



14<sup>o</sup> Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA  
10 e 11 de agosto de 2010  
Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA

## SELEÇÃO DE PRIMERS PARA ANÁLISE MOLECULAR EM GENÓTIPOS DE DENDEZEIRO

Andréa Cristina Rodrigues Fortes<sup>1</sup>, Maria Rosa T. da R. Costa<sup>2</sup>, Alessandra de Jesus Boari<sup>3</sup>, Caio Santos Silva<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Bolsista Embrapa Amazônia Oriental/UFRA. [andreafortes@rocketmail.com](mailto:andreafortes@rocketmail.com)

<sup>2</sup>Pesquisadora Embrapa Amazônia Oriental

<sup>3</sup>Pesquisadora Embrapa Amazônia Oriental

<sup>4</sup>Bolsista PIBIC CNPq-Embrapa Amazônia Oriental

**Resumo:** Selecionar *primers* para serem utilizados na caracterização molecular do dendezeiro com marcadores RAPD (Polimorfismos de DNA Amplificados ao Acaso) foi o objetivo deste trabalho. Para isso, inicialmente foram selecionadas plantas susceptíveis e tolerantes ao Amarelecimento Fatal, que é o principal problema fitossanitário desta palmeira. O material analisado foi composto de seis genótipos pré-selecionados provenientes de um plantio pertencente à fazenda MARBORGES-Moju, no Estado do Pará. As reações de amplificação foram desenvolvidas de acordo com o protocolo de Williams et al. e as amplificações foram realizadas em termociclador Eppendorf Mastercycler. Foram analisados seis kits de *primers* (OPB, OPQ, OPA, OPM, OPU e OPF) e somente foram consideradas as bandas que não davam margens a dúvidas. Foram obtidas de duas a dez bandas sendo que os *primers* mais polimórficos foram o OPA19 com oito bandas polimórficas e o OPF06 e OPB13 com seis bandas polimórficas cada um. Os *primers* selecionados mostraram-se eficientes para serem utilizados na caracterização genética do dendezeiro utilizando marcadores RAPD.

**Palavras-chave:** genética, marcadores moleculares, palmeiras, variabilidade

### Introdução

Os recursos genéticos vegetais são de fundamental importância para a manutenção e aproveitamento da biodiversidade. Neste contexto enquadra-se o dendezeiro (*Elaeis guineensis*, Jacq.) uma palmeira originária da Costa Ocidental da África (Golfo da Guiné), encontrada em povoamentos subespontâneos desde o Senegal até Angola. No Brasil, foi introduzido no século XVII, pelos escravos, adaptando-se bem ao clima tropical úmido. Seus principais produtos são os óleos de palma e de palmiste, extraídos industrialmente da polpa do fruto e da amêndoa, respectivamente, cuja demanda vem crescendo de forma acelerada principalmente devido ao seu grande potencial (6 a 8 t/ha/ano) para ser utilizado como biocombustível. Entretanto a doença conhecida como Amarelecimento Fatal (AF)



14<sup>o</sup> Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA  
10 e 11 de agosto de 2010  
Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA

tem sido um entrave para a expansão da mesma. Desta forma, selecionar *primers* para serem utilizados na análise da variabilidade genética, com marcadores moleculares RAPD (Polimorfismos de DNA Amplificados ao Acaso), entre plantas susceptíveis e tolerantes a esta doença, foi o objetivo deste trabalho.

### Material e Métodos

O material analisado foi composto de seis genótipos pré-selecionados provenientes de trinta amostras de plantas doentes e trinta de plantas tolerantes ao Amarelecimento Fatal (AF) pertencentes ao plantio da fazenda MARBORGES-Moju no Estado do Pará. O DNA foi extraído a partir de folhas utilizando um protocolo inorgânico modificado por Costa (2002). A concentração de DNA foi estimada em gel de agarose 1,0 %, pela comparação do DNA total com três concentrações do DNA Bacteriófago íntegro lambda. As amostras utilizadas na seleção, após a quantificação total, partiram de diluições da amostra total em água estéril, de modo a conter 5 ng/μl de DNA. As alíquotas foram armazenadas a -20 °C.

As reações de amplificação foram desenvolvidas de acordo com o protocolo de Williams et al. (1990) com modificações, num volume final de 12 μl contendo água destilada autoclavada, 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM KCl, 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM de cada dNTP, BSA purificada (2,5 mg/ml), 1,3 μM *primer* arbitrário, 1U.I Taq DNA polimerase e 15 ng de DNA genômico.

As amplificações foram realizadas em termociclador Eppendorf Mastercycler, sendo realizados 40 ciclos de 1' a 94 °C, 1' a 37 °C e 2' 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 1,0 %, corado com brometo de etídio 1mg/ml. Utilizou-se 12 μl de cada reação, acrescido de 5 μl de uma solução de azul de bromofenol (40 %) mais sacarose. 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 fotodocumentação por transiluminação em ultravioleta.

Foram analisados seis kits de *primers* (OPB, OPQ, OPA, OPM, OPU e OPF). Somente foram consideradas as bandas que não davam margens a dúvidas. Bandas muito fracas, de difícil resolução, não foram incluídas.



14<sup>º</sup> Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA  
10 e 11 de agosto de 2010  
Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA

### **Resultados e Discussão**

Foram obtidas de duas a dez bandas sendo que os primers mais polimórficos foram o OPA19 com oito bandas polimórficas e o OPF06 e OPB13 com seis bandas polimórficas. Foram selecionados os *primers* OPA (05,19 e 20), OPM 10, OPU (15 e 17), OPF06, OPQ (12 e 19) e OPB (13 e15) que apresentaram acima de quatro polimorfismos e mostram-se eficientes para serem utilizados na caracterização genética do dendezeiro utilizando marcadores RAPD (Polimorfismos de DNA amplificados ao acaso).

### **Conclusões**

Os *primers* selecionados mostraram-se eficientes para serem utilizados na caracterização genética do dendezeiro utilizando marcadores RAPD (Polimorfismos de DNA amplificados ao acaso) que será a etapa complementar deste trabalho.

### **Referências Bibliográficas**

COSTA, M.R; OLIVEIRA, M. do S.P. de; OHAZI, M.M.M; DINIZ, I.G. **Extração de DNA de açaizeiro (*Euterpe oleraceae*) a partir de folhas**. Documentos. Embrapa Amazônia Oriental. 2002.

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.