

# PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA GISH (GENOMIC IN SITU HYBRIDIZATION) EM *Lippia alba* (VERBENACEAE)

Juliana Mainenti Leal Lopes<sup>1</sup>, Aryane Campos Reis<sup>1</sup>, Saulo Marçal Sousa<sup>1</sup>, Pâmela Souza Silva<sup>1</sup>, Lyderson Facio Viccini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG.

## Resumo

*Lippia alba* é uma planta medicinal amplamente usada na fitoterapia brasileira devido a suas inúmeras propriedades. Em trabalhos anteriores foi identificado nessa espécie diferenças em relação ao número e morfologia dos cromossomos, com possíveis eventos de autopoliploidia. Entretanto, tais eventos ainda não foram comprovados. Dentre as diversas técnicas citológicas, a GISH tem sido uma importante metodologia que possibilita a identificação de eventos de auto ou aloploidia. O presente trabalho teve como objetivo padronizar a técnica de GISH em *L. alba* para que a mesma possa ser utilizada no futuro incrementando as evidências de autopoliploidia em diferentes citótipos da espécie. Para isso, o DNA genômico de *L. alba* e de *Lycopersicon esculentum* foram utilizados como sondas e quatro processos de hibridização realizados em duas lâminas de *L. alba* e duas de *L. esculentum*, as quais receberam, separadamente, sondas de DNA genômico de *L. alba* e *L. esculentum*. As hibridizações foram bem sucedidas quando as sondas e lâminas representavam a mesma espécie, entretanto, o mesmo não foi observado quando a hibridização se deu em espécies diferentes. Com esse resultado podemos confirmar a eficácia da técnica e futuramente utilizá-la em diferentes citótipos de *L. alba*.

**Palavra-chave:** GISH, *Lippia alba*, Verbenaceae.

## Introdução

O gênero *Lippia* possui cerca de 200 espécies, sendo o Brasil o maior centro de diversidade (Salimena, 2000). Em uma das espécies mais bem estudadas do gênero, *Lippia alba*, foram encontrados constituintes químicos com ações sedativa, ansiolítica, analgésica e anti-infecciosa (Hennebelle et al., 2008); bactericida e fungicida (Aguiar et al., 2008), assim como propriedades estomacais, antiespasmódicas (Gomes et al., 1993) e anti-ulcerogênicas (Pascual et al., 2001).

Brandão (2007) concluiu que *Lippia alba* é possivelmente uma espécie diplóide com  $2n=30$  cromossomos. Pierre et al. (2011), por outro lado, ao estudar a cariologia de três quimiotipos de *L. alba* (citral, carvona e linalol), observou diferenças em relação ao número e morfologia de seus cromossomos, onde o quimiotipo citral apresentou  $2n=30$ , o quimiotipo carvona  $2n=60$  e o quimiotipo linalol uma grande variação numérica,  $2n=12$  a  $60$ . Tais observações possibilitaram à autora inferir que tal espécie é bastante polimórfica geneticamente e que tal variação se origina provavelmente por eventos de autopoliploidia.

A citogenética tem um papel importante na documentação da biodiversidade e nos processos que a geram. Muitos estudos recentes têm utilizado técnicas citogenéticas como FISH (fluorescence *in situ* hybridisation) para mapear sequências individuais ou GISH (genomic *in situ* hybridization) para identificação da origem de parentais em híbridos, aloploidios e autopoliploidios (Chester, 2010). A técnica de GISH consiste na marcação de DNAs genômicos para utilização em experimentos de hibridização *in situ*, sendo amplamente utilizada para identificar genomas ou segmentos homeólogos entre espécies aparentadas (Guerra, 2004).

A técnica GISH tem sido utilizada tanto em programas de melhoramento como no estudo da origem da evolução genômica de aloploidios e autopoliploidios. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo padronizar tal técnica em *L. alba* para que a mesma possa ser utilizada no futuro incrementando as evidências de autopoliploidia em diferentes citótipos da espécie.

## Material e Métodos

Meristemas radiculares de *L. alba* e *L. esculentum* foram tratados com 8-hidrixiquinoeína 3mM por 9h e 3h, respectivamente, a 4°C e então fixados em etanol e ácido acético (3:1) por 24h. As raízes foram digeridas com Pectinase (2%) Cellulase Onozuka (20%) por aproximadamente 5 horas e as lâminas foram preparadas pela técnica de dissociação celular com secagem ao ar.

