

Anais



V Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Amazônia Ocidental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Anais da V Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental

*Francisco Célio Maia Chaves
Luadir Gasparotto
Lucinda Carneiro Garcia
Marcos Vinícius Bastos Garcia
Ricardo Lopes
Wenceslau Geraldes Teixeira
Editores Técnicos*

*Embrapa Amazônia Ocidental
Manaus, AM
2009*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Amazônia Ocidental

Rodovia AM-010, km 29, Estrada Manaus/Itacoatiara

Caixa Postal 319, 69010-970, Manaus, AM

Fone: (92) 3303-7800

Fax: (92) 3303-7820

www.cpaa.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Celso Paulo de Azevedo*

Secretária: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

Membros: *Aparecida das Graças Claret de Souza*

José Ricardo Pupo Gonçalves

Lucinda Carneiro Garcia

Luís Antonio Kioshi Inoue

Maria Augusta Abtibol Brito

Maria Perpétua Beleza Pereira

Paulo César Teixeira

Raimundo Nonato Vieira da Cunha

Ricardo Lopes

Ronaldo Ribeiro de Moraes

Revisão de texto: *Maria Perpétua Beleza Pereira*

Normalização bibliográfica: *Maria Augusta Abtibol Brito*

Diagramação e arte: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

1ª edição

1ª gravação em CD-ROM (2009): 200

Todos os direitos reservados.

**A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).**

**CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Amazônia Ocidental.**

Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental (5. : 2009 : Manaus).

Anais... / editores Wenceslau Gerales Teixeira, Lucinda Carneiro Garcia, Luadir Gasparotto, Marcos Vinicius Bastos Garcia, Ricardo Lopes e Francisco Célio Maia Chaves. – Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2009.

1 CD-ROM; 4[×] pol.

ISBN 978-85-89111-07-2

1. Pesquisa. 2. Desenvolvimento. I. Teixeira, Wenceslau Gerales. II. Garcia, Lucinda Carneiro. III. Gasparotto, Luadir. IV. Garcia, Marcos Vinicius Bastos. V. Lopes, Ricardo. VI. Chaves, Francisco Célio Maia. VII. Título.

CDD 501

Seção VII – Plantas Medicinais

Análise Preliminar da Diversidade entre Plantas de Crajiru Mantidas na Coleção de Plantas Medicinais Aromáticas e Condimentares da Embrapa Amazônia Ocidental

Natália Dayane Moura Carvalho
Paula Cristina da Silva Angelo
Francisco Célio Maia Chaves

Resumo

Na região de Manaus, AM, há três tipos de plantas reconhecidas pelo nome vulgar crajiru (tipos I, II e III), os quais apresentam diferenças na morfologia externa. Acessos dos três tipos são mantidos na Coleção de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares por mais de uma década, sem florescer. Na literatura científica, o nome vulgar crajiru é associado à espécie *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verl. O chá de crajiru é utilizado como fitoterápico. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade entre acessos de crajiru mantidos na coleção da Embrapa, utilizando marcadores moleculares RAPD. Para os padrões gerados por um marcador, observou-se tendência entre as plantas dos diferentes acessos a agruparem-se conforme o tipo, em um maior número de clados, do que conforme o local de coleta. Maior número de locos polifórmicos precisa ser acessado para fornecer confiabilidade aos resultados.

Termos para indexação: *Arrabidaea*, diversidade genética, polimorfismo, RAPD.

Introdução

Na medicina tradicional, o chá das folhas de cajuira é utilizado, principalmente, na região amazônica, como adstringente, antiespasmódico, no tratamento da leucemia e da anemia e na lavagem de feridas (LORENZI e MATOS, 2002).

Na região de Manaus, convencionou-se que existem pelo menos três tipos de cajuira, sendo mais frequentemente encontrado o tipo I. Os tipos I, II e III apresentam diferenças de hábito e de morfologia das folhas, sendo mais comum nos quintais o tipo I (Francisco Célio Maia Chaves, informação pessoal). Dos acessos mantidos na Coleção de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares da Embrapa Amazônia Ocidental, o tipo I é um arbusto ereto, que apresenta folhas trifolioladas, com folíolos lanceolados. Os tipos II e III apresentam-se como arbustos que têm características de plantas escandentes, como ramos novos pouco lenhosos e muito flexíveis. No tipo II, as folhas inseridas nos dois nós mais apicais apresentam uma gavinha muito delicada, ladeada por dois folíolos elípticos. Os três entrenós apicais são mais longos que os restantes de um mesmo ramo e as folhas inseridas a partir do terceiro nó são trifolioladas e não apresentam gavinhas. No tipo III, as folhas inseridas até o terceiro ou quarto nó podem apresentar gavinhas robustas ladeadas por dois folíolos elípticos e largos. Os quatro ou cinco entrenós apicais são longos e bastante flexíveis e as folhas inseridas a partir do terceiro ou quarto nó são trifolioladas. Essas plantas ainda não foram vistas florescendo.

