

SELEÇÃO DE MARCADORES RAPD PARA ANÁLISE GENÉTICA EM GERMOPLASMA DE TUCUMÃ-DO-PARÁ (*Astrocaryum vulgare* Mart.).

Natália Padilha de Oliveira¹, Maria do Socorro Padilha de Oliveira² e Elisa Ferreira Moura³

Resumo

O tucumã-do-pará é palmeira perene, oleaginosa, de caule múltiplo, indicada como uma das alternativas de matéria prima ao mercado de biodiesel. Marcadores RAPD são úteis em análises genéticas de espécies pouco estudadas, como o tucumã. O objetivo deste trabalho foi selecionar marcadores RAPD polimórficos para análises genéticas dessa palmeira. Foram testados 116 *primers* RAPD em cinco genótipos do Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA. Foram selecionados 24 *primers* que amplificaram bandas nítidas e polimórficas. A matriz binária foi gerada para análises do número ótimo de bandas, pelo método *bootstrap* e da similaridade genética. O número de bandas adequado para a genotipagem foi de 130. Logo, os 24 marcadores são úteis para expressar a variabilidade e a divergência genética em germoplasma dessa espécie.

Introdução

O tucumã-do-pará (*Astrocaryum vulgare* Mart.) é uma palmeira perene, oleaginosa, que apresenta caule em touceira e espinhos em várias partes da planta. É nativo da América do Sul com ocorrência no Norte e Nordeste do Brasil, especialmente no Pará, Amapá, Maranhão e Piauí (SHANLEY; MEDINA, 2005). É heliófila e pioneira sendo freqüente em áreas alteradas, formando aglomerados quase homogêneos. Tem uso integral, mas seus frutos se destacam pela obtenção de refresco e óleo para a alimentação da população local, na produção de ração animal e na confecção de bijóias.

Essa palmeira vem sendo indicada como uma alternativa no fornecimento de matéria prima ao mercado de biodiesel na região Norte (BIODIESEL, 2008). Por esse motivo tem despertado interesse de diferentes órgãos de pesquisas da região, para a obtenção de informações básicas que possam direcionar o manejo adequado de suas populações naturais e o estabelecimento de cultivos racionais.

A caracterização molecular é uma ferramenta útil na conservação *in situ* e *ex situ*, manejo e uso de qualquer espécie por acessar informações no genoma dos indivíduos (GRATTAPAGLIA, 2007). Marcadores moleculares, como os RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) são úteis na mensuração da variabilidade e da divergência genética entre e dentro de populações de espécies pouco estudadas (GRATTAPAGLIA, 2007), como a espécie em foco. São vantajosos por analisarem o polimorfismo de um grande número de amostras em pouco de tempo, além da simplicidade e rapidez na obtenção dos dados (GRATTAPAGLIA, 2007). Contudo, por terem seqüências aleatórias e pela disponibilidade de um grande número *primers* RAPD, faz-se necessário à realização de uma triagem para identificar aqueles capazes de gerar bandas polimórficas nítidas, para otimizar sua utilização.

O objetivo deste trabalho foi selecionar marcadores RAPD polimórficos para análises genéticas em germoplasma de tucumã-do-pará.

Material e Métodos

Foram testados 116 *primers* RAPD, escolhidos ao acaso de kits da *Operon Technologies* (INVITROGEN), em cinco genótipos coletados em Bragança-PA e conservados na forma *ex situ* no

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

³ Terceiro Autor é Bolsista de Desenvolvimento Científico Regional do Convênio CNPq/FAPESPA, Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Genética Molecular, Travessa Enéas Pinheiro s/n, Belém, PA, CEP 66095-100. E-mail: fermoura@hotmail.com
Apoio financeiro: FINEP, FAPESPA e CNPq.

BAG-tucumã da Embrapa Amazônia Oriental. De cada genótipo foi retirada uma amostra de folha jovem (folíolo recém colhido) para a extração do DNA genômico total.

O DNA foi extraído de 100 mg de cada amostra, de acordo com o protocolo CTAB estabelecido por Doyle e Doyle (1990), com modificações. A concentração de DNA foi avaliada pela comparação com três concentrações de DNA do fago λ (50, 100 e 200 ng. μl^{-1}) aplicadas em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio, sendo depois diluídos para a concentração de trabalho de 10 ng. μl^{-1} .

As reações de amplificação (PCR-RAPD) foram preparadas em microtubos de 0,2 ml, com volume final de 15 μl (35 ng de DNA genômico; 1 mM de cada um dos desoxirribonucleotídeos trifosfatos; 1,3 mM do primer; 10mg. ml^{-1} de BSA; 1 unidade de enzima Taq polimerase da Invitrogen; e tampão de reação contendo MgCl_2 fornecido pelo fabricante) e colocadas em termociclador Amplitherm TX96 da AXIGEN, programado para 40 ciclos, segundo Oliveira *et al.* (2007).

Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose a 1%, preparados com tampão TBE (0,45 M de Tris-Borato e 0,01 M de EDTA) 1,0X, corados com brometo de etídio, e separados por eletroforese horizontal, conduzida em 100 V por uma hora e 30 minutos. Os géis foram visualizados em transiluminador de luz UV e as imagens capturadas digitalmente.

Foram selecionados os *primers* que geraram bandas nítidas e polimórficas. Com os *primers* selecionados foi realizada a genotipagem dos cinco indivíduos. A matriz binária foi utilizada para as análises do número ótimo de bandas, pelo método *bootstrap* do aplicativo GENES, e para avaliar o padrão de similaridade genética dos cinco genótipos, pelo método UPGMA no software NTSYS-pc 2,1, com base no coeficiente de Jaccard.

Resultados e Discussão

Dos 116 *primers* testados, cinco não amplificaram, treze geraram apenas bandas monomórficas e os demais bandas polimórficas, representando 84,48% dos *primers* avaliados. Dos 98 *primers* que geraram polimorfismo 24 foram selecionados por apresentarem qualidade na amplificação e maior polimorfismo (Tab.1). Na Figura 1 encontra-se o perfil da amplificação de quatro *primers*. Os *primers* selecionados produziram 198 bandas, sendo 152 polimórficas, o que representa 76,77% de polimorfismo. Em média, cada *primer* amplificou de 6,3 bandas polimórficas. Moura *et al.* (2005), Cerqueira *et al.* (2008), Santos *et al.* (2007) selecionando *primers* RAPD para as espécies *Hancornia speciosa*, *Ricinus communis* e *Orbignya* ssp., respectivamente, obtiveram percentagens de *primers* polimórficos bem abaixo dos resultados aqui mencionados.

Na Tabela 2, encontra-se o resumo das análises de reamostragem. Percebe-se que houve uma relação direta entre o número de bandas analisadas e a magnitude de correlação dos valores obtidos com a matriz de similaridade para diferentes números de bandas simuladas. Para Kruskal (1964), quando o estresse (E) assume valor inferior a 0,05 o número de bandas pode ser considerado ideal. Como esse valor foi atingido com 130 bandas, onde a correção (r) foi de aproximadamente 0,99 e o estresse (E) de 0,047. Logo, o número de bandas avaliado foi adequado e, segundo Moura *et al.* (2005), a inclusão de novos locos vai depender da disponibilidade de recursos e do balanceamento entre a amostragem das plantas e das populações existentes no campo (MOURA *et al.*, 2005). Oliveira *et al.* (2007) relataram 180 bandas como ideais para 116 acessos da espécie *Euterpe oleracea*.

No dendrograma houve a formação de dois grupos a partir de 24% de similaridade: um formado apenas pelo genótipo 5 e o outro pelos demais genótipos (Figura 2) e expressa o padrão de similaridade entre os cinco genótipos. No último grupo, os genótipos 1 e 3 mostraram até 49% de similaridade genética. Moura *et al.* (2005) ao analisar seis genótipos de mangabeira encontraram padrão semelhante, porém com dois grupos sendo formados a partir de 49% de similaridade e dois genótipos apresentando até 65% de similaridade genética.

Conclusões

Os 24 marcadores RAPD selecionados são eficientes e devem ser úteis nas análises da variabilidade e divergência genética de germoplasma de tucumã-do-pará (*A. vulgare*). As 152 bandas polimórficas geradas pelo *primers* selecionados estão acima do número ideal (130 bandas) obtido pela análise

bootstrap. Logo, o dendrograma gerado para a separação dos genótipos expressa com precisão o padrão de similaridades entre os genótipos.

Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão de bolsas ao primeiro e terceiro autores e à FINEP pelo apoio financeiro.

Referências

- BIODIESEL no mundo. *Revista Biodieselbr.com*.(2008). Disponível em <http://www.biodieselbr.com/biodiesel/mundo/biodiesel-no-mundo.htm>. Acesso: Maio. 2009.
- 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.; PRIMO JR, J.F. Seleção de primers RAPD capazes de detectar polimorfismo em mamoneira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 3, 2008, Salvador. *Anais...*, campina Grande: Embrapa, 2008. DC-rom
- GRATTAPAGLIA, D. *Aplicações operacionais de marcadores*. In: Biotecnologia florestal. BORÉM, A (ed.). Viçosa: [s.n.], 2007. pág. 175-200.
- MOURA, N.F; CHAVES, L.J; VENCOVSKY, R; ZUCCHI, M.I; PINHEIRO, J.B; MORAIS, L.K; MOURA, M.F. Seleção de marcadores RAPD para o estudo da estrutura genética de populações de *Hancornia speciosa* Gómez. *Biosci. J.*, Uberlândia, v. 21, n.3, p. 119-125, Sept/Dec, 2005.
- OLIVEIRA, M. do S. P de; AMORIM, E.P; SANTOS, J.B dos; FERREIRA, D. F. Diversidade genética entre acessos de açaizeiro baseada em marcadores RAPD. *Ciênc. Agrotec.*, Lavras, v. 31, n.6, p. 1645-1653, 2007.
- SHANLEY, P; MEDINA, G. *Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica*. Belém: CIFOR, 2005. 300p.
- SANTOS, M.; SOUSA, I.G.B.; DINIZ, F.M.; SOUZA, V.A.B.; ARAÚJO, E.C.E.; SITOLIN, I.M.; LIMA, P.S.C. 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, 2007, Teresina. *Anais...*, Teresina: Embrapa, 2007. CD-rom.