Para construção das sondas, o DNA genômico das espécies foi extraído de folhas frescas com o método de extração CTAB e então marcado com biotina por meio de reação de nick translation com o kit BioNick (Roche) durante 30 minutos a 15 °C no termociclador.

Para o processo de hibridização, as lâminas foram hidrolisadas em HCl 1M por dez minutos, desnaturadas por 1 minuto a 85°C e então submetidas a desidratação em uma série alcóolica crescente. A mistura de hibridização contendo formamida deionizada 100%; 20xSSC pH7; sonda; dextran sulfato 50% e água, foi desnaturada por dez minutos a 90°C e adicionada nas lâminas nas regiões de interesse. A hibridização foi realizada durante 96h a 37°C em câmara úmida. Os banhos pós-hibridização foram realizados em 2xSSC e 1xPBS. Para a detecção, avidina conjugada com TRITC foi adicionada às lâminas junto com o reagente de bloqueio 5xTNB buffer e água. Após a detecção, as lâminas foram lavadas em 1xTNT e 1xPBS e montadas em 20 µL de Vectashield contendo DAPI. A visualização dos sinais foi realizada em microscopia de fluorescência Olympus BX51 e as imagens fotografadas com câmera acoplada ao microscópio.

Quatro processos de hibridização foram realizados, dois em lâminas de *L. alba* e dois em lâminas de *L. esculentum*, as quais receberam, separadamente, sondas de DNA genômico de *L. alba* e *L. esculentum*, respectivamente.

## Resultados e Discussão

As hibridizações foram bem sucedidas quando as sondas e lâminas representavam a mesma espécie (Figura 1 A, B, C e D), entretanto, o mesmo não foi observado quando a hibridização se deu em espécies diferentes (Figura 2 A, B, C e D).

Tais resultados indicam que a técnica da GISH será uma importante ferramenta para a caracterização de diferentes citótipos de *L. alba*, permitindo a inferência dos possíveis processos de poliploidia evidenciados para espécie. Além disso, a técnica também possibilitará a análise de possíveis rearranjos cromossômicos envolvidos no processo de evolução cromossômica da espécie, como já indicado por Pierre et al. (2011).

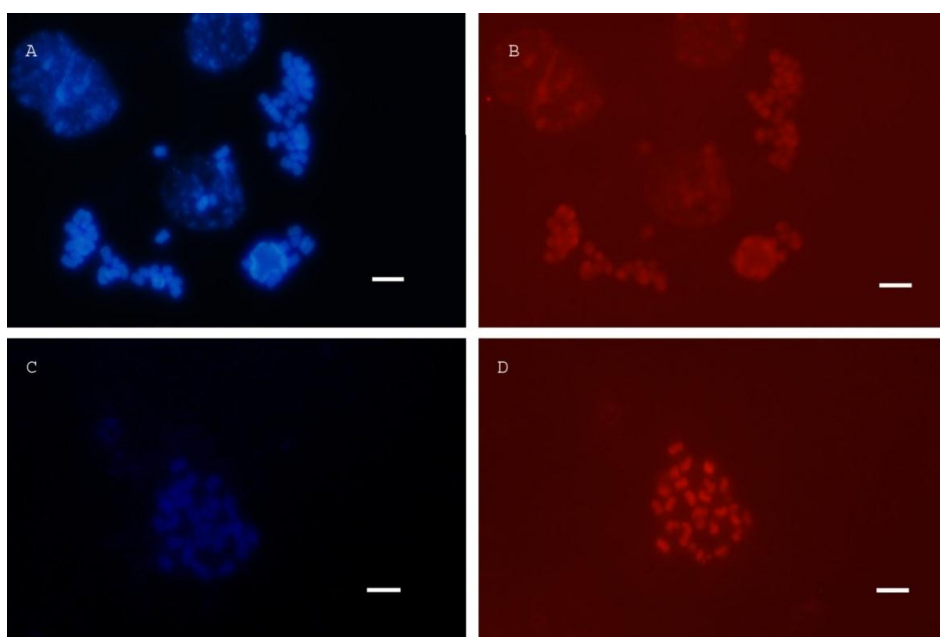


Figura 1. Técnicas de GISH aplicadas a *Lippia alba* e *Lycopersicon esculentum*. As figuras da esquerda foram coradas com DAPI, enquanto as imagens da direita mostram a marcação com o anticorpo avidina acoplada com TRITC para detecção da sonda, a barra corresponde a 5µm. (A) e (B) Sondas feitas a partir do genoma de *Lippia alba* aplicado a lâmina de *Lippia alba*. (C) e (D) Sondas feitas a partir do genoma de *Lycopersicon esculentum* aplicado em lâminas de *Lycopersicon esculentum*.

