

ISSN - 1517-591X



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Revista de Ciências Agrárias

NÚMERO 40, JULHO/DEZEMBRO 2003



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Revista de Ciências Agrárias

Journal of Agrarian Sciences

Esta publicação foi financiada pelo Department for International Development – **DFID**,
no âmbito do Projeto de Fortalecimento Institucional da UFRA – ProUFRA

ISSN - 1517-591X

Rev. ciênc. agrár. Belém n. 40 p. 9-186 jul./dez. 2003

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA IPECA (*Psychotria ipecacuanha* Stokes) POR MEIO DE MARCADORES RAPD¹

**Maria Rosa COSTA²
Osmar Alves LAMEIRA³
Isabela Guerreiro DINIZ⁴**

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi analisar a divergência genética entre 14 acessos de ipeca (*Psychotria ipecacuanha* Stokes) provenientes do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Amazônia Oriental. A extração de DNA foi feita conforme o protocolo de Nelson (1993), modificado, e para as amplificações utilizou-se o protocolo de Williams et al. (1990), modificado. Os fragmentos foram analisados em gel de agarose 1,5 % e a presença ou ausência de bandas determinou a construção da matriz binária. Utilizaram-se 11 *primers*, e todos geraram polimorfismo. Foram analisadas 129 bandas polimórficas de um total de 150 bandas amplificadas. A análise de divergência genética foi realizada a partir do programa NTSYS-pc 2.02, utilizando o coeficiente de Jaccard. Na análise do dendograma, foram observados dois grupos principais. No primeiro grupo, que se subdividiu em dois subgrupos com coeficiente de similaridade variando de 15% a 56%, incluíram-se 11 acessos oriundos de diferentes localidades. O segundo grupo, com quatro acessos, dividiu-se em dois subgrupos com similaridade genética variando de 11 % a 35 %. Os acessos 695, 827 e 808 foram distintos do restante, constituindo subgrupos isolados dentro do seu grupo. Os resultados obtidos mostraram variabilidade genética potencial para o programa de melhoramento genético e produziram informações úteis para o direcionamento de coleta de germoplasma de ipeca para enriquecimento do BAG.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: Ipeca (*Psychotria ipecacuanha* Stokes), Divergência Genética, RAPD, Coleção de Germoplasma.

GENETIC CHARACTERIZATION OF IPECA (*Psychotria ipecacuanha* Stokes) BY RAPD ANALYSIS

ABSTRACT: The objective of this work was to analyze the genetic diversity of 14 ipeca accesses from the germplasm of Embrapa, Eastern Amazon. DNA extraction was made by the modified Nelson (1993) protocol and the PCR analysis by the modified William et al (1990) protocol. PCR

¹ Aprovado para publicação em 4.11.2003

² Engenheira Agrônoma, M.Sc. em Genética e Melhoramento de Plantas, Pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental. Cx. Postal 48. CEP 66.017-970-Belém, PA.

³ Engenheiro Agrônomo, Dr. em Biotecnologia, Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental. Cx. Postal 48. CEP 66.017-970-Belém, PA.

⁴ Aluna do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará - Ufpa, estagiária da Embrapa Amazônia Oriental. Cx. Postal 48. CEP 66.017-970-Belém, PA.

(Polymerase Chain Reaction) products were visualized by electrophoresis in agar gels (1,5 %) and interpreted as a binary system (presence or absence of bands). All eleven RAPD primers utilized for DNA amplification produced polymorphic fragments. One hundred and twenty nine polymorphic bands were analyzed from the total of one hundred and fifty. Genetic divergence analysis was made by NTSYS-pc 2.02 software using the Jaccard coefficient. Results showed the accesses were organized in two sub clusters. The first sub cluster, splited into two groups with genetic similarity from 15 % to 56 %, had eleven accesses originated from different regions and the second sub cluster, also splited into two groups, with genetic similarity from 15 % to 35 %. The accessions number 695, 827 and 808 had the greatest divergence and were grouped separately. These results showed the occurrence of genetic diversity that can be used in breeding programs and to develop strategies to manage the germplasm collection of ipeca.

