

Anais do 7º Seminário de Iniciação Científica da UFRA e 13º Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA
01 a 04 de dezembro de 2009

SELEÇÃO DE *PRIMERS* RAPD PARA A CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GERMOPLASMA DE TUCUMÃ-DO-AMAZONAS (*Astrocaryum tucuma* Mart.)

Natália Padilha de OLIVEIRA¹; Maria do Socorro Padilha de OLIVEIRA²

Resumo

O tucumã-do-amazonas é palmeira perene, oleaginosa, monocaule e que vem sendo indicada como uma das alternativas de matéria prima ao mercado de biodiesel, mas pouco se conhece sobre essa espécie. Marcadores RAPD são úteis em análises genéticas de espécies pouco estudadas. Desta forma, buscou-se selecionar *primers* RAPD polimórficos para a caracterização de germoplasma dessa palmeira. Foram testados 113 *primers* RAPD em cinco amostras oriundas de Urucará, Amazonas, Brasil. A matriz binária foi utilizada para análises do número ótimo de bandas e dissimilaridade genética. Foram selecionados 21 *primers* que amplificaram 102 bandas nítidas e polimórficas e permitiu a separação dos genótipos em cinco grupos. O número de bandas adequado para a genotipagem foi de 100.

Palavras-chave: análise genética, marcadores moleculares e palmeira.

Área de Conhecimento: Área: Ciências Agrárias; Sub Área: Agronomia; Linha de pesquisa: Melhoramento Genético de Plantas.

Introdução

O tucumã-do-amazonas (*Astrocaryum tucuma* Mart.) é uma palmeira perene, oleaginosa, monocaule que possui espinhos de tamanhos variáveis em quase todas as partes da planta. É nativa da América do Sul, com ocorrência predominante no Norte do Brasil, especialmente no Amazo-

nas, Acre, Rondônia, Roraima e parte do Pará. Tem uso integral, sendo seus frutos bastante apreciados pela população Manauara. Esta palmeira vem sendo indicada como uma alternativa de matéria prima ao mercado de biodiesel na região Norte, mas pouco se sabe sobre essa espécie.

A caracterização molecular é uma ferramenta útil no manejo e uso de qualquer espécie, por acessar informações no genoma dos indivíduos, sendo os marcadores RAPD úteis na quantificação da variabilidade de espécies pouco estudadas (Grattapaglia, 2007). O objetivo deste trabalho foi selecionar marcadores RAPD polimórficos para a caracterização de germoplasma dessa espécie.

Material e Métodos:

Para a seleção foram testados 113 *primers* RAPD, escolhidos ao acaso de kits da *Operon Technologies*, em cinco genótipos oriundos de Urucará, AM. A extração de DNA genômico foi realizada utilizando-se 100 mg de folíolos de cada amostra, de acordo com o protocolo CTAB estabelecido por Doyle e Doyle (1997), com modificações, e ressuspendido em 400 µl de TE. A concentração de DNA existente em cada amostra foi estimada pela análise comparativa de três concentrações do DNA do fago λ (50, 100 e 200 ng µl⁻¹) em aplicações em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídeo, sendo depois as amostras diluídas para a concentração de trabalho de 10 ng µl⁻¹. As reações de PCR-

¹ Primeiro Autor é estudante de Licenciatura em Ciências Biológicas da UFPA, bolsista ITI A do CNPq, Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Genética Molecular, Travessa Enéas Pinheiro s/n, Belém, PA, CEP 66095-100. E-mail: natybiologia2006@gmail.com

² Segundo Autor é Pesquisador A da Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Genética Molecular, Travessa Enéas Pinheiro s/n, Belém, PA, CEP 66095-100. E-mail: spadilha@cpatu.embrapa.br

RAPD foram feitas segundo Oliveira et al. (2007), utilizando-se microtubos 0,2 ml e volume final de 15 µl. As amostras foram colocadas em termociclador Amplitherm TX96 da AXIGEN, programado para 40 ciclos. Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, e separados por eletroforese horizontal. As bandas obtidas foram visualizadas e capturadas digitalmente. Foram selecionados os *primers* que mais geraram bandas nítidas e polimórficas. A matriz binária foi utilizada para avaliar o número ótimo de bandas, pelo método *bootstrap* do aplicativo GENES, e para o padrão de dissimilaridade genética, pelo método UPGMA no software NTSYS-pc 2,1, com base no coeficiente de Jaccard.

Resultados e Discussão

Dos 113 *primers* testados, cinco não amplificaram e 14 geraram apenas bandas monomórficas. Os outros demais apresentaram bandas polimórficas, representando 87,61% dos *primers* avaliados. Dos 99 *primers* que geraram polimorfismo, 21 foram selecionados por apresentarem boa qualidade na amplificação e maior polimorfismo (Tabela 1). Os *primers* selecionados produziram 157 bandas, sendo 102 polimórficas, o que representa 64,97% de polimorfismo, com média de 7,5 bandas por *primer*. Cerqueira et al. (2008) e Santos et al. (2007) encontraram porcentagens menores de polimorfismo em estudos com *Ricinus communis* e *Orbignyia ssp*, respectivamente

Tabela 1. Identificação dos 21 *primers* RAPD selecionados para análises genéticas em germoplasma de tucumã-do-amazonas (*A. aculeatum*) e o número de bandas polimórficas.

