

RAPD como técnica para a distinção entre acessos de sacaca vermelha (*Croton cajuçara* Benth.) do Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Ocidental.

Paula Cristina da Silva Angelo⁽¹⁾, Francisco Célio Maia Chaves⁽¹⁾, Humberto Ribeiro Bizzo⁽²⁾, José Jackson Bacelar Nunes Xavier⁽¹⁾, Jeferson Chagas da Cruz⁽³⁾, Hilma Alessandra Rodrigues do Couto⁽³⁾, Irani da Silva de Morais⁽³⁾, Karola Gomes Maia Janaína⁽⁴⁾, Socorro Machado de Farias⁽⁴⁾.

⁽¹⁾ Pesquisadores III, Embrapa Amazônia Ocidental, Rod. AM 010 – Km 29, Caixa Postal 319, Zona Rural, 69011-970 – Manaus/AM, e-mail: paula@cpaa.embrapa.br; ⁽²⁾ Pesquisador III, Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501, Guaratiba, 23020-070 – Rio de Janeiro/RJ; ⁽³⁾ Laboratoristas, Embrapa Amazônia Ocidental; ⁽⁴⁾ Estagiárias, Centro Federal de Formação Tecnológica do Amazonas.

Palavras-chave: linalol, plantas medicinais, germoplasma, diversidade genética, Amazônia.

Introdução

A falta de informação sobre o material conservado *in situ* e *ex situ*, assim como uma escassa coordenação entre bancos de germoplasma e usuários de germoplasma (Ferrer & Clausen, 2001) e o pouco conhecimento sobre sua origem, atributos genéticos e produtivos (Berretta, 2001) são impedimentos para que os recursos fitogenéticos sejam bem utilizados. Caracterizações químicas de substâncias medicinais e aromáticas, em geral, também devem ser feitas (Abadie & Berretta, 2001).

A Embrapa Amazônia Ocidental mantém há cerca de 10 anos acessos de *Croton* spp., em Banco Ativo de Germoplasma (BAG) que faz parte da Rede Nacional de Recursos Genéticos, coordenada pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, com os objetivos de atender as prioridades de manutenção, valorização e melhor aproveitamento da biodiversidade resguardada em Bancos Ativos de Germoplasma de todo o país. A caracterização das plantas dos acessos de *Croton cajuçara* Benth., espécie que contém princípios ativos hipolipemiantes e hipoglicemiantes (Farias *et al.*, 1996 e 1996) e rica em linalol (Araújo *et al.*, 1971), muito valorizado pela indústria de cosméticos, deve ser o passo inicial para a definição de sistemas de produção agrícola, no ambiente da Amazônia, para o qual está adaptada, o que poderá representar uma maneira de aliviar a pressão do extrativismo não planejado em busca de linalol sobre as áreas de mata e significar fonte alternativa de renda para as populações locais.

Os objetivos deste trabalho foram gerar e utilizar marcadores RAPD (“random amplified polymorphic DNA”) para avaliar a diversidade genética dos acessos de sacaca vermelha do Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Ocidental

Material e Métodos

Material vegetal: folhas de plantas de sacaca vermelha foram tomadas dos 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. O DNA foi extraído de folhas maceradas em nitrogênio líquido utilizando tampão com CTAB e quantificado por espectrofotometria. As reações de PCR (reações de polimerização em cadeia) continham 30 ng de DNA; 2,0 mM de MgCl₂; 400 μM de dNTPs; 1,2 ng de "primer" decâmero por μL de reação; 1,5 unidade de Taq DNA polimerase e 0,1% de BSA (soroalbumina bovina), em 25 μL. Cinco "primers" decâmeros foram utilizados. O termociclador foi ajustado para ciclos de 94 °C for 5'; 35 x (94 °C por 30"; 33 °C por 45" e 72 °C por 45"); 72 °C por 5' e 4 °C por tempo indeterminado. A eletroforese foi realizada em géis de

agarose a 1,2 % com 0,5 µg/ml de brometo de etídio em tampão TBE. Os géis foram fotografados utilizando câmera Kodak DC120 e gravados como arquivos com extensão bip. A rotina “find bands” do aplicativo “1D Image Analysis Software/Kodak” foi aplicada a cada gel, sem que o parâmetro “band width” fosse alterado. As marcações assim definidas foram ajustadas manualmente ao perfil do gel, para que cada banda ocupasse o centro do pico de detecção na região em ocorreu o pico de fluorescência do brometo de etídio na sua região de abrangência. As tabelas de dados binários foram construídas depois deste procedimento. Os dados binários foram submetidos a “bootstrapping” (100 rearranjos), utilizados para a geração e reamostragem de matrizes de diversidade (5 reposicionamentos por matriz de índices clássicos de diversidade de Nei para sítios de restrição de 10 bases), agrupados e representados graficamente utilizando os aplicativos PHYLIP versão 3.6 (Felsenstein, 2004).

Resultados e Discussão

As plantas foram agrupadas em seis “clusters” principais, que podem ser correlacionadas com as quatro regiões de origem dos acessos do Banco de Germoplasma. Existem três acessos compostos por plantas coletadas em Belterra/PA, entre os quais o acesso formado pelas plantas 8, 9 e 10 (acesso A3) apresentou agrupamento mais coeso e identidade mais típica de acesso. As plantas 62 e 63 que vieram de Belém/PA também apresentaram coesão no agrupamento e apresentou-se como grupo destacado das demais. Plantas de Santarém/PA, constituintes de dois acessos, foram todas reunidas em um “cluster”, dentro do qual, no entanto, não se observou a distinção entre os acessos. O mesmo ocorreu para plantas oriundas de Rio Branco/AC (Figura 1).

