

OTIMIZAÇÃO DE REAÇÃO E SELEÇÃO DE PRIMERS RAPD PARA USO NA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CASTANHA-DE-SAPUCAIA (*Lecythis pisonis* Cambess)

Paulo Sarmanho da Costa Lima¹, Francisco Maxwell Gonçalves dos Santos², Isabela Santos Barbosa³, Bruno Guedes Alcoforado Aguiar², Raul Ferreira de Miranda Mendes⁴, Valdomiro Aurélio Barbosa de Souza¹

¹Pesquisador da Embrapa Meio-Norte, Av. Duque de Caxias, 5650 - Buenos Aires, Caixa Postal 1, CEP 64006-220 Teresina, PI, E-mail: sarmanho@cpamn.embrapa.br; valdo@cpamn.embrapa.br

²Graduando de Biomedicina da Faculdade NOVAFAPI, Rua Vitorino Orthiges Fernandes, 6123 - Bairro Uruguai. Teresina (PI). CEP: 64073-505, Teresina, PI. E-mail: fxamwell@hotmail.com ; onurbguedes@hotmail.com

³Graduanda de Biologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí – IFPI, Praça da Liberdade, 1597, Centro, Teresina (PI). CEP 64000-040 isabela.sbarbosa@hotmail.com

⁴Graduando de Biologia Universidade Estadual do Piauí - UESPI Rua João Cabral, s/n, Bairro Pirajá. Teresina (PI). CEP 64002-150 raul-mendes@hotmail.com

Introdução

A castanha-de-sapucaia, (*Lecythis pisonis* Camb.), ocorre naturalmente em quase toda Amazônia, e é encontrada do Maranhão até o Rio de Janeiro, na Mata Atlântica. A árvore possui altura média de 20 a 30 metros e tronco de até 90 cm de diâmetro, com folhas simples e lisas de 15 cm de comprimento. A floração ocorre de setembro a outubro e a frutificação de junho a setembro, com frutos grandes e de casca dura, cuja tampa solta quando estes amadurecem, liberando sementes (amêndoas) de cor marrom claro e comestíveis (BRAGA et al., 2007). Apesar de já existirem alguns estudos referentes à caracterização da árvore e da amêndoa, não há relatos de estudos sobre a diversidade genética da espécie.

A diversidade genética pode ser avaliada usando-se descritores morfológicos, marcadores isoenzimáticos, e os marcadores de DNA. Este último tem recebido mais atenção, especialmente em função do seu potencial de distinção, precisão e rapidez.

Dentre os marcadores de DNA, os de RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) que se baseiam na técnica de PCR possuem vantagens comparativas em relação aos outros marcadores, como baixo custo, estrutura laboratorial simples e de fácil implementação. Porém, tem a desvantagem de ter baixa repetibilidade e reprodutibilidade, dificultando a comparação de dados obtidos com diferentes reagentes e em diferentes

locais. A otimização dos fatores envolvidos na reação é a estratégia mais usada para superar esta desvantagem.

O objetivo deste trabalho foi otimizar a reação de amplificação e selecionar *primers* RAPD para caracterização molecular dos acessos componentes da Coleção de Germosplasma de Castanha-de-Sapucaia da Embrapa Meio-Norte.

Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Meio-Norte, Teresina-PI. Foram realizadas extrações de DNA genômico de tecido foliar jovem de plantas de castanha-de-sapucaia com o kit de purificação (Qiagen). A quantificação foi realizada em gel de agarose a 0,8% em TBE 0,5 corado com SYBR Safe DNA Gel Stain a 10.000X (Invitrogen), em seguida comparou-se o DNA das amostras com o DNA λ nas concentrações de 50, 100 e 150 ng.

Na otimização da reação de amplificação foram testadas duas concentrações de $MgCl_2$ (1,25 mM; 1,75 mM) e três concentrações de tampão (1,0X, 1,2X, 1,4X). Após a otimização da reação foram testados 53 primers RAPD para a seleção, utilizando cinco acessos (BGS 12, BGS 13, BGS 15, BGS 17 e BGS 18), em reações preparadas com volume final de 20 μ l, contendo 15ng de DNA, 0,75mM de dntp, 2U de Taq Polimerase (CenBiot), 0,25 mM de primer, 1,25 mM de $MgCl_2$, 2,4 μ L de tampão 10X e H_2O ultrapura.

As reações foram realizadas em Termociclador Veriti, com a etapa inicial de desnaturação de 1 min a 92°C, seguida de 45 ciclos de 40 segundos a 92°C para desnaturação, 1 min a 34°C para anelamento, 2 min a 72°C e uma extensão final de 5 min a 72°C. Os produtos das reações foram visualizados em gel de agarose 1,5%, corados com GelRed™(Biotium) e fotodocumentados sob luz ultravioleta no aparelho MiniBIS Pro (BioAmerica Inc).

Resultados e Discussão

As bandas com melhores definição e resolução (Figura 1) foram obtidas na concentração de 1,25 mM de $MgCl_2$ indicando que nesta concentração a ação da Taq polimerase e o anelamento do *primers* foram mais eficientes. A concentração 1,2X do tampão também proporcionou a força iônica ideal para a atividade da enzima e da especificidade de hibridação com o DNA molde, conforme observaram Hilton et al. (1997) quando avaliaram o efeito do tampão em reações de PCR-RAPD.

