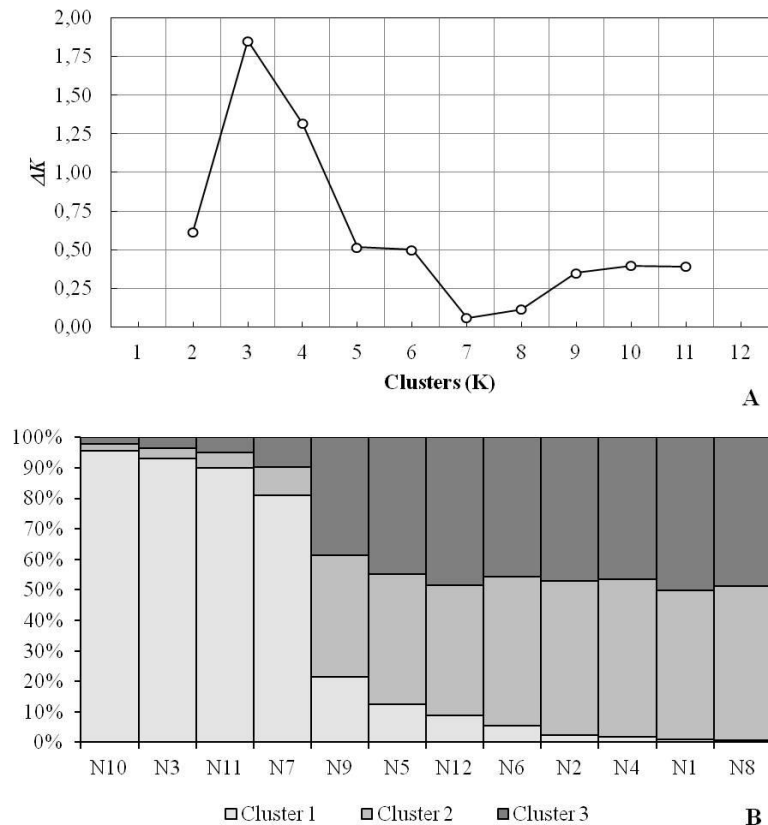
## RESULTS AND DISCUSSION

A total of 81 bands with molecular weights ranging from 250 to 2080 bp were amplified from the 11 RAPD primers. All primers showed a high level of polymorphism and 98.99% of the bands were polymorphic (Table 2). These results indicated that these 11 RAPD markers can be reliably used for differentiating *N. megapotamica* individuals and populations. Hanai et al. (2010) identified 94 bands

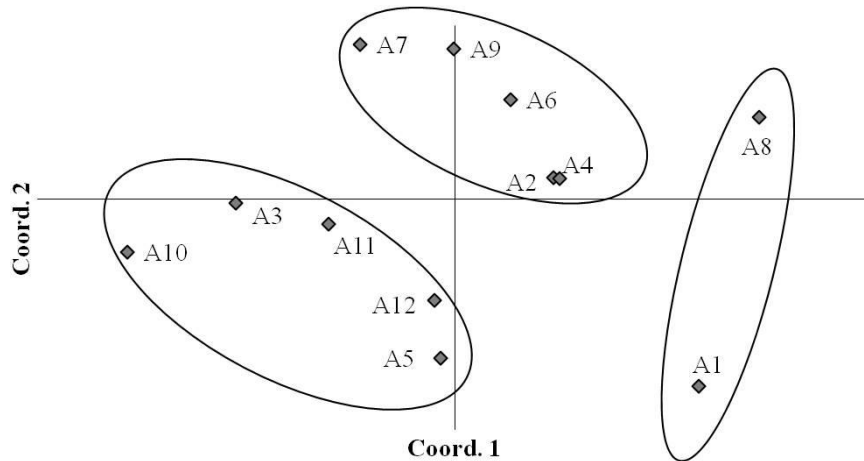


when they used the same RAPDs for screening *in vitro* cultures of *Ocotea catharinensis*.

The optimal value of  $K$  was 3 as determined by  $\Delta K$  statistic using STRUCTURE (Figure 1). The height of the  $\Delta K$  values indicate the strength of the population subdivision; here, the highest value was observed for  $K = 3$  and a second mode for  $K = 4$ . The standard deviation in  $\text{LnP}(K)$  (data not shown) also suggested the subdivision of the population into three clusters, and these results were consistent with PCoA (Figure 2).



**Figure 1.**  $\Delta K$  likelihood distribution (A). Estimated population structure (B). Each individual is represented by a vertical column, which is partitioned into segments of different shades of grey that represent the individual estimated membership fractions in  $k$  clusters.



**Figure 2.** Genetic relationship among 12 *Nectandra megapotamica* individuals as determined by principal coordinate analysis (PCoA). Axis 1 accounts for 38.80% and axis 2 for 12.23% of the variation in the data.

The observed number of alleles ( $N_A$ ) was 1.99, the effective number of alleles ( $N_E$ ) was 1.56,  $h$  was 0.33, and  $I$  was 0.49 (Table 3). Using RAPD markers analysis, when compared to other tree species from the same family, the diversity in *N. megapotamica* could be considered high. Oliveira et al. (2008) found very similar results in *Dimorphandra mollis* ( $N_A = 2$ ;  $N_E = 1.51$ ;  $h = 0.30$ ; and  $I = 0.46$ ). Among clusters, Nei's genetic distance ranged from 0.13 to 0.22 and Shannon's diversity index from 0.19 to 0.33 (Table 3).

**Table 3.** Number of individuals (N) and genetic parameters of the three clusters ( $K = 3$ ), as determined by STRUCTURE (Pritchard et al., 2000) and principle coordinates analysis, of a natural population of 12 *Nectandra megapotamica* individuals.

Parameters	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Overall
N	5	5	2	12
Na	1.68 (0.47)	1.58 (0.49)	1.32 (0.47)	1.99 (0.11)
Ne	1.33 (0.32)	1.39 (0.40)	1.22 (0.33)	1.56 (0.32)
$h$	0.21 (0.17)	0.22 (0.21)	0.13 (0.19)	0.33 (0.15)
$I$	0.32 (0.17)	0.33 (0.30)	0.19 (0.28)	0.49 (0.18)
P%	67.9	58.02	32.1	98.77

Na = Observed number of alleles; Ne = Effective number of alleles;  $h$  = Nei's genetic distance;  $I$  = Shannon's information index; P% = Percentage of polymorphic loci.

AMOVA indicated that the highest genetic diversity was within (75.11%) rather than among the three clusters (24.89%), indicating that *N. megapotamica* is allogamous (Hamrick and Godt, 1996). In several tropical tree species, the variation within populations is greater than among populations (Zucchi et al., 2005). The pattern of distribution of the genetic diversity within the population was also observed in three species of the Lauraceae family: *Ocotea catharinensis* (80%), *Ocotea odorifera* (88%), and *Ocotea porosa* (84%) (Martins et al., 2015). Souza and Moscheta (2000) studied the breeding system of *N. megapotamica*, focusing on the flowering patterns and the synchronization of flowering, and identified the presence of an anti-selfing

mechanism. Dichogamy has also been reported in other species of the Lauraceae family (Kubitzki and Kurz, 1984).

Estimates of genetic diversity among clusters  $F_{ST}$  using AMOVA indicated a high degree of differentiation between clusters 1 and 2 (0.16,  $P < 0.05$ ) and very high differentiation between clusters 2 and 3 (0.25,  $P < 0.05$ ). Between clusters 1 and 3, no significant differentiation was observed ( $P > 0.05$ ). These results showed that gene flow was independent from the geographical distribution and compatible with the hierarchical island model. The high and very high genetic differentiation observed between clusters 1 and 2, and 2 and 3, respectively, might be due to the relatively lower gene flow between individuals in these groups, as a result of a less synchronous activity of floral organs and pollinators. In *O. catharinensis*, *O. odorifera*, and *O. porosa*, the calculated  $F_{ST}$  values were relatively lower (0.148, 0.086, and 0.116, respectively), suggesting an effective gene flow among populations prior to habitat fragmentation (Martins et al., 2015). Zucchi et al. (2005) suggested that the variation among populations has direct conservation implications, indicating that a greater number of populations have to be sampled when the  $F_{ST}$  is high. On the other hand, if the  $F_{ST}$  value is low, a greater number of individuals by population must be sampled.

The Mantel test showed a low correlation between genetic and geographic distance among individuals ( $r = 0.25$ ) that was not significant ( $P = 0.105$ ), suggesting that the observed genetic differentiation was not caused by the distance. However, Zucchi et al. (2005) observed a strong spatial structure in the *Eugenia dysenterica* populations. Overall, this study revealed the high levels of genetic diversity and high genetic differentiation among the three clusters. No spatial pattern of genetic diversity was observed between clusters, whereas the gene flow followed the hierarchical island model and was independent from the geographical distribution.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We would like to thank Editage ([www.editage.com.br](http://www.editage.com.br)) for English language editing.

## REFERENCES

- Apel MA, Lima MEL, Souza A, Cordeiro I, et al. (2006). Screening of the biological activity from essential oils of native species from the Atlantic Rain Forest (São Paulo–Brazil). *Pharmacology* 3: 376-383.
- Bered F, Barbosa-Neto JF and Carvalho FIF (1997). Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. *Ciência Rural*. 27: 513-520.
- Buckley DP, O'Malley DM, Apsit O, Prance GT, et al. (1988). Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae). *Theor. Appl. Genet.* 76: 923-928.

- Dellaporta SL, Wood J and Hicks JB (1983). A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.
- Dos Santos DF and Gilbert B (1975). The alkaloids of *Nectandra megapotamica*. *Phytochemistry* 14: 821-822.
- Evanno G, Regnaut S and Goudet J (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14: 2611-2620.
- Excoffier L and Lischer HEL (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of program to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10: 564-567.
- Garcez FR, Garcez WS, Hamerski L and Miguita CH (2009). Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapotamica*. *Quím. Nova* 32: 407-411.
- Gobbo-Neto L and Lopes NP (2007). Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quím. Nova* 30: 374-381.
- Hamrick JL and Godt MJW (1996). Conservation Genetics of Endemic Plant Species. In: Conservation Genetics, Case Histories From Nature (Avice JC and Hamrick JL, eds.). Chapman and Hall, New York, 281-304.
- Hanai LR, Floh EIS, Fungaro MHP, Santa-Catarina C, et al. (2010). Methylation patterns revealed by MSAP profiling in genetically stable somatic embryogenic cultures of *Ocotea catharinensis* (Lauraceae). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 46: 368-377.
- Kubitzki K and Kurz H (1984). Synchronized dichogamy and dioecy in Neotropical Lauraceae. *Plant Syst. Evol.* 147: 253-266.
- Martins EM, Lamont RW, Martinelli G, Lira-Medeiros CF, et al. (2015). Genetic diversity and population genetic structure in three threatened *Ocotea* species (Lauraceae) from Brazil's Atlantic Rainforest and implications for their conservation. *Conserv. Genet.* 16: 1-14.
- Mittermeier RA, Myers N, Thomsen JB, Da Fonseca GAB, et al. (1998). Biodiversity hotspots and major tropical wilderness areas: approaches to setting conservation priorities. *Conserv. Biol.* 12: 516-520.
- Oliveira DL, Paula MFB, Pimenta MAS, Braga RF, et al. (2008). Variabilidade genética de populações de Fava D'Anta (*Dimorphandra mollis*) da região norte do estado de Minas Gerais. *Rev. Árvore* 32: 355-363.
- Pavel AB and Vasile CI (2012). PyElph - A software tool for gel analysis and phylogenetics. *BMC Bioinformatics* 13: 9.

Peakall R and Smouse PE (2012). GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.

Pritchard JK, Stephens M and Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.

Souza LA and Moscheta IS (2000). Morfo-anatomia e aspectos da biologia floral de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. (Lauraceae). *Acta Bot. Bras.* 14: 15-25.

Zucchi MI, Pinheiro JB, Chaves LJ, Coelho ASG, et al. (2005). Genetic structure and gene flow of *Eugenia dysenterica* natural populations. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 40: 975-980.

Yeh FC, Yang RC, Boyle TBJ, Ye ZH, et al. (1997). POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.

**4. ARTIGO 2 - Use of frozen leaves for morpho-anatomical characterization of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., Lauraceae**

COSTA, L.S.; REINIGER, L.R.S.; DONATO, M.H.M.T.; HEINZMANN, M. Use of frozen leaves for morpho-anatomical characterization of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., Lauraceae. Submetido na revista Brazilian Archives of Biology and Technology, 2018.

## Use of frozen leaves for morpho-anatomical characterization of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., Lauraceae

**Leonardo S. da Costa<sup>1</sup>, Lia R. S. Reiniger<sup>1\*</sup>, Maria H. M. T. Donato<sup>2</sup>, Berta M. Heinzmann<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

<sup>2</sup> Centro de Biotecnologia Vegetal, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Portugal

<sup>3</sup> Laboratório de Extrativos Vegetais, Departamento de Ciências Florestais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

Correspondence: Lia R. S. Reiniger - [liarsr@ufsm.br](mailto:liarsr@ufsm.br)

**Abstract:** *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. it is a native tree species of the Atlantic Forest, being know canela-preta. The species has some anti-inflammatory, antitumor, antirheumatic properties among others. In this work the use of frozen plant material for microscopy analysis was tested. In addition, the leaf morpho-anatomy of the species was characterized which allowed to perform a structural description and to identify structures of secretion and storage of essential oil. The plant material was prepared for analyzes in optical microscopy, fluorescence and scanning electron. The leaf anatomy shows glabrous epidermis, uniestratified, paracytic stomata, absence of trichomes, polyhedral epidermal cells. Some typical family characteristics were observed as a closed arc-shaped bicollateral bundle vascular system and dorsiventral mesophyll. The structures of secretion and storage of identified essential oil were identified as secretory cavities.

**Keywords:** forest species, new methodology, leaf anatomy, essential oil, secretory cavities.

## Introduction

The Lauraceae family comprises 52 genera and approximately 3000 species. It occurs predominantly in tropical and subtropical regions, being exceptionally found in temperate regions (Barroso, 2002; Ribeiro et al., 1999; Rohwer, 1993). In Brazil, it is represented by 22 genera and about 400 species that inhabit mostly the rainforests, restingas and cerrado (Lorenzi and Souza, 2008).

*Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez (Lauraceae), known popularly as canela-preta, is a forest species native to Brazil with a large occurrence in the Atlantic Forest. It is a species that has important characteristics and can be

used for various purposes. In recent years its non-wood products, in particular essential oils.

The essential oil of *Nectandra megapotamica* has already revealed to have microbial activity against *Staphylococcus aureus*, anti-inflammatory and antitumoral activity, indicating its pharmacological potential (Apel et al., 2006). Some organ-based preparations of this species have been shown to inhibit hemolytic, coagulant and proteolytic activities of venom of *Bothrops diporus* (Torres et al., 2014). The essential oil showed also an anesthetic effect on *Centropomus parallelus* (Tondolo et al., 2013), as well as antifungal and antimicrobial activities.

Medicinal properties can be induced by many different parts of a plant including leaves, roots, bark, fruit, seeds, flowers. In *Nectandra*, the leaves are used in the treatment of cough, flu and as a sedative (Alves et al., 2008); bark as analgesic and anti-rheumatic (da Silva Filho et al., 2008) and also in abscesses (Alves et al., 2008); and roots, such as analgesic and anti-inflammatory (Mello et al., 2005).

Therefore, several researches are being developed with *Nectandra*, demonstrating its pharmacological potential; however, no study was performed on the morphoanatomy of the leaves of the species.

Traditionally, microscopy studies using fresh plant material, however, in certain situations it is not possible to carry out the tests immediately after collection, as in the case of a large distance between the collection site and the laboratory. There is still the possibility of the absence of plant material in determined months of the year, in the case of when working with deciduous species.

In this sense, the objective of the present study was to analyze the potential employment of vegetal samples stored in ultrafreezer to characterize the species *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. regarding its leaf anatomy and to identify secretory structures and storage of essential oils.



## Material and Methods

The experiments of optical microscopy, fluorescence and scanning electron microscopy were carried out at the Laboratory of Molecular Biology of the Plant Biotechnology Center - Faculty of Sciences of the University of Lisbon.

The plant material used in the microscopy assays were stored in ULT freezer for 3 months. No dehydrated or freeze-drying procedure was used. For optical and fluorescence microscopy a protocol with Red Sudan IV dye was used. The leaf sections were immersed in saturated solution of 0.3% Red Sudan IV in 70% Ethanol (ETOH), for 15 min. Two quick washes were performed, one in 70% ethanol and other in distilled water (dH<sub>2</sub>O), proceeding with the assembly of the blades.

For Scanning Electron Microscopy (SEM), the samples were chemically fixed with 1% Glutaraldehyde (GA) in 0.05 M sodium cacodylate (CAC) buffer, pH 7.2, during 45 min at room temperature (the volume used was necessary to cover the samples). After, the fixative was replaced by a new solution of 1% Glutaraldehyde (GA), remaining for 2h at room temperature. Then, three washes were carried out with 0.05 M Sodium cacodylate buffer (CAC), for 5min. After, fixation was performed with a 1% Osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>) wash for 2h.

Dehydration were realized with a graded acetone series by subsequent exchanges of dilutions in distilled water (a 10%, 20%, 30%, until 100%) and drying by the critical point method through carbon dioxide (CPD 030, Balzers). Finally, the samples were mounted on a stub (several orientations) and received a coating of gold (MED 010, Balzers).

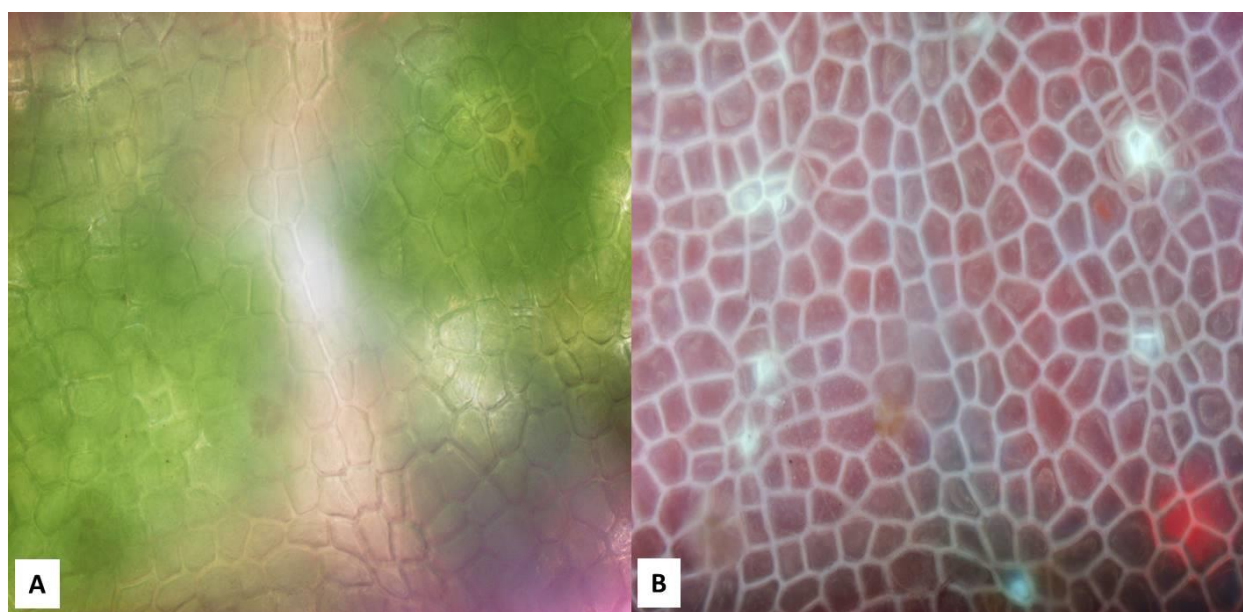
## Results and Discussion

From the frozen samples in ultra-freezer it was possible to obtain high quality blades. Although frozen, the leaf remained ultrastructurally intact post-thaw, which allowed to perform the morpho-anatomical characterization of the species. There is no research in the scientific literature describing the use of frozen samples in histological and histochemical tests. This study demonstrates

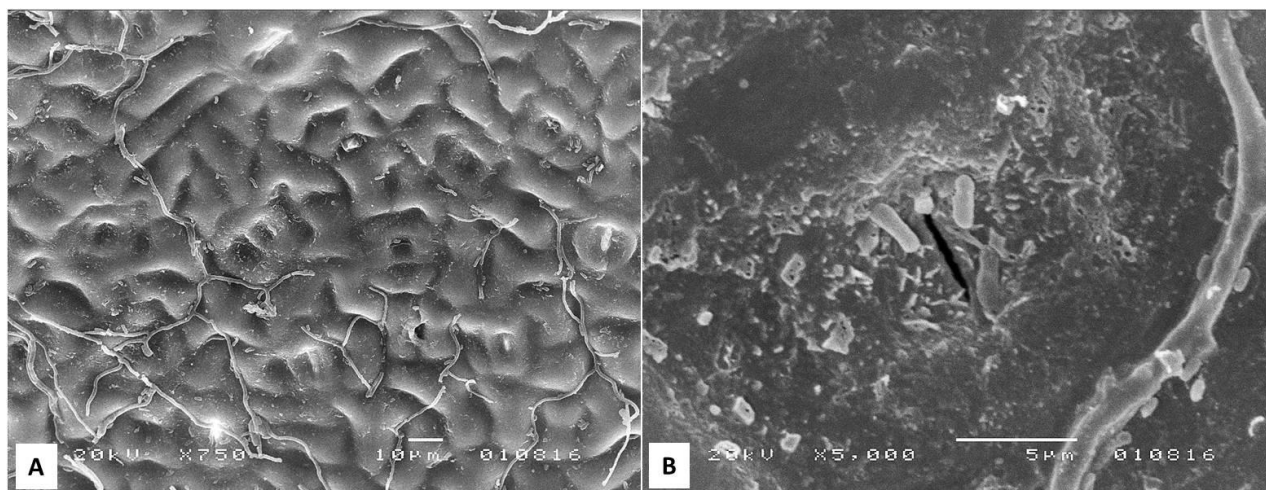
the possibility of using this type of samples, which was previously considered inappropriate.

Based on the images obtained by optical and fluorescence microscopy, it was possible to perform a histological and histochemical characterization for total lipids of the species under study. The leaf blade presents glabrous epidermis, unistratified, without trichomes, being composed of a single layer of cells on both faces. In frontal view of the adaxial face (Figure 1), the epidermal cells are of polyhedral shape, with straight anticlinal walls of irregular sizes and thickened walls.

In the abaxial face, the stomatal type can not be clearly visualized, appearing to be of the paracytic type with guard cells at the same level of the epidermis (Figure 2). Similar pattern were reported by Ceolin et al. (2009) with the same specie, in which the epidermal cells exhibit straight anticlinal walls, stomata and guard cells almost imperceptible (100x). The cuticle and the cutinized portion of epidermal cells are thin, and the cutinization of the epidermal cells occurs only in the external periclinal walls.



**Figura 1.** In front view, adaxial face of epidermis of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. A) Image taken in fluorescence microscope with visible light; B) Image taken with a fluorescence microscope with UV filter.



**Figura 2.** In front view, abaxial face of epidermis of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., image obtained by SEM. A) Abaxial face of epidermis. B) Stoma in the abaxial face.

The mesophyll is dorsiventral, corresponding to the characteristic pattern of the family Lauraceae (Metcalf & Chalk, 1972). It presents a palisade parenchyma layer near the adaxial surface and four to six layers of spongy parenchyma (Figure 3).

Together with the palisade parenchyma there are secretory cells of rounded or elliptical shape, located just below the adaxial epidermis and in subepidermal space. These cells have their lumen almost totally filled with oil and do not present chloroplasts. Histochemical test using Sudan IV (data not show) did not detect the presence of lipids in the walls of secretory cells.