INDEX TERMS: Ipeca (*Psychotria ipecacuanha* Stokes), Genetic Diversity, RAPD, Germplasm Collection.

1 INTRODUÇÃO

Psychotria ipecacuanha pertence à família Rubiaceae, sendo conhecida popularmente como ipeca ou poaia, e preconizada pela farmacopéia brasileira como emético, amebicida e expectorante devido à presença de alcalóides (emetina, cephalina entre outros) em suas raízes (PINTO; SANTIAGO; LAMEIRA, 2000). Nativa da Região Amazônica, tem sido considerada no mundo todo como uma importante espécie medicinal devido às suas propriedades curativas, sendo incluída nas farmacopéias indiana, japonesa, inglesa, americana e portuguesa (TREASE; EVANS, 1989).

Segundo Husain (1991), a demanda de fitoterápicos a base de ipeca no mundo tem aumentado porque o contínuo uso de drogas sintéticas tem promovido resistência em raças de amebas que provocam desenterias graves.

O uso de marcadores moleculares RAPD (polimorfismos de DNA amplificados ao acaso) constitui-se em uma

poderosa ferramenta na caracterização de germoplasma (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1996). Tais marcadores poderão ser empregados para identificar e auxiliar a seleção de genótipos promissores (STUBER, 1992). Os marcadores moleculares de DNA possuem a vantagem de não sofrer influência ambiental. A caracterização molecular associada aos dados de produção de biomassa e de alcalóides irá auxiliar a escolha do material para a constituição dos bancos de germoplasma e a preservação racional da espécie em estudo. Os estudos de caracterização através de marcadores moleculares em associação com avaliação da divergência genética nesta espécie são bastante limitados ou inexistem. O presente trabalho é considerado prioritário, devido à necessidade de se quantificar a variabilidade genética dos acessos de ipeca para verificar a similaridade entre eles, a fim de sanar dúvidas quanto à origem e uso nos cruzamentos, além de auxiliar na escolha de acessos potenciais para o enriquecimento

da variabilidade genética no próprio Banco Ativo de Germoplasma. Apesar da reconhecida variabilidade fenotípica existente nesses bancos, o germoplasma de ipeca tem sido pouco estudado sob o ponto de vista genético. O uso combinado de marcadores morfológicos e moleculares subsidiará os trabalhos de melhoramento, na busca de cultivares mais produtivos e com características de qualidade que atendam demandas do setor produtivo, contribuindo, ainda, para o intercâmbio de material caracterizado e de informações entre instituições de pesquisa.

A avaliação de produtividade de diferentes acessos de ipeca permitirá conhecer genótipos superiores que poderão no futuro ser multiplicados e utilizados em plantações de larga escala gerando dividendos para o País.

Assim, o objetivo deste estudo foi examinar o polimorfismo gerado por marcadores RAPD e analisar a diversidade genética entre acessos de ipeca pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Amazônia Oriental.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais analisados foram 14 acessos de ipeca (Tabela 1) provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém (PA)

O DNA genômico foi obtido através de folhas em estágio médio de desenvolvimento, recém-coletadas que, após desinfecção, foram maceradas com nitrogênio líquido. Cerca de 200 mg de pó foram transferidos para tubos Eppendorf.

Adicionou-se em seguida 700 mL de solução extratora (10mL de CTAB 20 % ; 28mL de NaCl 5M; 4mL de EDTA 0,5 M pH 8; 10 mL de Tris-HCL 1M pH 8,0 e 1 g de PVP para 100mL). Os tubos foram agitados e colocados em banho-maria a 60 °C, durante 60 minutos. O extrato foi misturado com 700 mL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) para formar uma emulsão. Após centrifugar por 10 minutos a 4 °C e 12 000 rpm, a parte superior aquosa foi cuidadosamente retirada e misturada a álcool 95 %, o que ocasionou a precipitação do DNA. O material foi colocado em “freezer” (-20 °C) por 20 minutos, sendo, em seguida, centrifugado por 10 minutos a 4 °C e 12 000 rpm, lavado com 1000 mL de

Tabela 1 - Identificação dos acessos analisados. Embrapa Amazônia Oriental. Belém (PA). 2001.

