

Determinação de variabilidade genética em *Cymbopogon* sp., *Stipa tenacissima* L. e *Andropogon schoenanthus* L. usando Marcadores RAPD

Lindomar Alberto Lerin¹, Jeferson Luis Cechet², Gabriele Gaiki³, Viviane Astolfi⁴,
Leandro Rodrigues Borges⁵, Altemir José Mossi⁶, Rogério Luis Cansian⁷

Introdução

O emprego das plantas medicinais vem evoluindo ao longo dos anos desde as formas mais simples de tratamento local até as formas tecnologicamente sofisticadas da fabricação industrial, tendo a propriedade de provocar reações benéficas no organismo capazes de resultar na recuperação da saúde.

O gênero *Cymbopogon* sp. é conhecido popularmente como citronela, pertence à família Poaceae. Seu uso, tanto para fins industriais como em hortas caseiras é largamente difundido no Brasil. A planta contém aproximadamente 0,5 % de óleo essencial, tendo como compostos majoritários o citral e mirceno. Industrialmente, o óleo é utilizado como aromatizante de ambientes e, principalmente, como substrato para a síntese de vitamina A [1].

O esparto (*Stipa tenacissima* L.) pertence ao gênero *Stipa* que inclui mais de 300 espécies [2], e ocorre no sul do Brasil tendo o seu limite de distribuição o Planalto do Paraná, [3].

O capim-limão (*Andropogon schoenanthus* L.) é rico em óleo de citroleína que fornece o odor característico do capim limão, possuindo ação calmante e digestiva.

Devido a condições ambientais e características genéticas próprias de cada genótipo, diferentes materiais ou cultivares de uma mesma espécie podem ter respostas diferenciadas nas características agrônomicas e de composição química.

Assim, torna-se relevante o estudo da variabilidade genética entre plantas de uma mesma espécie e entre espécies de um mesmo gênero com características fitoquímicas semelhantes, visando identificar genótipos superiores que, independentemente de condições ambientais, apresentem um ganho em quantidade e qualidade do produto.

Este trabalho teve como objetivo estudar a variabilidade genética intraespecífica em citronela, esparto e capim-limão, de matrizes presentes no banco

de germoplasma da URI Campus de Erechim, buscando genótipos diferenciados, a fim de obter-se materiais superiores para posterior multiplicação e utilização comercial.

Material e métodos

Cada espécie foi representada por 10 plantas coletadas aleatoriamente no Banco de Germoplasma da URI - Campus de Erechim. As folhas coletadas foram imediatamente armazenadas em freezer à - 80°C até a extração do DNA.

Para o isolamento de DNA total de cada planta foi utilizado o método descrito por Doyle e Doyle [4] modificado, a fim de otimizar o processo. Quantificação em espectrofotômetro UV a 260 nm e confirmação da integridade e pureza em espectrofotômetro UV a 280 nm.

A amplificação foi realizada em termociclador (modelo PTC 100, MJ Research INC., Watertown, MA), utilizando a reação descrita por Williams *et al.* [5] e os primers (OPA10, OPA18, OPA20, OPH04, OPH18, OPW01, OPW13, OPW20, OPY03, OPY20) da Operon Technologies, avaliando-se a quantidade de bandas produzidas, a intensidade destas e o polimorfismo gerado pelas mesmas.

A separação eletroforética foi realizada em gel de agarose 1,4 % em cuba de eletroforese horizontal, com voltagem constante de 90 Volts. A coloração dos fragmentos realizada com brometo de etídio e a observação feita sob luz ultravioleta. Os géis foram fotografados pelo sistema fotográfico digital GEL-PRO (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

Na determinação da variabilidade genética, os dados formaram uma matriz que foi analisada com auxílio do programa computacional MVSP. O dendrograma de similaridade foi construído pelo algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages), utilizando-se o coeficiente de Jaccard. Os resultados genéticos foram avaliados considerando diferenças genéticas entre as 10 plantas representadas de cada espécie.

Resultados e Discussão

Foram considerados para análise 10 primers, em *Stipa*

1. Lindomar Alberto Lerin é Bolsista de Iniciação Científica do Laboratório de Biotecnologia Vegetal – URI Campus de Erechim, Av 7 de Setembro, 1621, Caixa Postal 743, CEP: 99700-000. Erechim – RS, Brasil. E-mail: lindolerin@yahoo.com.br

2. Jeferson Luis Cechet é Bolsista de Iniciação Científica do Laboratório de Biotecnologia Vegetal – URI Campus de Erechim, Av 7 de Setembro, 1621, Caixa Postal 743, CEP: 99700-000. Erechim – RS, Brasil.

3. Gabriele Gaiki é Bolsista de Iniciação Científica do Laboratório de Biotecnologia Vegetal – URI Campus de Erechim, Av 7 de Setembro, 1621, Caixa Postal 743, CEP: 99700-000. Erechim – RS, Brasil.