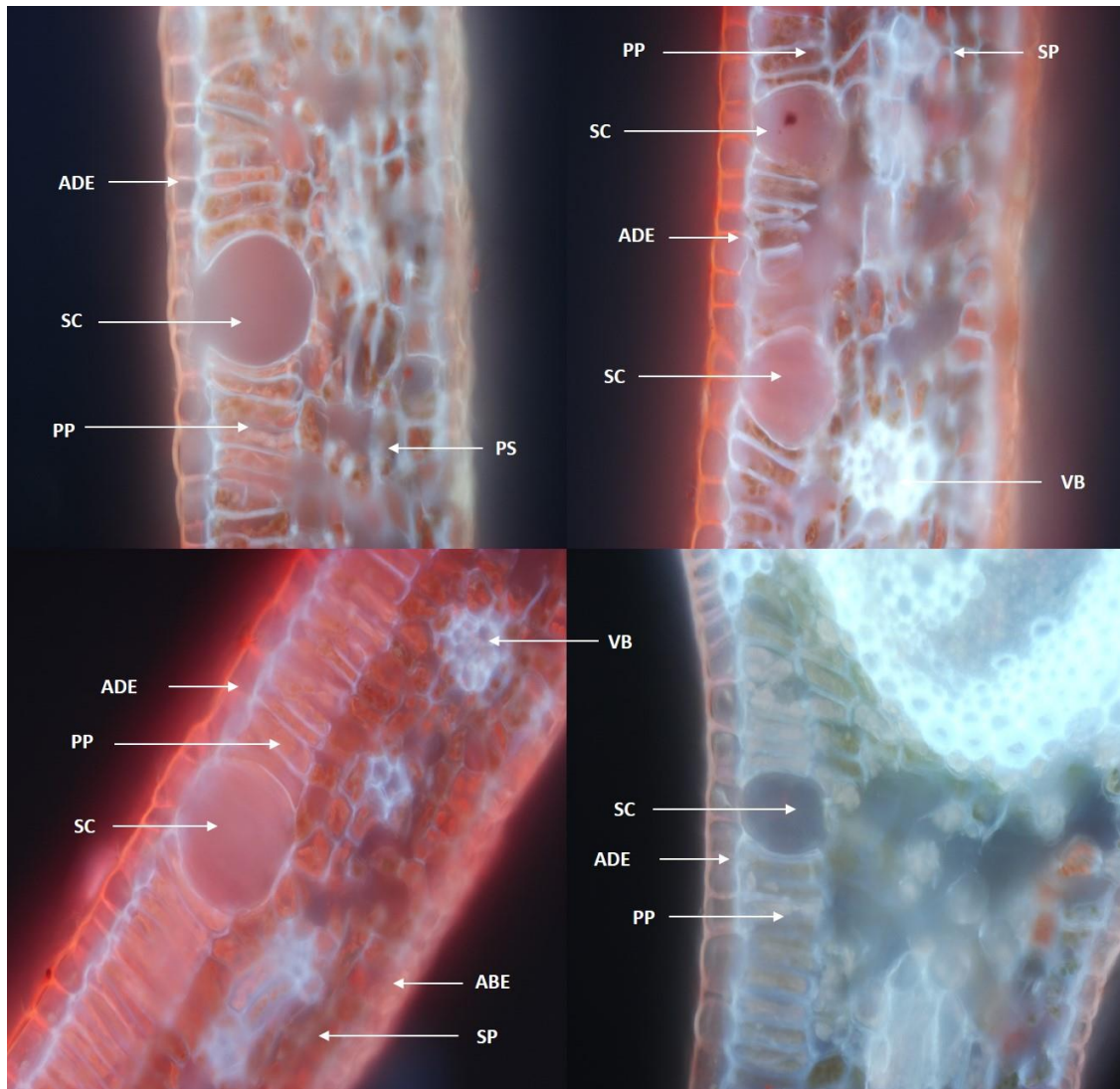
The secretory cells are secretory cavities because they occur in spherical format. These structures consist of large intercellular spaces that are formed either by the separation of the walls of neighboring cells, or by the disintegration of cells (Svoboda, 1996).

A very similar pattern of secretory cavity has been reported for other species of the genus *Nectandra*. In *Nectandra lanceolata* Nees et Mart. ex Nees, popularly known as canela-amarela, essential oil secretory structures were identified, distributed in the parenchyma randomly., including in the layers closest to the epidermis. In *Nectandra rigida* (H.B.K) Nees, popularly known as canela-ferrugem, the essential oil secretory structures were located in the subepidermal strata, randomly distributed among the cells of the palisade parenchyma (Marques, 2001).

The presence of mucilage and essential oil secretory structures is very common in species of the Lauraceae family. These structures were identified in almost twenty genera of the family, these structures being characterized by a spherical shape, with a suberized wall and often appear as translucent points of the leaves (Metcalf, 1987). In some blades it the presence of translucent spots could be observed (Figure 1), both in visible light and in UV filter. However, this feature cannot be viewed without the aid of a microscope. To validate the correlation of the translucent points with the secretory structures present in the species it is necessary to perform new blades and analyzes.

Structures containing essential oils or mucilage in species of the family Lauraceae have been reported by several authors (Solereder, 1908; Esau, 1960; Metcalf, 1987; Buvat, 1989; Toledo, 2000). These structures can occur simultaneously in the same plant in several families of Dicotyledons (Baas & Gregory, 1985). Essential oil or mucilage cells can be derived from identical initials and may even replace each other (Richter, 1981).

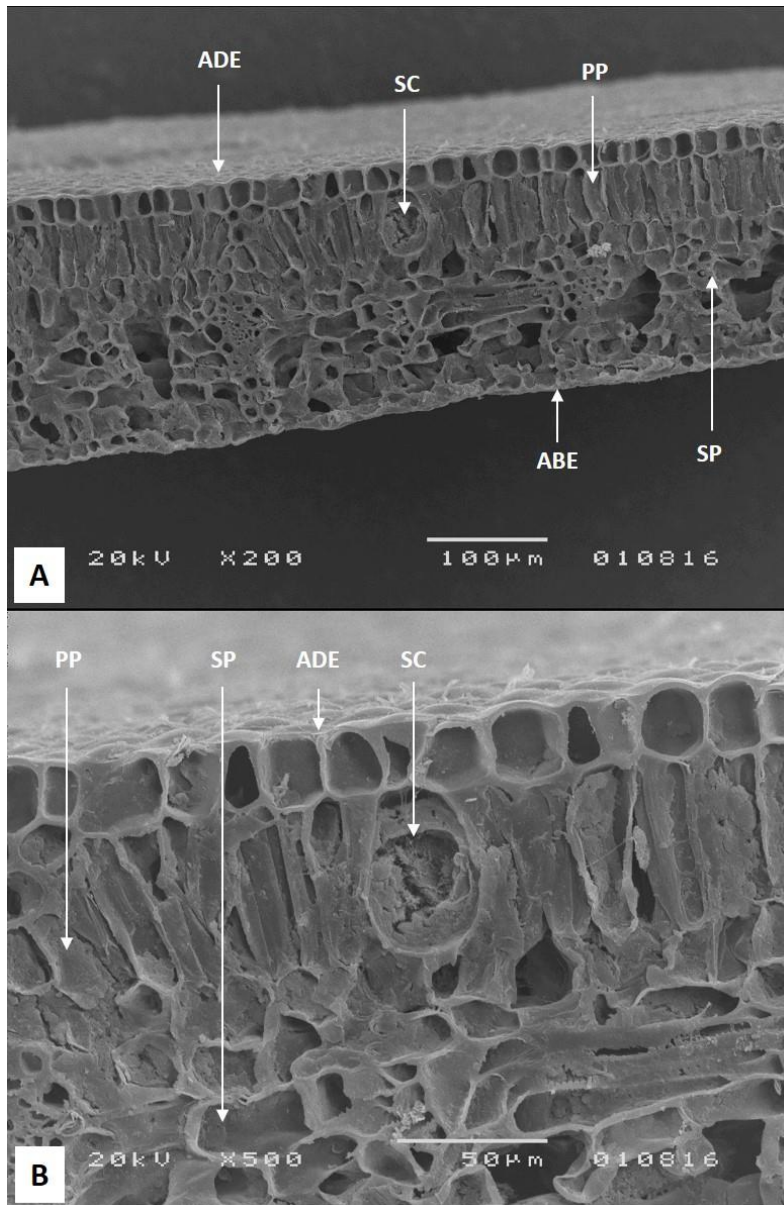
The mucilaginous cells occur in the leaves of the genera *Persea*, *Phoebe*, *Ocotea*, *Nectandra*, *Sassafras* and *Litsea* (Solereder, 1908). The mucilaginous cells are similar in size, shape and distribution to the oleifers, being found in at least fourteen genera.



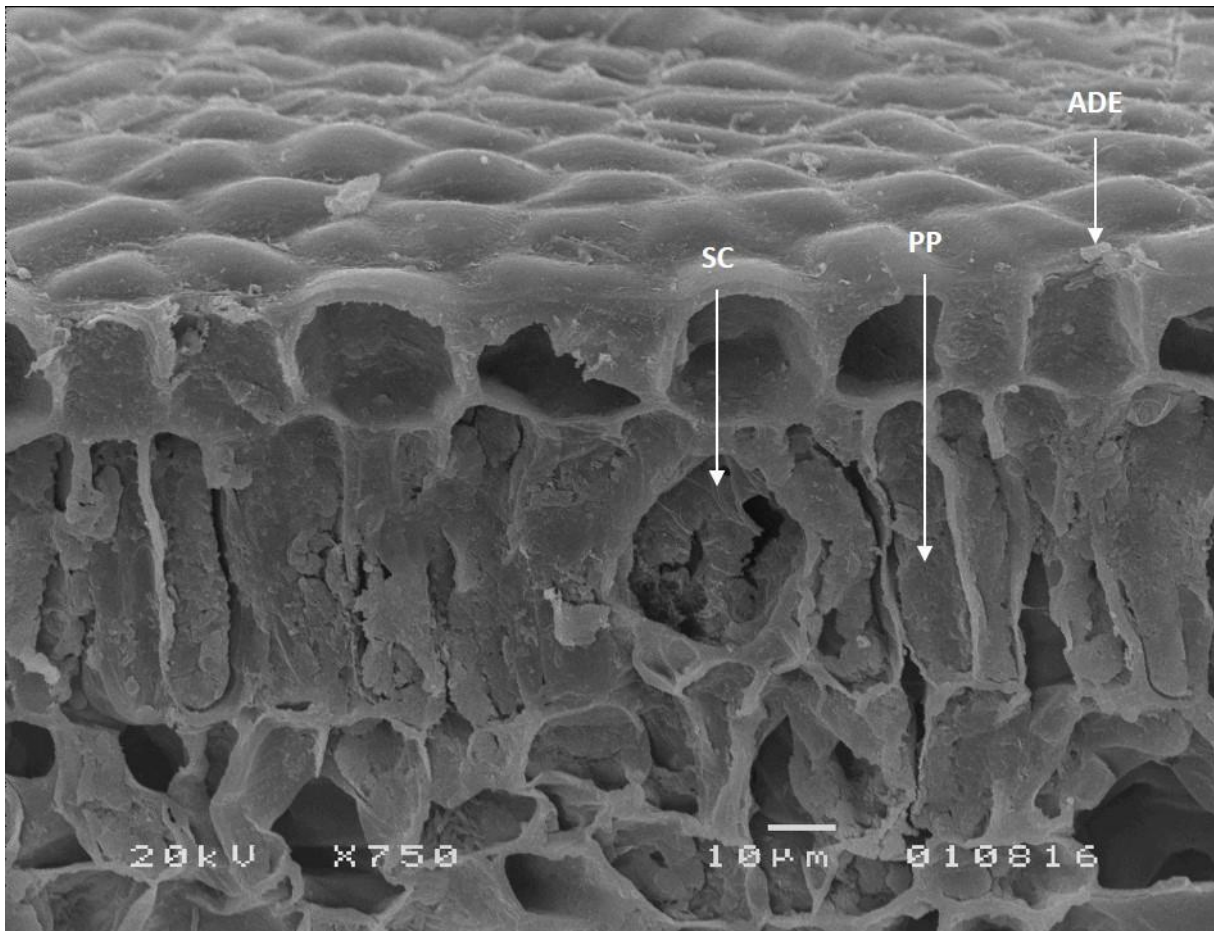
**Figura 3.** Leaf blade of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. (transversal section) obtained by fluorescence microscopy: ADE (adaxial epidermis), ABE (abaxial epidermis), PP (palisade parenchyma), SP (spongy parenchyma), SC (secretory cavity), VB (vascular bundle).

In Figure 4 it is possible to observe the leaf blade by SEM, in which the same structures shown in Figure 3 can be visualized, however, in another perspective.

Figure 5, showed the secretory cavity and its surrounding with a higher level of detail. The epidermal cells located above the secretory structures do not have characteristics that can differentiate them from the cells that surround them. Thus, secretory cavity are not amenable to recognition by visualization of the epidermis.



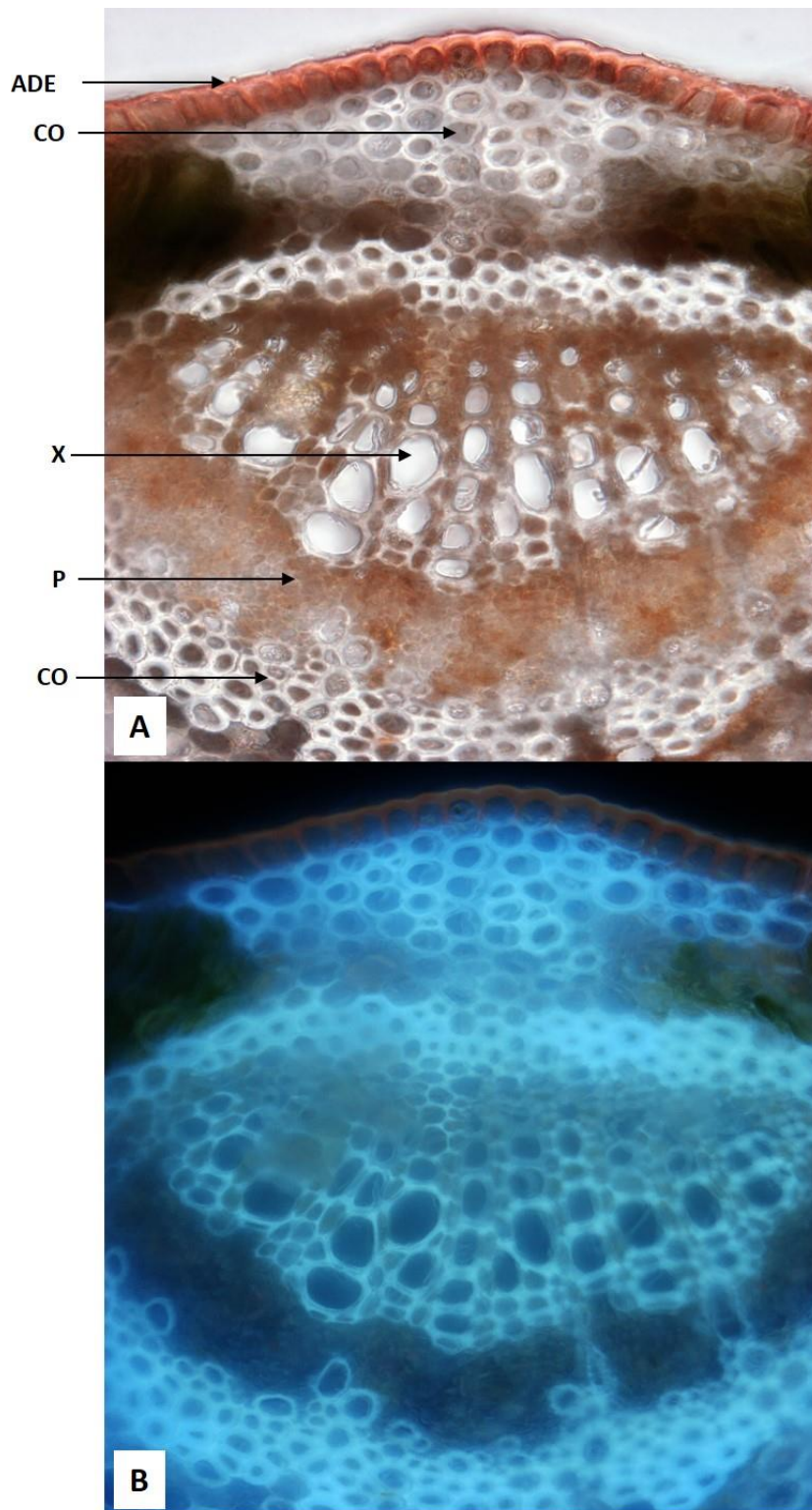
**Figure 4.** A) Aspect of leaf blade in frontal view; B) Aspect of the leaf blade with emphasis on the secretory cavity. ADE (adaxial epidermis), ABE (abaxial epidermis), PP (palisade parenchyma), SP (spongy parenchyma), SC (secretory cavity).



**Figura 5.** Leaf blade of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. (transversal section), with focus on the secretory cavity and its surrounding, obtained by SEM. ADE (adaxial epidermis), PP (palisade parenchyma), SC (secretory cavity).

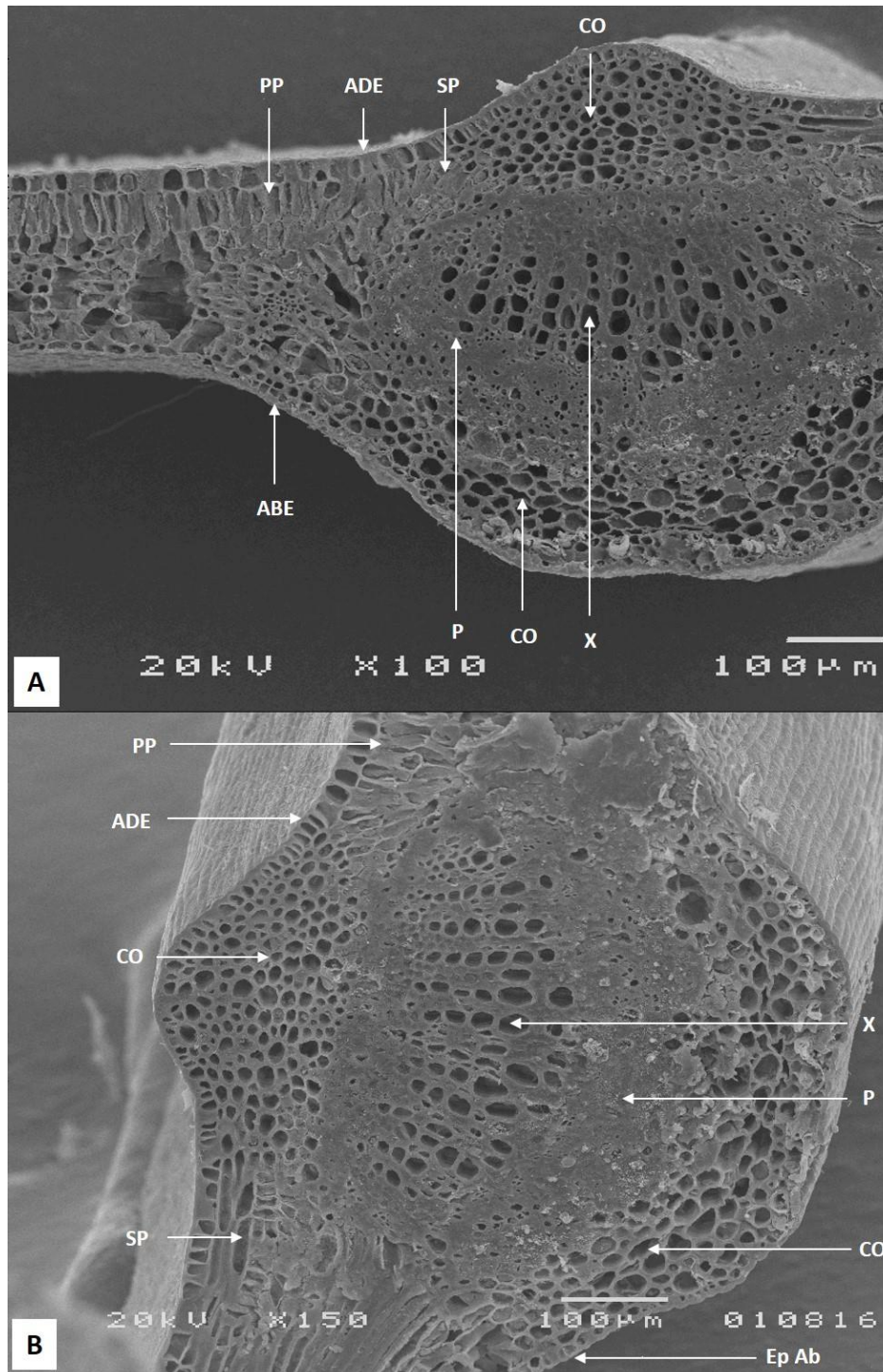
In relation to the central vein, this is presented in a slightly convex / concave shape (Figure 6 and 7). The vascular system is well defined and organized in a closed arc, with the phloem at the two poles of the xylem, characterizing the vascular system as bicollateral. The occurrence of a vascular system in arc format is characteristic in many genera of the family Lauraceae (Metcalf & Chalk, 1950).

The phloem of the abaxial region is strengthened by contact with sclerenchymatic fibers. Among these fibers and the abaxial epidermis of the primary and secondary veins there are usually four layers of angular collenchyma. Single crystals occur mainly in the spongy parenchyma. Dispersed in the mesophyll occur cells containing bacterial colonies.



**Figura 6.** Transversal section of the central vein of leaf tissues of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. A) Aspect of the central vein in optic microscopy; B) Aspect of the central vein in fluorescence microscopy with UV filter. AE (adaxial epidermis), P (phloem), X (xylem), SP (spongy parenchyma), CO (collenchyma).





**Figure 7.** Transverse section of the central vein of leaf tissues of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. A) Aspect of the central vein obtained by SEM; B) Aspect of central vein angled. ADE (adaxial epidermis), P (phloem), X (xylem), SP (spongy parenchyma), CO (collenchyma).

## Conclusion

The results obtained in the microscopy, although using frozen vegetable samples, allowed to obtain an initial description for the species, in which typical

structures of the family Lauraceae already described by other authors were identified. In general, the morpho-anatomical characterization of *N. megapotamica* leaf consists of glabrous epidermis, uni-stratified, paracytic stomata, absence of trichomes and polyhedral epidermal cells. Vascular system consists of a closed arc-shaped bicollateral bundle, mesophyll is dorsiventral and presence of secretory cavities. It was not possible to identify any exclusive structure for *Nectandra megapotamica*. Additional histological and histochemical tests based on the chemical composition of essential oils of the species under study, can provide more detailed characterization, especially with regard to the secretory and storage structures of these volatile substances.

## References

- Alves, E.O. et al. 2008. Levantamento etnobotânico e caracterização de plantas medicinais em fragmentos florestais de Dourados-MS. *Ciência Agrotecnologia*, 32, 651–658.
- Apel, M.A. et al., 2006. Screening of the biological activity from essential oils of native species from the atlantic rain forest (São Paulo – Brazil). *Pharmacology*, 3, 376-383.
- Baas, P., Gregory, M., 1985. A survey of oil cells in the dicotyledons with a comments on their replacement by and joint occurrence with mucilage cells. *Israel J Bot.* 34, 167-86.
- Barroso, G.M., Guimarães, E.F., Ichaso, C.L.F., Costa, C.G., Peixoto, A.L., 2002. *Sistemática de Angiospermas do Brasil*. Viçosa: UFV, v.1, 2 ed.
- Buvat, R., 1989. *Ontogeny, cell differentiation and structure of vascular plants*. New York: Springer-Verlag.
- Ceolin, G.B, Rosito, J.M., Canto-Dorow, T.S., 2009. Leaf surface characters applied to Lauraceae taxonomy in a seasonal forest of southern Brazil. *Braz Arch Biol Techn*, 52, 1453-1460.
- Da Silva Filho, A. A. et al. 2008. In vitro antileishmanial and antimalarial activities of tetrahydrofuran lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). *Phytother Res*, 22, 1307–1310.

- Esau, K., 1960. *Anatomia das plantas com sementes*. São Paulo: Edgard Blücher.
- Lorenzi, H., Souza, V.C., 2008. *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008, 2 ed.
- Marques, C.A., 2001. Anatomia foliar aplicada à taxonomia de espécies de Lauraceae Lind. Viçosa, 75 p. Master Thesis, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal de Viçosa.
- Mello, N.T.K., Dias, I.E.C., Yoshida, M., 2005. Chemical constituents of *Nectandra saligna* Nees (Lauraceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 10, 319.
- Metcalf, C. R., Chalk, L., 1950. *Anatomy of the Dicotyledons*. Oxford: Oxford Clarendon Press, v.1.
- Metcalf, C.R., Chalk, L., 1972. *Anatomy of the Dicotyledones: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*. Oxford: Clarendon Press, v.2.
- Metcalf, C.R., 1987. *Anatomy of the dicotyledons: magnoliales, illiciales, and laurales*. 2 ed. Oxford: Clarendon Press.
- Ribeiro, J.E.L.S., Hopkins, M.J.G., Vicentini, A., 1999. *Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das Plantas Vasculares de uma Floresta de Terra-Firme na Amazônia Central*. Manaus: Inpa-DFID.
- Richter, H.G., 1981. *Anatomie des Sekundärem Xylems und der Rinde der Lauraceae*: Sonderbände des Naturwiss Vereins in Hamburg. 5 ed. Berlin: Parey Hamburg.
- Rohwer, J.G., 1993. Lauraceae: *Nectandra*. *Flora Neotropica*, 60, 1-332.
- Svoboda, K., 1996. The Biology of Fragrance. *Aromatherapy Quarterly*, 49, 25-28.
- Toledo, M.G.T., 2000. Estudo botânico e fitoquímico de *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer. (Lauraceae) da região metropolitana de Curitiba. Curitiba, 110p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Paraná.
- Tondolo, J.S.M. et al. 2013. Anesthesia and transport of fat snook *Centropomus parallelus* with the essential oil of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. *Neotrop Ichthyol*, 11, 667-674.

Torres, A.M. et al. 2014. *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.: phytochemical characterization and neutralizing effect on *Bothrops diporus* venom. *J Essent Oil Res*, 26, 197-203.

**5. ARTIGO 3 - Leaf volatile oil analysis and RAPD markers: a combined approach for the study of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.**

COSTA, L.S.; REINIGER, L.R.S.; HEINZMANN, B.M.; AMARAL, L.P.; BIANCHINI, N.H. Leaf volatile oil analysis and RAPD markers: a combined approach for the study of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. A ser submetido à Genetics and Molecular Research, 2018.