Arrabidaea chica Verlot é reconhecida pelos nomes comuns cajuira, cajuru, pariri, chica, entre outros, e pertence à ordem *Lamiales*, família *Bignoniaceae*. Entre os três tipos de cajuira da Coleção de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares da Embrapa Amazônia Ocidental, o tipo II é similar ao *especimen*-tipo para *A. chica* var. *acutifolia*,

exsicata mantida no New York Botanical Garden (http://www.nybg.org/bsci/online_pubs.html). O gênero *Arrabidaea* ocorre na América Tropical, do sul do México até o Brasil Central e inclui várias espécies, além de *A. chica*. Esta é uma espécie que, segundo Lorenzi & Matos (2002), cresce nas matas tropicais, principalmente nas bordas das florestas, sobretudo as secundárias. Possui folhas compostas bi ou trifolioladas, de folíolos oblongo-lanceolados, cartáceos, de 8 cm–13 cm de comprimento, flores campanuladas de cor róseo-lilacina, dispostas em panículas terminais, e frutos que são síliquas deiscentes.

Entre os registros de coletas de *A. chica* na região da Amazônia Brasileira que foram encontrados na página do *New York Botanical Garden* (<http://scium.nybg.org>), em julho de 2002, e que incluíam o município e/ou as coordenadas do ponto de coleta, existiam três relatos de *especimens* floridos no Estado do Acre e um de material estéril, sendo este último mencionado como arbusto de 1,5 m e os demais como plantas escandentes. Para as flores, há três relatos de coloração lilás, ou similar, para corolas e um de coloração branca.

Análises fitoquímicas preliminares do extrato bruto das folhas desses três tipos de cajuira indicaram a presença de taninos, flavonoides e saponinas. O perfil do extrato metanólico do morfotipo III foi menos intenso no sistema clorofórmio-acetato de acetila (1:1) em sílica gel e os autores consideraram necessário dar continuidade à investigação química para identificar marcadores químicos específicos para cada um dos tipos (MESQUITA e FARIAS, 2003).

A presença de componentes minerais tais como Fe, Cu, Mn e Zn poderia estar associada às atividades terapêuticas, por serem essenciais ao equilíbrio bioquímico e fisiológico do organismo, atuando como cofatores na maioria das reações metabólicas. No entanto, apresentaram-se

em quantidades inferiores à necessária para sugerir uma atividade terapêutica como antianêmico (SOARES et al., 2002).

A caracterização molecular tem sido realizada por vários objetivos, entre eles a quantificação da diversidade genética e a determinação da estrutura genética de populações naturais. A diversidade genética é estimada através dos índices de dissimilaridade entre pares de indivíduos ou populações, e essas medidas de diversidade são representadas graficamente através de métodos de agrupamento (OLIVEIRA, 2005).

Os marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) apresentam como característica básica a dominância, ou seja, eles não permitem distinguir indivíduos homozigotos de heterozigotos em uma população. A sensibilidade da técnica não permite discriminar quantitativamente os dois casos (BORÉM e CAIXETA, 2006), quando ocorre a geração de produto de amplificação. De qualquer forma, o polimorfismo detectado por esses marcadores tem natureza binária, ou seja, determinado fragmento ou banda está presente ou ausente no gel, e bandas de tamanhos diferentes são consideradas locos diferentes (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Marcadores RAPD apresentam vantagens, podendo ser destacados: simplicidade, rapidez na obtenção de resultados, baixo custo, *primers* aleatórios são facilmente adquiridos, não necessitando de informação genética prévia sobre a espécie estudada, os mesmos *primers* podem ser aplicados a qualquer tipo de organismo. Entretanto, apresentam limitações sendo consideradas duas mais importantes: a característica dominante dos marcadores RAPD que não permitem a diferenciação de indivíduos heterozigotos e, conseqüentemente, a obtenção de outras informações relevantes para estudos genéticos e a baixa reprodutibilidade de algumas bandas (LACERDA et al., 2002).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética entre os acessos mantidos na Coleção de Plantas Medicinais Aromáticas e Condimentares da Embrapa Amazônia Ocidental utilizando marcadores moleculares do tipo RAPD.