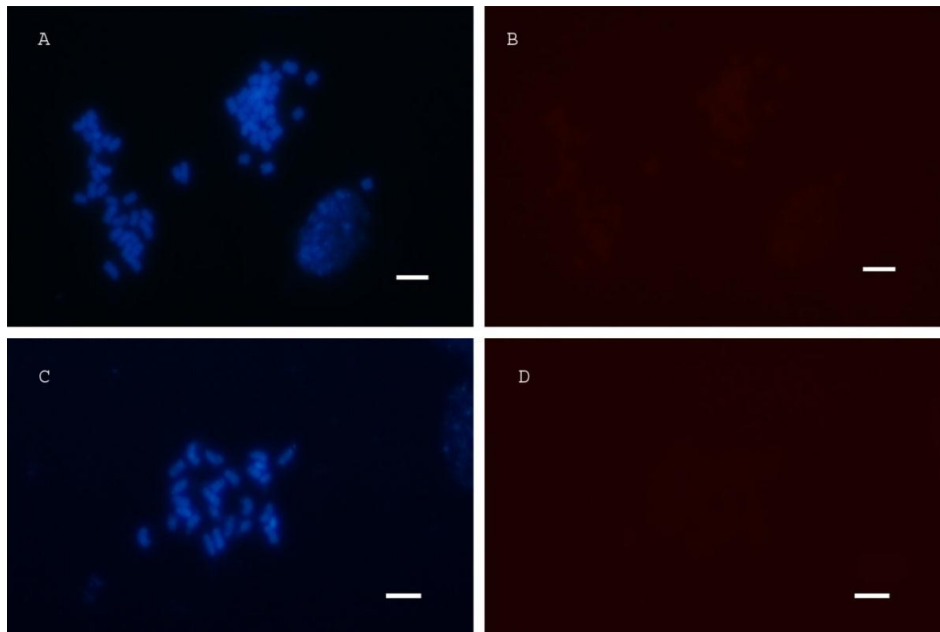


Figura 2. Técnicas de GISH aplicadas a *Lippia alba* e *Lycopersicon esculentum*. As figuras da esquerda foram coradas com DAPI, enquanto as imagens da direita mostram a marcação com o anticorpo avidina acoplada com TRITC para detecção da sonda. (A) e (B) Sondas feitas a partir do genoma de *Lycopersicon esculentum* aplicado a lâmina de *Lippia alba*. (C) e (D) Sondas feitas a partir do genoma de *Lippia alba* aplicado em lâminas de *Lycopersicon esculentum*.

### Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer a FAPEMIG, CNPq, Capes e UFJF pelo apoio financeiro e estrutural para realização do presente trabalho.

### Referências

- AGUIAR, J. S.; COSTA, M. C. C. D.; NASCIMENTO, S.C.; SENA, K. X. F. R. 2008. Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia** 18(3): 436-440.
- BRANDÃO, A.D.; VICCINI L.F.; SALIMENA, F.R.G.; VANZELA, A.L.L. RECCO-PIMENTEL, S.M. 2007. Cytogenetic characterization of *Lippia alba* and *Lantana camara* (Verbenaceae) from Brazil. **Journal of Plant Research**. 120: 317-321.
- CHESTER, M.; LEITCH, A.R.; SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D.E. 2010. Review of the Application of Modern (FISH/GISH) Cytogenetic Methods to the Study of Reticulation (Polyploidy/Hybridisation). **Genes**.10:166-192
- GOMES, E.C.; MING, L.C.; MOREIRA, E.A.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D.; KERBER, V.A.; CONTI, A.; FILHO, A.W. 1993. Constituintes do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmácia**. 74 (2): 29-32.
- HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; JOSEPH, H; BAILLEUL, F. 2008. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**. 116: 211–222.
- PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ- MATA, D.; VILLAR, A. 2001. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**. 76: 201- 214.
- PIERRE, P.M.O.; SOUSA, S.M; DAVIDE, L. C.; MACHADO, M.A.; VICCINI, L.F. 2011. Karyotype analysis, DNA content and molecular screening in *Lippia alba* (Verbenaceae). **Annals of Brazilian Academy of Science** 83(3):1-13.
- SALIMENA, F.R.G. Revisão taxonômica de *Lippia sect. Rhodolippia* (Verbenaceae). 2000. **Tese de doutorado**. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 582 p.