

Caracterização molecular de germoplasma de patchouli (*Pogostemon* sp.) por marcadores RAPD

Molecular characterization of germplasm of patchouli (*Pogostemon* sp.) by RAPD markers

P. S. Santos; M. F. A. Blank; A. F. Blank; S. A. Silva; I. G. Gois; R. S. Mann

Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, São Cristóvão-SE, Brasil

priscilla-santana1987@bol.com.br

(Recebido em 31 de janeiro de 2013; aceito em 15 de maio de 2013)

O patchouli (*Pogostemon* sp.) é uma planta herbácea, pertencente a família Lamiaceae, cujo óleo essencial é utilizado na indústria de cosméticos e perfumaria. O trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade genética de acessos de patchouli do Banco Ativo de Germoplasma da UFS por meio de marcadores RAPD. Para a caracterização molecular foram utilizados os acessos POG-001, POG-002, POG-006, POG-014, POG-015, POG-016, POG-017, POG-019, POG-021 e POG-022. Foram coletadas folhas jovens dos acessos para a extração de DNA. A seguir, procedeu-se a purificação e amplificação utilizando 11 oligonucleotídeos, sendo os produtos separados em gel de agarose 1% corados com brometo de etídio e visualizados sob luz UV. A similaridade genética entre os acessos foi calculada pelo coeficiente de similaridade de Jaccard e a construção do dendrograma realizada utilizando-se o método de agrupamento de médias aritméticas não ponderadas – UPGMA. A análise genética por meio de marcadores RAPD possibilitou a separação dos acessos de patchouli em quatro grupos. Houve variabilidade genética entre os acessos avaliados.

Palavras-chave: planta aromática; genótipo; variabilidade genética

The patchouli (*Pogostemon* sp.) is a herbaceous plant belonging to the Lamiaceae family, whose essential oil is widely used in cosmetics and perfumery. The study aimed to evaluate the genetic variability of patchouli accesses the Active Germplasm Bank of UFS by RAPD markers. For molecular characterization were used accessions POG-001, POG-002, POG-006, POG-014, POG-015, POG-016, POG-017, POG-019, POG and POG-021-022. We collected young leaves of access to DNA extraction. Then we proceeded to the purification and amplification using oligonucleotides 11, and the products separated on a 1% agarose gel stained with ethidium bromide and visualized under UV light. The genetic similarity among accessions was calculated by Jaccard Similarity coefficient and dendrograms were performed using the method of grouping unweighted arithmetic average - UPGMA. Genetic analysis by RAPD markers enabled the separation of patchouli accessions into four groups. There was significant variability among accessions.

Keywords: aromatic plant; genotype; genetic variability

1. INTRODUÇÃO

A família Lamiaceae possui distribuição cosmopolita, incluindo cerca de 300 gêneros e 7.500 espécies, sendo que destes 28 gêneros e cerca de 350 espécies ocorrem no Brasil. Dentre os gêneros pertencentes a essa família, *Pogostemon* foi introduzido no Brasil [1] e é composto por 80 a 90 espécies, incluindo altos subarbustos e ervas aquáticas [2].

Devido a sua importância econômica, a espécie *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth., nativa da Indonésia, Malásia, Índia e Filipinas, vem se destacando no mercado nacional e internacional [3]. *P. cablin*, conhecida vulgarmente como patchouli, é uma erva perene, aromática, ereta e ramificada, que atinge altura de 0,5 a 1,2 m; com folhas opostas cruzadas e ovaladas, de 5 a 10 cm de comprimento e 3 a 8,9 cm de largura, margem lobada com dentes crenato-serrados, os lobos e o ápice da folha são obtusos, as flores brancas, bissexuadas, zigomorfas, diclamídeas, cálice pentâmero, gamossépalo, ovário súpero e bicarpelar [4,5,1].

O óleo essencial do patchouli se caracteriza como um dos mais importantes na indústria da perfumaria [6], e se inclui entre os 18 óleos essenciais de maior importância comercial no mundo [7].