Material e Métodos

Material vegetal

As análises foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental. Foram utilizados 12 acessos de cajuru mantidos na Coleção de Plantas Medicinais Aromáticas e Condimentares da Embrapa e uma espécie de ipê (*Tabebuia impetigiosa*), encontrada na área da mesma Instituição. Os acessos de cajuru foram classificados segundo o tipo, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Relação dos acessos de cajuru utilizados no estudo da diversidade genética por meio de marcadores RAPD.

Acesso	Local de coleta	Tipo
A	Rio Preto da Eva /AM	1
B	Manaquiri /AM	1
C	Goiânia/ GO	1
D	Rio Branco/ AC	1
E	Barcelos /AM	1
F	Embrapa - CPAA/AM	2
G	Propriedade do Sr. Alan	2
H	Rio Preto da Eva /AM	2
I	Belém/ PA	3
J	Belém/ PA	1
L	Belém/ PA	2
M	Belém/ PA	3

Extração do DNA

A extração do DNA de cajuru e de ipês rosa e amarelo foi efetuada utilizando o protocolo de Doyle e Doyle (1987). Em um tubo de volume total de 50 ml foram colocados 3 g de tecido de folha macerado no almofariz com o auxílio de nitrogênio líquido e depois adicionados 15 ml de tampão de extração (pré-aquecido a 65 °C

com 0,2% mercaptoetanol). As amostras foram incubadas por 30 minutos a 65 °C em banho-maria, agitadas a cada 10 minutos. Sucédidos 60 minutos, foram retiradas as amostras e deixadas por 10 minutos na bancada, para retornarem à temperatura ambiente, para então adicionar 15 mL de CIA (clorofórmio-álcool isoamílico 24:1). As amostras foram agitadas lentamente por 10 minutos e centrifugadas na macrocentrifuga por 20 minutos a 4.000 rpm em temperatura ambiente. Após essa etapa, a fase superior foi transferida para um novo tubo e adicionado 0,6 volume de isopropanol (-20° C). A mistura foi obtida por inversão dos tubos por cerca de 10 minutos, em seguida centrifugados por 30 minutos a 4.000 rpm, para descartar o sobrenadante. O precipitado foi lavado uma vez com 5 ml de etanol 70% por 10 minutos e uma vez com 5 ml de etanol 100% por 5 minutos. Em seguida, deixou-se o *pellet* secar na bancada para então suspendê-lo em 250 µl de TE contendo RNase (10 µg/ml) e incubar a 37° C por 30 minutos.

Quantificação do DNA

Foi realizada análise espectrofotométrica no aparelho GeneQuant pro RNA/DNA Calculador (Amersham Pharmacia Biotech). A razão entre as leituras espectrofotométricas a 260 e a 280 nm foi utilizada para a estimativa da pureza do DNA. Além disso, foi realizada a análise de géis de eletroforese com quatro concentrações de DNA do bacteriófago Lambda, sendo de 25 ng, 50 ng, 75 ng, 100 ng e 150 ng, como padrões e diversos volumes das soluções de DNA de cajuru e ipê. A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 0,8%, usando o tampão TBE (1 x) e brometo de etídeo (0,5 µg/ml) para quantificação das amostras de DNA. Após a corrida, o gel foi fotografado sob iluminação UV (300 nm), e as fotografias, registradas pelo sistema de fotodocumentação da Kodak.

Amplificação do DNA

As reações de PCR foram realizadas com as alterações, em seguida foram introduzidas nas reações com 400 nM de *primers* 03/2002 e 24/2002; 2 mM de MgCl₂; 100 µM de cada dNTP. A amplificação realizou-se no termociclador (Thermo Electron Corporation PxE 0.2 Thermal Cycler). Cada ciclo se compunha de uma desnaturação de DNA a 94° C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94° C (desnaturação), 45 segundos a 33° C (anelamento dos *primers*) e 45 segundos a 72° C (extensão do *primer*), finalizando com 7 minutos a 72° C, para extensão final.