## Leaf volatile oil analysis and RAPD markers: a combined approach for the study of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.

Costa LS<sup>1</sup>, Reiniger LRS<sup>1</sup>, Heinzmann BM<sup>2</sup>, Bianchini NH<sup>2</sup>, Amaral LP<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

<sup>2</sup> Laboratório de Extrativos Vegetais, Departamento de Ciências Florestais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

### ABSTRACT.

A combined analysis of RAPD molecular markers and chemical composition of *N. megapotamica* leaves essential oil were performed aiming the understand if diversity in volatile oil composition can be related to genetic variability of the species. 12 primers were used in the analysis producing 81 bands, with 98.99% polymorphism. All summer samples (2015 and 2016) presented Bicyclogermacrene and Germacrene D as major constituents of the essential oil. The cluster analysis of the molecular data indicated the presence of three groups, in accordance with the cluster analysis of essential oil composition. However, the individuals present in each cluster were different, showing a low correlation. Some studies have observed the same pattern, while others have observed high correlation between molecular data and essential oil composition. In the study no direct correlation between chemical analysis and molecular assessments could be found. Due to low similarity found between molecular and chemical assessments, other molecular tools and new approaches have to be used in the next researches to further understand the influence of both environmental and genetic factors on volatile composition.

**Key words:** essential oil; molecular marker; canela-preta; Lauraceae.

### Introduction

The family Lauraceae is composed by 49 genus and has 2.500 – 3.000 species (Werff, 1996), highlighting for its economic importance. The genus Aniba, *Nectandra* and *Ocotea* have the largest number of species of economic importance (Marques, 2001).

The genus *Nectandra* has some species that are studied in recent years. *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. popularly known as 'canela-preta' is found in the south, southeast and central regions of Brazil. The species has some properties indicated by folk medicine, as anti-rheumatic, anti-inflammatory and analgesic (Garcez et al. 2009; Santos Filho, 1975; Apel et al., 2006; Macías-Villamizar, 2015).

Previous studies with the species show that there is a variation in the composition of the essential oil between different populations. Previous analysis of volatile oil of *N. megapotamica* performed by Romoff et al. (2010) in the same season,  $\alpha$  – bisabolol (67.7-69.4%) and  $\delta$ -elemene (8.2-16.2%) were the major components. In contrast Amaral et al. (2015), identified  $\alpha$  – pinene (29.3-39.1%), bicyclogermacrene (21.4-31.2%) and  $\beta$  – pinene (15.2-24.9%) as the

main components; while Tondolo et al. (2013) found bicyclogermacrene (34.56-46.47%),  $\alpha$  – pinene (26.19-26.82%) and germacrene D (9.20-9.61%).

Variations in major constituents of essential oil may occur due to environmental factors, such as seasonality, temperature, water availability, radiation, nutrients, altitude and atmospheric pollution, which can cause significant variations in the chemical composition of the extractives (Gobbo Neto, 2007). However, the chemical composition of essential oils is mainly determined by genetic factors (Filho et al., 2017).

An important tool for the characterization and evaluation of genetic diversity are DNA-based molecular markers. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) is the PCR technique which involves the use of arbitrary short primers (8-12 nucleotides) (Kumari, 2014). RAPD markers have several advantages, such as low cost, quickness, relatively easy assay, and requirement for small amount of template DNA, no requirement of DNA sequence information (Rao, 2014).

These markers generally have low levels of repeatability. However, this problem can be overcome by consistent laboratory protocols and by performing repeatability tests (Ramos et al., 2008).

RAPD markers have previously been used in the study of aromatic plants in combination with essential oil analysis (Singh et al., 2013; Baghizadeh, 2014; Singh, 2015; Rahali et al., 2016). Some authors have succeeded in combining molecular analysis with the composition of essential oils, while others obtained contradictory results, revealing an absence of a true consensus on this matter. In present study we use RAPD, together with essential oil analysis, aiming to understand if diversity in volatile oil composition can be related to genetic variability of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. in the central region of Rio Grande do Sul state, Brazil.

## **Materials and Methods**

### **Plant material**

A total of 12 individual samples of *N. megapotamica* were collected on Itaara (RS) – Brazil (Figure 1). For molecular analysis, the collected leaves were stored and dried at room temperature.

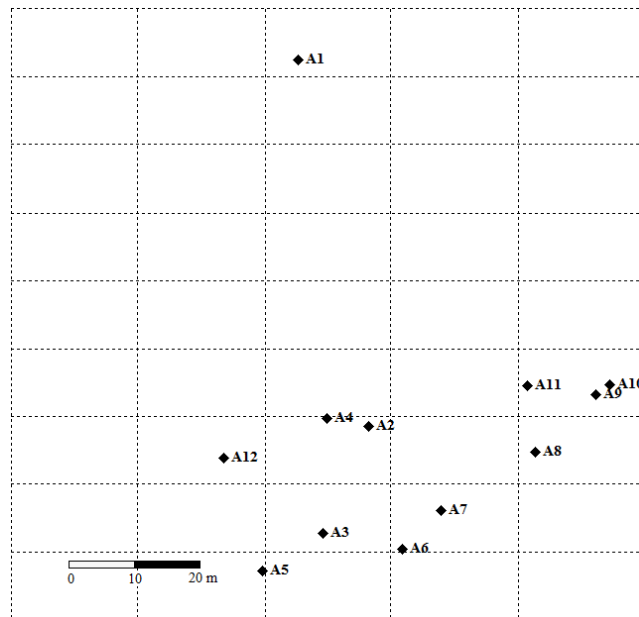


Figure 1. Geographical location of the 12 individuals of *N. megapotamica* in Itaara, Rio Grande do Sul, Brazil.

### DNA extraction and RAPD amplification

The molecular data used was previously obtained by Costa et al. (2015), in a research on diversity and genetic structure of a natural population of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.

DNA was extracted from dry leaves, following the method described by Dellaporta et al. (1983) and modified by Costa et al. (2016).

Total of 11 primers were selected (Table 1). This selection was based on high polymorphism and good reproducibility of the fragments generated. The protocol for RAPD analysis was described by Costa et al. (2015).

Table 1. RAPD primers sequence used for the screening of the 12 individuals of *Nectandra megapotamica*.

Primer	Sequence
OPA-02	5'-TGCCGAGCTG-3'
OPA-04	5'-AATCGGGCTG-3'
OPA-10	5'-GTGATCGCAG-3'
OPA-11	5'-CAATCGCCGT-3'
OPA-12	5'-TCGGCGATAG-3'
OPA-13	5'-CAGCACCCAC-3'
OPA-15	5'-TTCCGAACCC-3'
OPA-18	5'-AGGTGACCGT-3'
OPD-05	5'-TGAGCGGACA-3'
OPD-07	5'-TTGGCACGGG-3'
OPD-08	5'-GTGTGCCCCA-3'



## Extraction of volatile oils and identification of constituents

Leaves from *N. megapotamica* were collected in Santa Maria, south of Brazil, during the summer 2015 and 2016. The essential oils were extracted from previously fractionated fresh leaves ( $\leq 1$  cm) by hydrodistillation for 3 h, using Clevenger type apparatus (European Pharmacopea, 2010).

The chemical composition was analyzed out using an Agilent 7890A gas chromatograph coupled with a 5975C mass detector (GC-MS). Previously, the oil samples were diluted in hexane HPLC (1:1000). The split mode used was 1:100, and the ionization technique was electron impact at 70 eV. The analysis parameters were: silica capillary column HP-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m), volume of injection 1.0  $\mu$ L, helium as carrier gas, with flow of 1.0 ml/min; injector and detector temperatures, 250 and 280°C, respectively, and oven program: 40 to 320°C at 4°C/min, and delay of four minutes. The identification of the constituents was performed by comparison of the linear retention indices with literature data, and the fragmentation pattern of the mass spectra with the system database (Adams, 2009; NIST, 2008).

For quantitative analysis, gas chromatography with a flame ionization detector (GC-FID) was performed using a column with equivalent characteristics and the same oven parameters than GC-MS. Injection and detection temperatures were programmed at 300°C and the split inlet mode ratio was 1:50. Essential oils compounds relative percent was determined by peak area integration obtained from FID chromatograms.

## Data analysis

On the gel analysis, only distinct and reproducible bands were considered. For the molecular analysis, fragment data were scored for the presence (“1”) or the absence (“0”) of a band using PyElph (Pavel and Vasile, 2012). In order to evaluate genetic variation with RAPD the analysis of molecular variance (AMOVA) was performed calculated using Arlequin 3.5. Principal coordinates analysis (PCoA) was performed using GenAlEx 6.5 (Peakall and Smouse, 2012) to visualize the genetic relationship between clusters.

To determine the relationship between the different accessions of *N. megapotamica* we used the percentage of the essential oil composition by principal components analysis (PCA) using the XLSTAT (Addinsoft, 2017). PCA analysis was performed order to obtain a representation of both samples and components present in percentages  $\geq 10\%$  in, at least, one oil sample.

## Results and Discussion

### Molecular analysis

In the study performed by Costa et al. (2015) all the 11 RAPD primers tested generated bright and reproducible amplification products, generating a total of 81 amplicons. These showed a high level of polymorphism with 98.99% of the bands were polymorphic (Table 2).

Table 2. Selected Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) primers used in this study for the genetic analysis of 12 *Nectandra megapotamica* individuals along with the number of obtained bands, number of polymorphic bands, and percentage of polymorphic bands.

Primer	Sequence	Number of obtained bands	Number of polymorphic bands	Polymorphic bands (%)
OPA-02	5'-TGCCGAGCTG-3'	2	2	100
OPA-04	5'-AATCGGGCTG-3'	11	11	100
OPA-10	5'-GTGATCGCAG-3'	3	3	100
OPA-11	5'-CAATCGCCGT-3'	9	9	100
OPA-12	5'-TCGGCGATAG-3'	6	6	100
OPA-13	5'-CAGCACCCAC-3'	11	11	100
OPA-15	5'-TTCCGAACCC-3'	4	4	100
OPA-18	5'-AGGTGACCGT-3'	6	6	100
OPD-05	5'-TGAGCGGACA-3'	10	10	100
OPD-07	5'-TTGGCACGGG-3'	10	10	100
OPD-08	5'-GTGTGCCCCA-3'	9	8	88.89
Overall		81	80	98.99

Font: Costa et al., 2015.

The Principal coordinates analysis obtained from the molecular data (Figure 2) showed a clear separation of *N. megapotamica*. Cluster analysis revealed three distinct groups: Cluster I included A3, A5, A10, A11 and A12 accessions; Cluster II included A2, A4, A6, A7 and A9 accessions; Cluster II included A1 and A8 accessions.

Estimates of genetic diversity among clusters  $F_{ST}$  using AMOVA indicated a high degree of differentiation between clusters 1 and 2 (0.16,  $P < 0.05$ ) and very high differentiation between clusters 2 and 3 (0.25,  $P < 0.05$ ). Between clusters 1 and 3, no significant differentiation was observed ( $P > 0.05$ ).

The AMOVA allowed to evaluate the genetic differentiation among the clusters, showing high degree of differentiation between clusters 1 and 2 (0.16,  $P < 0.05$ ) and very high differentiation between clusters 2 and 3 (0.25,  $P < 0.05$ ). Between clusters 1 and 3, no significant differentiation was observed ( $P > 0.05$ ).

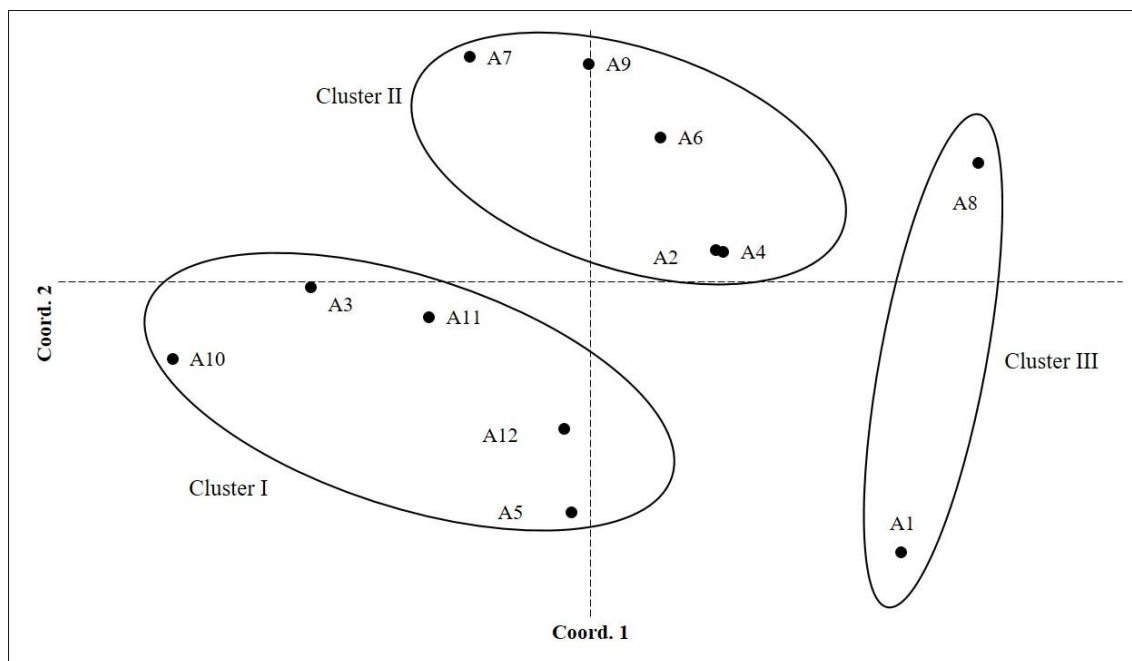


Figure 2. Cluster analysis of 12 *Nectandra megapotamica* individuals as determined by principal coordinate analysis (PCoA). Axis 1 accounts for 38.80% and axis 2 for 12.23% of the variation in the data. Font: Costa et al., 2015.

### Volatile oil analysis

The chemical analysis of volatile oils extracted from the twelve individuals showed that components were always detected in all volatile oil samples, amounting 26.20-60.45% of the total composition in the summer of 2015, and 25.51-47.90% in the summer of 2016. Of all constituents identified six were present in relative percentages above 10%, at least in one volatile oil sample. In the samples of summer 2015, bicyclogermacrene and germacrene D were the two main components detected (Table 3), with variation of 15.20-49.77% and 1.46-16.65%, respectively. Spathulenol was present in relative amounts between 1.0-36.03%.

In summer of 2016, bicyclogermacrene and germacrene D were also identified as major constituents (Table 4), with variation of 33-49.85% and 10.56-16.88%, respectively.

All volatile oils were dominated by sesquiterpenes, representing 58.48-98.48%, the monoterpenes attained 0.49-30.69%, while the phenylpropanoids ranged from absence in more than one sample until 22.06%.

Table 3. Relative amounts (%) of summer 2015 samples of components  $\geq 10\%$  in, at least, one oil sample and of the grouped components in the volatile oils from the 12 individuals (A1-A12) of *Nectandra megapotamica*.

	$\beta$ -Pinene <sup>MH</sup>	Germacrene D <sup>SH</sup>	Bicyclogermacrene <sup>SH</sup>	<i>E</i> -Nerolidol <sup>OCS</sup>	Spathulenol <sup>OCS</sup>	<i>E</i> -Asarone <sup>P</sup>	MH	SH	OCS	P
<b>A1</b>	1.62	12.34	42.58	3.36	1.00	8.50	7.08	68.37	15.16	8.50
<b>A2</b>	5.16	1.46		2.27	36.03		14.96	14.21	56.02	0.00
<b>A3</b>	5.10	10.34	25.34		3.97	21.67	15.82	48.42	10.05	22.06
<b>A4</b>	0.23	14.52	49.77	0.90	2.42		1.01	83.92	12.03	0.00
<b>A5</b>	4.57	16.65	39.99	0.18	2.42	9.39	14.07	64.80	8.13	9.39
<b>A6</b>	1.85	6.09	15.20	2.08	28.41		10.37	37.99	44.51	1.33
<b>A7</b>	6.00	13.65	32.73	1.41	1.61		16.78	66.20	14.39	0.00
<b>A8</b>	0.23	16.48	46.15	1.44	3.18	0.91	1.46	81.21	14.92	0.91
<b>A9</b>	4.57	9.56	36.62	1.25	3.22		14.95	66.89	16.68	0.00
<b>A10</b>	6.77	5.13	15.91	16.67	20.11		18.28	33.44	44.65	0.00
<b>A11</b>	0.13	13.74	46.02	4.83	3.20	0.94	0.78	76.60	16.63	0.94
<b>A12</b>	7.84	15.01	38.63		1.16		21.90	68.52	8.32	0.00

MH: monoterpene hydrocarbons; SH: sesquiterpene hydrocarbons; OCS: oxygen-containing sesquiterpenes; P: phenylpropanoid.

Table 4. Relative amounts (%) of components  $\geq 10\%$  in of summer 2016 samples, one oil sample and of the grouped components in the volatile oils from the 12 individuals of *Nectandra megapotamica*.

	$\beta$ -Pinene <sup>MH</sup>	Germacrene D <sup>SH</sup>	Bicyclogermacrene <sup>SH</sup>	<i>E</i> -Nerolidol <sup>OCS</sup>	Spathulenol <sup>OCS</sup>	<i>E</i> -Asarone <sup>P</sup>	MH	SH	OCS	P
<b>A1</b>	10.41	10.56	33.00	1.29	0.46	5.27	30.69	52.61	9.49	5.27
<b>A2</b>	0.21	16.88	49.85	1.31	5.42		5.75	73.16	17.89	0.00
<b>A3</b>	1.74	13.73	39.73	0.18	2.09	16.39	7.10	65.10	9.41	16.39
<b>A4</b>	7.90	15.21	40.92	0.68	1.27		22.40	66.59	10.00	0.00
<b>A5</b>	5.55	16.16	40.87		1.43	9.05	15.83	65.30	8.17	9.05
<b>A6</b>	4.53	11.69	40.51	0.63	1.09		22.66	66.55	8.95	0.00
<b>A7</b>	3.31	14.96	42.42	2.46	1.96		12.27	69.64	16.79	0.00
<b>A8</b>	5.23	16.04	39.46		1.87		17.47	71.58	10.04	0.00
<b>A9</b>	2.24	10.91	41.32	0.92	1.84		9.45	75.13	14.48	0.00
<b>A10</b>	2.34	11.44	49.08	8.86	0.98		11.04	73.37	14.87	0.00
<b>A11</b>	6.23	12.30	42.62	3.64	2.06	0.33	23.95	62.68	11.12	0.33
<b>A12</b>	0.08	16.02	49.19	0.80	4.06		0.49	84.41	14.07	0.00

MH: monoterpene hydrocarbons; SH: sesquiterpene hydrocarbons; OCS: oxygen-containing sesquiterpenes; P: phenylpropanoid.

The volatile oil scatter plot, obtained by PCA, showed three groups of accession (A-C), for the 2015 and 2016 samples (Figure 3), in accordance with the molecular data cluster. In the analysis of the 2015 samples, bicyclogermacrene was the main compound in the volatile oils from the individuals in group A, Spathulenol in group B and E-Asarone in group C. For the 2016 samples,  $\beta$ -Pinene was the major compound in group A, Bicyclogermacrene I group B and E-Asarone in group C.

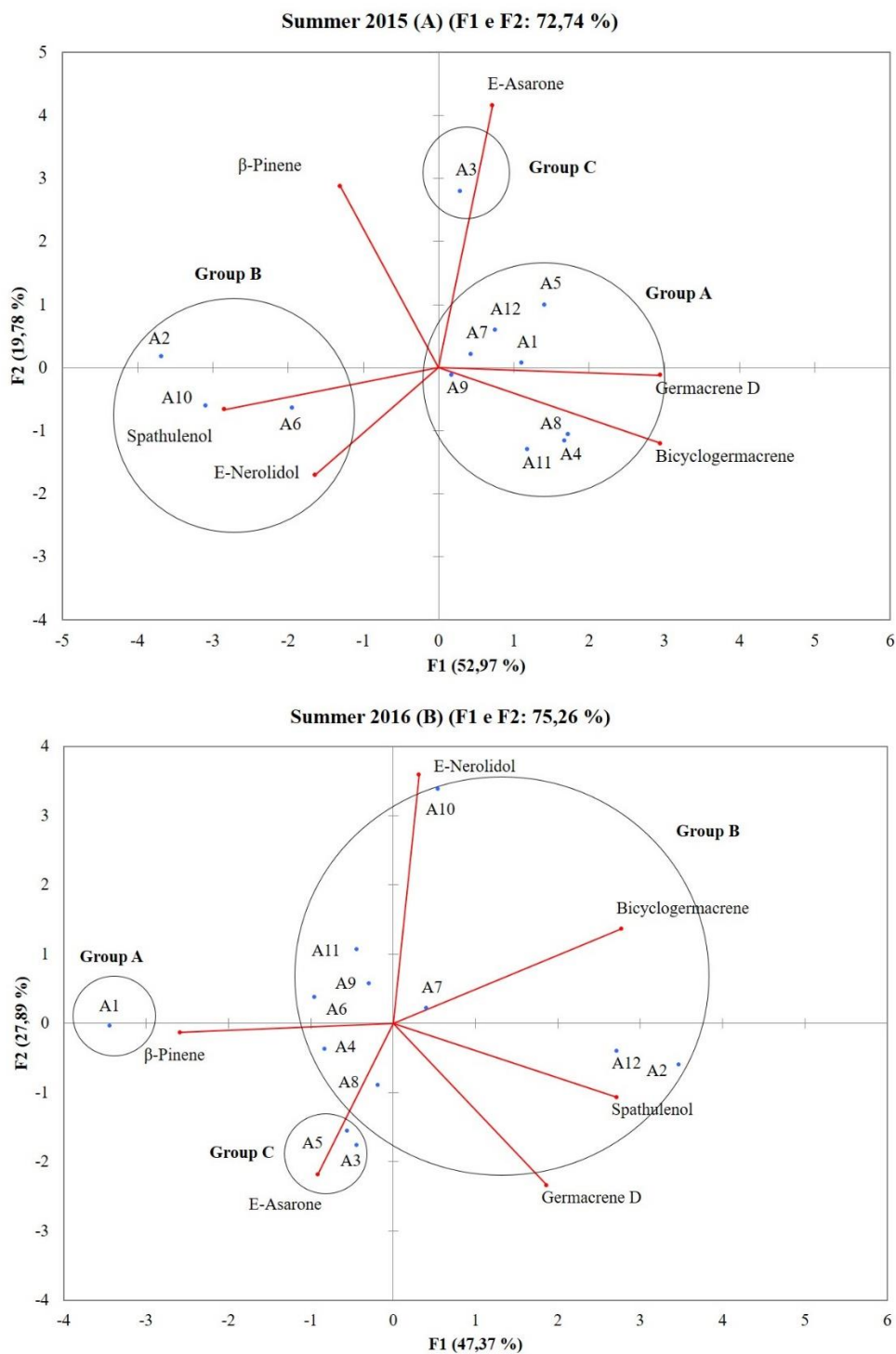


Figure 3. Principal components analysis of the volatile oils chemical components from the 12 individuals *Nectandra megapotamica* in summer 2015 (A) and summer 2016 (B). For the analysis, six components present in percentages  $\geq 10\%$  in, at least, one oil sample, were considered.

The cluster analysis for the molecular data and essential oil composition showed similarity only in the number of groups. Both analyzes classified the species into three distinct groups. The genetic base is a determining factor in

the oil composition, in addition, seasonal variations and plant age strongly influence the chemical variation in oil the composition of plant (Hudaib et al., 2012).

The low similarity between RAPD molecular data and essential oil composition can be explained due to the inexistence of a characteristic chemical profile of the species. In two studies performed with some individuals from the same population, the major constituents identified were  $\alpha$ -Pinene and Bicyclogermacrene (Amaral et al., 2014; Amaral et al., 2015). In the present study, the major constituents were Bicyclogermacrene and Germacrene-D. Similar researches developed by Lima et al. (2010) and Pluhár et al. (2012) with *Thymus* sp. detected high diversity in the volatile and molecular profile, but no correlation among chemical and genetic assessments could be observed. The use of RAPD markers in the study realized by Costa et al. (2015) was extremely useful in providing a rapid assessment of the genetic diversity and structure for the *Nectandra* population. The high genetic diversity of the species and high differentiation among the clusters contributes strongly to the differences in the chemical composition of the essential oil identified in several studies. However, in the specialized literature some examples can be found where the combined use of molecular markers RAPD and essential oil analysis are correlated. Vieira et al. (2001) performed study with *Ocimum gratissimum* verified a high correlation between the clusters obtained with RAPD and those with essential oil. Echeverrigaray et al. (2001) analyzed the essential oil composition and genetic variability of six commercial cultivars of thyme (*Thymus vulgaris* L.) with high correlation.

The molecular analysis using RAPD did not show identical clustering as with the chemical composition and no direct correlation between chemical analysis and molecular assessments could be found. Due to low similarity have been found between molecular and chemical assessments found in this work, new approaches have to be used in the next researches to further understand this specie. So, the question as to what the relation of essential oil composition and the genetic factor is still open, due its complexity of factors involved.

## References

Adams, R.P., 2009. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation. Illinois, 455p.

Addinsoft, 2017. XLSTAT Version 19.03. New York, Addinsoft, USA.