Nos últimos anos, tem sido observado um constante aumento na utilização de marcadores moleculares no mundo, principalmente, pelo fato de ser um método seguro, uma vez que não é afetado pelo ambiente e permite descrever as diferenças entre os acessos, reunindo informações úteis ao melhoramento genético, além de servir como complementação a técnicas morfológicas, bioquímicas e citológicas [8].

A técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) é uma técnica molecular relativamente barata, frente à quantidade de informações genéticas obtidas em curto prazo, podendo ser aplicada a qualquer espécie, envolvendo amostragens não destrutivas e gerando informações interpretáveis geneticamente, atendendo de forma rápida às demandas existentes em programas de conservação de espécies ameaçadas [9].

O estudo da variabilidade genética de patchouli pode ser útil quando associado a caracteres fenotípicos como teor, rendimento e composição química do óleo essencial.

O Banco de Germoplasma (BAG) de patchouli foi instalado em 2008 e é mantido cultivado em vasos em estufa agrícola do Departamento de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal de Sergipe. O BAG possui 10 acessos: POG-001, POG-002, POG-006, POG-014, POG-015, POG-016, POG-017, POG-019, POG-021 e POG-022, sendo dois (POG-001 e POG-006) pertencentes à espécie *Pogostemon heyneanus* Benth. e os demais acessos pertencentes à *Pogostemon cablin* Benth..

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade genética de acessos de patchouli do Banco Ativo de Germoplasma da UFS por meio de marcadores RAPD.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização das análises de RAPD foram empregadas folhas jovens dos acessos POG-001, POG-002, POG-006, POG-014, POG-015, POG-016, POG-017, POG-019, POG-021 e POG-022 oriundos do Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal de Sergipe (UFS) localizado no município de São Cristóvão-SE, latitude 11°00' S e longitude 37°12' W.

As plantas de patchouli do BAG da UFS, mantidas em vasos em estufa agrícola a temperatura média de 28°C, apresentam variação para todas as características morfológicas qualitativas avaliadas (Tabela 1).

As folhas jovens de cada acesso foram coletadas, acondicionadas em gaze, mantidas a baixa temperatura e conduzidas ao Laboratório de Cultura de Tecidos e Melhoramento Vegetal da UFS, onde foram mantidas em freezer (-20°C) até o momento da extração.

A extração do DNA [10] foi realizada com modificações. O DNA extraído foi quantificado utilizando gel de agarose e DNA de fago lambdas de concentrações conhecidas. O DNA foi diluído à concentração de 10 ng μL^{-1} . Foram preparados coquetéis para as reações de amplificação contendo: 3,0 μL DNA; 1,30 μL tampão 10X; 1,04 μL dNTP 2,5 mM; 1,0 μL MgCl_2 50 mM; 2,5 μL oligonucleotídeo 10 μM ; 0,5 μL *Taq* DNA polimerase 1 U e água ultrapura para completar o volume de 13,0 μL e submetidas a 45 ciclos de amplificação após a desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos. Cada ciclo foi constituído de três temperaturas: 15 segundos para desnaturação a 94°C, 30 segundos para anelamento do oligonucleotídeo a 42°C, e 30 segundos para a extensão da fita de DNA a 72°C. Ao final dos 45 ciclos foi realizada uma extensão fina de 2 minutos a 72°C.

Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1,0% durante 1 hora e 30 minutos a 120V, utilizando um marcador de tamanho molecular de 100 pares de bases como referência para os fragmentos gerados e corado com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por 10 a 15 minutos e os produtos da amplificação visualizados e fotografados sob luz ultravioleta.

Tabela 1: Características morfológicas qualitativas dos acessos de *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. e *Pogostemon heyneanus* Benth. do Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal de Sergipe.