Cálculo do Índice de Diversidade e Agrupamento

Os padrões de bandas obtidos foram transformados em dados binários, utilizando a codificação 0 para ausência de bandas e 1 para a presença. Os dados binários foram utilizados para o cálculo dos Índices de Diversidade de Nei & Li entre pares de plantas, e a matriz de diversidade serviu de base para gerar o agrupamento pelo método Fitch-Margoliash. Essas análises foram realizadas utilizando o aplicativo PHYLIP (versão 3.65).

Então, o *primer* 03/2002 gerou 15 bandas, todas polimórficas, com tamanhos entre 350 e 2.000 pares de bases, aproximadamente. Não houve sucesso nas amplificações utilizando outros *primers* selecionados, com exceção do *primer* 24/2002, que possibilitou a geração de apenas uma banda por indivíduo, monomórfica (resultado não apresentado).

Os índices de dissimilaridade de Nei & Li entre pares de plantas calculados a partir dos dados binários estão apresentados na Figura 2.

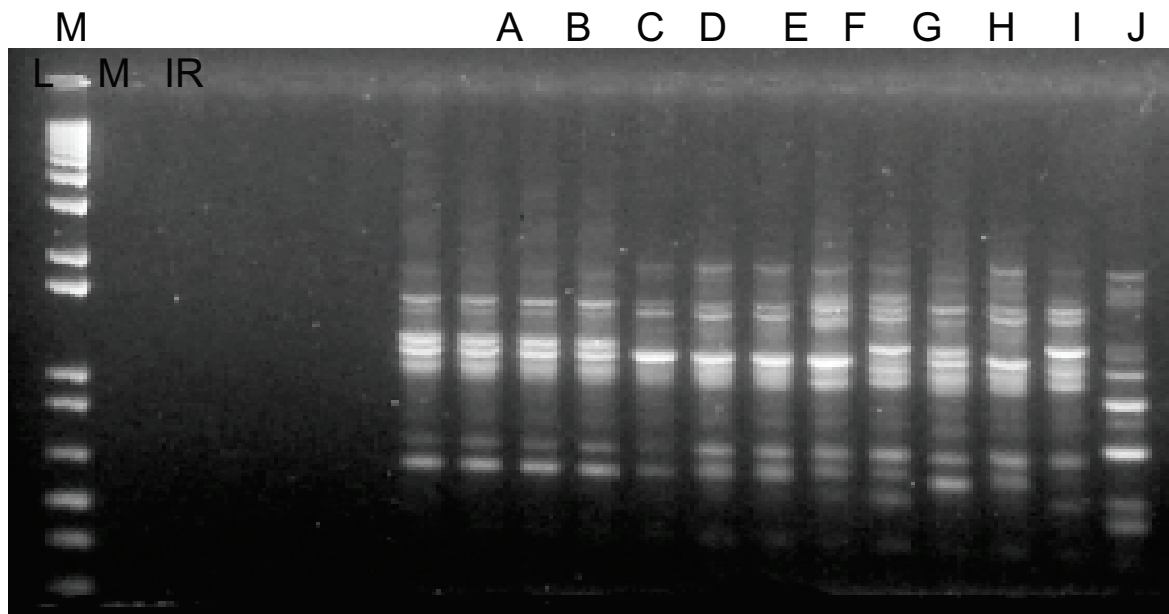


Fig. 1. Amplificação dos acessos de craijuru e uma espécie de ipê-rosa com o *primer* 03/2002. M = marcador molecular 1 kb Ladder Plus. Os códigos acima das canaletas indicam os acessos de craijuru (A a M) e a planta de ipê rosa (IR).

A														
B	0.000000	B												
C	0.000000	0.000000	C											
D	0.000000	0.000000	0.000000	D										
E	0.031931	0.031931	0.031931	0.031931	E									
F	0.018260	0.018260	0.018260	0.018260	0.009539	F								
G	0.018260	0.018260	0.018260	0.018260	0.009539	0.000000	G							
H	0.040685	0.040685	0.040685	0.040685	0.033742	0.022356	0.022356	H						
I	0.034933	0.034933	0.034933	0.034933	0.047187	0.034933	0.034933	0.010545	I					
J	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.031931	0.018260	0.018260	0.040685	0.034933	J				
L	0.018260	0.018260	0.018260	0.018260	0.009539	0.000000	0.000000	0.022356	0.034933	0.018260	L			
M	0.040685	0.040685	0.040685	0.040685	0.056227	0.040685	0.040685	0.025184	0.010545	0.040685	0.040685	M		
IR	0.205074	0.205074	0.205074	0.205074	0.197927	0.205074	0.205074	0.110899	0.069723	0.205074	0.205074	0.081654		

Fig. 2. Índices de diversidade entre acessos de craijuru e ipê-rosa, determinados utilizando padrões de 15 bandas RAPD polimórficas.