Tabela 1. Identificação dos 24 marcadores RAPD selecionados para análises genéticas em germoplasma de tucumã-do-pará (*A. vulgare*) e o número de bandas polimórficas geradas.

Marcador RAPD	Seqüência (5'→3')	Nº. de bandas polimórficas
OPA-08	5' GTGACGTAGG 3'	6
OPA-11	5' CAATCGCCGT 3'	7
OPA-14	5' TCTGTGCTGG 3'	9
OPA-19	5' CAAACGTCGG 3'	9
OPAB-01	5' TTCCCCACCC 3'	7
OPAB-04	5' GGCACGCGTT 3'	7
OPAB-08	5' GTTACGGACC 3'	7
OPAB-19	5' ACACCGATGG 3'	9
OPAB-20	5' CTCTCGGAC 3'	6
OPAR-07	5' TCCTTCGGTG 3'	7
OPAZ-04	5' CCAGCCTCAG 3'	7
OPAZ-05	5' TCCGCATAACC 3'	6
OPAZ-11	5' TCCAGCGCGT 3'	6
OPAZ-18	5' CCGACGTTGA 3'	8
OPB-02	5' TGATCCCTGG 3'	4
OPB-05	5' TGCGCCCTTC 3'	4
OPJ-13	5' CCACACTACC 3'	5
OPN-20	5' CGTGCTCCGT 3'	5
OPO-03	5' CTATGCCGAC 3'	6
OPO-12	5' CAGTGCTGTG 3'	8
OPU-05	5' TTGGCGGCCT 3'	5
OPU-06	5' ACCTTTGCGG 3'	5
OPU-10	5' ACCTCGGCAC 3'	5
OPU-17	5' ACCTGGGGAG 3'	4
Total		152
Média		6,3



Figura 1. Perfil de um gel de agarose contendo a amplificação de bandas polimórficas de quatro *primers* RAPD aplicados nos cinco genótipos de tucumã-do-pará (*A. vulgare*).

Tabela 2. Resumo da análise de *bootstrap* contendo as médias para n°. de marcadores polimórficos simulados com base nas 152 bandas geradas entre os cinco genótipos de tucumã (*A. vulgare*).

Nº de bandas	Correlação (r)	SQDesvio	Estresse (E)
10	0,5095	0,2928	0,4469
20	0,6033	0,1529	0,3176
30	0,7872	0,0731	0,2246
40	0,8239	0,0562	0,1962
50	0,8902	0,0376	0,1588
60	0,9114	0,0301	0,1433
70	0,9198	0,0246	0,1293
80	0,9414	0,0193	0,1148
90	0,9576	0,0134	0,0953
100	0,9680	0,0100	0,0827
110	0,9733	0,0085	0,0755
120	0,9805	0,0059	0,0628
130	0,9896	0,0033	0,0476
140	0,9954	0,0015	0,0317
150	0,9993	0,0003	0,0139
152	1,0	0,0	0,0

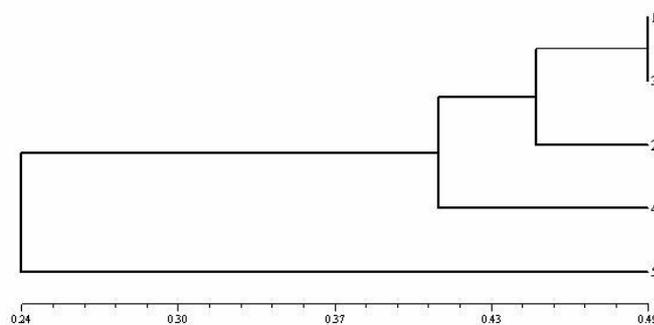


Figura 2. Padrão de similaridade genética gerado pelo método UPGMA com base no coeficiente de Jaccard, pelas 152 bandas polimórficas de RAPD obtidas nos cinco genótipos de tucumã (*A. vulgare*).