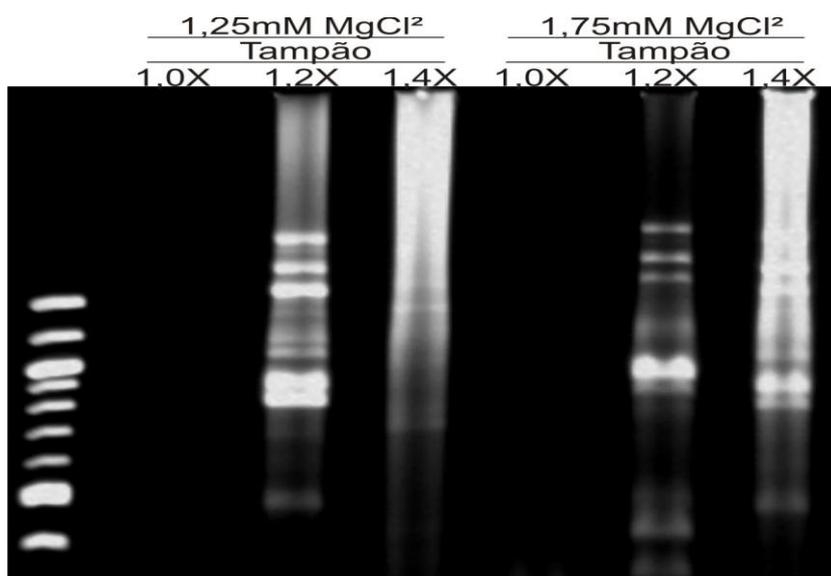


Figura 1. Otimização da reação de amplificação com alterações nas concentrações de Cloreto de Magnésio (1,25 mM e 1,75mM) e Tampão (1,0, 1,2 e 1,4x).

Dentre os 53 *primers* testados, 43 foram polimórficos (Tabela 1), gerando 299 bandas das quais 175 polimórficas, o que representa 58,52% de polimorfismo. Os *primers* A1, A2, A5, A11 e G8 foram os que apresentaram maior número de bandas polimórficas e os *primers* N12, N14, N4, N16, N17, N20, A12, G1, G2, G6 e G16 foram os que apresentaram o menor número de bandas polimórficas. Observa-se na Figura 2 o perfil eletroforético de alguns *primers* selecionados que apresentaram bom padrão de amplificação.

TABELA 1. Relação dos *primers* RAPD selecionados para o estudo de caracterização dos acessos de castanha-de-sapucaia, com o número total de bandas e número de bandas polimórficas amplificadas.

<i>Primer</i>	Total de bandas	Nº de bandas polimórficas	<i>Primer</i>	Total de bandas	Nº de bandas polimórficas.
N1	2	2	A8	7	6
N3	10	3	A9	9	5
N4	11	1	A10	4	4
N5	9	5	A11	9	8
N6	5	4	A12	1	1
N7	5	4	A14	4	2
N9	6	6	G1	8	1
N10	4	2	G2	9	1
N11	3	2	G3	8	4
N12	1	1	G4	11	5
N14	3	1	G5	7	2
N15	1	1	G6	3	1
N16	1	1	G7	4	4

N17	5	1	G8	8	8
N18	3	3	G9	4	4
N19	4	4	G10	10	2
N20	5	1	G12	5	3
A1	11	11	G13	5	3
A2	16	11	G16	9	1
A3	18	8	G17	6	6
A4	14	7	G18	4	4
A5	9	9	G19	11	7
A7	7	5			

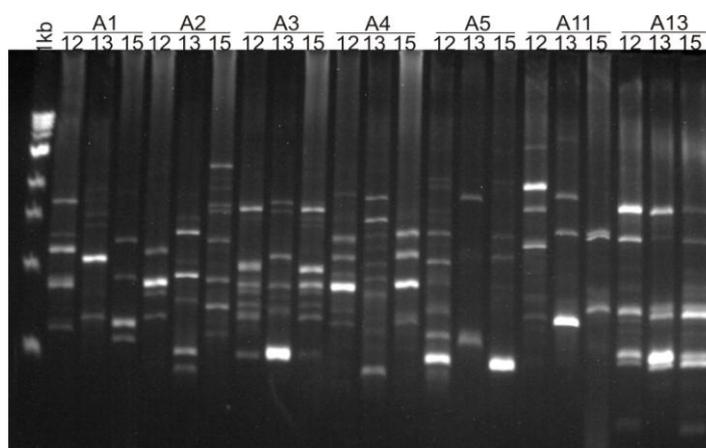


Figura 2. Perfil eletroforético de alguns *primers* RAPD selecionados.

Conclusões

As concentrações de 1,25 mM de MgCl₂ e 1,2X de tampão foram as que proporcionaram as bandas de melhor qualidade.

O polimorfismo identificado nos *primers* testados demonstra haver variabilidade genética entre os acessos da Coleção de Germoplasma de Castanha-de-Sapucaia da Embrapa Meio-Norte.

REFERÊNCIAS

- BRAGA, L.F., et al. Caracterização morfométrica de sementes de castanha de sapucaia (*Lecythis pisonis* Camb. - Lecythidaceae). **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v.5, n.1, p.111-116, 2007.
- FREITAS, P. D. **Estudos de diversidade genética em camarões utilizando marcadores moleculares. Manual Prático Marcadores de RAPD.** Disponível em: <http://www.shrimp.ufscar.br>. Acessado 08/09/2010
- HILTON, A.C.; BANKS, J.G.; PENN, C.W. Optimization of RAPD for fingerprinting *Salmonella*. Letters in Applied Microbiology, Malden MA, N.24,9.243-248,1997.