Código	Origem	Localidade
695	MT, Brasil	Barra do Bugres
767	BA, Brasil	Bicarai
802	RO, Brasil	Rolim de Moura
595	MT, Brasil	Mirassol
712	MT, Brasil	Rio Branco
808	RO, Brasil	Rolim de Moura
812	RO, Brasil	Rolim de Moura
834	RO, Brasil	Costa Marques
836	RO, Brasil	Costa Marques
590	MT, Brasil	Salto do céu
607	MT, Brasil	Vila Bela
827	RO, Brasil	Costa Marques
803	RO, Brasil	Rolim de Moura
700	MT, Brasil	Tangará da Serra

etanol 70 % para remover sais e, posteriormente, seco à temperatura ambiente por, aproximadamente, 12 horas. O DNA foi ressuspensionado com 100 mL RNase/ TE (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). A concentração de DNA foi estimada em gel de agarose 1%, pela comparação do DNA total com três concentrações do DNA íntegro do bacteriófago Lambda. As amostras utilizadas no RAPD, após a quantificação total, partiram de diluições da amostra total em água estéril, de modo a conter 5 ng/mL de DNA. As soluções de DNA foram armazenadas a -20 °C.

2.1 ANÁLISE RAPD

Os *primers* utilizados foram: OPAZ 03, OPAZ 11, OPAZ 14, OPAZ 16, OPN 02, OPN 09, OPN 15, OPN 18, OPS 03, OPS 09, e OPO 06.

As reações foram desenvolvidas de acordo com o protocolo de Williams et al. (1990) com pequenas modificações, num volume final de 13 mL contendo água destilada autoclavada; 20 mM Tris-HCl (pH 8); 50 mM KCl; 2 mM MgCl₂; 200 mM de cada dNTP; BSA purificada (2,5 mg/mL); 1,3 mM *primer* arbitrário; 1U.I Taq DNA polimerase e 15 ng de DNA genômico, cobertos com duas gotas de óleo mineral.

As amplificações foram realizadas em termociclador de DNA Thermolyne Amplitron II modelo DB.80225, sendo realizados 40 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 37 °C e 2 minutos a 72 °C, seguidos de mais 7 minutos a 72 °C para a completa extensão dos produtos amplificados. O

método utilizado para a separação dos produtos amplificados foi a eletroforese horizontal em gel de agarose (1,5 %), corado com brometo de etídio (1mg/mL). Utilizaram-se 13 mL de cada reação, acrescidos de 2 mL de uma solução de azul de bromofenol mais sacarose (40 %). Foi utilizado TBE (Trizma base 0,1 M; ácido bórico 1M e EDTA 0,5M) como tampão do gel e de corrida.

Após a eletroforese, os géis foram visualizados e fotografados em equipamento de foto documentação por transiluminação em ultravioleta.

2.2 ANÁLISE DOS DADOS

Aplicou-se em cada gel um marcador de peso molecular conhecido, o ladder de 1Kb (Gibco-BRL) no início e no final do gel para definir o tamanho aproximado dos fragmentos gerados nas PCRs.

Inicialmente, foi construída uma matriz para os fragmentos polimórficos amplificados com (1) significando presença e (0) significando ausência de banda. Somente foram consideradas as bandas que não davam margens a dúvidas. Bandas muito fracas, de difícil resolução, não foram incluídas. Para análise dos dados, utilizou-se o NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System), versão 2.02. A similaridade entre as amostras foi estimada pelo coeficiente de Jaccard, e resultou em uma matriz de similaridade. A partir dessa matriz foi gerado o “cluster” pelo método UPGMA (“Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average”), apresentado sob a forma de um dendograma (Figura 3).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 150 fragmentos RAPD, com tamanhos variando de 300 pb (pares de bases) a 2200 pb, foi amplificado pelos 11 *primers* utilizados, dos quais 129 eram polimórficos, gerando 86% de polimorfismo. O número de fragmentos amplificados variou de 10 (OPAZ 03 e OPAZ 16) a 21 (OPAZ 11). O número de fragmentos polimórficos por *primer* variou de 7 (OPAZ 03; OPS 03 e OPS 09) a 21 (OPAZ 11). Observou-se, dentre os fragmentos amplificados, a ocorrência de bandas específicas aos acessos (Figura 1). Foram estimados os índices de similaridade entre todos os acessos (Figura 2). A similaridade genética média foi de 32 %. A maior dissimilaridade genética foi obtida comparando-se o acesso 834 com o 607 e com o 700 (11 %). A segunda maior dissimilaridade foi entre o acesso 695 e o 834 (15 %). Isso indica que estes acessos são