Marcador RAPD	Nº. de bandas		Nº. total de bandas
	Monomórficas	Polimórficas	
OPA-07	1	5	6
OPA-09	2	4	6
OPA-15	0	5	5
OPAB-01	4	5	9
OPAB-02	2	5	7
OPAB-04	4	4	8
OPAB-11	3	7	10
OPAB-15	1	5	6
OPJ-13	4	4	8
OPN-09	4	7	11
OPO-03	4	4	8
OPO-11	0	5	5
OPO-12	4	5	9
OPU-01	5	4	9
OPU-05	2	4	6
OPU-08	2	4	6
OPU-11	4	7	11
OPU-19	0	6	6
OPBA-06	3	4	7
OPBA-09	2	4	6
OPBA-10	4	4	8
Total	55	102	157
Média	2,6	4,9	7,5

De acordo com a matriz binária gerada pelo programa GENES o número ótimo de bandas encontrado foi de 100 ($r=0,9872$, $SQd=0,0006$ e $E=0,0231$).

Como visto na Figura 1, cada genótipo formou um grupo a partir de 52% de dissimilaridade genética demonstrando a eficiência dos *primers* selecionados.

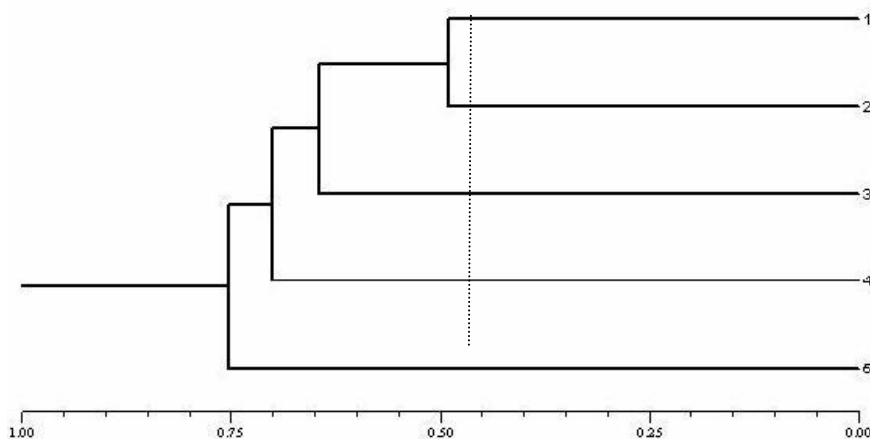


Figura 1. Dissimilaridade genética dos cinco genótipos de tucumã com 102 bandas polimórficas RAPD.

Conclusões

Os 21 *primers* selecionados são eficientes e podem ser utilizados para caracterização molecular da espécie estuda. As 102 bandas utilizadas foram superiores ao número ideal de bandas estimado pela análise de *bootstrap*. Foi possível separar os genótipos em cinco grupos distintos utilizando-se a dissimilaridade genética.

Agradecimentos

Ao CNPq e à FINEP pela bolsa de Iniciação Científica, à orientadora, à Embrapa e aos funcionários do Laboratório de Genética Molecular.

Referências

CERQUEIRA, L.S, SILVA, S.A, VILARINHOS, A.D, AMORIM, E.P, PALMIERI, D.A, MOREIRA, R.F.C, PESTANA, K.N, SILVA, A.N DA E PRIMO JR., J.F. (2008) **Seleção de primers RAPD capazes de detectar polimorfismo em mamoneira.** In: Congresso

brasileiro de mamona, 3, *Anais...*, campina Grande: Embrapa, DC-rom.

DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, St Paul, v.12, p.13-15, 1997.

GRATTAPAGLIA, D. **Aplicações operacionais de marcadores.** In: Biotecnologia florestal. BORÉM, A (ed.). Viçosa: [s.n.], 2007. pág. 175-200.

OLIVEIRA, M. DO S. P DE, AMORIM, E.P, SANTOS, J.B DOS E FERREIRA, D. F. (2007) Diversidade genética entre acessos de açaizeiro baseada em marcadores RAPD. **Ciênc. Agrotec.**, 31: 6, 1645-1653.

SANTOS, M, SOUSA, I.G.B, DINIZ, F.M, SOUZA, V.A.B, ARAÚJO, E.C.E, SITTOLIN, I.M.; LIMA, P.S.C. (2007) **Seleção de primers para o uso de RAPD na análise de diversidade genética em babaçu (*Orbignya ssp Mart.*).** In: Congresso Internacional de Agroenergia e biocombustíveis, Teresina, PI, Brasil. *Anais...*, Teresina: Embrapa, CD-rom.