Acesso	Formato Copa	Cor			Pilosidade folha
		Caule	Folha	Nervura	
POG-001	Taça	verde (lignificado) avermelhado (jovem)	verde-escuro	verde (jovem) lilás (dorsal)	-
POG-002	Taça	bege (lignificado) lilás+ verde (jovem)	verde-médio	Vermelha	superfície superior superfície inferior
POG-006	Arredondado	verde (lignificado) avermelhado (jovem)	verde-médio	verde (jovem) lilás (dorsal)	-
POG-014	Irregular	bege (lignificado) lilás+ verde (jovem)	verde-médio	Rosa	superfície superior superfície inferior
POG-015	Taça	bege (lignificado) lilás+verde (jovem)	verde-médio	Rosa	superfície superior superfície inferior
POG-016	Taça	bege (lignificado) lilás+verde (jovem)	verde-médio	Rosa	superfície superior superfície inferior
POG-017	Irregular	bege (lignificado) lilás+verde (jovem)	verde-claro	Rosa	superfície superior superfície inferior
POG-019	Irregular	bege (lignificado) lilás+verde (jovem)	verde-claro	Rosa	superfície superior superfície inferior
POG-021	Irregular	bege (lignificado) vermelho (jovem)	verde-médio	Vermelha	superfície superior superfície inferior
POG-022	Irregular	bege (lignificado) lilás+ verde (jovem)	verde-médio	Rosa	superfície superior superfície inferior

Nas avaliações visuais dos géis, a presença (1) e a ausência de bandas (0) foram usadas para a construção de uma matriz binária. A partir desta foi calculada a porcentagem de polimorfismo obtido com cada oligonucleotídeo utilizado, por meio da fórmula:

$$P = nbp / nbt \times 100$$

Onde:

P = porcentagem de polimorfismo (ou taxa de polimorfismo);

nbp = número de bandas polimórficas;

nbt = número de bandas total.

A estimativa de similaridade genética (S_{gij}), entre cada par de indivíduos estimada por meio do coeficiente de Jaccard empregando o programa NTSYS pc 2.1 [11]. As similaridades obtidas foram calculadas empregando-se a seguinte expressão:

$$S_{gij} = a / a + b + c$$

Onde:

a = número de casos em que ocorre a presença de fragmentos amplificado em ambos os indivíduos, simultaneamente;

b = número de casos em que ocorre a presença de fragmento somente no indivíduo i ;

c = número de casos em que ocorre a presença de fragmento somente no indivíduo j .

Os erros associados a cada distância ($1 - S_{gij}$) foram estimados [12], pela seguinte expressão:

$$V = n.d(1 - d) / n - 1$$

Onde:

V = Variância da distância genética entre cada par de indivíduos;

n = número total de fragmentos utilizados na estimativa da distância genética;

d = distância genética entre cada par de indivíduos. O erro padrão foi estimado pela expressão $(V/n)^{1/2}$.

A representação simplificada das similaridades foi realizada pela construção de dendrograma pelo método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Arithmetic Average) [13], utilizando o programa NTSYS pc 2.1 [11].

Os indivíduos geneticamente diferentes foram identificados a partir da estimativa do valor mínimo de similaridade, valor acima do qual os indivíduos são considerados geneticamente iguais (Sgm). O Sgm foi estimado por meio do teste t (0,1% de probabilidade), utilizando-se a seguinte expressão [14]:

$$Sgm = 1 - (t \cdot Ssg)$$

Onde:

t = valor tabelado de t com n-2 graus de liberdade,

Ssg = erro médio das comparações consideradas no dendrograma.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise de RAPD, dos 11 oligonucleotídeos utilizados, foi gerado um total de 53 produtos de amplificação, com 100% de polimorfismo (Tabela 2). Resultados divergentes ao observado [15] estudando seis cultivares da espécie *P. cablin*, em que dos 98 produtos de amplificação registrados, 16,7% foram monomórficos e 83,3% foram polimórficos.

No trabalho de Wu et al. [16] foi avaliada a diversidade genética de 16 populações de *P. cablin* por meio de marcadores RAPD e, verificou-se que com a utilização de 21 oligonucleotídeos selecionados, um total de 213 fragmentos foram geradas das quais 169 foram polimórficas, onde o polimorfismo e a porcentagem dos fragmentos amplificados revelados com RAPD foram 79,21% e 78,40%, respectivamente, indicativo de um alto nível de diversidade genética existente entre as populações.