candidatos potenciais como fonte de variabilidade no programa de hibridização desta espécie, visando o melhoramento genético. Estes dados podem monitorar os cruzamentos com grande potencial de aumento de variabilidade no germoplasma de ipeca. Por outro lado, a maior similaridade genética foi entre o acesso 595 e o 712 (56%).

Na Figura 3, encontra-se o dendograma gerado pelo método UPGMA, através do programa NTSYS-pc, 2.02. A clusterização provocou a separação dos acessos em dois grupos principais. No primeiro grupo, que se subdividiu em dois subgrupos, com coeficiente de similaridade variando de 15% a 56 %, incluem-se 11 acessos oriundos de diferentes localidades. O segundo grupo, com quatro acessos, dividiu-se em dois subgrupos, com similaridade genética variando de 11 % a 35 %. Os acessos 695, 827 e 808 foram distintos em relação ao restante, constituindo subgrupos isolados dentro do seu grupo.

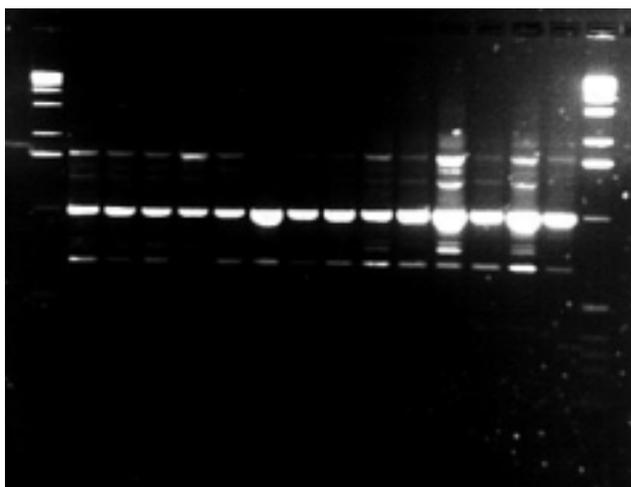


Figura 1 - Eletroforese do RAPD em ipeca gerado pelo primer OPS 03. A primeira e a última colunas correspondem ao marcador ladder e as demais aos acessos analisados. Embrapa Amazônia Oriental. Belém (Pa), 2001.

	695	767	802	595	712	808	812	834	836	590	607	827	803	700
695	1.00													
767	0.43	1.00												
802	0.45	0.50	1.00											
595	0.45	0.41	0.49	1.00										
712	0.39	0.42	0.44	0.56	1.00									
808	0.19	0.19	0.20	0.28	0.25	1.00								
812	0.25	0.31	0.37	0.25	0.27	0.34	1.00							
834	0.15	0.23	0.25	0.18	0.16	0.20	0.35	1.00						
836	0.32	0.33	0.48	0.47	0.44	0.22	0.23	0.18	1.00					
590	0.36	0.35	0.35	0.32	0.42	0.23	0.23	0.17	0.43	1.00				
607	0.30	0.26	0.27	0.36	0.38	0.21	0.17	0.11	0.50	0.53	1.00			
827	0.30	0.35	0.30	0.30	0.31	0.19	0.20	0.20	0.36	0.48	0.37	1.00		
803	0.36	0.35	0.44	0.38	0.41	0.22	0.23	0.18	0.51	0.50	0.50	0.36	1.00	
700	0.27	0.28	0.25	0.30	0.37	0.22	0.18	0.11	0.42	0.53	0.52	0.40	0.43	1.00

