

Avaliação inicial do RAPD como forma de acessar a variabilidade genética na espécie rica em linalol *Croton cajuçara* Benth. (sacaca)

Paula Cristina da Silva Angelo¹
Francisco Célio Maia Chaves²
José Jackson Bacelar Nunes Xavier²
Jeferson Chagas da Cruz³
Maria do Perpétuo Socorro Lira⁴

O óleo essencial de sacaca (*Croton cajuçara* Benth.) é rico em linalol, um álcool terpênico utilizado na indústria de cosméticos. Entre espécies encontradas na Amazônia, o linalol é obtido principalmente do pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke e *A. duckei* Kosterm.). Nas décadas passadas, era obtido da madeira dessas árvores e os métodos de exploração não planejada de extensas áreas da Floresta levaram as duas espécies ao risco de extinção. Por esta razão, há cerca de 30 anos, foi realizada uma busca por fontes alternativas de linalol, e a sacaca apresentou-se como uma opção (Araújo et al., 1971). A espécie pode ser utilizada para a extração de linalol sem a necessidade de destruir as plantas e é mais facilmente cultivada que árvores de pau-rosa, em parte porque é de porte arbustivo, apresenta crescimento rápido e sistema de propagação vegetativa eficiente.

O agronegócio na Região Amazônica é constituído de desafios, e a Embrapa está comprometida com a manutenção da biodiversidade e com a adaptação de sistemas de manejo florestais e agroflorestais que permitam o desenvolvimento sustentável. A descoberta contínua e a introdução de novas espécies em agroecossistemas são pontos que demandam pesquisa,

para que ocorra a inclusão no mercado de produtos de espécies nativas que tenham propriedades medicinais, que possam ser utilizados como corantes, inseticidas e substâncias aromáticas (Kitamura et al., 2002).

Sendo assim, durante o ano de 1995, como parte de um projeto de pesquisa, foi realizada a análise do óleo essencial de folhas de plantas cultivadas de sacaca e registraram-se porcentagens de linalol entre 30,12 e 44,70 (Sá Sobrinho et al., 1998). E, desde 1997, a Embrapa Amazônia Ocidental mantém plantas de *Croton* spp., coletadas em oito municípios da Região Norte, com os objetivos de preservar o germoplasma das espécies e de verificar a existência de variabilidade quanto à produção de biomassa e a porcentagem de linalol no óleo essencial de folhas (Kalil Filho et al., 1998).

As plantas de *C. cajuçara* podem ser morfológicamente classificadas como brancas ou vermelhas, de acordo com a cor das folhas, especialmente folhas jovens nos galhos recém-desenvolvidos. O componente principal do óleo essencial destes dois morfotipos é o linalol e o hidroxicalameneno, respectivamente, como demonstrado por experimentos de cromatografia a gás realizados recentemente (Chaves et al., 2003).

¹Bióloga, D.Sc., Embrapa Amazônia Ocidental, Caixa Postal 319, 69010-970, Manaus - AM. paula@cpaa.embrapa.br

²Eng. Agrôn., D.Sc., Embrapa Amazônia Ocidental. celio@cpaa.embrapa.br e jjackson@cpaa.embrapa.br

³Técnico de Nível Médio, Embrapa Amazônia Ocidental. jeferson@cpaa.embrapa.br

⁴Eng. Florestal, M.Sc., Bolsista DTI/CNPq, helplira@hotmail.com

O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilidade dos métodos praticados no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Amazônia Ocidental, incluindo o teste da reprodutibilidade das bandas, para acessar a variabilidade genética entre plantas de sacaca por meio de marcadores moleculares do tipo RAPD ("random amplified polymorphic DNA").

Material e Métodos

Material vegetal: folhas de plantas de sacaca vermelha e de sacaca branca foram tomadas de dois acessos do Banco Ativo de Germoplasma de *Croton*. Folhas de uma planta de mandioca da cultivar BRS-Purus foram introduzidas nos experimentos para funcionar como "outside species" no contraste dos resultados obtidos para plantas da espécie *Croton cajuçara* com aqueles de outra espécie da mesma família botânica, Euphorbiaceae.

Extração, purificação e quantificação do DNA: o DNA foi obtido de folhas maceradas em nitrogênio líquido, utilizando o kit DNEasy Extraction Kit (QIAGEN), e quantificado por espectrofotometria.