O número de fragmentos amplificados variou de acordo com o oligonucleotídeo. Observou-se que o maior número de fragmentos polimórficos (7) foi encontrado pela amplificação, usando-se os oligonucleotídeos IDT 3, 4 e 6 (Tabela 2).

Tabela 2: Relação do número de produtos amplificados por cada oligonucleotídeo (NTB), número de fragmentos polimórficos (NFP) e porcentagem de polimorfismo (%), em análise de RAPD, em acessos de *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. e *Pogostemon heyneanus* Benth.

Oligonucleotídeos	Sequência 5'-3'	<i>Pogostemon</i> sp.		
		NTB	NFP	%P
IDT 2	CAG GCC CTT C	4	4	100
IDT 3	GTT TCG CTC C	7	7	100
IDT 4	TGA TCC CTG G	7	7	100
IDT 6	GTG AGG CGT C	7	7	100
IDT 7	ACC GCG AAG G	4	4	100
IDT 9	CCC AAG GTC C	4	4	100
IDT 10	GGT GCG GGA A	3	3	100
IDT 11	ACG GAT CCT G	3	3	100
IDT 12	GAG GAT CCC T	5	5	100
IDT 17	ACC TGG ACA C	4	4	100
IDT 19	CCC GGC ATA A	5	5	100
Total	-	53	53	100

De acordo com a tabela de estimativas de similaridades genéticas (Tabela 3), os acessos POG-006 e POG-019 apresentaram menores similaridades (0,00%). Comparando-se as características morfológicas destes acessos, observa-se que ambos apresentam várias diferenças, como nos aspectos relacionado à cor do caule e cor da nervura de folhas (Tabela 1). As maiores similaridades foram observadas entre os pares POG-006 e POG-022 (93,02%); POG-001 e POG-016 (85,71%); POG-006 e POG-016 (85,10%).

Tabela 3: Estimativas de similaridade genéticas em % (abaixo da diagonal) e erro padrão associado à similaridade (acima da diagonal) entre acessos de *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. e *Pogostemon heyneanus* Benth. empregando o Coeficiente de Jaccard.

Acessos	POG-001	POG-002	POG-006	POG-014	POG-015	POG-016	POG-017	POG-019	POG-021	POG-022
POG-001		0,08	0,08	0,05	0,13	0,13	0,05	0,12	0,05	0,05
POG-002	37,03		0,10	0,10	0,10	0,10	0,09	0,13	0,09	0,09
POG-006	32,00	51,28		0,05	0,07	0,13	0,05	0,00	0,05	0,13
POG-014	13,33	50,00	11,90		0,10	0,12	0,11	0,05	0,11	0,11
POG-015	83,33	54,54	26,31	48,14		0,09	0,09	0,06	0,09	0,10
POG-016	85,71	48,38	85,10	73,33	46,67		0,11	0,05	0,12	0,12
POG-017	12,90	38,70	14,28	68,96	46,43	65,63		0,05	0,11	0,10
POG-019	71,42	95,23	0,00	16,00	23,53	13,79	11,11		0,05	0,05
POG-021	12,12	40,62	13,63	70,00	43,33	77,42	67,74	14,29		0,12
POG-022	13,33	44,82	93,02	65,52	48,15	73,33	58,06	16,00	75,86	

Pela análise do dendrograma (Figura 1), nota-se a formação de quatro grupos, sendo o grupo 1 formado pelos acessos POG-001 e POG-006, o grupo 2 formado pelos acessos POG-002 e POG-015, o grupo 3 composto pelos acessos POG-014, POG-016, POG-017, POG-021 e POG-022 e o grupo 4 composto pelo acesso POG-019.

Com base nos erros associados a cada similaridade, os acessos são considerados semelhantes acima de 77%. Desse modo, os acessos POG-016 e POG-021 (77,42%) apresentam-se semelhantes, estando posicionados ao lado direito da linha de corte (77%).