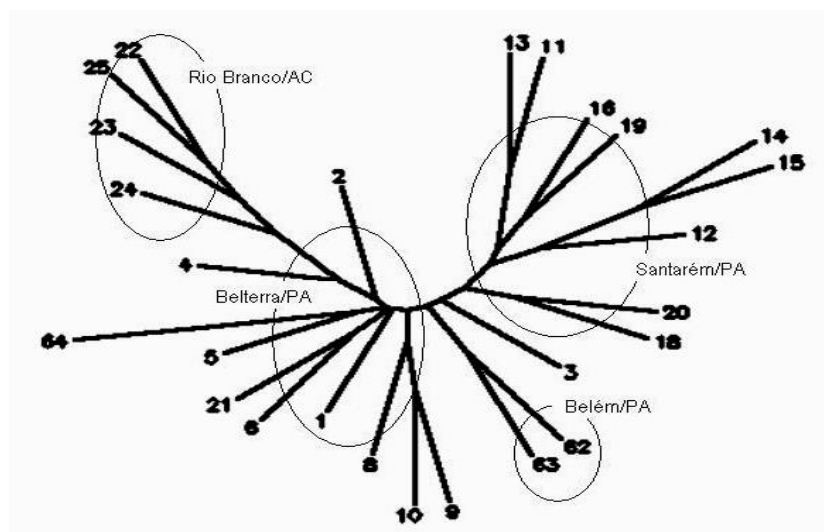


Figura 1. Agrupamento de plantas de oito acessos de sacaca (*Croton cajuçara* Benth.) vermelha do Banco de Germoplasma do Gênero *Croton* da Embrapa Amazônia Ocidental. 1 a 10 e 64 – plantas dos acessos A2, A3 e A4-3ª. introdução, oriundas de Belterra/PA; 11 a 16 – plantas do acesso A5-3ª. introdução, oriundas de Santarém/PA; 17, 18 e 19 – plantas do acesso A6-3ª. introdução, oriundas do Bosque Sta. Lúcia, Santarém/PA; 22, 23 e 24 – plantas do acesso A7-3ª. introdução, oriundas de Rio Branco/AC; 25 – planta do acesso A8-3ª. introdução, oriunda de Rio Branco/AC; e, 62 e 63 – plantas do acesso BE/PA, oriundas de Belém/PA.

Estes resultados podem ser correlacionados ao fato de que plantas dos acessos de sacaca vermelha mantidas no Banco de Germoplasma apresentam grau de diversidade genética intramorfotípica maior que o grau de diversidade estimado para plantas de sacaca branca (Angelo *et al.*, submetido) e suficiente para que a distinção entre eles seja consistente. A divergência entre o grupo de plantas de Rio Branco, cidade localizada no extremo oeste da área de coletas, e as

demais ocorreu 20% das vezes em que o agrupamento foi testado por “bootstrapping”. No leste da área de coletas, plantas oriundas de Belterra divergiram das demais, como grupo, em 14% das vezes; plantas de Belém em 11% das vezes e o grupo de plantas de Santarém destacou-se das demais em 27% das vezes.

Conclusão

Os resultados gerados com marcadores moleculares RAPD foram suficientes para distinguir grupos de acessos de sacaca vermelha do Banco de Germoplasma do Gênero *Croton* da Embrapa Amazônia Ocidental oriundos de localidades diferentes da região norte.

Referências Bibliográficas

- Abadie, T.; Berretta, A. 2001. Caracterización e evaluación de recursos fitogenéticos. In: PROCISUR – Estrategia en recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur. Berretta, A. & Rivas, M. (Coords.). Montevideo, PROCISUR.
- Angelo, P.C.S.; Chaves, F.C.M.; Bizzo, H.R.; Xavier, J.J.B.N.; Cruz, J.C.; Lira, M.P. Genetic diversity in sacaca (*Croton cajucara* Benth.) accessed by RAPD markers (submetido).
- Araújo, V.C.; Corrêa, G.C.; Maia, J.G.S.; Silva, M.L.; Gottlieb, O.R.; Marx, C.R.; Magalhães, M.T. 1971. Óleos essenciais da Amazônia contendo linalol. *Acta Amazonica*, 1(3): 45-47.
- Berretta, A. 2001. Introducción. In: PROCISUR – Estrategia en recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur. Berretta, A. & Rivas, M. (Coords.). Montevideo.
- Farias, R.A.F.; Neto, M.F.O.; Viana, G.S.B.; Rao, V.S.N. 1996. Efectos of *Croton cajucara* extract on serum lipids of rats fed a high fat diet. *Phytotherapy Research*, 10(8): 697-699.
- Farias, R.A.F.; Rao, V.S.N.; Viana, G.S.B.; Silveira, E.R.; Maciel, M.A.M.; Pinto, A.C. 1997. Hypoglycemic effect of trans-dehydrocrotonin a nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara*. *Planta Medica*, 63(6): 558-560.
- Felsenstein, J. 2004. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. *Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle*
- Ferrer, M.E. & Clausen, A.M. 2001. Variabilidad genética en los recursos vegetales de importancia para la agricultura del Cono Sur. In: PROCISUR – Estrategia en recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur. Berretta, A. & Rivas, M. (Coords.). Montevideo.