Condições de realização das PCR ("polymerase chain reaction"): as reações de PCR (reações de polimerização em cadeia) continham 10 ng de DNA; 2,5 mM de $MgCl_2$; 400 μM de dNTPs; 375 nM de "primer" decâmero; 1,5 unidade de Taq DNA polimerase e 0,1% de BSA ("bovine serum albumine", soroalbumina bovina), em 25 μL . Dez "primers" decâmeros foram testados: (5'-CATCCGTGCT-3'; 5'-ACCCGACCTG-3'; 5'-CAGCACTGAC-3'; 5'-AATCGGGCTG-3'; 5'-TCAGAGCGCC-3'; 5'-AGATGCAGCC-3'; 5'-AAGTCCGCTC-3'; 5'-ACGGCGTATG-3'; 5'-TCACCACGGT-3'; 5'-TCCACGCAA-3').

O termociclador foi ajustado para ciclos de 92 °C por 1

min; 35 x (92 °C por 1 min; 30 °C por 2 min e 72 °C por 2 min); 72 °C por 5 min e 4 °C por tempo indeterminado.

Teste da reprodutibilidade das bandas RAPD: as reações de PCR foram realizadas em datas diferentes, observando sempre as mesmas condições experimentais, para exatamente as mesmas plantas dos mesmos acessos do Banco de Germoplasma de *Croton* e de mandioca. Para cada banda foi verificado o número de vezes em que o resultado obtido da primeira vez foi repetido na segunda vez em que os experimentos foram realizados. Somente bandas cujo padrão (presença ou ausência) repetiu-se pelo menos duas vezes dentre as três vezes em que foi testado (uma vez para cada genótipo incluído nos testes) foram admitidas para o cálculo do índice de diversidade de Sorenso/Nei & Li, utilizando o aplicativo GENES (Cruz, 2001).

Resultados e Discussão

Foram produzidas 71 bandas RAPD como resultado das PCR realizadas com DNA extraído das plantas de sacaca vermelha, sacaca branca e da mandioca. Destas 71 bandas, 66 foram polimórficas, considerando as duas réplicas dos experimentos, realizadas em dias diferentes (Figura 1). Dentre estas bandas foram selecionadas aquelas com grau de reprodutibilidade igual ou superior a 2/3, utilizadas para as análises genéticas. O grau de reprodutibilidade foi calculado como no exemplo a seguir: banda presente em sacaca branca, presente em sacaca vermelha e ausente em mandioca, na primeira réplica; mas ausente em sacaca branca, presente em sacaca vermelha e presente em mandioca, na segunda réplica, apresentaram grau de reprodutibilidade igual a 1/3 e os dados binários a elas referentes não foram admitidos para os cálculos dos índices de diversidade. Então, depois da eliminação daquelas com grau de reprodutibilidade abaixo de 2/3, restaram 31 bandas para as análises genéticas.