Amaral, L.P., Schindler, B., Bianchini, N.H., Longhi, S.J., et al., 2015. Variabilidad de la composición química del aceite esencial de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez (Lauraceae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 14, 190-205.

Amaral, L.P., Tondolo, J.S.M., Schindler, B., Silva, D.T., et al., 2015. Seasonal influence on the essential oil production of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. *Braz. Arch. Biol. Technol*, 58, 12-21.



- Apel, M.A., Lima, M.E.L., Souza, A., Cordeiro, I. et al., 2006. Screening of the biological activity from essential oils of native species from the atlantic rain forest (São Paulo – Brazil). *Pharmacology*, 3, 376-383.
- Baghizadeh, A., Balouchi, A., Nazem, H., 2014. A Study of Genetic and Chemical Diversities of some Chamomile Ecotypes Based on RAPD Markers and Essential oil Compositions. *Journal of Medicinal Plants and By-products*, 1, 41-46.
- Costa, L.S., Reiniger, L.R.S., Heinzmann, B.M., Amaral, L.P., Serrote, C.M.L., 2015. Study of the genetic diversity and structure of a natural population of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. using RAPD markers. *Genetics and Molecular Research*, 14, 18407-18413.
- Costa, L.S., Reiniger, L.R.S., Stefenon, V.M., Heinzmann, B.M., Oliveira, A.S., 2016. Comparative analysis of five DNA isolation protocols and three drying methods for leaves samples of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. *Semina: Ciências Agrárias*, 37, 1177-1188.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B., 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1, 19-21.
- Echeverrygaray, S., Agostini, G., Atti-Serfini, L., Paroul, N., 2001. Correlation between the Chemical and Genetic Relationships among Commercial Thyme Cultivars. *J Agr Food Chem*, 49, 4220-4223.
- European Pharmacopeia, 2010. European directorate for the quality of medicines. 7th edn. Strassbourg.
- Excoffier, L., Lischer, H.E.L., 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of program to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour*, 10, 564-567.
- Filho, J.M.T.A. et al., 2017. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from leaves of *Croton heliotropiifolius* in different seasons of the year. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27, 440-444.
- Garcez, F.R., Garcez, W.S., Hamerski, L., Miguita, C.H., 2009. Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapotamica*. *Química Nova*, 32, 407-411.
- Gobbo-Neto, L., Lopes, N.P., 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quím. Nova*, 30, 374-381.
- Hudaib, M., Speroni, E., Di Pietra, A.N., Cavrini, V., 2002. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29, 691-700.
- Kumari, N., Thakur, S.K., 2014. Randomly Amplified Polymorphic DNA – A brief review. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 9, 6-13.

Lima, A.S., Trindade, M., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., et al., 2010. Molecular and volatiles characterization of Portuguese *Thymus caespititius* chemotypes. *Acta Horticulturae*, 860, 81–85.

Macías-Villamizar, V.E., Cuca-Suárez, L. E.; Coy-Barrera, E.D., 2015. Genus *Nectandra*: “Phytochemistry and Biological Activity”. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales e Aromáticas*, 14, 317-342.

Marques, C.A., 2001. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. *Floresta e Ambiente*, 8, 195-206.

National Institute of Standards and Technology: NIST 2008. Mass spectral library (NIST/EPA/NIH), Gaithersburg, USA, 2008.

Pavel, A.B., Vasile, C.I., 2012. PyElph - A software tool for gel analysis and phylogenetics. *BMC Bioinformatics*, 13, 9.

Peakall, R., Smouse P.E., 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.

Romoff, P., Ferreira, M.J.P., Padilla, R., Toyama, D.O., et al., 2010. Chemical composition of volatile oils from leaves of *Nectandra megapotamica* Spreng. (Lauraceae). *Quím Nova*, 33, 1119-1121.

Rahali, F.Z., Lamine, M., Gargouri, M., Rebey, I.B, et al., 2016. Metabolite profiles of essential oils and molecular markers analysis to explore the biodiversity of *Ferula communis*: Towards conservation of the endemic giant fennel. *Phytochemistry*, 124, 58-67.

Ramos, J.R. et al., 2008. Optimizing reproducibility evaluation for random amplified polymorphic DNA markers. *Genet Mol Res*, 7 (4), 1384-1391.

Rao, V.P., Chaudhary, R., Singh, S., Sengar, R.S., Sharma, V., 2014. Assessment of genetic diversity analysis in contrasting sugarcane varieties using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *African Journal of Biotechnology*, 13, 3736-3741.

Santos Filho, D., Gilbert, B., 1975. The alkaloids of *Nectandra megapotamica*. *Phytochemistry*, 14, 821-822.

Singh, T.D., Devi, K.D., Shagolsem, B.S., Singh, C.B., et al., 2013. Assessment of Genetic Stability in Traditional Ginger Cultivated in Manipur, India Based on Molecular and Chemical Markers. *Journal Analytical Letters*, 43, 2941-2953.

Singh, S.K., Katoch, R., Kapila, R.K., 2015. Genetic and Biochemical Diversity among *Valeriana jatamansi* Populations from Himachal Pradesh. *The Scientific World Journal*, 1-10.

Tondolo, J.S.M., Amaral, L.P., Simões, L.N., Garlet, Q.I., et al., 2013. Anesthesia and transport of fat snook *Centropomus parallelus* with the essential oil of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. *Neotropical Ichthyology*, 11, 667-674.

Vieira, R.F., Grayer, R.J., Paton, A., Simon, J.E., 2001. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. *Biochem Syst Ecol*, 29, 287-304.

Werff, H.W., Richter, H.G., 1996. Toward and improved classification of Lauraceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 8, 419-432.

## 6. RESULTADOS ADICIONAIS I

### ANÁLISE ESTACIONAL DA COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE UMA POPULAÇÃO DE *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.

#### OBJETIVO

O objetivo do presente estudo consistiu em realizar a análise sazonal da composição do óleo essencial em uma população de indivíduos de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez a partir de amostras coletadas no verão e inverno de 2015.

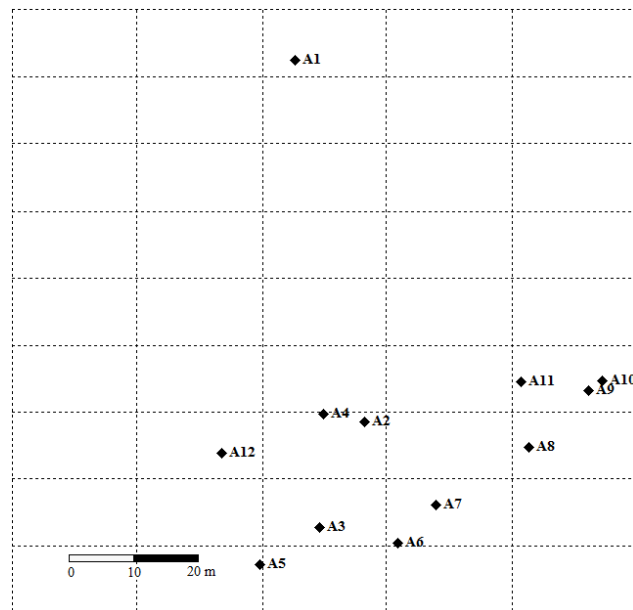
#### MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos, a seguir descritos, foram realizados no Laboratório de Extrativos Vegetais – LABEV, Centro de Ciências Rurais da UFSM, localizado em Santa Maria, RS.

##### Material vegetal

Um total de 12 indivíduos de *N. megapotamica* foram coletados em Itaara (RS) – Brasil (Figura 1). Para a realização das análises moleculares, foram coletadas folhas que foram, a seguir, armazenadas e secas em temperatura ambiente.

Figura 1 - Localização geográfica dos 12 indivíduos de *N. megapotamica* em Itaara, Rio Grande do Sul, Brasil.



#### Extração de óleo essencial e identificação de constituintes

Folhas de *N. megapotamica* foram coletadas em Itaara (RS), durante o verão e inverno de 2015. Foram coletadas folhas maduras, no período da manhã (das 09h às 11h 30min), sendo posteriormente selecionadas aquelas que apresentavam aspecto saudável. O óleo essencial foi extraído a partir de folhas frescas, pelo método de hidrodestilação durante 3 horas, utilizando aparato do tipo Clevenger (European Pharmacopea, 2010).

A composição química foi determinada utilizando um cromatógrafo de gás Agilent 7890A acoplado com um detector de massas 5975C (CG-EM). Previamente, as amostras de óleo foram diluídas em hexano (1: 1000). O modo de injeção foi com divisão de fluxo 1: 100, e a técnica de ionização foi de impacto de elétrons a 70 eV. Os parâmetros de análise foram: coluna capilar de sílica HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m), volume de injeção 1,0  $\mu$ L, hélio como gás carreador, com fluxo de 1,0 ml / min; temperatura do injetor e do detector, 250 e 280 °C, respectivamente, e programa do forno: 40 a 320 °C a 4 °C / min e retardo de quatro minutos. A identificação dos constituintes foi realizada por comparação dos índices de retenção linear com os dados da literatura e o padrão de fragmentação dos espectros de massas com o banco de dados do sistema (ADAMS, 2009; NIST, 2008).

Para análise quantitativa, a cromatografia gasosa com um detector de ionização de chama (GC-FID) foi realizada usando uma coluna com características equivalentes à anteriormente citada e os mesmos parâmetros do forno do CG. As temperaturas de injeção e detecção foram programadas a 300 °C e para a injeção foi utilizada divisão de fluxo de 1:50. O percentual relativo de compostos de óleos essenciais foi determinado por integração de área de pico obtida a partir de cromatogramas FID.

Tabela 1 – Quantidade de material vegetal utilizado de cada um dos 12 indivíduos de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., coletado no verão e inverno de 2015, utilizando hidrodestilação como método para obter o óleo essencial.

Amostra	Quantidade de material vegetal (g)	
	Verão	Inverno
1	545.37	504.26
2	548.46	506.50
3	586.27	506.04
4	560.04	506.83
5	548.53	506.32
6	558.36	506.97
7	577.48	535.20
8	466.57	505.38
9	544.86	528.74
10	559.84	516.21
11	550.47	552.22
12	549.67	516.27
<b>Média</b>	<b>549.66</b>	<b>515.91</b>

## RESULTADOS

Considerando-se a influência ambiental sobre a biossíntese de óleos essenciais, é possível que um mesmo genótipo apresente diferentes composições em resposta a alterações do ambiente. Tal afirmação é apoiada no raciocínio a seguir apresentado.

A biossíntese dos componentes dos óleos essenciais ocorre por meio de vias biossintéticas, que basicamente compreendem uma série de reações enzimáticas, em que moléculas complexas são formadas a partir de moléculas simples (RHIND, 2012). Dessa forma, tendo em vista que a codificação de enzimas específicas é determinada pela expressão diferencial de determinados genes, regulada por

variações ambientais (SANGWAN et al., 2000), a taxa de biossíntese de compostos voláteis pode ser correlacionada com os níveis de transcritos dos genes que codificam tais enzimas (PAULA et al., 2011). Assim, um indivíduo de ciclo perene, exposto a distintas condições ambientais, pode sofrer alterações nas suas rotas biossintéticas como um mecanismo de adaptação, acarretando alterações na composição dos óleos essenciais nas estações do ano.

### Análise do óleo essencial

A análise do óleo essencial extraído a partir dos 12 indivíduos revelou que os componentes que sempre foram detectados em todas as amostras, totalizaram 26,20-60,45% do total no verão de 2015, e 48,21-86,55% no inverno de 2015. De todos os constituintes identificados 5 estavam presentes em porcentagens relativas acima de 10%, pelo menos em uma amostra de óleo volátil no verão e seis no inverno.

Nas amostras de verão, biciclogermacreno e germacreno D foram os dois principais componentes detectados (Tabela 2), com variação de 15,20-49,77% e 1,46-16,65%, respectivamente. O espatulenol estava presente em quantidades relativas entre 1,0-36,03%. No verão, os óleos voláteis foram dominados por sesquiterpenos, representando 74,30-98,73%, os monoterpenos variaram de ausência em mais de uma amostra até 8,51, enquanto os fenilpropanoides variaram de ausência em mais de uma amostra até 22,06%.

No inverno, biciclogermacreno e germacreno D também foram identificados como constituintes principais (Tabela 3), com variação de 15,14-57,89% e 2,83-18,52%, respectivamente. No inverno, as sesquiterpenos representaram 82,34-99,46%, os monoterpenos variaram de ausência em mais de uma amostra até 0,97%, enquanto os fenilpropanoides variaram de ausência em mais de uma amostra até 14,60%.

Tabela 2 - Composição química do óleo essencial de folhas de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. coletadas no Verão de 2015. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.

Constituinte	RT	IK Exp	IK Lit.	Porcentagem da composição no Verão (%)											
				A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
$\alpha$ -Pineno <sup>M</sup>	11,10 - 11,12	931 - 931	930 - 931 <sup>Nb</sup>	0,48	2,96	2,36	0,17	1,83	0,81	3,17	0,09	2,13	5,70	0,12	6,91
NI1	11,54 -	941 -	-			0,17									
Canfeno <sup>M</sup>	11,76 - 11,78	947 - 947	943 - 947 <sup>Nb</sup>	0,06	0,39	0,03		0,18		0,17		0,12			
NI2	11,89 -	950 -	-			0,04									
Sabineno <sup>M</sup>	12,75 - 12,77	971 - 971	970 - 971 <sup>Nb</sup>	0,08	0,28	0,28		0,28		0,30	0,07	0,23	0,36		0,39
$\beta$ -Pineno <sup>M</sup>	12,92 - 12,95	975 - 975	974 - 979 <sup>Nb</sup>	1,62	5,16	5,10	0,23	4,57	1,85	6,00	0,23	4,57	6,77	0,13	7,84
$\beta$ -Mirceno <sup>M</sup>	13,49 - 13,51	989 - 989	987 - 990 <sup>Nb</sup>	0,37	0,60	0,76	0,07	0,57	0,34	0,82	0,18	0,67	0,72	0,09	0,96
NI3	13,51 -	989 -	-												
$\alpha$ -Cimeno <sup>M</sup>	14,89 -	1023 -	1021 -		0,62										
Limoneno <sup>M</sup>	15,07 - 15,09	1028 - 1028	1026 - 1028 <sup>Nb</sup>	3,55	4,56	5,51	0,45	5,81	7,36	6,33	0,66	4,07	4,69	0,44	4,76
Eucaliptol <sup>M</sup>	15,18 - 15,19	1030 - 1031	1029 - 1031 <sup>Nb</sup>	0,38	1,36	0,85	0,21				0,20	0,68			0,27
$\beta$ - <i>E</i> -Ocimeno <sup>M</sup>	15,40 - 15,42	1036 - 1036	1035 - 1035 <sup>Na</sup>			0,24		0,16				0,48	0,05		
$\beta$ - <i>Z</i> -Ocimeno <sup>M</sup>	15,81 - 15,83	1046 - 1047	1045 - 1048 <sup>Nb</sup>	0,38		1,14	0,09				0,24	2,28			0,57
$\gamma$ -Terpineno <sup>M</sup>	16,26 - 16,27	1057 - 1058	1058 -												
Terpinoleno <sup>M</sup>	17,32 - 17,34	1084 - 1084	1084 - 1086 <sup>Nb</sup>	0,54		0,40		0,68				0,40			0,46
$\alpha$ -Óxido de pineno <sup>M</sup>	17,85 -	1097 -	1095 -		0,39										
$\beta$ -Linalol <sup>M</sup>	17,94 - 17,94	1099 - 1099	1098 - 1098 <sup>Na</sup>		3,32										
NI4	18,25 -	1107 -	-		0,50										
4-Terpineol <sup>M</sup>	20,98 -	1179 -	1179 -			0,47		0,57							
NI5	21,18 -	1185 -	-											0,20	
$\alpha$ -Terpineol <sup>M</sup>	21,52 - 21,54	1194 - 1194	1192 - 1193 <sup>Na</sup>		3,83	0,20		0,23		0,13					
Acetato de isornila <sup>M</sup>	24,72 -	1284 -	1284 -					0,34							
$\delta$ -Elemeno <sup>S</sup>	26,34 - 26,36	1331 - 1332	- 1331 <sup>Na</sup>			0,89		0,19	0,21	1,24			0,69	0,29	



NI6	26,46 - 26,47	1335 - 1335	-					1,81	0,83							2,00
NI7	26,86 -	1347 -	-													0,43
Ylangeno <sup>S</sup>	27,58 -	1368 -	- 1368 <sup>Na</sup>							0,28						
Copaeno <sup>S</sup>	27,81 - 27,82	1375 - 1375	1375 - 1377 <sup>Nb</sup>	3,06	1,34	2,03	2,41	0,69	3,95	4,48	4,19	6,61	3,78	3,13	2,79	
β-Bourboneno <sup>S</sup>	28,08 - 28,09	1383 - 1383	1383 - 1384 <sup>Na</sup>						0,49	0,75		0,31				
β-Elemeno <sup>S</sup>	28,20 - 28,27	1387 - 1389	1388 - 1390 <sup>Nb</sup>	1,63	2,59	1,26	1,93	1,48	3,87	0,41	0,71	1,80	1,72	1,15	1,69	
NI8	28,84 -	-	-													
β-Cariofileno <sup>S</sup>	29,23 - 29,25	1419 - 1419	1418 - 1420 <sup>Nb</sup>	6,80	3,98	2,98	3,56	3,81	4,97	6,84	4,97	5,88	2,36	3,14	3,44	
β-Copaeno <sup>S</sup>	29,56 - 29,57	1429 - 1429	1432 - 1432 <sup>Aa</sup>						0,69	0,68						0,63
Bergamoteno <sup>S</sup>	29,66 -	1432 -	1432 -													
β-Gurjuneno <sup>S</sup>	29,70 - 29,71	1433 - 1434	1432 - 1432 <sup>Na</sup>						0,40	0,64						
Aromadendreno <sup>S</sup>	29,82 - 29,84	1437 - 1438	1438 - 1439 <sup>Nb</sup>	1,93	2,21	1,67	2,98	2,67	1,96	2,04	2,75		1,33	2,75	1,87	
γ-Gurjuneno <sup>S</sup>	30,07 - 30,07	1445 - 1445	1444 - 1444 <sup>Na</sup>						0,50	1,20						0,12
NI9	30,17 -	1448 -	-								0,15					
NI10	30,27 - 30,28	1452 - 1452	-					0,99			0,71					0,58
α-Cariofileno <sup>S</sup>	30,37 - 30,38	1455 - 1455	1454 - 1455 <sup>Nb</sup>	2,81	2,60	2,64	3,46		3,92	2,86	3,38	4,27	2,52	2,85	2,42	
Allo-Aromadendreno <sup>S</sup>	30,50 - 30,52	1459 - 1460	1459 - 1460 <sup>Na</sup>		3,05	2,49	6,79		0,41	0,52	2,61	4,62	2,79	1,63	1,18	
NI11	30,89 -	-1471	-								0,67					
γ-Muuroleno <sup>S</sup>	30,97 - 30,99	1474 - 1474	1474 - 1474 <sup>Na</sup>		0,40	0,38	0,92	0,57	1,13	0,86	0,78	0,62	0,97	0,99	0,62	
Germacreno D <sup>S</sup>	31,17 - 31,19	1480 - 1481	1480 - 1481 <sup>Nb</sup>	12,34	1,46	10,34	14,52	16,65	6,09	13,65	16,48	9,56	5,13	13,74	15,01	
NI12	31,26 - 31,26	1483 - 1483	-			1,47										
Varidifloreno <sup>S</sup>	31,47 - 31,49	1490 - 1490	1489 - 1491 <sup>Nb</sup>	1,94	3,16	0,91		1,40	0,39	1,50	1,93	1,45	0,68	1,93	1,61	
Bicyclogermacrene <sup>S</sup>	31,62 - 31,66	1494 - 1496	1500 - 1500 <sup>Ab</sup>	42,58		25,34	49,77	39,99	15,20	32,73	46,15	36,62	15,91	46,02	38,63	
NI13	31,84 - 31,99	1502 - 1507	-													
β-Bisabolene <sup>S</sup>	31,98 - 31,99	1506 - 1507	1505 - 1506 <sup>Na</sup>							0,94					1,65	0,59
NI14	32,15 - 32,16	1512 - 1512	-													
δ-Cadineno <sup>S</sup>	32,29 - 32,30	1517 - 1517	1514 - 1518 <sup>Nb</sup>	4,89		3,11	4,60	0,67	2,14	4,82	5,30	5,63	0,46	3,32	3,79	





NI6	26,46 - 26,47	1335 - 1335	-													
NI7	26,86 -	1347 -	-													
Ylangeno <sup>S</sup>	27,58 -	1368 -	- 1368 <sup>Na</sup>													
Copaeno <sup>S</sup>	27,81 - 27,82	1375 - 1375	1375 - 1377 <sup>Nb</sup>	2,47	0,69	1,66	2,53		2,65	3,48	2,25	6,90	2,96	3,26	1,74	
β-Bourboneno <sup>S</sup>	28,08 - 28,09	1383 - 1383	1383 - 1384 <sup>Na</sup>						0,30							
β-Elemeno <sup>S</sup>	28,20 - 28,27	1387 - 1389	1388 - 1390 <sup>Nb</sup>	1,40	1,93	1,20	0,43		2,43	1,52	1,58	1,72	1,58	1,32	1,67	
NI8	28,84 -	-	-													
β-Cariofileno <sup>S</sup>	29,23 - 29,25	1419 - 1419	1418 - 1420 <sup>Nb</sup>	5,14	5,88	2,65	3,87	4,25	4,50	7,17	3,42	5,90	2,43	2,99	3,49	
β-Copaeno <sup>S</sup>	29,56 - 29,57	1429 - 1429	1432 - 1432 <sup>Aa</sup>													
Bergamoteno <sup>S</sup>	29,66 -	1432 -	1432 -		0,88											
β-Gurjuneno <sup>S</sup>	29,70 - 29,71	1433 - 1434	1432 - 1432 <sup>Na</sup>													
Aromadendreno <sup>S</sup>	29,82 - 29,84	1437 - 1438	1438 - 1439 <sup>Nb</sup>	1,80	1,46	0,37			2,52		2,27		2,63		1,50	
γ-Gurjuneno <sup>S</sup>	30,07 - 30,07	1445 - 1445	1444 - 1444 <sup>Na</sup>													
NI9	30,17 -	1448 -	-													
NI10	30,27 - 30,28	1452 - 1452	-													0,37
α-Cariofileno <sup>S</sup>	30,37 - 30,38	1455 - 1455	1454 - 1455 <sup>Nb</sup>	3,16	1,33	1,74	3,11		2,06	2,72	2,66	4,46	4,19	2,92	2,90	
Allo-Aromadendreno <sup>S</sup>	30,50 - 30,52	1459 - 1460	1459 - 1460 <sup>Na</sup>		2,69	2,27					1,92	4,58	2,58		7,79	
NI11	30,89 -	-1471	-													
γ-Muuroleno <sup>S</sup>	30,97 - 30,99	1474 - 1474	1474 - 1474 <sup>Na</sup>				0,41				1,05		1,44		0,51	
Germacreno D <sup>S</sup>	31,17 - 31,19	1480 - 1481	1480 - 1481 <sup>Nb</sup>	12,71	16,31	10,65	16,86	18,52	13,57	17,53	15,45	12,26	2,83	16,95	12,49	
NI12	31,26 - 31,26	1483 - 1483	-		0,98											
Varidifloreno <sup>S</sup>	31,47 - 31,49	1490 - 1490	1489 - 1491 <sup>Nb</sup>	1,11	1,43	0,90	2,21	1,72	2,51	1,95	1,85	2,41		1,85	1,29	
Biciclogermacreno <sup>S</sup>	31,62 - 31,66	1494 - 1496	1500 - 1500 <sup>Ab</sup>	42,34	49,08	28,69	57,89	49,08	50,97	49,79	51,56	45,85	15,14	48,42	53,42	
NI13	31,84 - 31,99	1502 - 1507	-		0,74	0,59										
β-Bisaboleno <sup>S</sup>	31,98 - 31,99	1506 - 1507	1505 - 1506 <sup>Na</sup>										1,50	2,17	0,92	
NI14	32,15 - 32,16	1512 - 1512	-			0,52										
δ-Cadineno <sup>S</sup>	32,29 - 32,30	1517 - 1517	1514 - 1518 <sup>Nb</sup>	6,10	1,98	2,92	4,11	2,99	5,26	5,47	5,44	6,89	1,51	1,05	0,74	



## 7. RESULTADOS ADICIONAIS II

### IDENTIFICAÇÃO DE GENES DAS TERPENO SINTASES EM *NECTANDRA MEGAPOTAMICA* (SPRENG.) MEZ.

#### OBJETIVO

O objetivo deste estudo consistiu na identificação de genes que codificam as enzimas responsáveis pela síntese de terpenos, denominadas terpeno sintases (TPS), a partir de amostras coletadas no verão de 2016.

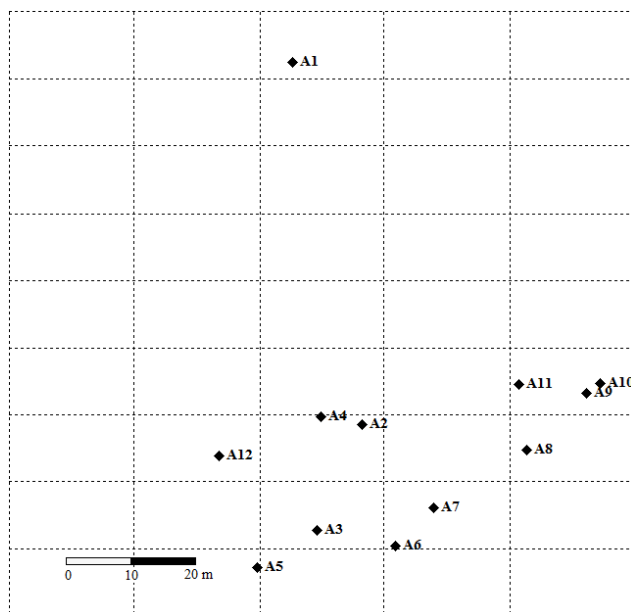
#### MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos, a seguir descritos, foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Biotecnologia Vegetal, localizado na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

##### Obtenção do material botânico

Foram coletadas amostras foliares de 12 indivíduos de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. em uma população localizada no município de Santa Maria, RS (Figura 1). O material coletado foi imediatamente armazenado em ultra freezer a -80 °C, sendo posteriormente acondicionado em caixa térmica contendo gelo seco para fins de transporte. O transporte das amostras foi devidamente autorizado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (Autorização nº 010191/2014-3), por estar de acordo com a Resolução N°15, de 27 de Maio de 2004.

Figura 1 – Localização dos indivíduos de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.



Extração de RNA total, síntese de cDNA e teste com genes de referência

O protocolo utilizado para extração de RNA foi baseado no descrito por Azevedo (2003), com alterações modificações visando otimizar o processo para a espécie. Todas as soluções foram preparadas com água Milli-Q tratada com dietilpirocarbonada 0,01 % (DEPC) e autoclavada.

Para a extração de RNA foram utilizados aproximadamente 300mg de material vegetal (armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ ). O material foi macerado em almofariz e pistilo previamente resfriados com nitrogênio líquido. Posteriormente, foi transferido para tubos Falcon (50mL) contendo 5mL de tampão de extração (CTAB a 2 %; NaCl 5 M; EDTA 100 mM; Tris-HCl 100 mM pH 8,0; PVPP a 2 %; 2-mercaptoetanol a 2 % e  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  de proteinase K), pré-aquecidos a  $42^{\circ}\text{C}$  durante 10 min. A seguir, vortexou-se a mistura e incubou-se durante 90 min a  $42^{\circ}\text{C}$ , as quais foram agitadas a cada 15 min para homogeneização do material. Após, foi adicionado 1 vol. (5 mL da mistura) de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v/v). Vortexou-se e centrifugou-se a  $15.000 \text{ g}$  ( $13.200 \text{ rpm}$ ) durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi transferido para novos tubos Falcon, repetindo-se a extração com clorofórmio: álcool isoamílico e centrifugando-se

nas mesmas condições. Após, o sobrenadante foi transferido para novos tubos Falcon e adicionou-se  $\frac{1}{4}$  vol de Cloreto de Lítio (LiCl) 10 M. Na sequência, a precipitação ocorreu *overnight* a 4°C. Posteriormente ao passo de precipitação, centrifugou-se a 15.000 g durante 25 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado. Lavou-se o *pellet* em 2 mL de LiCl 2 M e centrifugou-se a 15.000 g durante 25 min a 4°C. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi dissolvido em 100  $\mu$ L de água DEPC.

Para a determinação da concentração e pureza do RNA foi utilizado o Espectrofotômetro SmartSpec™ Bio-Rad (Bio-Rad), em que foi determinada a relação  $A_{260}/A_{280}$ . Com a finalidade de verificar a integridade das soluções de RNA obtidas, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1%, durante 45 min a 80 V, corado com GreenSafe™ (NZYTech, Lisboa, Portugal).

Para a síntese de cDNA, foram realizadas reações em termociclador Bio-Rad T100™, em que 1  $\mu$ L de RNA total foi transcrito por meio da transcriptase reversa M-MLV (Promega, Madison, WI, USA) e primer Oligo (dT) (Promega, Madison, WI, USA), de acordo com as recomendações do fabricante.

No que se refere ao teste com genes de referência, devido à inexistência de estudos dessa natureza com *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., foram utilizados iniciadores desenvolvidos para outras espécies e que já haviam sido empregados pelo grupo de pesquisadores do Centro de Biotecnologia Vegetal da Universidade de Lisboa (Tabela 1). As reações de PCR foram realizadas em termociclador Bio-Rad T100™ para um volume final de 15  $\mu$ L, contendo 0,75  $\mu$ L de cDNA, 1x Green GoTaq Flexi Buffer (Promega, Madison, WI, USA), 1,5 mM  $MgCl_2$ , 0,2 mM dNTPs, 0,3 mM de cada iniciador (STAB Vida, Caparica, Portugal) (Tabela 2) e 0,8U GoTaq DNA polimerase (Promega, Madison, WI, USA). O perfil térmico consistiu em 95°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 92°C por 45 seg, 60°C por 45 seg e 72°C por 1 min, e um passo de extensão final a 72°C por 7 min.



Tabela 1 – Genes de referência testados com cDNA obtido de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.

Primer		Sequência 5'-3'	Referência
18S <i>Solanum tuberosum</i> (18S ST)	Fw	GGGCATTCGTATTTTCATAGTCAG AG	Dados não publicados
	Rv	GTTAGCAGGCTGAGGTCTCGT	
18S <i>Pinus pinaster e Pinus pinea</i> (18S PP)	Fw	TTAGGCCATGGAGGTTTGAG	Trindade (2016)
	Rv	GAGTTGATGACACGCGCTTA	
Elongation factor 1- $\alpha$ (EF)	Fw	CAACATATCTGAGCCCAAGAGG	Crocoll et al. (2010)
	Rv	GCTCCTTTCCAGACCTCCTATC	

### Desenho dos iniciadores

Para o desenho dos iniciadores foram realizadas buscas por sequências nucleotídicas relacionadas às terpeno sintases no banco de dados 'GenBank'. Posteriormente, foi utilizado o 'software Geneious' (Versão 9.1) (KEARSE et al., 2012) para realizar o alinhamento das sequências encontradas, bem como o desenho dos iniciadores. Os critérios utilizados para o desenho dos iniciadores foram: conteúdo de GC de aproximadamente 50%, temperatura de anelamento entre 50-60°C e valores de *hairpin* e *primer dimer* próximos de zero.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador Bio-Rad T100™ para um volume final de 15  $\mu$ L, contendo 0,75  $\mu$ L de cDNA, 1x Green GoTaq Flexi Buffer (Promega, Madison, WI, USA), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,3 mM de cada iniciador (STAB Vida, Caparica, Portugal) e 0,8U GoTaq DNA polimerase (Promega, Madison, WI, USA).

Foram testados diferentes perfis térmicos, conforme apresentado na Tabela 2. Os produtos de PCR foram revelados em gel de agarose a 1%, em migração eletroforética conduzida durante 45 min a 80 V, sendo o gel corado com GreenSafe Premiun (NZYTech, Lisboa, Portugal).

Tabela 2 – Perfis térmicos testados com os iniciadores desenvolvidos para *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.

Nome	Desnaturação	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final
Nec_1	1x 95°C 5 min	35x 92°C 1 min	35x 55°C 45 seg	35x 72°C 1 min	1x 72°C 5 min
Nec_2	1x 95°C 5 min	35x 92°C 1 min	35x 50°C 45 seg	35x 72°C 1 min	1x 72°C 5 min
Nec_Touch 1	1x 95°C 5 min	40x 92°C 1 min	10x 60°C 45 seg; 30x 55°C 45 seg	40x 72°C 1 min	1x 72°C 5 min
Nec_Touch 2	1x 95°C 5 min	40x 92°C 1 min	10x 55°C 45 seg; 30x 50°C 45 seg	40x 72°C 1 min	1x 72°C 5 min

### Sequenciamento dos produtos de PCR

Somente os produtos de PCR de tamanho esperado foram enviados para sequenciamento na ‘STAB-Vida Company’. Para tal, foi realizada nova reação de PCR, desta vez para um volume final de 45  $\mu$ L, sendo utilizados 5  $\mu$ L do produto para confirmação da amplificação, e o restante, purificado com a combinação enzimática de Exonuclease I (ExoI) e Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), seguindo as recomendações do fabricante.

O ‘software Geneious’ (Versão 9.1) (KEARSE et al., 2012) foi utilizado para as análises das sequências, edição e alinhamento com as sequências obtidas neste estudo e àquelas disponíveis em bases de dados.

## Amplificação rápida de extremidades de cDNA (RACE – Rapid Amplification of cDNA Ends)

Alternativamente à tradicional síntese de cDNA e posterior realização de RT-PCR, foi utilizada a técnica de amplificação rápida de extremidades de cDNA – RACE. Tal procedimento é uma variação da RT-PCR, sendo utilizado para obter amplificação de sequências de cDNA desconhecidas, seja a partir da extremidade 5' seja da 3' (FROHMAN, 1988). No presente estudo foi utilizada a metodologia 3' RACE, que apresenta a vantagem de utilizar a cauda Poli A como iniciador genérico, partindo-se do princípio que ela é naturalmente encontrada no mRNA.

Primeiramente, foi realizada a síntese de cDNA específico para a técnica 3' RACE, utilizando um iniciador Oligo dT âncora (Tabela 5). Na sequência, foram realizadas reações de PCR com o cDNA específico, em que foram utilizados os iniciadores 'Forward' previamente desenhados em conjunto com o iniciador Adaptador 3' (Tabela 5) que visa a região da cauda poli (A).

## RESULTADOS

### Extração de RNA total e síntese de cDNA

A análise da razão A260/A280 revelou valores que variaram de 1,412, para o genótipo 12, até 1,845 para o genótipo 7 (Tabela 3). Uma razão A260/A280 maior que 1,8 é geralmente considerada um indicador de RNA de boa qualidade (SAMBROOK et al., 1989; MANCHESTER, 1996). Embora tenham sido realizadas adaptações no protocolo de extração de RNA de Azevedo (2003), deve ser considerada a possibilidade de realização de um estudo adicional visando estabelecer um protocolo específico para a espécie, semelhante ao trabalho realizado por Costa et al. (2016), em que devido à dificuldade em obter soluções de DNA de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. de qualidade e concentração adequadas, foram testados diferentes métodos de isolamento.

Adicionalmente, é possível que a grande amplitude dos valores na razão A260/A280 observada tenha ocorrido em virtude da degradação do RNA no transporte, mesmo que as amostras foliares tenham sido transportadas em condições adequadas. Nesse sentido, vários autores descrevem que existem diversos sistemas ativos de degradação, presentes em todas as células dos organismos (DECKER & PARKER, 1994; BEELMAN & PARKER, 1995; HOUSELEY & TOLLERVEY, 2009; SACHS, 1993).

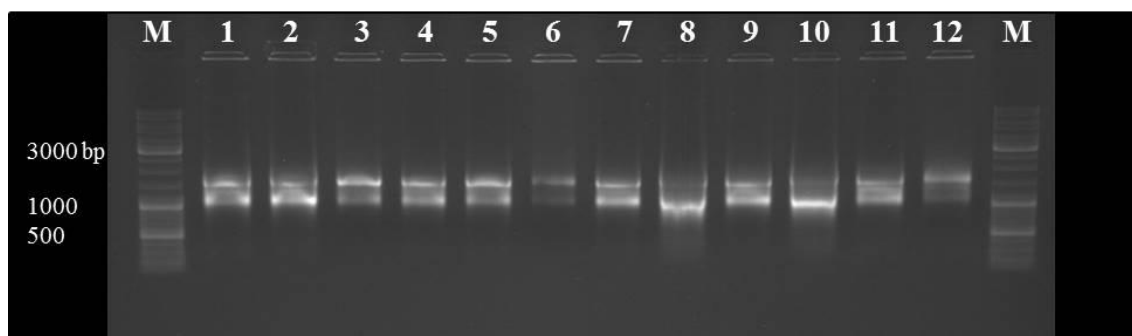
Posteriormente, com a finalidade de avaliar a integridade das soluções obtidas, 1  $\mu$ L de cada amostra foi carregado em gel de agarose a 1%, (Figura 2), sendo realizada a migração eletroforética durante 50 min a 90 V.

Tabela 3 – Valores de absorvância no comprimento de onda de 260 (A260) e 280 nm (A280), razão A260/A280 e concentração (ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) de RNA total isolado de 12 genótipos de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.

Genótipo	A260	A280	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	ng $\mu\text{L}^{-1}$
1	0,508	0,337	1,507	345,440
2	0,634	0,377	1,682	431,120
3	0,303	0,204	1,485	206,040
4	0,283	0,176	1,608	192,440
5	0,189	0,118	1,602	128,520
6	0,096	0,063	1,524	65,280
7	0,203	0,110	1,845	138,040
8	1,006	0,565	1,781	684,080
9	0,395	0,259	1,525	268,600
10	0,880	0,515	1,709	598,400
11	0,569	0,368	1,546	386,920
12	0,305	0,216	1,412	207,400
Mínimo	0,096	0,063	1,412	65,280
Máximo	1,006	0,565	1,845	684,080
Média	0,448	0,276	1,602	304,357

Na Figura 2 é possível observar que embora o RNA isolado de alguns genótipos (8 e 10) tenha apresentado valores para a razão A260/A280 próximos daquele considerado indicativo de boa qualidade, o gel de agarose revelou indícios de degradação. Já para os genótipos 4, 5 e 9, os valores ficaram abaixo do considerando ideal, no entanto, o gel de agarose não revelou sinais de degradação. Nesse sentido, cabe ressaltar a importância da análise combinada de espectrofotometria e eletroforese, visando identificar a qualidade e integridade do RNA respectivamente.

Figura 2 – RNA total isolado de 12 genótipos de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.



Após realizar a síntese de cDNA, as amostras foram testadas com três conjuntos de iniciadores para genes de referência (Tabela 1) desenhados para outras espécies. No primeiro ensaio foram utilizadas apenas quatro amostras (4, 7, 8 e 10). Dos três conjuntos de iniciadores testadores, apenas o 18S, desenvolvido para *Solanum tuberosum* resultou positivo, gerando um fragmento de 400 pb, conforme o esperado (Figura 3). Na sequência, o 18S ST foi testado com todos os cDNAs obtidos para a espécie em estudo (Figura 4), confirmando o resultado obtido anteriormente, com um fragmento na faixa dos 400 pb.

Figura 3 – Teste com iniciadores desenvolvidos para *Solanum tuberosum* (18S ST), *Pinus pinaster* e *Pinus pinea* (18S PP) e *Thymus caespititius* (EF) com cDNA de quatro genótipos de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.

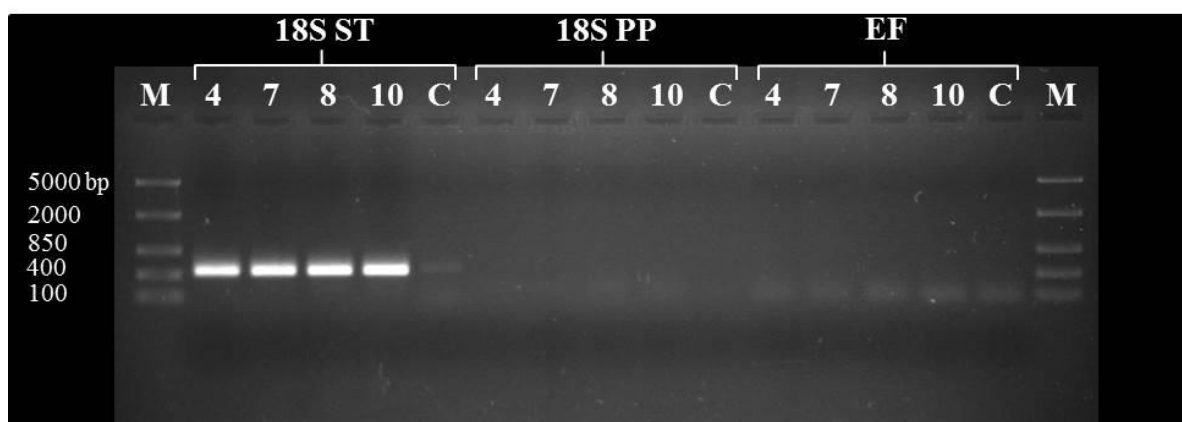
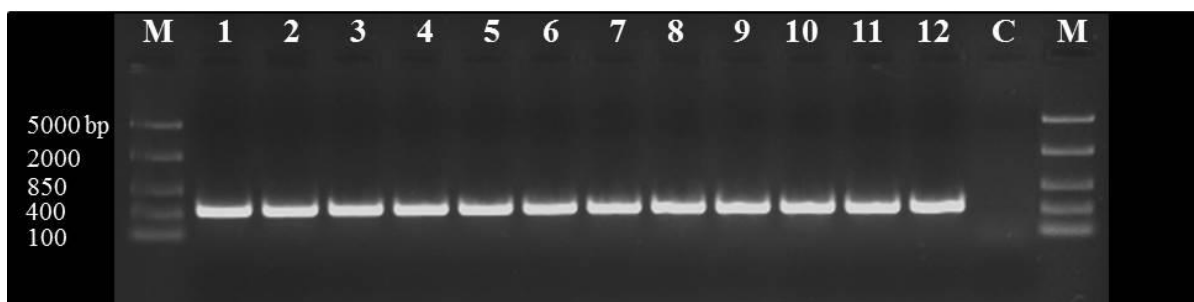


Figura 4 – Teste com iniciador desenvolvido para *Solanum tuberosum* com cDNA de 12 genótipos de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.



### Desenho dos iniciadores

Primeiramente, foram realizadas pesquisas no 'GenBank' referente a genes das terpenos sintases, não sendo obtidas informações especificamente para a espécie *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. ou para o gênero *Nectandra*. No entanto, quando a pesquisa foi extrapolada para a família Lauraceae foram obtidos resultados, sendo a espécie *Laurus nobilis* L. (Nº de acesso KR336615) a mais próxima taxonomicamente da espécie em estudo.

Posteriormente, foi utilizada a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), disponível no site do 'GenBank', com a finalidade de realizar uma pesquisa no banco de dados e encontrar sequências similares àquela utilizada como referência (KR336615).

A ferramenta BLAST utiliza um determinado algoritmo para calcular a similaridade do alinhamento da sequência de referência com as sequências encontradas, sendo apresentadas as melhores combinações ("hits") por ordem decrescente. Os resultados são apresentados na forma de gráfico e tabela, conforme determinadas estatísticas, a seguir descritas.

A primeira estatística é o *Max Score*, que apresenta uma pontuação referente ao maior alinhamento obtido entre a sequência de referência e a sequência encontrada. Em seguida é apresentado o *Total Score*, que é soma da pontuação de todos os alinhamentos obtidos entre as duas sequências. No caso do valor do *Max Score* ser igual ao *Total Score*, significa que houve apenas um alinhamento. No que se refere ao *Query Cover*, a estatística corresponde à porcentagem da sequência de referência que é coberta pelo

alinhamento com a melhor correspondência. *E-Value* é a estatística de significância, em que um valor próximo de zero indica que o alinhamento é significativo, ordenando os *hits*. Quando os valores de *E-Value* são iguais, o *Max Score* é utilizado para ordenar. Por fim, *Max Identity* corresponde à porcentagem de identidade máxima entre as sequências, nucleotídeo a nucleotídeo (WHEELER & BHAGWAT, 2007).

A análise revelou duas sequências depositadas para a espécie *Litsea cubeba* (Lour.) Persoon (Tabela 4) com números de acesso HQ651179 e HQ651180. As sequências apresentaram um único alinhamento (pontuação de *Max Score* igual a *Total Score*), sendo 99% da sequência de *Laurus* coberta pelos alinhamentos com *Litsea*, e uma máxima identidade de 95 e 94% respectivamente.

Tabela 4 – Resultado do BLAST realizado no ‘GenBank’. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E-Value	Max Identity	Accession
<i>Laurus nobilis</i> terpene synthase 2 (TPS2) mRNA	3230	3230	100%	0	100%	KR336615
<i>Litsea cubeba</i> alpha-thujene synthase mRNA	2704	2704	99%	0	95%	HQ651179
<i>Litsea cubeba</i> alpha-thujene synthase/sabinene synthase mRNA	2638	2638	99%	0	94%	HQ651180

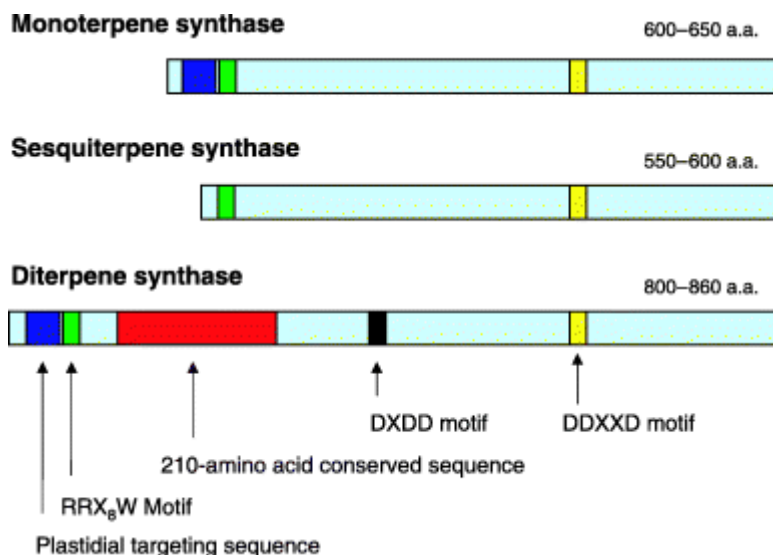
Após serem obtidas informações referentes a genes das terpeno sintases em espécies taxonomicamente próximas a *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., foi utilizado o ‘software Geneious’ para realizar o alinhamento das sequências nucleotídicas e alinhamento das sequências de aminoácidos.

De modo geral, as terpeno sintases (TPSs) compreendem uma grande família de enzimas que estão relacionadas tanto com o metabolismo primário quanto o secundário (BOHLMANN et al., 1998b; MARTIN et al., 2004). As terpeno sintases podem ser divididas em três classes funcionais: monoterpeno



sintases, sesquiterpeno sintases e diterpeno sintases, com aproximadamente 550-860 aminoácidos de comprimento (Figura 5). Estas três classes de terpeno sintases possuem regiões altamente conservadas, denominados motivos conservados (*conserved motif*), RRX<sub>8</sub>W e DDXXD.

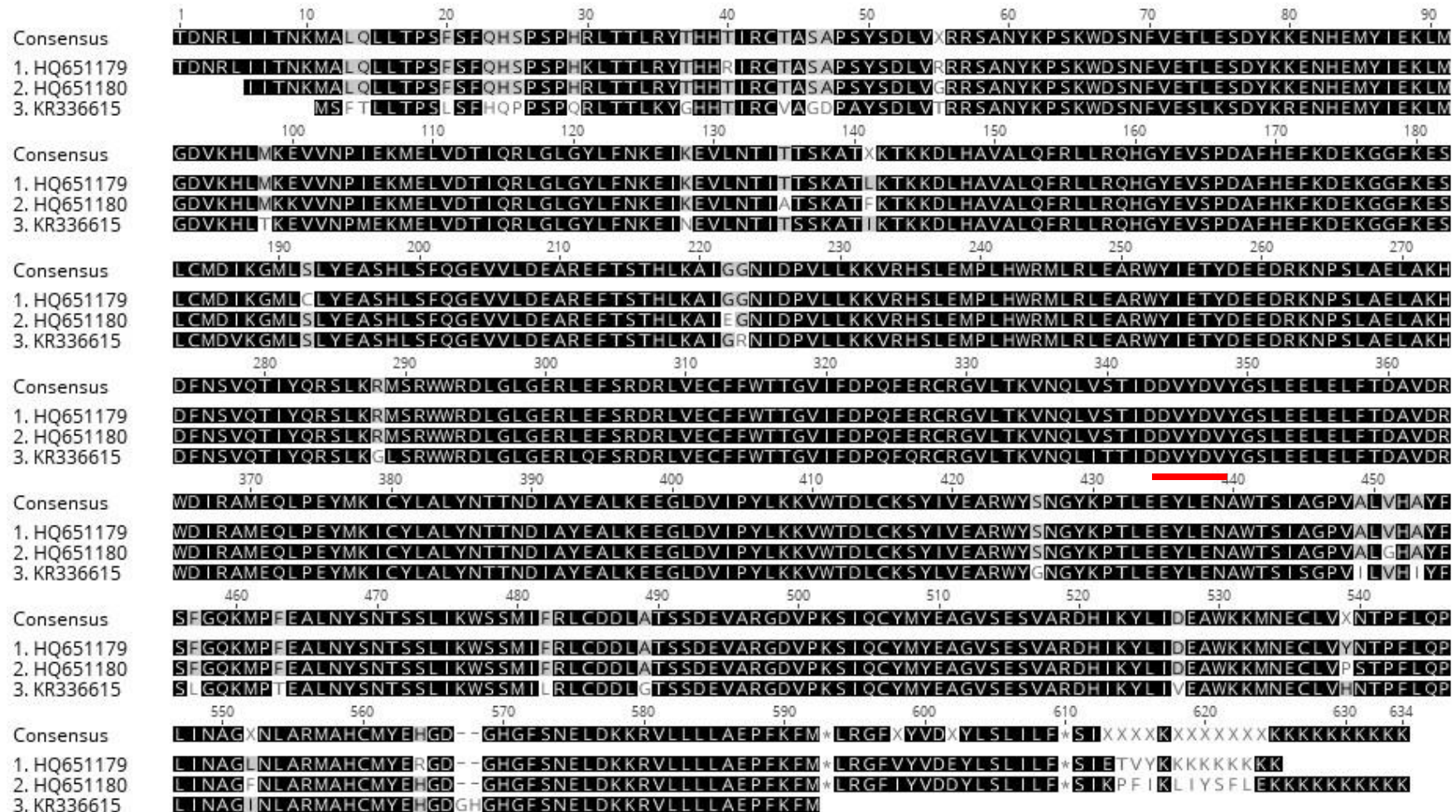
Figura 5 – Esquema das terpeno sintases. a.a., aminoácidos. Fonte: Bohlmann et al. (1998b).