Os maiores índices de diversidade foram encontrados entre o ipê, que foi utilizado como “out group” e os acessos de craijuru. A representação gráfica das relações entre os acessos está apresentada no agrupamento da Figura 3.

Obviamente será necessário acessar mais locos para que os resultados apresentem confiabilidade. No entanto, verifica-se que há uma tendência para que a maioria dos acessos dos tipos I e II agrupe-se conforme o tipo morfológico, e

não conforme o local de coleta. Vide, por exemplo, os clados formados pelos acessos A a D e J, de plantas do tipo I e pelos acessos F, G e L que são de plantas do tipo II embora tenha sido incluído nesse clado o acesso E que é do tipo I (Fig. 3).

No herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (Inpa), criado há mais de cinco décadas, e que constitui a maior referência da biodiversidade da Amazônia, há pelo menos 30 exsicatas identificadas como *A. chica* (Tabela 3).

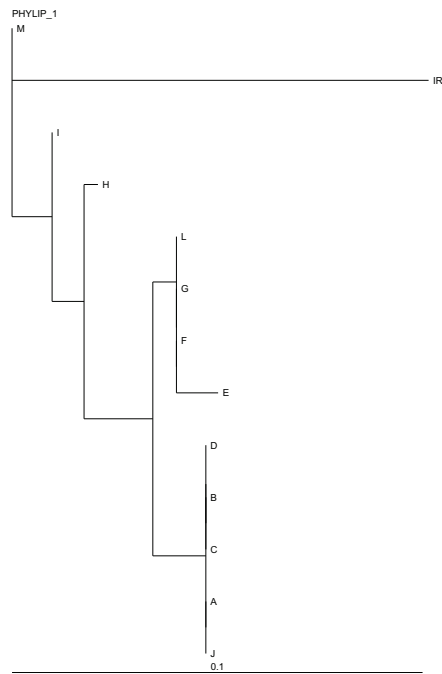


Fig. 3. Agrupamento de plantas de acessos de crajiru da Coleção de Plantas Medicinais Aromáticas e Condimentares da Embrapa da Embrapa Amazônia Ocidental. **A a M** – acessos de crajiru; **IR** – ipê-rosa.

Tabela 3. Número e algumas características das exsiccatas do acervo do herbário do Inpa que foram identificadas como *A. chica* e variedade dessa espécie.

Número da exsicata	Local de coleta	Anotações na exsicata	Observações
153.290 - A	Ilha do Careiro - Terra Nova - AM	Cipó, trifoliolada com folíolos estreitos e finos	Similar ao tipo I
37.069	Estrada Manaus-Porto Velho - RO	Trepadeira com flores lilases, sem gavinhas	-
48.911	Equador - Los Rios	Cipó, flores magenta, frutos verdes	-
48.945	Equador – Los Rios	-	-
49.558	Venezuela - Barinas	Cipó, flores magenta claras com tubo branco, frutos marrons	Similar ao tipo II
54.427	Estrada de Itacoatiara - AM	-	Similar ao tipo III
54.482	Inpa - AM	Bifolioladas, com gavinhas	-
57.129	Inpa - AM	Trifolioladas, sem gavinhas	Similar ao tipo I
80.573	Estrada Porto Velho, Km 387 - RO	Bifolioladas, com gavinhas robustas	-
95.477	Humaitá - AM	Bifolioladas, com gavinhas	-

Tabela 3. Continuação.