Analisando as características morfológicas qualitativas dos acessos de patchouli do Banco Ativo de Germoplasma da UFS, observou-se que os acessos POG-001 e POG-006 apresentam a ausência de pêlos nas folhas. Essas características morfológicas não foram evidenciadas nos demais acessos (Tabela 1).

Analisando-se o dendrograma (Figura 1), observa-se que o acesso POG-001 apresenta uma similaridade genética maior com o acesso POG-006 (32%), como observado por Blank et al. [17] com a análise multivariada considerando as similaridades dos constituintes químicos do óleo essencial de patchouli.

O acesso POG-002 apresentou uma similaridade genética maior com o POG-015 (54,54%), o mesmo ocorre com os acessos POG-016 e o POG-021 (77,42%) (Figura 1).

Blank et al. [17] em estudos de caracterização química de óleos essenciais destes mesmos acessos, verificaram que POG-016 e POG-021 apresentaram similaridades na composição química dos óleos essenciais na segunda e quarta colheitas, já que os acessos POG-015 e POG-022 mostraram similaridade na composição química, já na primeira colheita. No entanto, em estudos de similaridade genética nesta pesquisa não foram observadas estas mesmas relações.

De acordo com WU et al. [16], a similaridade genômica não reflete necessariamente semelhança ou diferenças nas características como composição dos óleos, caracteres morfológicos ou características agrônômicas, visto que em seu trabalho duas populações estudadas foram diferentes nas suas características morfológicas, mas geneticamente muito semelhantes. No entanto, deve-se considerar que características morfológicas e de composição de óleos são altamente influenciadas pelas condições ambientais, e que os marcadores moleculares não são influenciados pelo ambiente.

Estudos posteriores deverão ser realizados a fim de identificar os fragmentos amplificados associados a características de interesse.

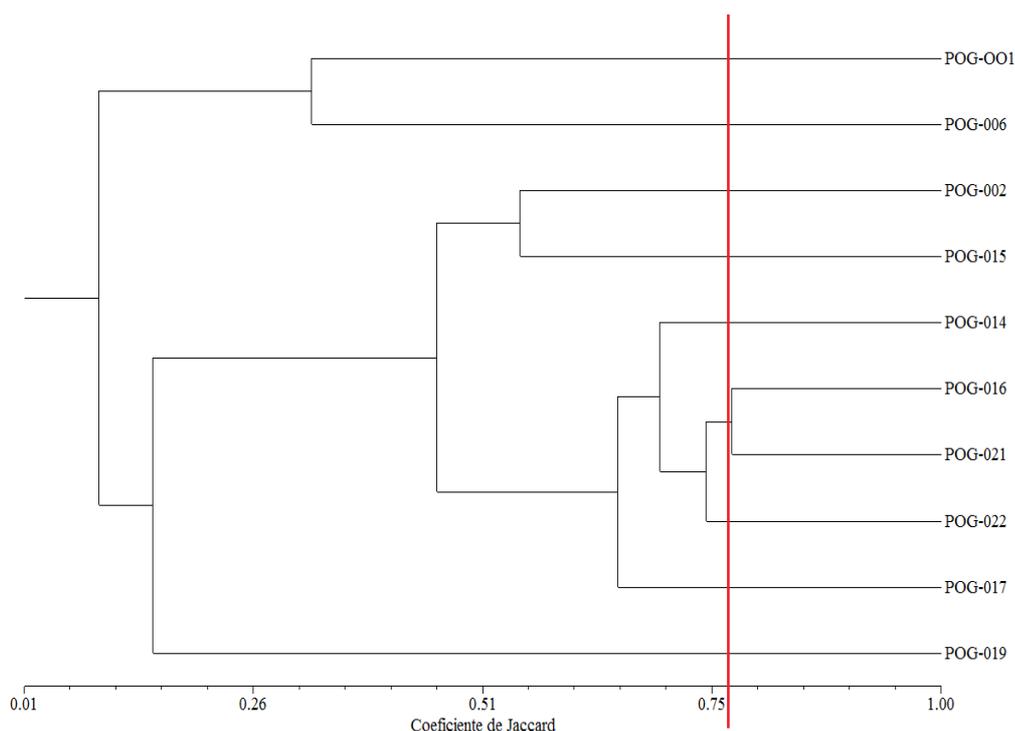


Figura 1: Dendrograma construído por meio do método de agrupamento de médias aritméticas não ponderadas (UPGMA) a partir dos valores de similaridade genética entre os acessos de *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. e *Pogostemon heyneanus* Benth.

4. CONCLUSÃO

Há variabilidade genética entre os acessos de *Pogostemon cablin* e *Pogostemon heyneanus* do Banco Ativo de Germoplasma da UFS. Os acessos POG-001 e POG-006 apresentam similaridade genética e características morfológicas semelhantes e diferentes dos demais acessos, já que pertencem à espécie distinta dos demais acessos.

1. SOUZA, V. C.; LORENZI, H. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II*, 2 ed. Instituto Plantarum, SP, 703p. (2008).
2. INGROUILLE, M.; BHATTI, G. R. Infrageneric relationships within *Pogostemon* Desf. (Labiatae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 28: 159-183, (1998).
3. ANONIS, D. P. Woody notes in perfumery, patchouly oil, absolute and aroma chemicals: Part I. *Perfumer & Flavorist*, 31: 36-39, (2006).
4. GUENTHER, E. *The essential oils: volume three - individual essential oils of the plant families Rutaceae and Labiatae*. Malabar: Krieger Publishing Company, 777p. (1972).
5. SALERNO, A. R.; REBELO, A. M.; SILVA JUNIOR, A. A. Plantas aromáticas para cultivo em Santa Catarina. *Agropecuária Catarinense*, 17(2): 46-49, (2004).
6. SINGH, M.; SHARMA, S.; RAMESH, S. Herbage, oil yield and oil quality of patchouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] influenced by irrigation, organic mulch and nitrogen application in semi-arid tropical climate. *Industrial Crops and Products*, 16(2): 101-107, (2002).
7. BIZZO, H. R., HOVELL, A. M. C., REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova*, 32: 588-594, (2009).
8. WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLF, K., KAHL, G. *DNA finger printing in plants*, 2 ed. CRC Press, Taylor & Francis, 444p. (2005).
9. FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*, 3 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220p. (1998).

10. NIENHUIS, J.; TIVANG, J.; SCKROCH, P.; SANTOS, J. B. Genetic relationships among cultivars and lines of lima beans (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 120(2): 300-306, (1995).
11. ROHLF, F. J. *Numerical taxonomy and multivariate system*. Version 2.1. Exeter Software, 38p, (2000).
12. SKROCH, P. W.; TIVANG, J.; NIENHUIS, J. Analysis of genetic relationship using RAPD marker data. In: Iufro International Conference: "Breeding tropical trees" Section 202-208, Proceedings... 26-30, (1992).
13. SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. *Numerical Taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. W. H. Freeman, (1973).
14. CASTANHEIRA, A. L. M. *Marcadores RAPD na avaliação do potencial de métodos de condução de população segregante de feijão*. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas), Universidade Federal de Lavras, 76p, (2001).
15. KUMARA, S. M.; ANURADHA, M. Analysis of genetic cultivars (*Pogostemon cablin* Benth.) by using RAPD markers. *Research in Biotechnology*, 2(6): 64-71, (2011).
16. WU, L.; WU, Y.; GUO, Q.; LI, S.; ZHOU, K.; ZHANG, J. Comparison of genetic diversity in *Pogostemon cablin* form China revealed by RAPD. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(18): 4549-4559, (2011).
17. BLANK, A. F.; SANT'ANA, T. C. P.; SANTOS, P. S.; ARROGONI-BLANK, M. F.; PRATA, A. P. D.; JESUS, H. C. R.; ALVES, P. B. Chemical characterization of the essential oil from patchouli accessions harvested over four season. *Industrial crops and Products*, 34(1): 831-837, (2011).