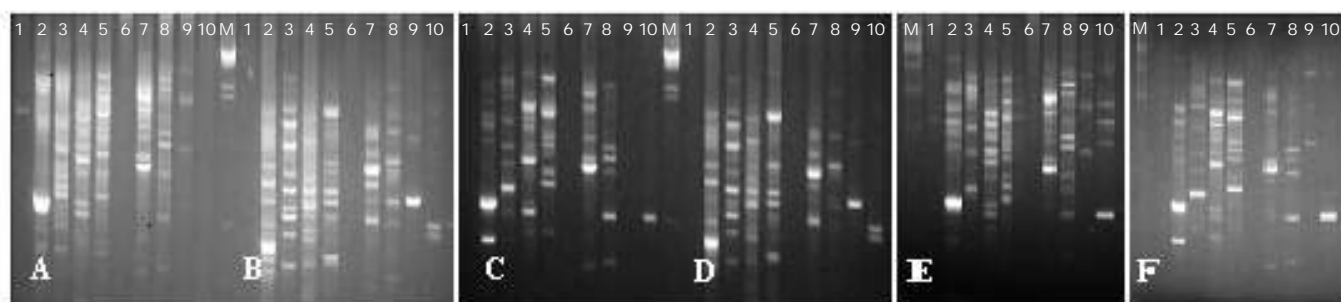


Fig. 1. Imagem do resultado da eletroforese de padrões RAPD gerados com DNA extraído de plantas de sacaca branca, sacaca vermelha (*C. cajuçara*) e mandioca cultivar BRS-Purus (*Manihot esculenta*). A, B e C são padrões gerados na primeira vez em que os experimentos foram realizados (primeira réplica) para plantas de sacaca branca, sacaca vermelha e mandioca cultivar BRS-Purus, respectivamente. D, E e F são padrões gerados da segunda vez em que os experimentos foram realizados (segunda réplica), para plantas de mandioca, sacaca branca e sacaca vermelha, respectivamente (Embrapa Amazônia Ocidental - Manaus/AM). M = marcador de peso molecular. Os números indicam os "primers" utilizados.

O índice de similaridade genética entre as sacacas branca e vermelha, calculado quando todas as bandas RAPD geradas foram admitidas, foi 0,7080 para a primeira réplica e 0,6980 para a segunda réplica. A similaridade calculada entre a sacaca branca e a mandioca foi 0,4680 e 0,4250, na primeira e na segunda réplicas,

respectivamente, e a similaridade calculada entre a sacaca vermelha e a mandioca foi 0,3690 e 0,4340, para a primeira e a segunda réplicas, respectivamente (Tabela 1, B, C e D). Quando as bandas produzidas na primeira réplica foram tomadas em conjunto com aquelas produzidas na segunda para o cálculo dos índices de

similaridade, foi encontrado ainda um terceiro conjunto de valores, sendo 0,7200 para a similaridade entre os dois morfotipos de sacaca, 0,4250 para a similaridade entre a sacaca branca e a mandioca e 0,2960 para a similaridade entre a sacaca vermelha e a mandioca (Tabela 1, D).

Tabela 1. Índices de similaridade calculados utilizando o Coeficiente de Sorenson/Nei & Li para plantas de sacaca branca e vermelha (*C. cajuçara*) e mandioca cultivar BRS-Purus (*M. esculenta*) (Embrapa Amazônia Ocidental - Manaus/AM).

A - bandas RAPD com reprodutibilidade acima de 2/3 em cada repetição e para as duas repetições tomadas simultaneamente

sacaca branca x mandioca.....	0,4555
sacaca branca x sacaca vermelha.....	0,8000
sacaca vermelha x mandioca.....	0,2439

B - bandas RAPD produzidas na primeira repetição sem análise de reprodutibilidade

sacaca branca x mandioca.....	0,4680
sacaca branca x sacaca vermelha.....	0,7080
sacaca vermelha x mandioca.....	0,3690

C - bandas RAPD produzidas na segunda repetição sem análise de reprodutibilidade

sacaca branca x mandioca.....	0,5050
sacaca branca x sacaca vermelha.....	0,6980
sacaca vermelha x mandioca.....	0,4340

D - bandas RAPD produzidas para as duas repetições sem análise de reprodutibilidade

sacaca branca x mandioca.....	0,4250
sacaca branca x sacaca vermelha.....	0,7200
sacaca vermelha x mandioca.....	0,2960

Resultados bastante diferentes foram encontrados depois da eliminação das bandas com reprodutibilidade abaixo de 2/3. Os valores encontrados para os índices de similaridade foram sempre os mesmos, quer fossem admitidas apenas as bandas obtidas na primeira réplica, aquelas obtidas na segunda réplica ou todas elas em conjunto. Esses valores foram 0,8000 para a similaridade entre sacacas branca e vermelha, 0,4555 entre a sacaca branca e a mandioca e 0,2439 entre a sacaca vermelha e a mandioca (Tabela 1, A).

Esses resultados foram tomados como demonstração de que houve influência de bandas com reprodutibilidade abaixo de 2/3 sobre o cálculo dos índices de similaridade genética e que esta influência foi eliminada com a eliminação daquelas bandas. Observou-se ainda que os valores calculados para os índices por admissão de 71 bandas não selecionadas quanto à reprodutibilidade (Tabela 1, D) aproximaram-se mais daqueles que foram calculados com um menor número de bandas (31) que, no entanto, foram selecionadas em função da reprodutibilidade (Tabela 1, A). Sendo assim é possível que experimentos deste tipo, que visam testar a reprodutibilidade das bandas, quando realizados no momento da escolha dos "primers" que serão utilizados em trabalhos de avaliação de diversidade genética, possam inclusive ser úteis, a depender da ocasião, para tornar os experimentos mais baratos, por redução do número de bandas e/ou de "primers", e, portanto, de reações de PCR necessárias para que as análises mantenham-se igualmente informativas.