Número da exsicata	Local de coleta	Anotações na exsicata	Observações
105.477	Humaitá - AM	Trepadeira, folhas trifolioladas, flor lilás, anemocorica	-
106.231	Santarém - PA	Bi ou trifolioladas, com gavinhas	Similar ao tipo I
108.794	The New York Botanical Garden	Cipó, flores púrpura, trifolioladas, com gavinhas	Similar ao tipo II
109.951	-	<i>A. chica</i> var <i>cuprea</i> . com gavinhas, flores rosada escura, capoeira e escandente	Similar ao tipo II
112.898	Laranjeira do Sul - Paraná	Trepadeira, flor rosada, orla da mata	-
117.600	Cachoeira Porteira - PA	Bi ou trifolioladas, com gavinhas, frutos semelhante a legumes	-
124.792	Rio Branco - AC	Folhas trifolioladas , sem gavinhas	-
146.110	-	Cipó cultivado, bifoliolada, folhas elípticos	-
161.538	Inpa - AM	Folhas trifolioladas, sem gavinhas	Similar ao tipo I
161.538	Manaus – LBA - AM	Trifolioladas, sem gavinhas	Similar ao tipo I
161.671	Inpa - AM	Folhas trifolioladas	Similar ao tipo I
167.809	Mineração Rio do Norte,	(<i>A. candicans</i>). Cipó com folhas bi e trifolioladas	-
171.194	Estrada da Mina, Km 5 - PA Mineração Rio do Norte	Sem gavinhas, bi ou trifolioladas, flores	-
171.204	Porto Trombetas - PA	Cipó grosso, forte, flores	Similar ao tipo III
173.419	Fazenda Caranã - PA	Folhas obovadas, parecida com Fabacea	-
176.122	Distrito da Suframa - AM	-	-
199.548	Mineração Rio do Norte,	Bi ou trifolioladas, gavinhas	Similar ao tipo I
209.415	Porto Trombetas - PA Cantá - RR Beruri - AM	Bifolioladas acima de alguns nós e trifolioladas abaixo de alguns nós	Similar ao tipo III
214.794	Embrapa - AM	-	Similar ao tipo III
215.005	Tarumã- Mirim - AM	Folhas finas e alongadas, sem flores, sem gavinhas	Similar ao tipo I

Entre essas exsicatas, apenas uma está identificada até o taxon de variedade. Aquelas que apresentam folíolos e gavinhas dispostos de maneira similar aos tipos mantidos na Embrapa receberam observações na Tabela 3. No entanto, existem exsicatas com folíolos bastante diferentes daqueles três tipos, inclusive obovados. As anotações dos coletores que acompanham as exsicatas descrevem número variado de folíolos, presença e ausência de gavinhas. Entre os tipos II e III na Embrapa, essa variação também é visível e pode tratar-se de um tipo de heterofilia. No entanto, no tipo I, na Embrapa, não foram observadas gavinhas em nenhum dos ramos dos arbustos, desde os basais, mais antigos, até os apicais, e não se observaram folhas semelhantes àquelas dos tipos II e III. Uma observação interessante é que entre as exsicatas observadas no Inpa apenas naquelas semelhantes ao tipo I constavam anotações de uso medicinal.

Conclusões

Tomando todos os resultados e observações em conjunto, é possível considerar a hipótese, que precisa ser testada, de que os tipos mantidos na Coleção da Embrapa podem ser representantes de, por exemplo, variedades diferentes de *A. chica*.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq pela bolsa de iniciação científica, ao técnico do laboratório de Biologia Molecular, Jeferson Chagas da Cruz, ao pesquisador Gilvan Ferreira da Silva, a Michelly Cristo e demais estagiários do Laboratório de Biologia Molecular.

Referências

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: Editora JARD, 2006. 374 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

LACERDA, D. R. et al. **A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas**. Belo Horizonte: Editora Lundiana, 2002. v. 3, n. 2. p. 87-92.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 85 p.

MESQUITA, L. S. B.; FARIAS, A. A. Análise cromatográfica comparativa dos extratos brutos das variedades de cajuru-*Arrabidaea chica* Verlot. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS, 12., 2003, Manaus. **Anais...** Manaus: Amazon Graphic, 2003. p. 52.

OLIVEIRA, M. do S. P. **Caracterização molecular e morfo-agronômica de germoplasma de açaizeiro**. 2005. 23 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SOARES, A de O. et al. Estudo dos compostos inorgânicos presentes nas folhas de *Arrabidaea chica* Verl. em relação a sua utilização popular como antianêmico. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS, 10., 2002, Manaus. **Anais...** Manaus: Amazon Graphic, 2002.

The New York Botanical. Disponível em: <http://scisu.nybg.org:8890/searchdb/owa/wwwcatalog.search_list>. Acesso em: 23 jul. 2002.