Nesse sentido, a abordagem utilizada para o desenho dos iniciadores foi a de encontrar estes motivos altamente conservados e identificar regiões para o desenho dos iniciadores “*forward*” e “*reverse*”, que permitissem gerar fragmentos de, no mínimo, 400 nucleotídeos, contendo o motivo conservado. Adicionalmente, foram consideradas as características de conteúdo GC, de aproximadamente 50% e temperaturas de anelamento na faixa de 60 °C.

Na Figura 6 é possível observar o alinhamento das sequências de aminoácidos de *Laurus* e *Litsea*, com destaque para o motivo conservado DDXXD localizado na região de 343-347 aminoácidos, correspondente a 1027-1041 nucleotídeos.

Figura 6 – Alinhamento das sequências de *Laurus nobilis* e *Litsea cubeba*. Em destaque, o motivo conservado DDXXD. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.



Na Tabela 5 são apresentados os iniciadores desenhados para *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Foram testadas todas as combinações de iniciadores em que fosse possível obter um fragmento superior a 400 nucleotídeos.

Tabela 5 – Iniciadores desenhados para *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.

Name	Sequence	Lenght	Interval	%GC	Tm
Nec_Fw_1	GATGAGAAGGGTGGCTTCAAAGAAAGC	27	520-546	48	62
Nec_Fw_1_1	GGGTGGCTTCAAAGAAAGC	19	528-546	52,63	54,51
Nec_Fw_2	CACAAGCACACATCTCAAGGCTATCG	26	639-664	50	61
Nec_Fw_2_1	CACAAGCACACATCTCAAGG	20	639-658	50	53,96
Nec_Fw_3	GCTTCACACCTTTCCCTTTC	19	586-604	47,4	51,4
Nec_Fw_4	GGTGGTGGAGGGATCTTGGG	20	872-891	65	60
Nec_Fw_5	GCAATGGATAACAAGCCAACAC	21	1.277-1.297	47,62	54,7
Nec_Fw_6	GACGATCTGCCAATTACAAGCC	22	167-188	50	56,33
Nec_Fw_7	GGAGCTGGTTGACACTATCC	20	324-343	55	55
Nec_Rv_1	GGATAGACTTTGGAACATCACCTCTGG	27	1.487-1.513	48	59
Nec_Rv_2	CCCTCCTCTTTAAGGGCTTCATAAGC	26	1.174-1.199	50	60
Nec_Rv_3	CAT TCA TTT TCT TCC ACG CC	20	1.584-1.603	45	52,3
Nec_Rv_4	CCACAGCATCGGTAAAGAGC	20	1.068-1.087	55	56,1
Nec_Rv_5	GTGTTGGCTTGTATCCATTGC	21	1.277-1.297	47,62	54,7
Nec_Rv_6	CAGCCAGCAATAACAAGACTCGC	23	1.731-1.753	52,17	
Oligo d(T) Âncora	GACCACGCGTATCGATGTTCGAC(T) <sub>16</sub> VN				
3' Adaptador	GACCACGCGTATCGATGTTCGAC				

### Sequenciamento dos produtos de PCR

No total, foram testadas 40 combinações de iniciadores, com quatro diferentes perfis térmicos, sendo que apenas as combinações Fw\_4 – Rv\_5, Fw\_1\_1 – Rv\_4, com o perfil térmico Nec\_Touch 1, com o genótipo 9, resultaram um fragmento do tamanho esperado, contendo 425 e 559 nucleotídeos respectivamente. Após, a reação foi repetida nas mesmas

condições, sendo, posteriormente, o produto purificado e enviado para o sequenciamento.

A Figura 7 apresenta as sequências obtidas com o genótipo 9, com o emprego da combinação de iniciadores Fw\_4 e Rv\_5, com um comprimento de 390 e 401 nucleotídeos e qualidade de 76,4% e 56,9% respectivamente. É possível observar que no início e no final das sequências existem regiões com vários picos na mesma posição e sinais fracos, o que impossibilita a definição correta dos nucleotídeos. Assim, foi necessário eliminar tais regiões até o ponto em que seja identificado um pico por posição, determinando corretamente o nucleotídeo.

Após o processamento (Figura 8), o comprimento das sequências foi reduzido para 334 e 359 com uma qualidade de 83,5% e 62,1%, para os iniciadores Fw\_4 e Rv\_5, respectivamente. O incremento na qualidade ocorreu devido à eliminação de tais regiões.

Figura 7 – Sequências obtidas com o genótipo 9 de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez, com destaque para os ruídos no início e final (destaque em preto). Santa Maria, RS, UFSM, 2018.

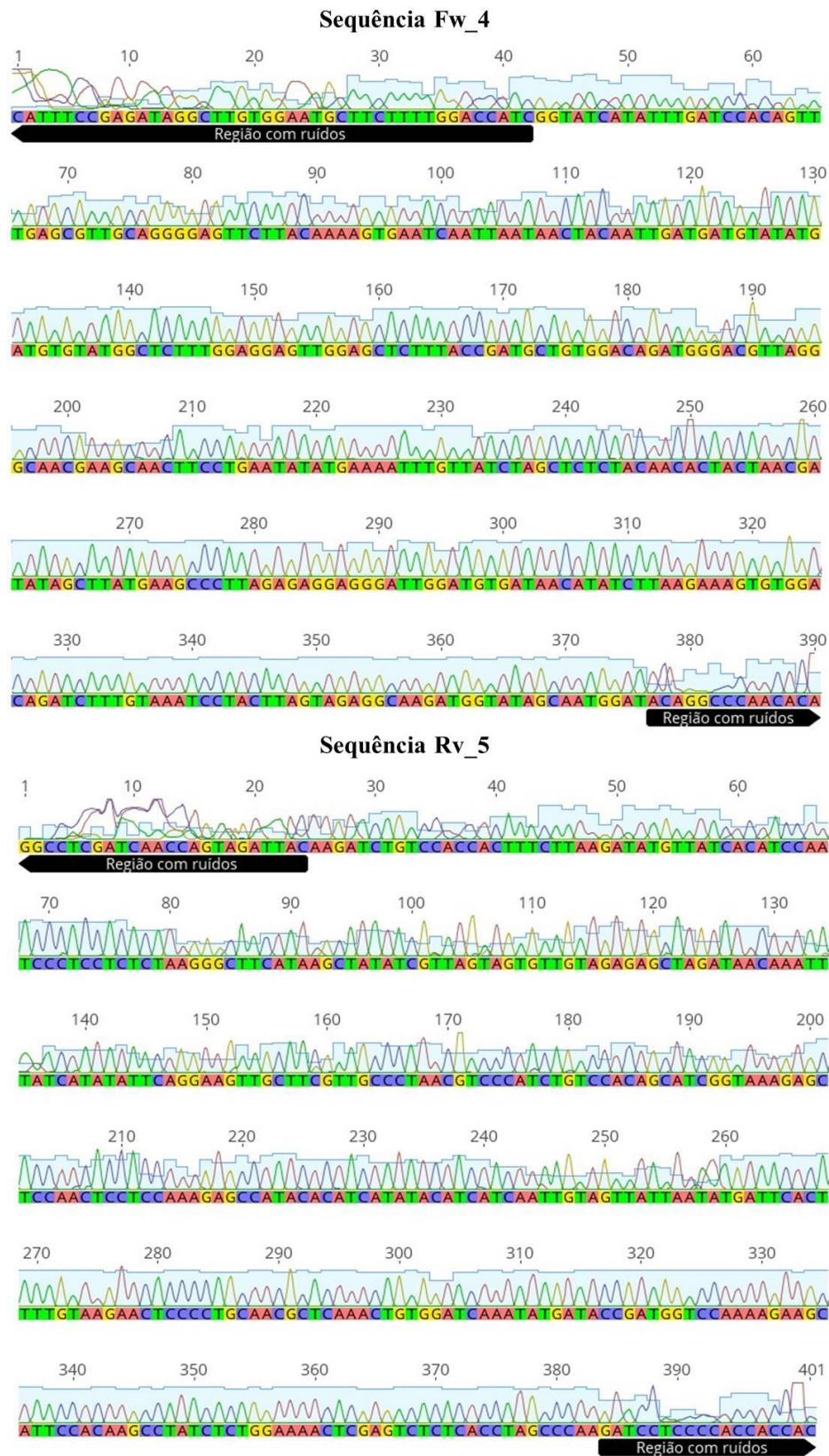
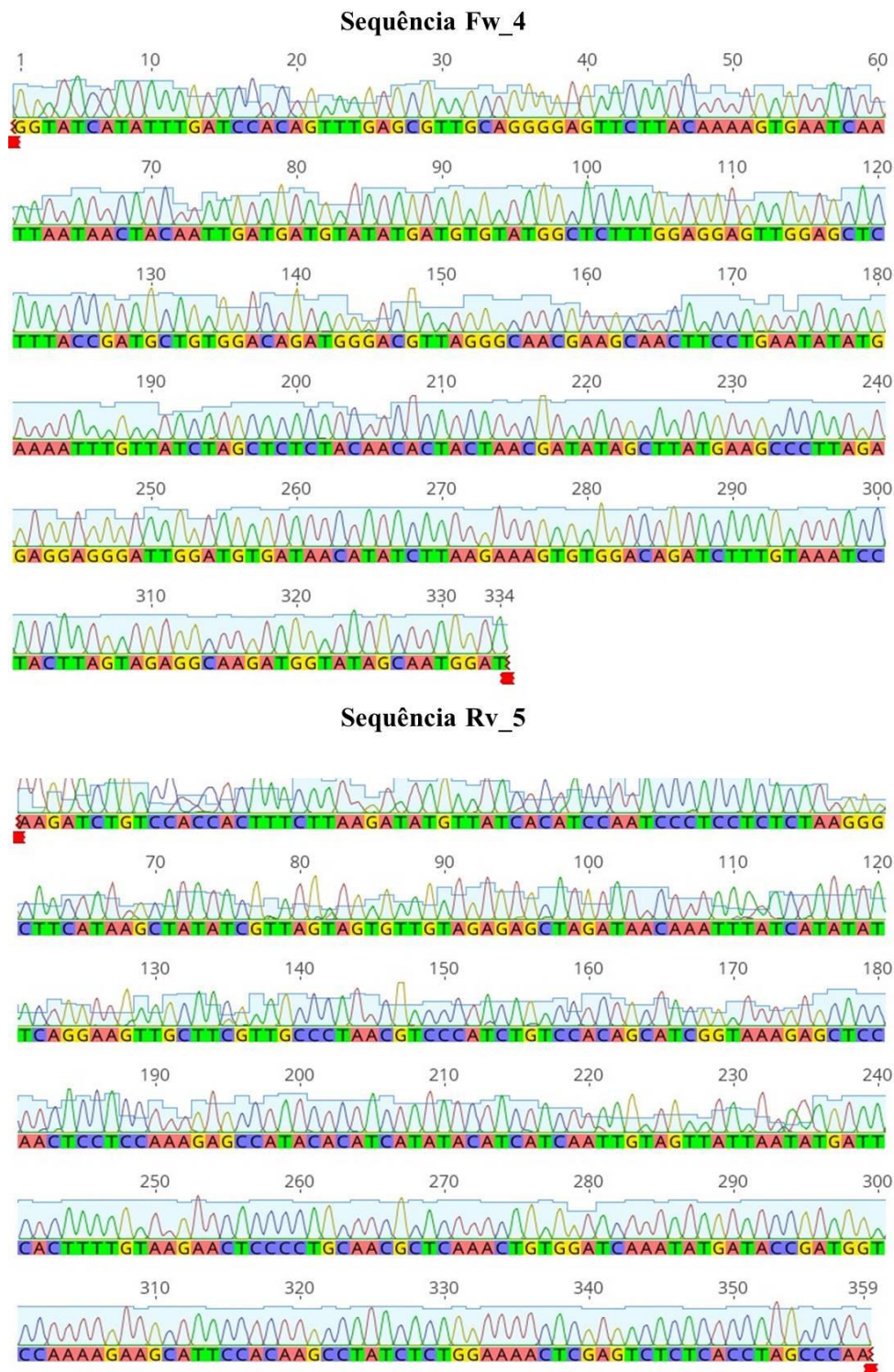


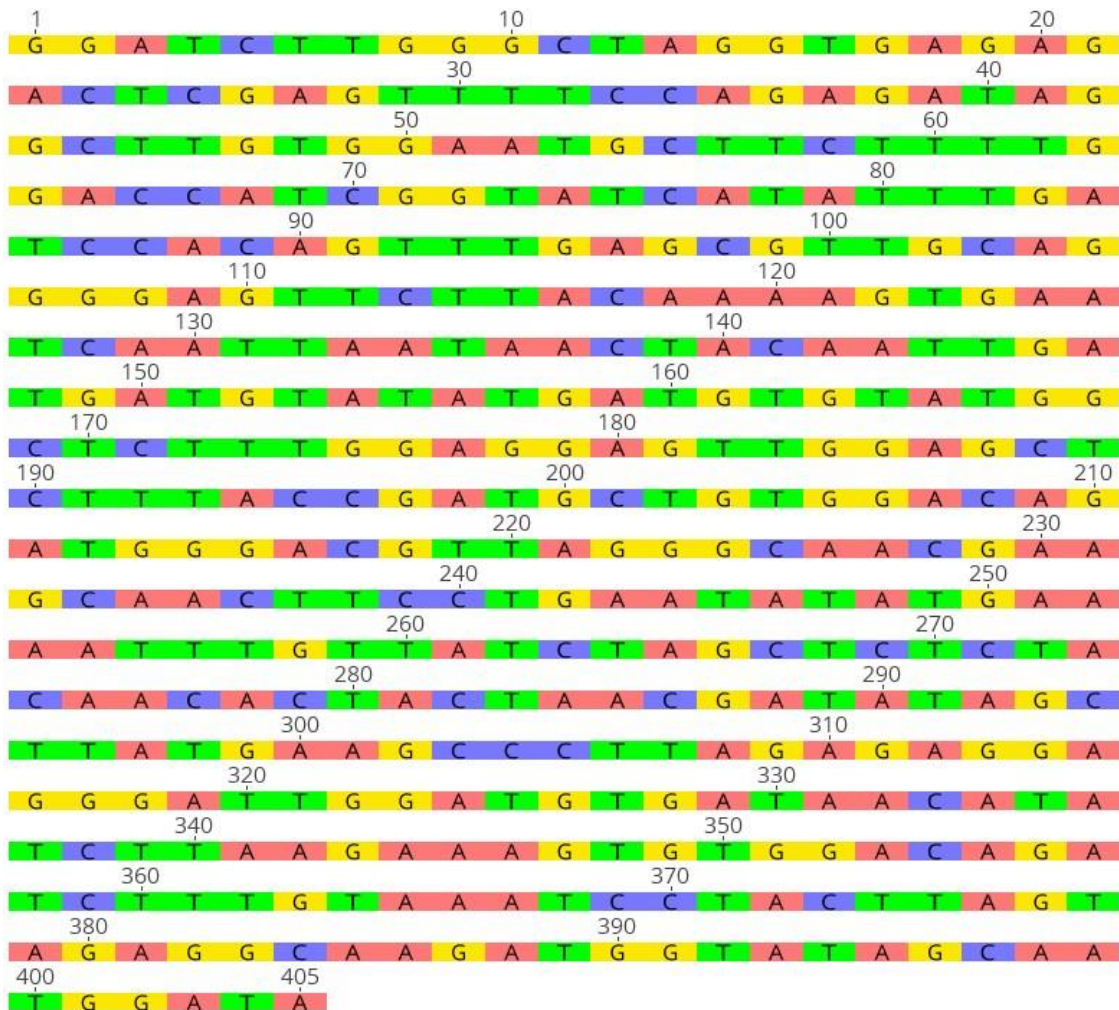
Figura 8 – Sequências obtidas com o genótipo 9 de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez, após processamento no 'software Geneious', em que os ruídos do início e final foram eliminados. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.



Após a edição, foi obtida a sequência consenso (Figura 9) entre os iniciadores Fw\_4 e Rv\_5, gerando uma sequência de 405 nucleotídeos. Em seguida, os dados foram convertidos para o formato FASTA, permitindo, assim,

a realização de um novo BLAST no 'GenBank', desta vez, com uma sequência obtida para a espécie em estudo.

Figura 9 – Sequência consenso gerada pelo 'software Geneious' para o fragmento obtido com o emprego dos iniciadores Fw\_4-Rv\_5 no genótipo 9 de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.



A análise identificou os três acessos utilizados para o desenho dos iniciadores (Tabela 6). Tal resultado indica que mesmo que tenham sido utilizadas sequências de outras espécies para o desenho dos iniciadores, foi obtido sucesso. O fragmento obtido e sequenciado corresponde a aproximadamente 22% da sequência completa dos genes descritos nos estudos com *Laurus* e *Litsea*.

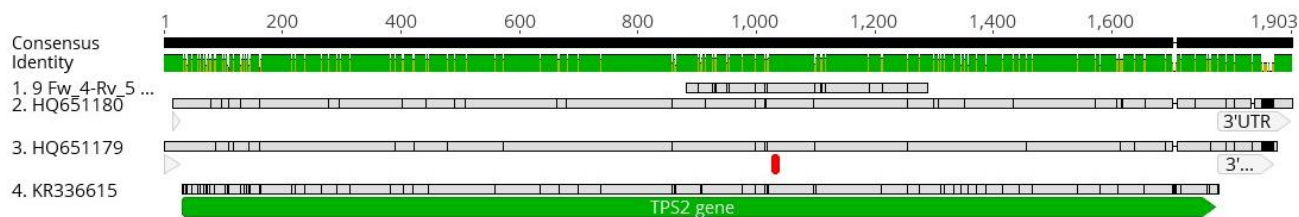
Tabela 6 – Resultado do BLAST realizado no ‘GenBank’ a partir de uma sequência obtida para *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E- Value	Max Identity	Accession
<i>Litsea cubeba</i> alpha-thujene synthase/sabinene synthase mRNA	649	649	100%	0	96%	HQ65118 0
<i>Litsea cubeba</i> alpha-thujene synthase mRNA	649	649	100%	0	96%	HQ65117 9
<i>Laurus nobilis</i> terpene synthase 2 (TPS2) mRNA	627	627	100%	8e- 176	95%	KR33661 5

Após obter a sequência consenso e realizar a pesquisa no ‘Genbank’, foi efetuado o alinhamento entre a sequência consenso obtida para o conjunto de iniciadores Fw\_4 – Rv\_5 e os acessos utilizados (*Laurus* e *Litsea*). É possível observar na Figura 10 que a sequência obtida corresponde a uma fração central do gene, junto do motivo conservado DDXXD (em vermelho).



Figura 10 – Alinhamento da sequência obtida para *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. com os iniciadores Fw\_4 – Rv\_5, com as sequências utilizadas para o desenho dos iniciadores. Destacado em vermelho o motivo conservado DDXXD. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.



A Figura 11 apresenta as sequências obtidas com o genótipo 9, a partir da combinação de iniciadores Fw\_1\_1 e Rv\_4, gerando um fragmento com comprimento de 533 e 518 nucleotídeos e qualidade de 88,9% e 89,6% respectivamente. Após o processamento (Figura 12), as sequências foram reduzidas para 474 e 485 nucleotídeos com uma qualidade de 98,1% e 95,7%, para os iniciadores Fw\_1\_1 e Rv\_4, respectivamente.

Após a edição, foi obtida a sequência consenso (Figura 13) entre os iniciadores Fw\_1\_1 e Rv\_4, gerando uma sequência de 542 nucleotídeos. Como descrito anteriormente, os dados foram convertidos para o formato FASTA, e novamente foi realizado um BLAST no 'GenBank'.

Figura 11 – Sequências obtidas com o genótipo 9 de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez, com destaque para os ruídos no início e final (destaque em preto). Santa Maria, RS, UFSM, 2018.

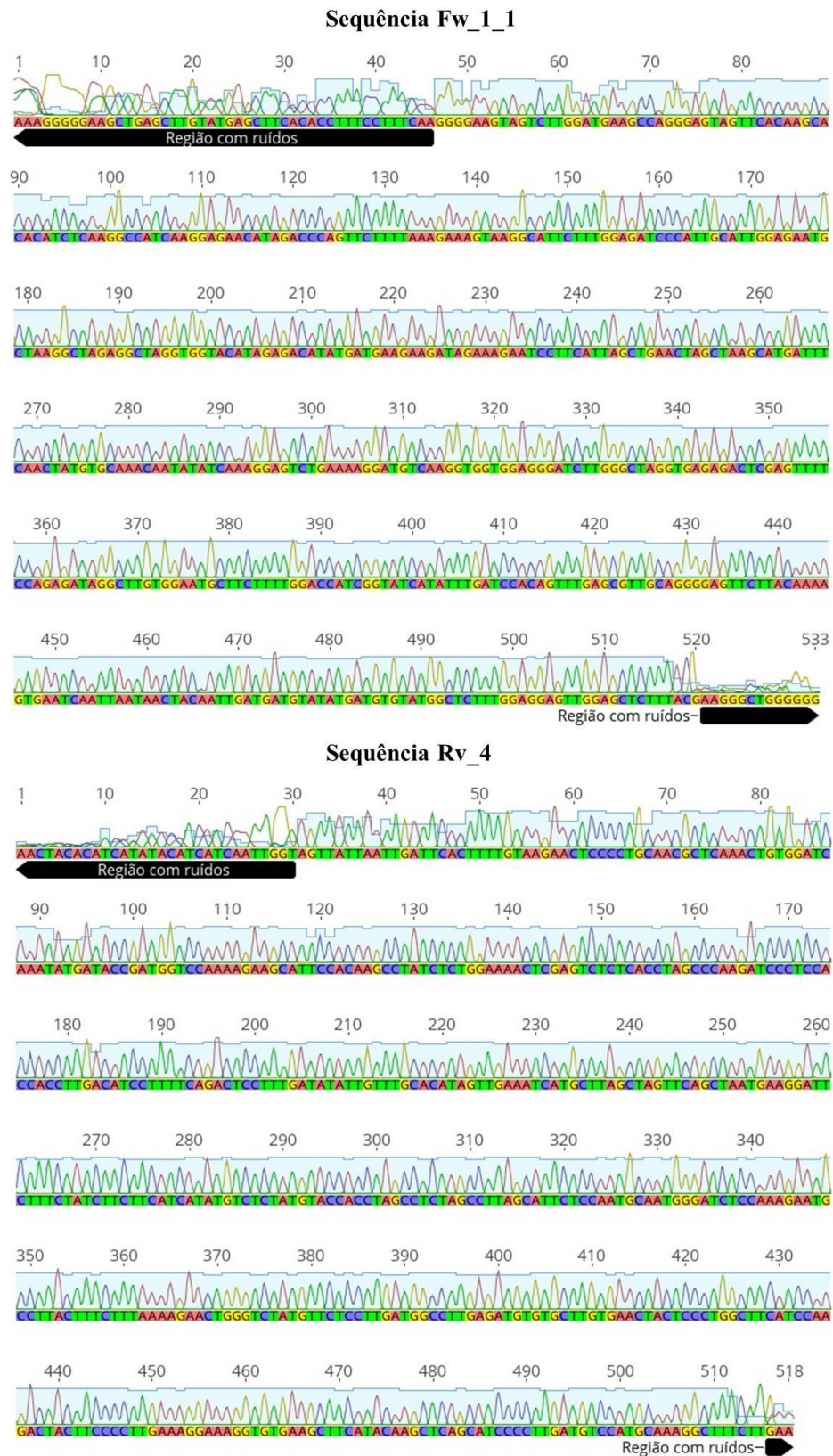


Figura 12 – Sequências obtidas com o genótipo 9 de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez, após processamento no 'software Geneious', em que os ruídos do início e final foram eliminados. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.