4. Viviane Astolfi é Bolsista de Iniciação Científica do Laboratório de Biotecnologia Vegetal – URI Campus de Erechim, Av 7 de Setembro, 1621, Caixa Postal 743, CEP: 99700-000. Erechim – RS, Brasil.

5. Leandro Rodrigues Borges é Bolsista de Iniciação Científica do Laboratório de Biotecnologia Vegetal – URI Campus de Erechim, Av 7 de Setembro, 1621, Caixa Postal 743, CEP: 99700-000. Erechim – RS, Brasil.

6. Altemir José Mossi é professor e pesquisador do Laboratório de Biotecnologia Vegetal – URI Campus de Erechim, Av 7 de Setembro, 1621, Caixa Postal 743, CEP: 99700-000. Erechim – RS, Brasil. E-mail: amossi@uri.com.br

7. Rogério Luis Cansian é professor e pesquisador do Laboratório de Biotecnologia Vegetal – URI Campus de Erechim, Av 7 de Setembro, 1621, Caixa Postal 743, CEP: 99700-000. Erechim – RS, Brasil. E-mail: cansian@uri.com.br

Apoio financeiro: FAPERGS e SC&T – RS.

tenacissima onde se observou 53 fragmentos, sendo que 41,5 % mostram-se polimórficos, apresentando número médio de fragmentos por primer de 5,3 (**Tab. 1**). A similaridade (Coeficiente de Jaccard) entre 10 plantas representantes da população de *Stipa tenacissima* variou entre 0,65 e 0,95 com a média de 0,80 (**Tab. 2**).

Para as 10 plantas de *Cymbopogon* sp. obteve-se 70 fragmentos e destes 12,8 % mostram polimórficos, com número médio de fragmentos por primer de 7,0 (**Tab. 1**). Observou-se uma similaridade que variou entre 0,91 e 0,98 obtendo uma média de 0,95 (**Tab. 2**).

Nas 10 plantas de *Andropogon schoenanthus* obteve-se 71 fragmentos e destes 4,22 % mostraram-se polimórficos com número médio de 7,1 fragmentos por primer (**Tab. 1**). A similaridade (Coeficiente de Jaccard) dentre as 10 plantas de *Andropogon schoenanthus* variou de 0,93 e 0,98 com uma média de 0,96 (**Tab. 2**).

A análise de agrupamentos através do algoritmo UPGMA, dos fragmentos gerados por marcadores RAPD, permitiu separar os grupos das plantas analisadas em três grupos correspondentes a cada uma das populações avaliadas (**Fig. 1**), podendo-se utilizar esta técnica para identificação destas espécies.

Observa-se também que existe uma maior proximidade genética entre citronela e capim limão em relação ao esparto.

Esta proximidade genética se reflete nas características morfológicas levando a dificuldades de identificação das mesmas e inclusive atribuição de sinonímia entre *Cymbopogon* sp. e *Andropogon schoenanthus* [1].

Analisando-se a variabilidade intraespecífica observa-se uma maior variabilidade em esparto uma baixa variabilidade em citronela e praticamente ausência de variabilidade em capim limão (**Tab. 2**).

Estes resultados podem ser explicados pela forma propagação destas espécies, onde esparto produz sementes viáveis enquanto que citronela produz sementes atrofiadas e capim limão produz flores raras e estéreis [1].

Assim, a busca de genótipos que possam formar matrizes com características agrônomicas ou de composição química superiores é mais facilmente atingida em esparto o qual apresenta variabilidade genética suficiente para tal fim.

Esta busca de genótipos superiores em esparto também se justifica pela qualidade de seu óleo essencial (mais de 90 % de citral, que tem propriedades medicinais), mas com baixa produtividade de massa foliar em relação ao capim limão, que tem o mesmo perfil químico.

Referências

- [1] LORENZI, H.; MATOS, F.J. A. 2002. *Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 544 p.
- [2] TORRES, M.A. 1993. *Revisión del género Stipa (Poaceae) en la Provincia de Buenos Aires*. Monografía apresentada ao Ministerio de la Producción, CIC. La Plata.