Detectou-se variabilidade entre as plantas de sacaca testadas, o que foi considerado suficiente para justificar a realização de experimentos mais completos, incluindo os outros acessos mantidos no Banco Ativo de Germoplasma de *Croton* (Figura 2). Observou-se que a sacaca branca apresentou maior similaridade com a mandioca do que a sacaca vermelha (Tabela 1).



Fig. 2. Representação gráfica - dendrograma - da diversidade genética calculada para plantas de sacaca branca e vermelha (*C. cajuçara*) e mandioca cultivar BRS-Purus (*M. esculenta*). O método de agrupamento utilizado foi do vizinho mais próximo. 1 - sacaca branca; 2 - mandioca; 3 - sacaca vermelha (Embrapa Amazônia Ocidental - Manaus/AM).

Conclusões

Os métodos utilizados para a geração e análise de padrões RAPD foram úteis para detectar diversidade genética entre plantas de sacaca;

A eliminação de bandas RAPD com reprodutibilidade abaixo de 2/3 resultou na obtenção de índices de similaridade idênticos para réplicas dos experimentos;

Plantas de sacaca branca e vermelha divergiram com valores diferentes da planta de mandioca utilizada como "outside species".

Referências Bibliográficas

ARAÚJO, V. C. et al. Óleos essenciais da Amazônia contendo linalol. *Acta Amazônica*, v. 1, n. 3, p. 45-47, 1971.

CHAVES, F. C. M. et al. (2003). Diferença na composição química do óleo essencial de folhas de dois morfotipos de sacaca (*Croton cajuçara* Benth). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 2., 2003, Campinas. Diagnóstico e perspectivas. Campinas: IAC, 2003. p. 155. (Documentos IAC, 74).

CRUZ, C. D. Programa Genes aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2001. p. 163-81.

KALIL FILHO, A. N. et al. Conservação de germoplasma de sacaca (*Croton cajuçara* Benth.), uma nova fonte de linalol para a Amazônia Ocidental. Manaus: EMBRAPA-CPAA, 1998. 3 p. (EMBRAPA-CPAA. Pesquisa em Andamento, 39).

PERES, J. J. R. et al. O meio ambiente e o compromisso institucional da Embrapa. Brasília: Embrapa, 2002. 87 p.

SÁ SOBRINHO, A. F. et al. Linalol, principal componente químico dos óleos essenciais da folha da sacaca (*Croton cajuçara* Benth) e da madeira do pau-rosa (*Aniba duckei* Kosterm.). Manaus: EMBRAPA-CPAA, 1998. 4 p. (EMBRAPA-CPAA. Comunicado Técnico, 15).

Comunicado Técnico, 28



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Amazônia Ocidental
Endereço: Rodovia AM 010, km 29 - Estrada
Manaus/Itacoatiara, Caixa Postal 319, 69010-970,
Manaus-AM
Fone: (92) 621-0300
Fax: (92) 232-8101 e 622-1100
E-mail: sac@cpaa.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2005): 300 exemplares

Comitê de Publicações

Presidente: *José Jackson Bacelar Nunes Xavier*
Secretária: *Gleise Maria Teles de Oliveira*
Membros: *Adauto Mauricio Tavares, Cintia Rodrigues de Souza, Edsandra Campos Chagas, Francisco Célio Maia Chaves, Gleise Maria Teles de Oliveira, José Clério Rezende Pereira, Maria Augusta Abtibal Brito, Maria Perpétua Beleza Pereira, Paula Cristina da Silva Angelo, Raimundo Nonato Vieira da Cunha e Sebastião Eudes Lopes da Silva.*

Expediente

Revisão de texto: *Maria Perpétua Beleza Pereira*
Normalização bibliográfica: *Maria Augusta Abtibal Brito*
Editoração eletrônica: *Gleise Maria Teles de Oliveira*