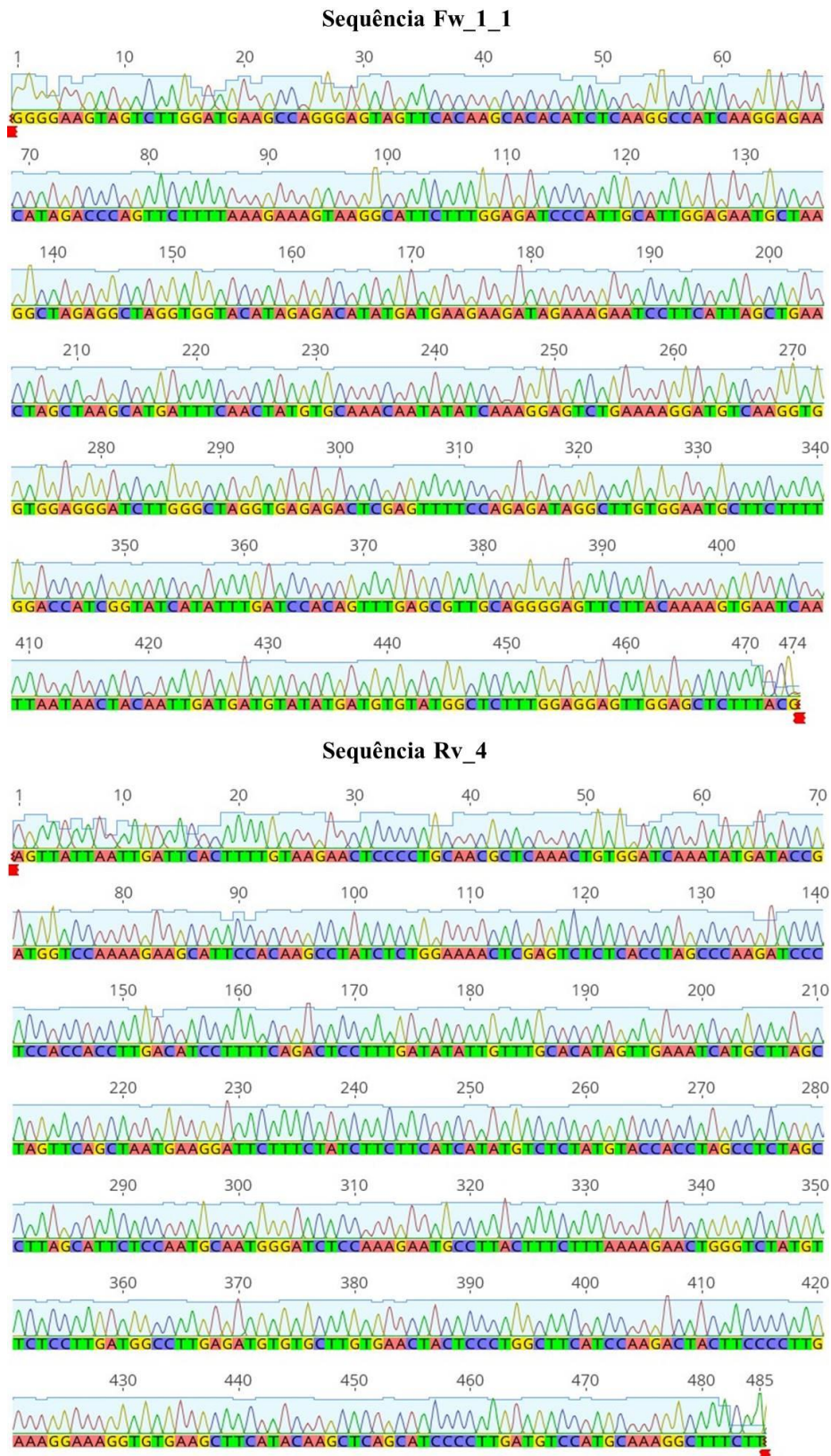
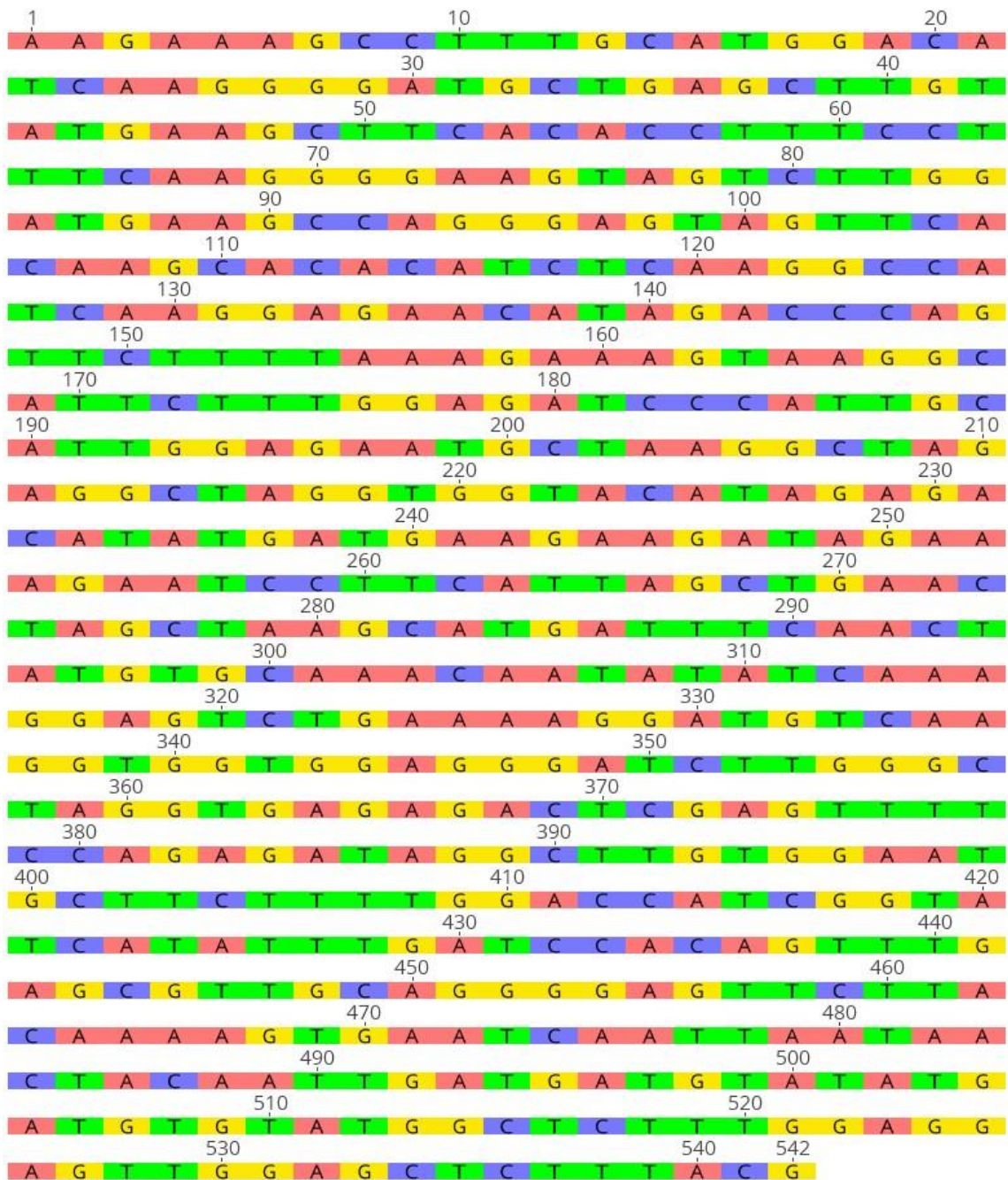


Figura 13 – Sequência consenso gerada pelo 'software Geneious' para o fragmento obtido com os iniciadores Fw\_1\_1 – Rv\_4 com o genótipo 9 de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.



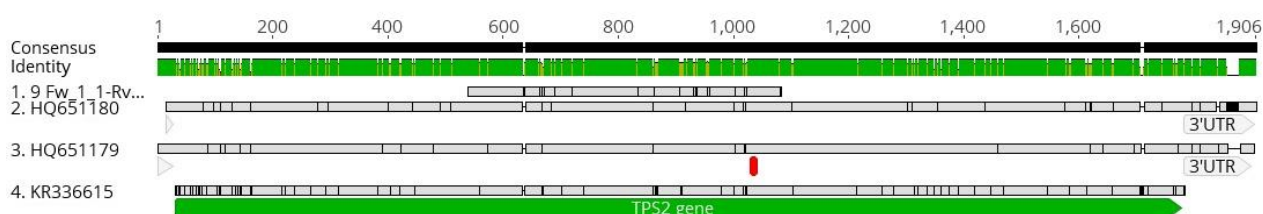
O resultado do BLAST novamente indicou os três acessos utilizados para o desenho dos iniciadores como os mais similares à sequência consenso (Tabela 7).

Tabela 7 – Resultado do BLAST realizado no ‘GenBank’ a partir de uma sequência obtida para *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E-Value	Max Identity	Accession
<i>Litsea cubeba</i> alpha-thujene synthase/sabinene synthase mRNA	874	874	99%	0	96%	HQ651180
<i>Litsea cubeba</i> alpha-thujene synthase mRNA	874	874	99%	0	96%	HQ651179
<i>Laurus nobilis</i> terpene synthase 2 (TPS2) mRNA	871	871	99%	0	95%	KR336615

Assim, como descrito anteriormente, após obter a sequência consenso e realizar a pesquisa no ‘Genbank’, foi realizado o alinhamento entre a sequência consenso obtida para o conjunto de iniciadores Fw\_1\_1 – Rv\_4 e os acessos utilizados (*Laurus* e *Litsea*) (Figura 14). Observa-se que a sequência obtida também contém o motivo conservado DDXXD (vermelho), porém, abrange uma região diferente, mais no início do gene.

Figura 14 - Alinhamento da sequência obtida para *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. com os iniciadores Fw\_1\_1 – Rv\_4, com as sequências utilizadas para o desenho dos iniciadores. Destacado em vermelho a sequência conservada DDXXD. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.



Pelo fato das duas sequências obtidas para a espécie terem sido geradas a partir de distintos conjuntos de iniciadores, que resultaram na amplificação de diferentes regiões do gene, foi realizado o alinhamento entre tais sequências, visando construir um maior fragmento correspondente ao gene das terpeno sintases. O alinhamento entre as duas sequências dos conjuntos de iniciadores resultou uma sequência consenso de 725 nucleotídeos (Figura 15). O fragmento obtido e sequenciado corresponde a aproximadamente 38% da sequência completa dos genes descritos nos estudos com *Laurus* e *Litsea*. Novamente, os dados foram convertidos para o formato FASTA e a pesquisa no 'GenBank' identificou os três acessos (Tabela 8).

Figura 15 - Sequência consenso gerada pelo 'software Geneiou's para o fragmento obtido com os iniciadores Fw\_4 – Rv\_5 e Fw\_1\_1 – Rv\_4 com o genótipo 9 de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.

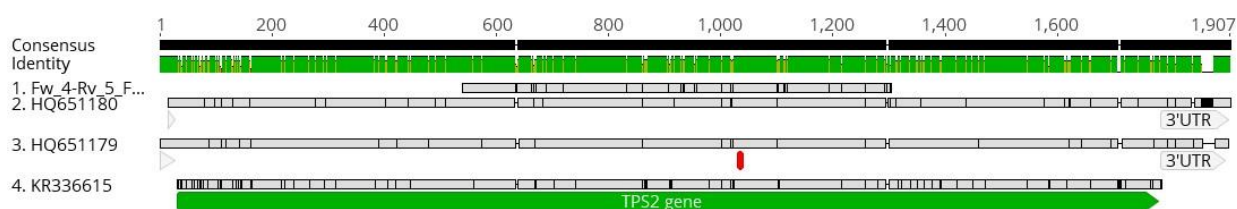
1 10 20 30 40  
 A A G A A A G C C T T T G C A T G G A C A T C A A G G G G A T G C T G A G C T T G T  
 50 60 70 80  
 A T G A A G C T T C A C A C C T T T C A A G G G G A A G T A G T C T T G G  
 90 100 110 120  
 A T G A A G C C A G G G A G T A G T T C A C A A G C A C A C A T C T C A A G G C C A  
 130 140 150 160  
 T C A A A G G A G A A C A T A G A C C C A G T T C T T T T A A A G A A A G T A A G G C  
 170 180 190 200 210  
 A T T C T T T T G G A G A T C C C A T T G C A T T T G G A G A A T G C T A A A G G C T A G  
 220 230 240 250  
 A G G C T A G G T G G T A C A T A G A G A C A T A T G A T G A A G A A G A T A G A A  
 260 270 280 290  
 A G A A T C C T T C A T T A G C T G A A C T A G C T A A G C A T G A T T T C A A C T  
 300 310 320 330  
 A T G T G C A A A C A A T A T A T C A A A G G A G T C T G A A A A G G A T G T C A A  
 340 350 360 370  
 G G T G G T G G A G G G A T C T T G G G C T A G G T G A G A G A C T C G A G T T T T  
 380 390 400 410 420  
 C C A G A G A T A G G G C T T G T G G A A T G C T T C T T T T G G A C C A T C G G T A  
 430 440 450 460  
 T C A T A T T T G A T C C A C A G T T T G A G C G T T G C A G G G G A G T T C T T A  
 470 480 490 500  
 C A A A A G T G A A T C A A T T A A T A A C T A C A A T T G A T G A T G T A T A T G  
 510 520 530 540  
 A T G T G T A T A T G G C T C T T T T G G A G G A G T T G G A G C T C T T T A C C G A T G  
 550 560 570 580  
 C T G T G G A C A G A T G G G A C G T T A G G G C A A C G A A G C A A C T T C C T G  
 590 600 610 620 630  
 A A T A T A T G A A A A T T T G T T A T C T A G C T C T C T A C A A C A C T A C T A  
 640 650 660 670  
 A C G A T A T A G C T T A T G A A G C C C T T A G A G A G G A G G G A T T G G A T G  
 680 690 700 710  
 T G A T A A C A T A T C T T A A G A A A G T G T G G A C A G A T C T T T G T A A A T  
 720 730 740 750  
 C C T A C T T A G T A G A G G C A A G A T G G T A T A G C A A T T G G A T A C A G G C  
 760 764  
 C C A A C A C A

Tabela 8 – Resultado do BLAST realizado no ‘GenBank’ a partir de uma sequência obtida para *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E- Value	Max Identity	Accession
<i>Litsea cubeba</i> alpha-thujene synthase/sabinene synthase mRNA	1234	1234	99%	0	96%	HQ651180
<i>Litsea cubeba</i> alpha-thujene synthase mRNA	1229	1229	99%	0	96%	HQ651179
<i>Laurus nobilis</i> terpene synthase 2 (TPS2) mRNA	1184	1184	99%	0	95%	KR336615

Assim, como descrito anteriormente, após obter a sequência consenso e realizar a pesquisa no ‘Genbank’, foi realizado o alinhamento entre a sequência consenso obtida para o conjunto de iniciadores Fw\_4 – Rv\_5 e Fw\_1\_1 – Rv\_4 e os acessos utilizados (*Laurus* e *Litsea*) (Figura 16). Observa-se que a sequência obtida também contém o motivo conservado DDXXD (vermelho)

Figura 16 - Alinhamento da sequência consenso gerada a partir das sequências obtidas com os iniciadores Fw\_4 – Rv\_5 e Fw\_1\_1 – Rv\_4 para *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., com as sequências utilizadas para o desenho dos iniciadores. Destacado em vermelho a sequência conservada DDXXD. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.



Adicionalmente aos resultados obtidos com as combinações de iniciadores apresentados anteriormente, a combinação Fw\_4 – Rv\_6 apresentou resultado positivo com o genótipo 9, em duas repetições (9c e 9e), em que somente uma das quatro sequências amplificou um fragmento próximo



ao tamanho esperado (881 nucleotídeos). Para a repetição 9c, foi amplificado um fragmento de 270 e 828 nucleotídeos com qualidade de 27,4% e 44,9% respectivamente (Figura 17). Após o processamento, as sequências apresentaram um total de 226 e 805 nucleotídeos, com qualidade de 32,7 e 46,2% respectivamente (Figura 18).

Já para a repetição 9e, o fragmento amplificado apresentou 470 e 489 nucleotídeos, com qualidade de 91,1% e 37% (Figura 19) respectivamente. Após o processamento no 'software', as sequências foram reduzidas para 433 e 436 nucleotídeos, com qualidade de 95,2% e 41,5% respectivamente (Figura 20).

Após a edição, foi obtida a sequência consenso (Figura 21) entre os iniciadores Fw\_4 e Rv\_6, gerando uma sequência de 477 nucleotídeos. Como descrito anteriormente, os dados foram convertidos para o formato FASTA, e novamente foi realizado um BLAST no 'GenBank'.

Figura 17 - Sequências obtidas com o genótipo 9 (repetição c) de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez, com destaque para os ruídos no início e final (destaque em preto). Santa Maria, RS, UFSM, 2018.

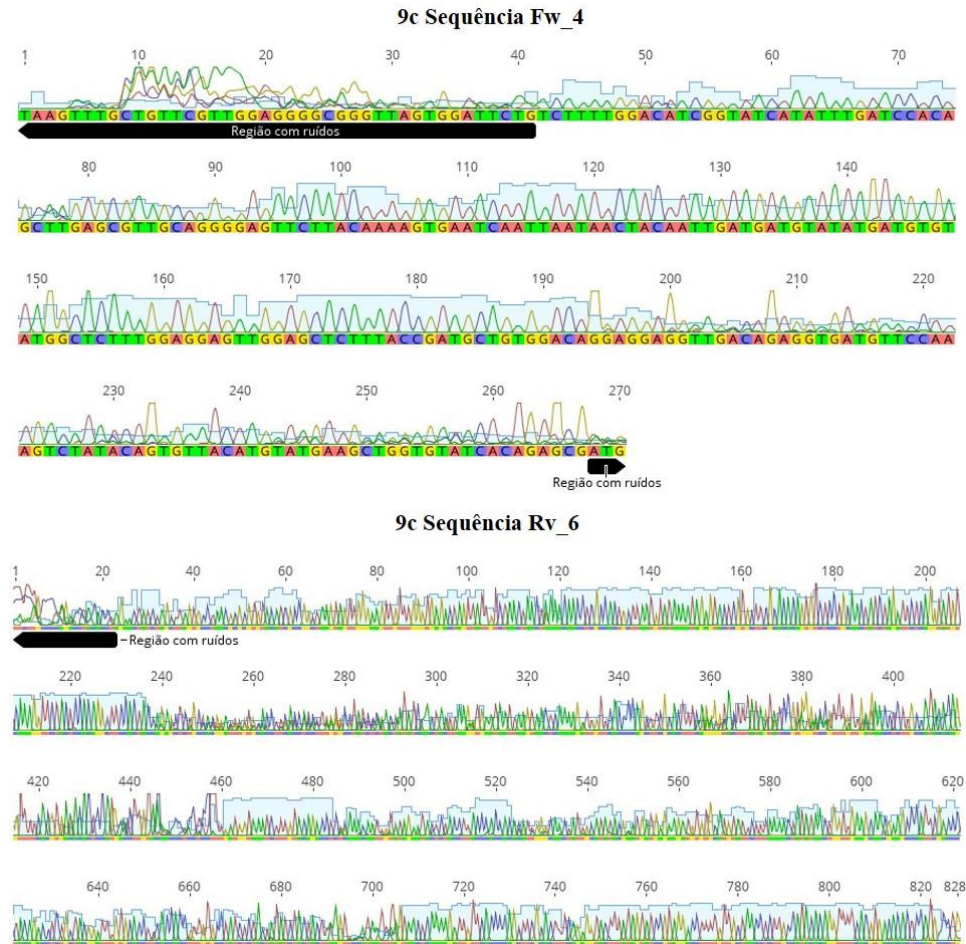


Figura 18 - Sequências obtidas com o genótipo 9 (repetição c) de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez, após processamento no 'software Geneious1. Santa Maria, RS, UFSM, 2018

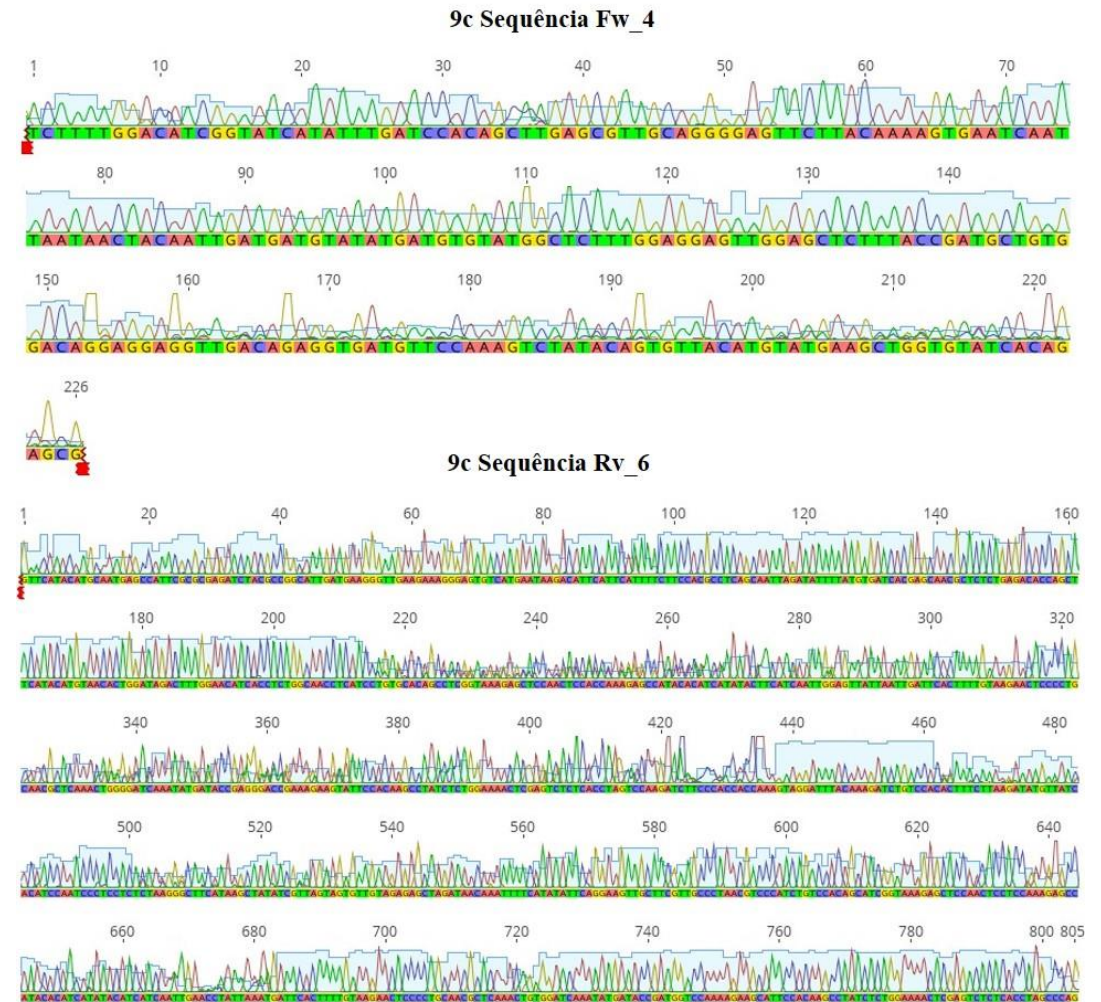


Figura 19 - Sequências obtidas com o genótipo 9 (repetição e) de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez, com destaque para os ruídos no início e final (destaque em preto). Santa Maria, RS, UFSM, 2018.

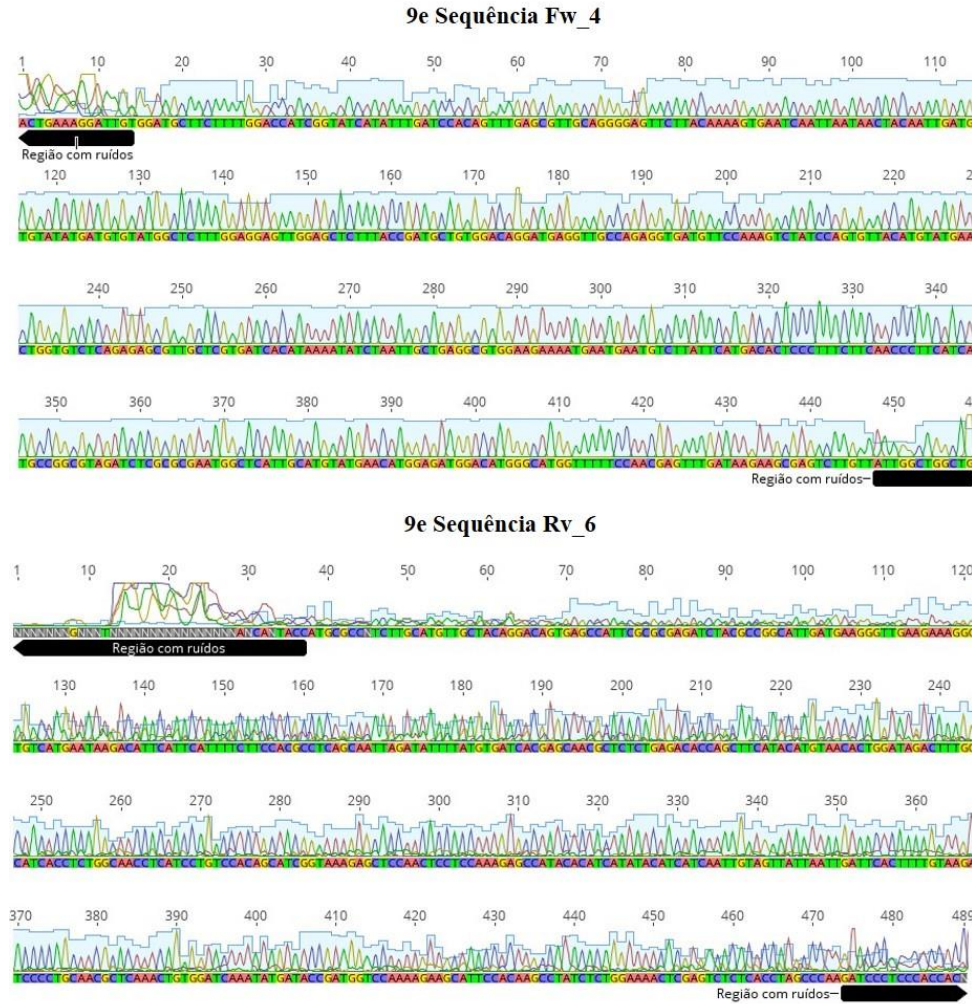


Figura 20 - Sequências obtidas com o genótipo 9 (repetição e) de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez, após processamento no 'software Geneious'. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.

