

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA IPECACUANHA (*Psychotria ipecacuanha* Stokes) ATRAVÉS DE MARCADORES RAPD

DINIZ, Isabela Guerreiro¹; COSTA, Maria Rosa²; LAMEIRA, Osmar Alves³

A Ipecacuanha (*Psychotria ipecacuanha* Stokes) é uma planta medicinal da família Rubiaceae, conhecida vulgarmente por ipeca, sendo indicada no tratamento anti-diarréico, amebicida, expectorante e anti-inflamatório, tendo como princípio ativo a emetina. Não obstante ser uma espécie com elevado potencial econômico para a região, possui escassez de informações sobre a sua diversidade, principalmente aquelas relacionadas à documentação e caracterização genética. Neste sentido, a conservação e caracterização de germoplasma se tornam necessárias visando assegurar informações sobre essas fontes de genes para a utilização futura que, além de prevenir a perda desses recursos são fundamentais para o sucesso da produção agrícola. Um dos passos a ser dado é a caracterização genética através de marcadores moleculares, os quais podem, inicialmente subsidiar o estudo das diferenças e/ou unicidade das populações. A caracterização molecular através das diversas técnicas de marcadores moleculares, hoje amplamente divulgadas, pode enriquecer e direcionar as informações no processo de conhecimento do germoplasma disponível, essencial para sua utilização em etapas subsequentes de programas de melhoramento genético de plantas. Graças ao avanço na área de marcadores moleculares de PCR ("Polymerase Chain Reaction"- Reação de Polimerase em Cadeia), hoje é possível estudar melhor o comportamento de organismos de interesse econômico. Trata-se de um processo cíclico, no qual a enzima DNA polimerase faz cópias de um DNA, para o qual iniciadores (*primers* – oligonucleotídeos) específicos são fornecidos, sendo que, em cada ciclo o número de cópias é duplicado, produzindo um aumento exponencial do mesmo. O processo envolve as fases de desnaturação das fitas de DNA; anelamento dos oligonucleotídeos; extensão e polimerização pela enzima DNA polimerase. O RAPD é basicamente uma variação do protocolo de PCR, com duas características distintas, que são utilizar um primer único ao invés de um par de primers e este primer único ter seqüência arbitrária e, portanto, sua seqüência alvo ser desconhecida. A técnica baseia-se na habilidade do primer determinar a amplificação do DNA genômico em fragmentos de tamanho variável. O polimorfismo é detectado pela presença de um fragmento específico amplificado em um indivíduo comparado com a ausência do mesmo em outro indivíduo (Williams et al., 1990; Fairbanks et al., 1991), sendo portanto utilizada na caracterização de diversas espécies de procariotos e eucariotos, em estudos populacionais, no mapeamento genético e na obtenção de marcadores ligados a genes de resistência à doenças, facilitando e acelerando os estudos que já ocorriam com espécies mais tradicionais, bem como, permitindo a realização de estudos de análise genética em espécies anteriormente não contempladas. O objetivo do trabalho é analisar a divergência genética presente na coleção de germoplasma de ipecacuanha da Embrapa Amazônia Oriental, visando a eliminação de duplicatas, o direcionamento do programa de melhoramento genético desta espécie e a formação de uma "core collection". O trabalho será desenvolvido no Laboratório de Genética-LABGEN da Embrapa Amazônia Oriental, onde atualmente já se desenvolve atividade de caracterização genética em diversas espécies vegetais. O DNA será extraído através do protocolo de Nelson (1993), utilizando-se material vegetal (folhas) recém coletado. A técnica de PCR será através do protocolo de Williams et al. (1990) com modificações. O DNA genômico (3 μ l) será pipetado no fundo do microtubo, no qual será adicionado 10 μ l do mix preparado com água estéril, tampão da enzima, dNTPs, primers e por último a enzima Taq DNA polimerase, perfazendo um total de 13 μ l por reação. Será acrescentado 50 μ l de óleo mineral comercial, para evitar evaporação. A amplificação será realizada em termociclador de DNA, programado como segue: Desnaturação-1 minuto a 92 $^{\circ}$ C; Anelamento do primer-1 minuto a 35 $^{\circ}$ C; Extensão pela Taq polimerase-dois minutos a 72 $^{\circ}$ C; no final sete minutos a 72 $^{\circ}$ C. Este ciclo será repetido 40 vezes. Os produtos de amplificação serão visualizados em gel de agarose 1,5% num tampão TBE, com um gradiente de 6V cm⁻¹, por cerca de três horas. Após a corrida eletroforética os géis serão visualizados em transiluminação com ultravioleta, sendo fotografados para documentação e análise. Serão analisados os dados gerados a partir da detecção de fragmentos polimórficos. As bandas que possuírem a mesma mobilidade, no geral serão consideradas idênticas, independentes de sua identidade. Como marcadores RAPD se comportam como marcadores genéticos dominantes, os genótipos homocigoto dominante e o heterocigoto serão colocados juntos na mesma classe fenotípica. Bandas muito fracas ou que ocorrerem em um só indivíduo não serão consideradas. Os fragmentos polimórficos amplificados serão computados na forma de uma matriz retangular binária onde o "0" representará a ausência da banda e o "1" a presença. Para as análises será utilizado o programa NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System), 2.0. A similaridade entre as amostras será estimada mediante a utilização do coeficiente de Jaccard (Sneath & Sokal, 1973). O resultado será a caracterização genética da espécie trabalhada, cujas informações poderão ser utilizadas tanto pela comunidade científica como pela sociedade em geral.

¹Estagiária / Embrapa Amazônia Oriental / Bacharelado em Biologia – UFPA/8 $^{\circ}$ semestre.

²Eng.-Agr., M.Sc., Pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental.

³Eng $^{\circ}$ Agr., Dr. Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental