

# DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE JABORANDI (*Pilocarpus microphyllus*) POR MEIO DE MARCADORES RAPD

Elisa Ferreira Moura<sup>1</sup>, José Eduardo Brasil Pereira Pinto<sup>2</sup>, João Bosco dos Santos<sup>3</sup>,  
Osmar Alves Lameira<sup>4</sup>, Suzan Kelly Vilela Bertolucci<sup>2</sup>

**Palavras-chave** : germoplasma, planta medicinal, marcador molecular

## INTRODUÇÃO

O jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) tem como princípio ativo a pilocarpina, um alcalóide imidazólico usado na oftalmologia para contração da pupila e em certos tipos de glaucoma, usado como estimulante da salivação e transpiração e também é indicado para o tratamento de xerostomia pós-irradiação (MERCK, 1989; VALDEZ et al., 1993). Apesar de já haverem áreas plantadas de jaborandi no Estado do Maranhão, autores comentam que elas ainda não suprem totalmente a demanda pelas folhas de jaborandi e assim a atividade extrativista ainda persiste (MAGALHÃES, 2000; PINHEIRO, 2002). Na década de 1970, em função da intensa procura extrativista pelas folhas de jaborandi no Maranhão, houve acentuada diminuição de populações naturais e em alguns locais elas desapareceram por completo. Isso levou o IBAMA a incluí-lo na lista de espécies ameaçadas de extinção.

O manejo adequado de uma planta medicinal envolve programas de melhoramento genético, a fim de se obter maior proveito da espécie, principalmente no que se refere a maior produção e qualidade de princípio ativo. Para que isso seja realizado, é primordial o conhecimento prévio do germoplasma disponível em instituições de pesquisa, através da caracterização.

Em 1992, foi estabelecido um banco de germoplasma para o jaborandi na Embrapa Amazônia Oriental, visando seu manejo e conservação. Entretanto, poucos estudos foram realizados para medir a variabilidade genética existente no banco. Além disso, o número de acessos contidos no banco ainda é pequeno, sendo importante quantificar áreas de maior diversidade, a fim de se direcionar novas coletas.

Este trabalho objetivou caracterizar a variabilidade genética do banco de germoplasma de jaborandi por meio de marcadores RAPD.

---

<sup>1</sup> Aluna Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas-UFLA, Lavras-MG

<sup>2</sup> Professor Departamento de Agricultura/UFLA, Lavras-MG

<sup>3</sup> Professor Departamento de Biologia/UFLA, Lavras-MG

<sup>4</sup> Pesquisador Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas folhas de 93 plantas pertencentes a doze locais de coleta contidas no Banco de Germoplasma de jaborandi em Belém-PA. A extração de DNA foi realizada de acordo com o procedimento descrito por NIENHUIS et al. (1995), com modificações. Os locais de coleta com respectivos números de plantas coletadas foram: Dom Eliseu-PA (5); São Félix do Xingu-PA (6); Serra dos Carajás-PA (18); Breu Branco-PA (13); Fazenda Merck-MA (10); Moju1-PA (10); Moju2-PA (14); Açailândia-MA (6); Nina Rodrigues-MA (3); Mata Roma-MA (2); Brejo-MA (4) e Santa Quitéria-MA (2).

As reações RAPD foram baseadas em procedimento semelhante ao citado por NIENHUIS et al. (1995). Os produtos da amplificação foram separados em géis de 1,0 % de agarose, e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta Fotodyne. Na análise dos géis, cada banda foi considerada como um loco, sendo que a sua ausência em um indivíduo foi designada por (0) e sua presença foi designada por (1).

As análises de similaridade genética foram realizadas por meio do programa NTSYS-pc 2.0 (RHOLF, 1992), utilizando-se o coeficiente de Nei & Li. Os erros associados a cada similaridade e o valor máximo da similaridade entre dois acessos foram estimados por meio de metodologia citada por HAGIWARA et al. (2001). A análise de agrupamento das similaridades foi feita através do método da média das similaridades (UPGMA), gerando um dendograma, por meio do programa NTSYS-pc 2.0.

Para verificar a diversidade dentro de cada local coletado, foi calculada a média e a variância das similaridades entre cada par de indivíduos de cada local.

Para calcular a correlação entre as distâncias geográficas e as similaridades genéticas, calculou-se as similaridades entre as áreas de ocorrência através da média entre as similaridades entre dois grupos de indivíduos, sendo utilizado o coeficiente de Mantel através do programa NTSYS-pc 2.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas 85 bandas polimórficas através de 17 *primers*. Os *primers* que geraram polimorfismo foram OPAH-10 (5 bandas), OPAM-04 (4), OPAM-7 (5), OPAM-10 (5), OPAM-14 (4), OPAM-20 (4), OPAN-7 (3), OPAN-10 (6), OPAN-17 (4), OPAO-5 (4), OPAO-6 (5), OPAO-8 (7), OPAO-17 (4), OPAP-1 (7), OPAP-6 (6), OPAP-7 (6) e OPAP-14 (8), gerando uma média de 5 bandas polimórficas/*primer*.

A similaridade genética entre as plantas variou de 0,55 a 0,91. O valor máximo de similaridade obtido, a nível de 1% de significância, foi de 0,86, sendo que com isso, foram encontrados 11 pares de duplicatas (Figura 1). Com exceção de dois casos, sendo que em

um deles, dois indivíduos de São Félix do Xingu (PA) e da região de Serra dos Carajás (PA) e no outro, dois indivíduos de Santa Quitéria (MA) e Açailândia (MA) foram considerados geneticamente iguais, os outros pares de duplicatas foram todos provenientes da mesma área de coleta, sendo que a população 2 de Moju (PA) foi a que mais apresentou pares de duplicatas (4).

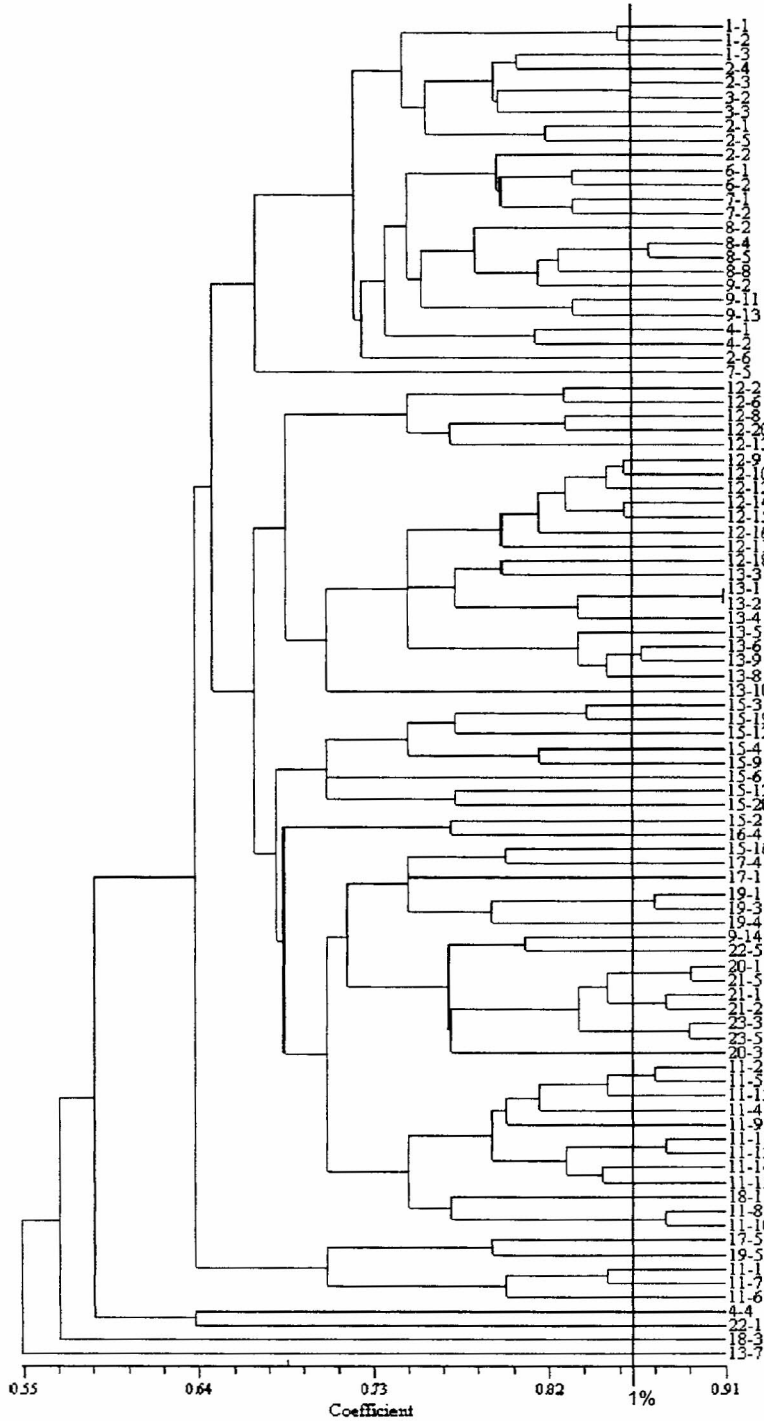
As similaridades genéticas calculadas entre as áreas de coleta variaram de 0,61 a 0,73 (dados não mostrados), indicando que a variação entre áreas de ocorrência é significativa. A análise do dendograma (Figura 1) indicou que somente os indivíduos de Breu Branco (PA) se agruparam por completo, o que é um indício de que o jaborandi possui mais variabilidade dentro do que entre áreas de ocorrência, uma característica de plantas alógamas (HAMRICK, 1983). A ocorrência de diferenciação genética entre áreas de ocorrência em plantas alógamas tem como causas o isolamento geográfico, os métodos de polinização e dispersão de sementes e as taxas de endogamia em cada região, que podem ser influenciadas por reduções no tamanho populacional. Segundo PINHEIRO (1997), a redução de muitas populações de jaborandi foi devido à freqüente e excessiva coleta de folhas da mesma planta, o que levaria a mortalidade das mesmas. Provavelmente, este pode ter sido um importante fator para a existência de estruturação genética do jaborandi.

As médias das similaridades (Tabela 1) entre os indivíduos de cada área de coleta variaram de 0,79 (Brejo-MA) a 0,72 (Fazenda Merck-MA). As variâncias encontradas (Tabela 1) para as áreas de coleta no Estado do Pará variaram de 0,009 (Dom Eliseu) a 0,003 (Moju 2) e no Estado do Maranhão variaram de 0,006 (Açailândia) a 0,001 (Nina Rodrigues). Segundo PINHEIRO (2002), a maior extração de folhas vem ocorrendo no Maranhão. Isto pode ser um fator para a menor variabilidade observada neste estado. Entretanto, o número de plantas coletadas por área no Maranhão foi inferior ao das plantas coletadas no Pará, o que pode ter contribuído para subestimar a variabilidade neste estado.

O valor da correlação entre as distâncias geográficas e as similaridades genéticas entre as áreas de coleta não foi significativo, sendo  $r = -0,19$ . O mesmo foi obtido por LIMA (2002), trabalhando com acessos de *Psychotria ipecacuanha*, sendo que neste trabalho as áreas de coleta pertenciam a regiões bem mais distantes que as do jaborandi. No caso do presente estudo, a dispersão de sementes e pólen por rios, assim como a introdução de materiais pelo homem, podem ter contribuído para o intercruzamento dos diferentes genótipos, levando assim a ausência de correlação. Segundo SOUSA & SOUZA (2001), a observação de que as amostras da distribuição geográfica correspondem à estrutura genética de uma espécie nem sempre é válida.

Um resultado curioso foi a baixa similaridade genética entre as duas populações de Moju-PA (0,67), o que pode ter sido resultado de coleta em épocas diferentes ou ação antrópica nesta região, já que o jaborandi é uma espécie medicinal com uso empírico por populações

interioranas. Sugere-se que sejam realizadas mais coletas nesta região para avaliar melhor essa variação.



**Figura 1:** Dendrograma das similaridades genéticas entre os acessos de jaborandi. Cada primeiro número corresponde a uma área de coleta. 1 e 23 = Dom Eliseu-PA; 2 = São Felix do Xingu; 3-9 = Serra dos Carajás; 11 = Moju-PA (1); 12 = Novo Breu Branco-PA; 13 – Moju-PA (2); 15 = fazenda Merck-MA; 16, 21 e 22 = Açailândia-MA; 17 = Nina Rodrigues-MA; 18 = Mata Roma-MA; 19 = Brejo-MA; 20 = Santa Quitéria-MA.

**Tabela 1:** Média das similaridades e respectivas variâncias obtidas para cada área de coleta.

<i>Locais de Coleta</i>	<i>Média das similaridades</i>	<i>Variância</i>
Dom Eliseu-PA	0,73	0,009
São Félix do Xingu-PA	0,76	0,004
Serra dos Carajás-PA	0,72	0,003
Novo Breu Branco-PA	0,74	0,005
Merck-MA	0,72	0,002
Moju-PA (1)	0,75	0,006
Açailândia-MA	0,75	0,006
Nina Rodrigues-MA	0,74	0,001
Brejo-MA	0,79	0,002
Moju-PA (2)	0,76	0,003

### CONCLUSÕES

- Aparentemente, a variabilidade genética foi maior dentro do que entre as áreas de coleta;
- Não foi observada estruturação geográfica.

### AGRADECIMENTOS

Às agências de fomento, FAPEMIG e CAPES.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HAGIWARA, W.E.; SANTOS, J.B. dos & CARMO S.L.M. do. Use of RAPD to aid selection in common bean backcross breeding programs. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.1(4), p.355-362, 2001.

HAMRICK, J.L. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: SCHONEWALD COX, C.M.; CHAMBERS, S.M.; MACBRIDE, B. & THOMAS, L.. **Genetics and Conservation**. Menlo Park: The Benjamin / Cummings publishing company, 1983.

LIMA, P.S.G. **Divergência genética e efeito do nitrogênio total no crescimento in vitro de ipeca** [*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes]. Dissertação de mestrado-Lavras:UFLA, 2002.

MAGALHÃES, P.M. **Agrotecnologia para el cultivo de jaborandi o remédio milagroso**. In: Fundamentos de Agrotecnologia de Cultivo de Plantas Medicinales Iberoamericanas. 1/1 ed. Santafé de Bogotá : Convênio Andrés Bello/CYTED, 2000.

MERCK **Index Merck. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**. Susan Budavari, Ed., Merck & Co.: Rahway, New Jersey, 1989.

NIENHUIS, J.; TIVANG, J.; SKROCH, P.W. & SANTOS, J.B. Genetic relationships among cultivars and lines of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.120, p.300-306, 1995.

PINHEIRO, C.U.B. Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*): a wild species and its rapid transformation into a crop. **Journal for Economical Botany**, v.51 (1), p.49-58, 1997.

PINHEIRO, C.U.B. Extrativismo, cultivo e privatização do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf Ex. Holm.; Rutaceae) no Maranhão, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v.16(2), p.141-150, 2002.

RHOLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York, 470p., 1992.

SOUSA, N.R. & SOUZA, A.das G.C. Conservação ex-situ e utilização de espécies nativas. In: SOUSA, N.R. & SOUZA, A.das G.C. **Recursos Fitogenéticos na Amazônia Ocidental**, Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 205p., 2001.

VALDEZ, I.H., WOLFF, A., ATKINSON, J.C., MACYNSKI, A. A. & FOX, P.C. Use of pilocarpine during head and neck radiation therapy to reduce xerostomia and salivary dysfunction. **Cancer**, v. 71 (5), p.1848-1851, 1993.