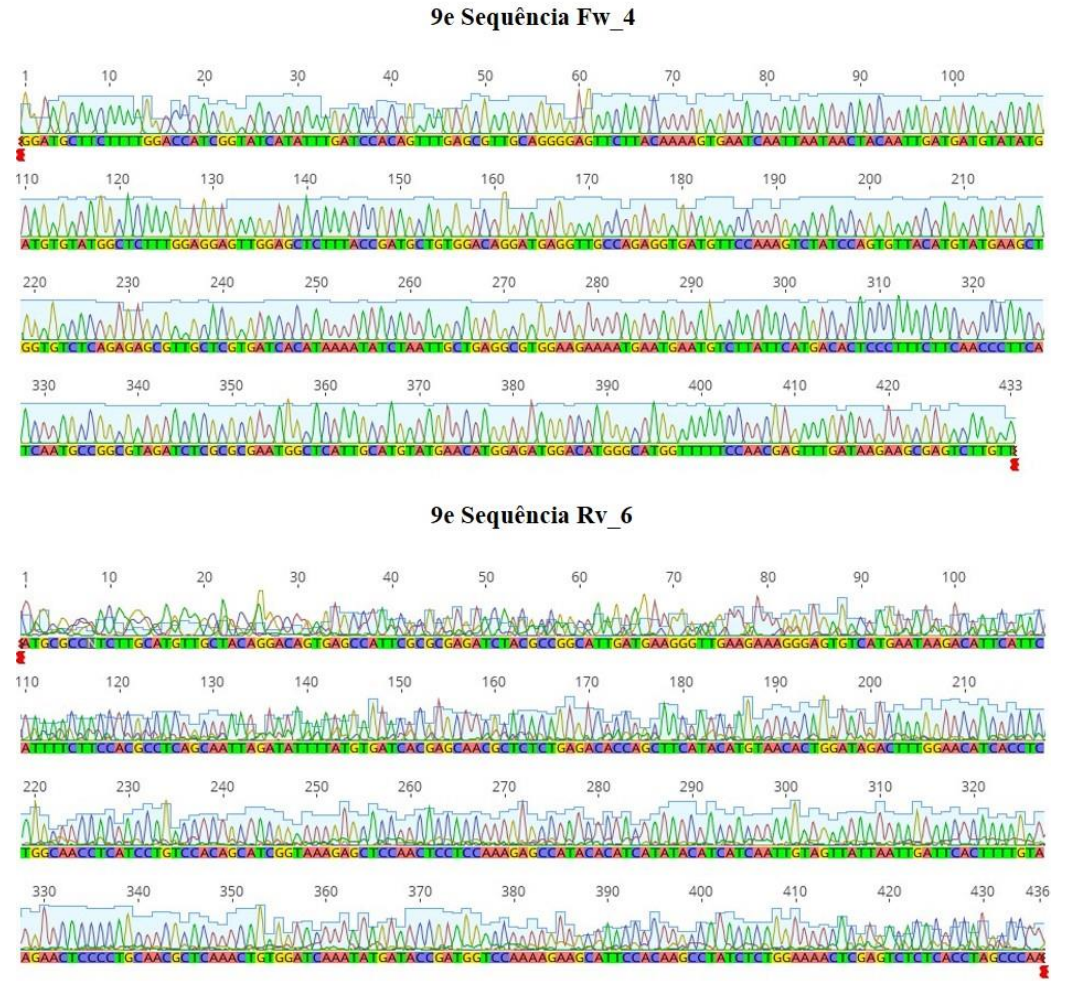
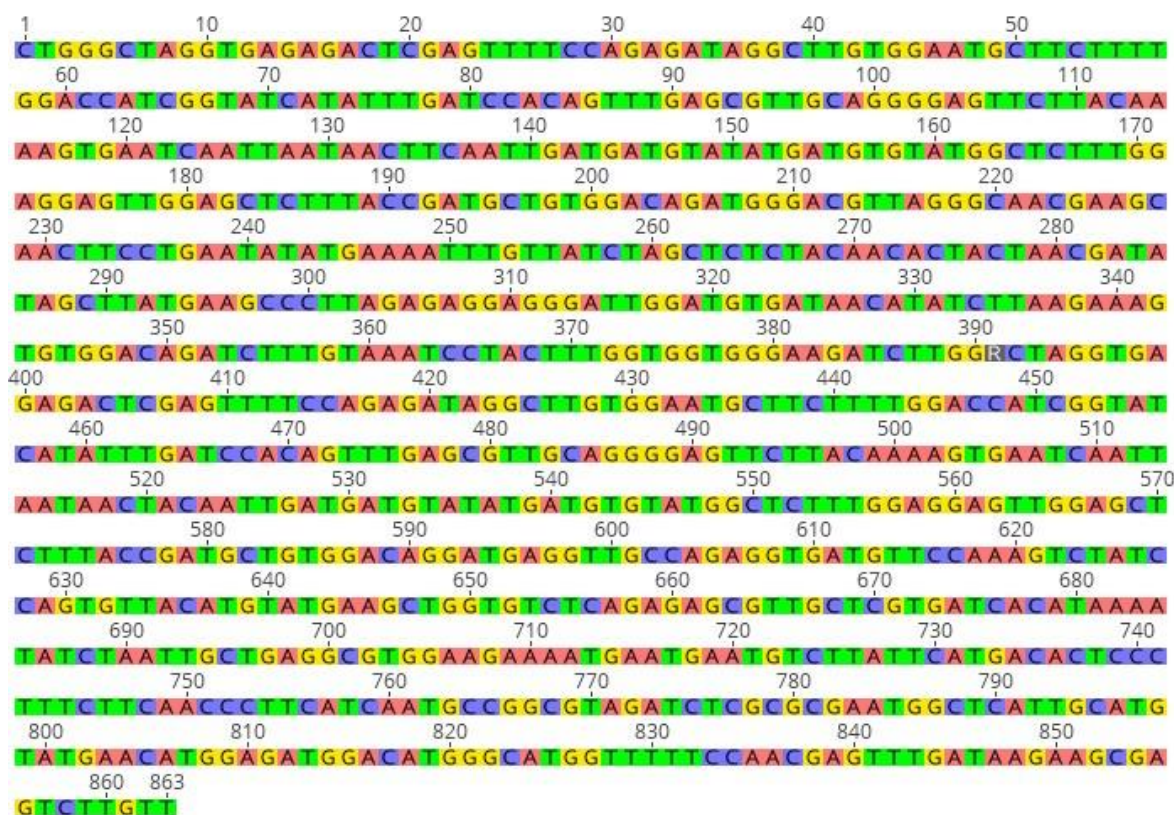


Figura 21 – Sequência consenso gerada pelo ‘software Geneious’ para o fragmento obtido com os iniciadores Fw\_4 – Rv\_6 com o genótipo nove (repetições 9c e 9e) de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.



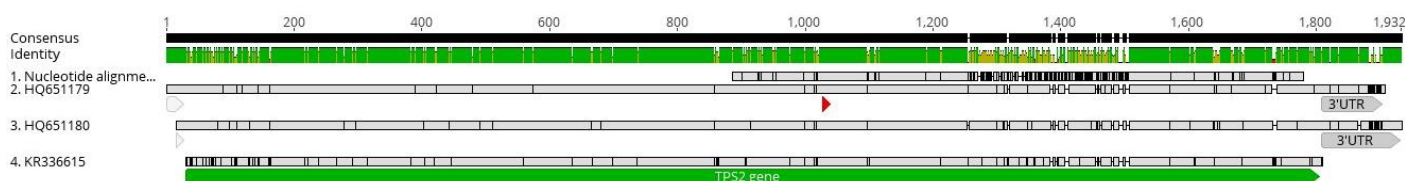
O resultado do BLAST novamente indicou os três acessos utilizados para o desenho dos iniciadores como os mais similares à sequência consenso (Tabela 9).

Tabela 9 - Resultado do BLAST realizado no ‘GenBank’ a partir de uma sequência obtida para *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E- Value	Max Identity	Accession
<i>Litsea cubeba</i> alpha-thujene synthase/sabinene synthase mRNA	579	1270	99%	5e-161	95%	HQ651180
<i>Litsea cubeba</i> alpha-thujene synthase mRNA	579	1292	99%	5e-161	95%	HQ651179
<i>Laurus nobilis</i> terpene synthase 2 (TPS2) mRNA	560	1312	99%	2e-155	94%	KR336615

Assim como descrito anteriormente, após obter a sequência consenso e realizar a pesquisa no 'Genbank', foi realizado o alinhamento entre a sequência consenso obtida para o conjunto de iniciadores Fw\_4 – Rv\_6 e os acessos utilizados (*Laurus* e *Litsea*) (Figura 22). Observa-se que a sequência obtida também contém o motivo conservado DDXXD (vermelho).

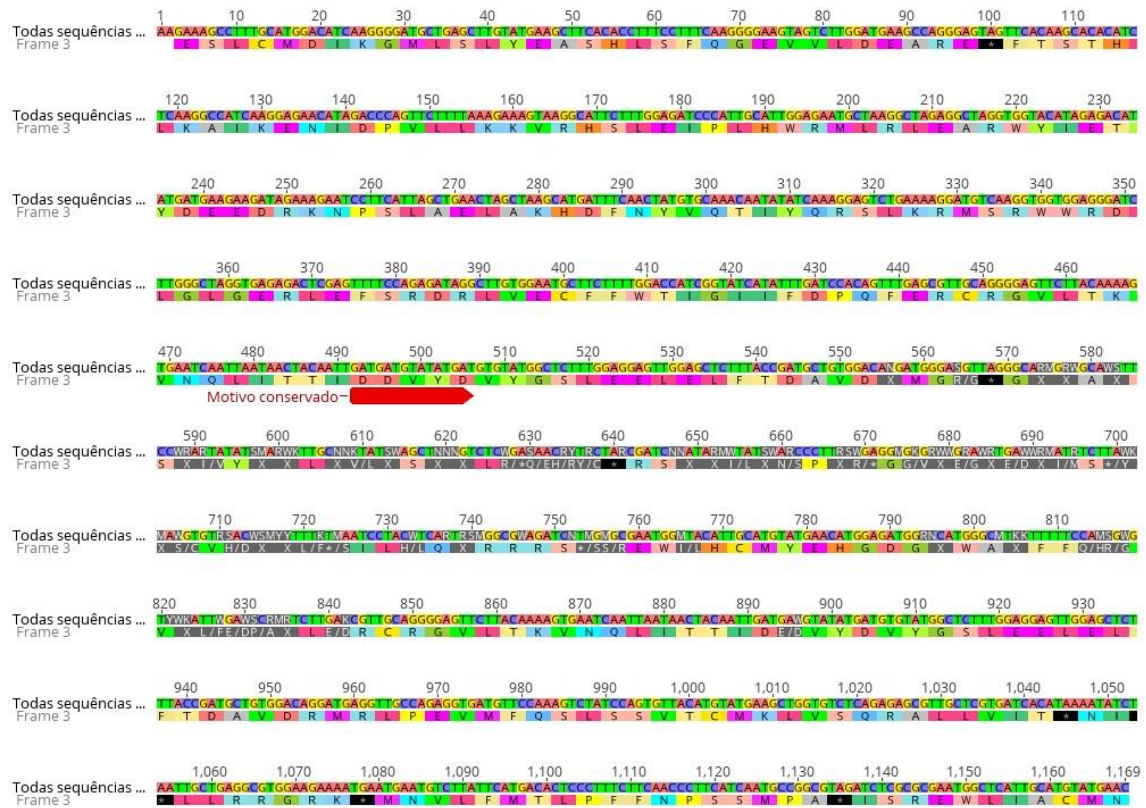
Figura 22 - Alinhamento da sequência obtida para *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. com os iniciadores Fw\_4 – Rv\_6, com as sequências utilizadas para o desenho dos iniciadores. Destacado em vermelho o motivo conservado DDXXD. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.



Tendo como base todas as sequências obtidas com os conjuntos de iniciadores que forneceram resultados positivos, foi possível construir uma sequência consenso mais abrangente. Em todas as sequências obtidas, foi possível identificar o motivo conservado DDXYD, o que permite inferir que tais sequências correspondem a um gene TPS, tendo em vista que tal região é altamente conservada ao longo de todas as terpeno sintases vegetais (DEGENHARDT et al., 2009). No entanto, foram obtidas informações referentes à parte central do gene, sendo ainda necessário abordar diferentes estratégias que permitam obter as regiões do início e fim do gene.

A Figura 23 apresenta a sequência consenso obtida com base nos fragmentos sequenciados para o genótipo 9, com as combinações de iniciadores apresentadas, correspondendo a aproximadamente 62% dos genes das sequências completas descritas nos estudos com *Laurus* e *Litsea*.

Figura 23 - Sequência consenso gerada pelo 'software Geneious' para todos os fragmentos obtidos com o genótipo 9 de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. Santa Maria, RS, UFSM, 2018.



Amplificação rápida das extremidades do RNA (RACE – ‘Rapid Amplification of cDNA Ends’)

Conforme mencionado anteriormente, a técnica RACE foi aplicada com a finalidade de obter amplificação de sequências de cDNA desconhecidas. No estudo, foi utilizada a variação 3’, que permite obter o conhecimento da sequência da região final do gene. No entanto, não foram obtidos resultados consistentes, devido à baixa reprodutibilidade dos fragmentos amplificados.

## 8. CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo foi possível obter informações científicas relevantes sobre a estrutura e diversidade genéticas, anatomia foliar e identificação parcial de genes das terpeno sintases de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez., tendo em vista que muitos dos resultados obtidos são inéditos para esta espécie.

Os resultados obtidos por meio dos marcadores moleculares RAPD revelaram que a população natural analisada se apresenta subdividida em três *clusters*, sendo verificados níveis elevados de diversidade genética dentro dos *clusters* e alta diferenciação genética entre eles, sem qualquer padrão espacial de distribuição dessa variabilidade genética. Além disso, o fluxo de genes mostrou-se independente da distribuição geográfica, sendo compatível com o modelo hierárquico da ilha. Esse foi o primeiro estudo molecular com a espécie, e que permitiu obter informações inéditas sobre a estrutura genética de uma população natural dessa espécie. Ainda na área de biologia molecular, foi realizada a análise combinada dos dados obtidos com marcadores RAPD e os resultados da composição do óleo essencial. Contudo, não foi verificada correlação entre os dois conjuntos de dados, indicando que existe uma grande variabilidade na composição do óleo essencial, provavelmente resultante da combinação dos diversos fatores ambientais e características genéticas, e de eventuais interações entre ambos.

No que se refere à microscopia, os ensaios realizados permitiram obter lâminas de alta qualidade a partir de material vegetal congelado, metodologia ainda não descrita na literatura especializada até o momento, caracterizando o manuscrito como inovador. Adicionalmente, foi possível descrever aspectos de sua anatomia foliar, bem como identificar as estruturas secretoras e de armazenamento, do tipo cavidades secretoras – conhecimento inédito também haja vista que até o presente essas estruturas, na família Lauraceae, estavam sendo referidas como idioblastos.

A análise estacional da composição do óleo essencial, igualmente, revelou uma grande variabilidade, sendo observados compostos majoritários diferentes daqueles que haviam sido observados em estudo anterior realizado com a mesma população. Considerando o exposto, é evidente a significativa influência dos diversos fatores ambientais na biossíntese de determinados compostos. Assim, análises complementares poderiam auxiliar a compreender como esses fatores

(temperatura, radiação, precipitação, umidade, entre outros) afetam a biossíntese. Ainda relacionados ao óleo essencial da espécie, foram realizados experimentos pioneiros referentes à identificação de genes responsáveis pela síntese de terpenos, que codificam as terpeno sintases, sendo possível obter uma sequência parcial de um gene. Esse estudo corresponde a uma pequena contribuição, sendo necessária a realização de um conjunto adicional de experimentos para que seja desvendado o gene inteiro.

De modo geral, o caráter multidisciplinar da tese apresentada trouxe contribuições relevantes ao estado da arte de *Nectandra megapotamica*, uma espécie florestal arbórea, nativa do bioma Mata Atlântica, demonstrando a potencialidade que esse tipo de abordagem pode fornecer à análise de problemas reais.



## 9. REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy**. Allured Publishing Corporation. Illinois, 455p, 2009.

AMARAL, L. P. et al. Seasonal influence on the essential oil production of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 1, p. 12-21, 2015a.

AMARAL, L. P. et al. Variabilidad de la composición química del aceite esencial de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. (Lauraceae). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 14, n. 3, p. 190-205, 2015b.

APEL, M. A.; LIMA, M. E. L.; SOUZA, A.; CORDEIRO, I.; YOUNG, M. C. M.; SOBRAL, M. E. G.; SUFFREDINI, I. B.; MORENO, P. R. H. Screening of the biological activity from essential oils of native species from the atlantic rain forest (São Paulo – Brazil). **Pharmacology**, v. 3, p. 376-383, 2006.

AZEVEDO, H.; LINO-NETO, T.; TAVARES, R. M. An improved method for a high-quality RNA isolation from needles of adult Maritime Pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, 21: 333–338, 2003.

BARROSO, G.M.; GUIMARÃES, E.F.; ICHASO, C.L.F.; COSTA, C.G.; PEIXOTO, A.L. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa: UFV, v.1, 2 ed., 2002. 309 p.

BEELMAN, C. A.; PARKER, R. Degradation of mRNA in eukaryotes. **Cell**, 81 (2): 179-183, 1995.

BOHLMANN, J.; MEYER-GAUEN, G.; CROTEAU, R. Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA 95: 4126–4133, 1998b.

BOUWMEESTER, H. J.; GERSHENZON, J.; KONINGS, M. C. J. M.; CROTEAU, R. Biosynthesis of the monoterpenes limonene and carvone in the fruit of caraway. Demonstration of enzyme activities and their changes with development. **Plant Physiology**, v. 117, p. 901-912, 1998.

CAMPANILI, M.; PROCHNOW, M. **Mata Atlântica, uma rede pela floresta**. Brasília: RMA, 2006.

CROCOLL, C. et al. 2010. Terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. **Plant Molecular Biology**, v.73, p. 587–603, 2010.

COSTA, L. S. et al. Comparative analysis of five DNA isolation protocols and three drying methods for leaves samples of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, p.1177–1188, 2016.

COSTA, L. S. et al. Study of the genetic diversity and structure of a natural population of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. using RAPD markers. **Genet Mol Res**, v.14, p.18407-18413, 2015.

DA SILVA FILHO, A.A. da. et al. *In vitro* antileishmanial and antimalarial activities of tetrahydrofuran lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). **Phytotherapy Research**, v.22, n.10, p.1307–1310, 2008.

DECKER, C. J.; PARKER, R. Mechanisms of mRNA degradation in eukaryotes. **Trends in Biochemical Sciences**, v.19(8), p.336-340, 1994.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents. **Plant Physiology**, v.122, p.627-633, 2000.

DUDAREVA, N.; NEGRE, F.; NAGEGOWDA, D.A.; ORLAVA, I. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.25, p.417-440, 2006.

EHRlich, P. R.; RAVEN, P. H. Butterflies and plants. A study in co-evolution. **Evolution**, v.18, p.586–608, 1964.

FROHMAN, M. A.; DUSH, M. K.; MARTIN, G. R. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.85(23), p.8998-9002.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; HAMERSKI, L.; MIGUITA, C. H. Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapotamica*. **Química Nova**, v.32(2), p.407-411, 2009.

GERSHENZON, J.; MCCONKEY, M. E.; CROTEAU, R. B. Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. **Plant Physiology**, v.122, p.205-214, 2000.

HARBORNE, J. B. **Introduction to ecological biochemistry**. 4.ed. London, Academic Press, 1993. 384p.

HOUSELEY, J.; TOLLERVEY, D. The Many Pathways of RNA Degradation. **Cell**, v.136(4), p.763-776, 2009.

KEARSE, M. et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v.28, p.1647–1649, 2012.

LORENZI, H.; SOUZA, V. C. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. p. 85-89.

MANCHESTER, K. L. Use of UV methods for measurement of protein and nucleic acid concentrations. **Biotechniques**, v.20, p.968–970, 1996.

MARCHIORI, J. N. C. **Dendrologia das angiospermas: das magnoliáceas às flacurtiáceas**. Santa Maria, RS: Ed. da UFSM, 1997. 271p.

MARTIN, D. M.; FÄLDT, J.; BOHLMANN, J. Functional characterization of nine Norway Spruce TPS genes and evolution of gymnosperm terpene synthases of the TPS-d subfamily. **Plant Physiology**, v.135, p.1908–1927, 2004.

MELO, J.O. et al. Anti-inflammatory Activity of Crude Extract and Fractions of *Nectandra falcifolia* leaves. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v.29, n.11, p.2241-2245, 2006.

MELLO, E. M. C. L. **Identificação de genes envolvidos na biossíntese de monoterpenos em Pau-rosa (*Aniba rosaedora*)**. 2008. 41 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Urbana) - Universidade Nilton Lins, Manaus, 2008.

MITTERMEIER, R. A.; MYERS, N.; THOMSEN, J. B.; DA FONSECA, G. A. B., et al. Biodiversity hotspots and major tropical wilderness areas: approaches to setting conservation priorities. **Conservation Biology**. v. 12, p. 516-520, 1998.

NAGEGOWDA, D. A. Plant volatile terpenoid metabolism: biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. **FEBS Letters**, v. 284, p. 2965-2973, 2010.

National Institute of Standards and Technology: NIST 2008. Mass spectral library (NIST/EPA/NIH), Gaithersburg, USA, 2008.

PAULA, J. A. M. et al. Intraspecific chemical variability in the essential oils of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum (Myrtaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, 643-650, 2011.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2001, 906 p.

REITZ, R.; KLEIN, R.M.; REIS, A. **Projeto Madeira do Rio Grande do Sul. SUDESUL/Herbário Barbosa Rodrigues**, 1989. p.22-129;194-200.

RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A. **Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das Plantas Vasculares de uma Floresta de Terra-Firme na Amazônia Central**. Manaus: Inpa-DFID, 1999. 816 p.

RHIND, J. P. **Essential Oils: A Handbook for Aromatherapy Practice**. London, United Kingdom: Singing Dragon, 2012, p. 134.

ROHWER, J. G. Lauraceae: *Nectandra*. **Flora Neotropica**, v. 60, p. 1-332, 1993.

ROMOFF, P.; FERREIRA, M. J. P.; PADILLA, R.; TOYAMA, D. O.; et al. Chemical composition of volatile oils from leaves of *Nectandra megapotamica* Spreng. (Lauraceae). **Química Nova**, 33, p. 1119-1121, 2010.

SACHS, A. B. Messenger RNA degradation in eukaryotes. **Cell**, 74 (3): 413-421, 1993.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1989.

SANGWAN, S. P. S. et al. Assessment of genetic relationships in *Mentha* species. **Euphytica**, v. 111, 121-125, 2000.

SANTOS FILHO, D.; GILBERT, B. The alkaloids of *Nectandra megapotamica*. **Phytochemistry**, v. 14, p. 821-822, 1975.

SINGH, B.; SHARMA, R. A. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. **3 Biotech**, 3, p. 129-151, 2015.

SOUZA, L. A.; MOSCHETA, I. S. Morfo-anatomia e aspectos da biologia floral de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez (Lauraceae). **Acta Bot. Bras**, v. 14, p. 15-25, 2000.

THOLL, D. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. **Current in Opinion Plant Biology**, v. 9, p. 297-304, 2006.

TRAPP, S. C.; CROTEAU, R. B. Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. **Genetics**, v 158, p. 811-832, 2001.

TRINDADE, H.; SENA, I.; FIGUEIREDO, A. C. Characterization of  $\alpha$ -pinene synthase gene in *Pinus pinaster* and *P. pinea* in vitro cultures and differential gene expression following *Bursaphelenchus xylophilus* inoculation. **Acta Physiol Plant**, 38: 143, 2016.

VERPOORTE, R.; ALFERMANN, A. W. **Metabolic engineering of plant secondary metabolism**. Netherland: Kluwer Academic Publishers, 2000, 286 p.

WERFF, H. W.; RICHTER, H. G. Toward and improved classification of Lauraceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 8, p. 419-432, 1996.

WHEELER, D.; BHAGWAT, M. **BLAST QuickStart: Example-Driven Web-Based BLAST Tutorial**. In: Comparative Genomics. Bergman, N. H (ed) & Totowa, N. J. 2007.