Figura 2 - Matriz de similaridade genética estimada pelo índice de Jaccard para todos os acessos analisados. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, (Pa). 2001

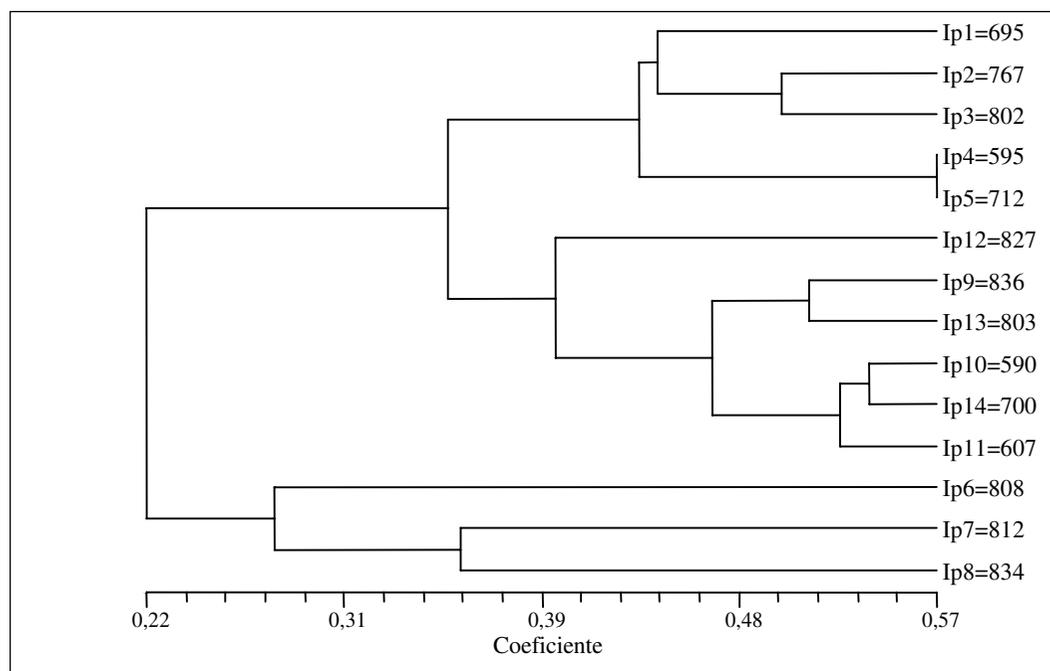


Figura 3 – Dendrograma gerado pelo método de análise UPGMA para o coeficiente de Jaccard, a partir das 129 bandas polimórficas geradas pelo RAPD. Embrapa Amazônia Oriental Belém, (Pa). 2001.

4 CONCLUSÃO

Os marcadores RAPD mostraram-se eficientes para detectar de maneira rápida a variabilidade genética apresentada pelos acessos da coleção de germoplasma de ipeca da Embrapa Amazônia Oriental e a obtenção de informações úteis para o seu manejo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Brasília, DF: EMBRAPA. CENARGEN, 1996. 220p.

HUSAIN, A. Economic aspects of exploitation of medicinal plants. In: AKERELE, O.; HEYWOOD, V.; SYNGE, H. (Ed.). *Conservation of medicinal plant*. Cambridge: University of Cambridge, 1991. p. 125-133.

NELSON, J. C. ITMI *Wheat mapping workshop-laboratory manual*. Ithaca: Cornell University, 1993. 140p.

PINTO, J.E.B.P.; SANTIAGO, E.J.A. de; LAMEIRA, O.A. *Compêndio de plantas medicinais*. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000. 205p.

STUBER, C.W. Biochemical and molecular markers in plant breeding. In: DUDLEY, J.W.; HALLAUER, A.R.; RYDER, M. (Ed.). *Plant breeding reviews*. New York: J. Wiley, 1992.

TREASE, G. E.; EVANS, W. C. *Pharmacognosy*. 13th ed. London: Baillière Tindal, 1989. p. 595-599

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, v.18, p.6531-6535, 1990.