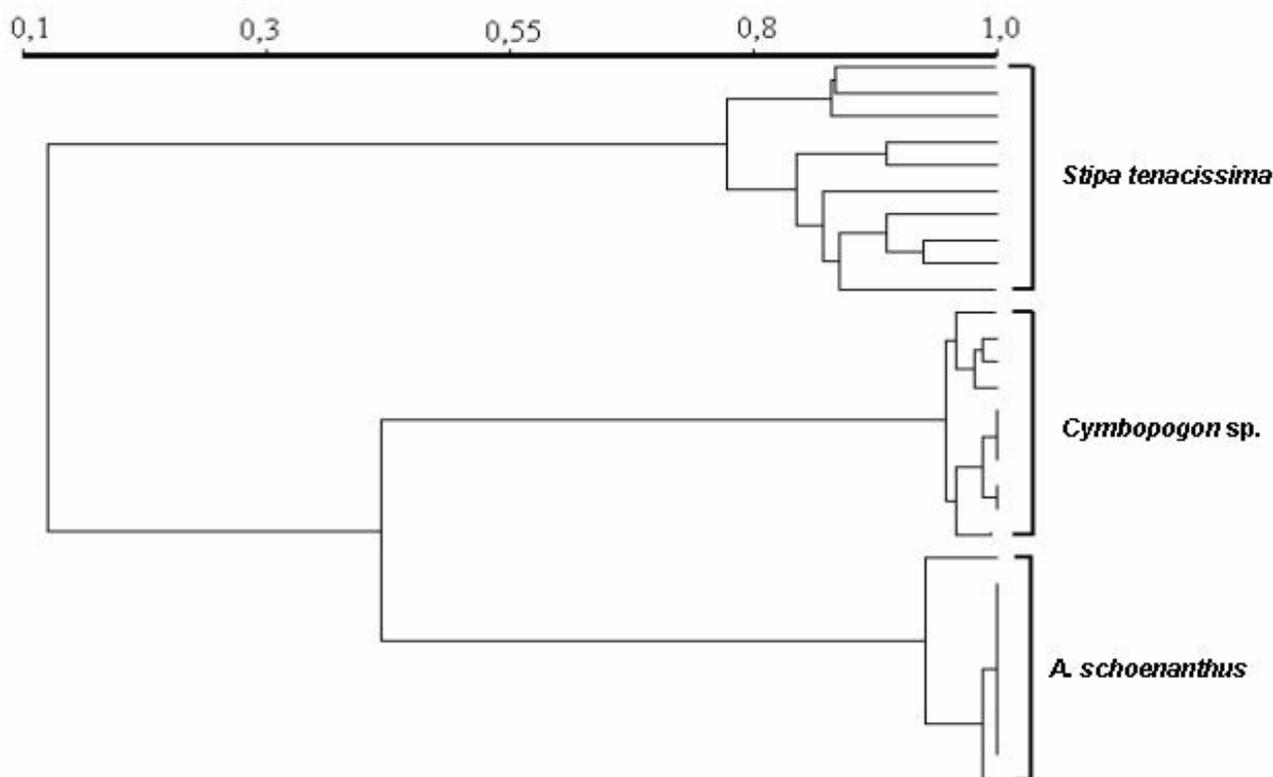
- [3] ZANIN, A., MUJICA - SALLES, J.; LONGHI - WAGNER, H.M. 1992. *Flora ilustrada do Rio Grande do Sul*. Fasc. 22. Gramineae. Tribo Stipeae, n. 51.
- [4] DOYLE, J.; DOYLE, J.L. 1988. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Am J Bot.*, 75: 1238.
- [5] WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. 1991. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.*, 18: 6531 – 6535.

Tabela 1: Número total e número de fragmentos polimórficos obtidos em cada primer utilizado na avaliação intrapopulacional.

Primer	Seqüência (5' para 3')	Esparto		Citronela		Capim Limão	
		Total de fragmentos	Total de polimórficos	Total de fragmentos	Total de polimórficos	Total de fragmentos	Total de polimórficos
OPA10	GTGATCGCAG	07	02	08	00	09	00
OPA18	AGGTGACCGT	05	00	06	00	07	00
OPA20	GTTGCGATCC	08	05	08	00	08	00
OPH04	GGAAGTCGCC	03	01	06	01	06	00
OPH18	GAATCGGCCA	04	04	07	02	09	01
OPW01	CTCAGTGTC	04	01	07	03	08	00
OPW13	CACAGCGACA	07	05	07	01	06	01
OPW20	TGTGGCAGCA	05	03	05	02	05	01
OPY03	ACAGCCTGCT	04	01	08	00	06	00
OPY20	AGCCGTGGAA	06	00	08	00	07	00
Total de fragmentos		53	22	70	09	71	03
% de polimorfismo			41,5		12,8		4,2

Tabela 2: Similaridade intrapopulacional em *Stipa tenacissima*, *Cymbopogon* sp. e *Andropogon schoenanthus*.

Espécie	Médio	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	CV%
Esparto	0,80	0,65	0,95	0,06	0,08
Citronela	0,95	0,91	0,98	0,01	0,19
Capim Limão	0,96	0,93	0,98	0,02	0,02

**Figura 1:** Dendrograma obtido por marcadores RAPD (UPGMA com coeficiente de Jaccard) em *Stipa tenacissima*, *Cymbopogon* sp. e *Andropogon schoenanthus*.