

SELEÇÃO DE *PRIMERS* RAPD PARA ESTUDOS GENÉTICOS EM *Oenocarpus distichus* MART.

Jean Roberto Silva da Costa¹, Maria do Socorro Padilha de Oliveira², Elisa Ferreira Moura³,
Emanuelly Melo de Oliveira⁴

Resumo

A espécie *O. distichus*, conhecida por bacaba-de-azeite, tem importância pela qualidade dos produtos obtidos de seus frutos, seja para óleo ou refresco. O presente trabalho teve por objetivo selecionar *primers* RAPD para aplicação em estudos de variabilidade do germoplasma dessa palmeira. Foram testados 120 *primers* RAPD em DNA genômico de cinco genótipos. Dos 120 *primers*, apenas 43 amplificaram de forma satisfatória. Dos *primers* que amplificaram dois apresentaram bandas nítidas e monomórficas e 39 nítidas e polimórficas. Os *primers* polimórficos revelaram perfis com até oito bandas por *primer*, com média de 5,22 bandas. No geral, 22 *primers* foram selecionados por apresentarem maiores números de bandas polimórficas. Com base nos resultados obtidos, espera-se que os *primers* selecionados possam gerar alto grau de polimorfismo ao serem aplicados em todos os acessos do BAG dessa espécie da Embrapa Amazônia Oriental.

Introdução

Palmeiras do gênero *Oenocarpus* possuem ampla distribuição na Amazônia e apresentam potencial sócio-econômico para a produção de frutos e palmito. A espécie *O. distichus*, conhecida como bacaba-de-azeite, tem sua importância voltada para frutos por possuir estipe solitário, cachos bem pesados e excelente rendimento de polpa. Os principais produtos obtidos de seus frutos são: o refresco *in natura* e o óleo, similar ao azeite de oliva, sendo utilizados especialmente pelas populações que habitam essa região.

Vale ressaltar que essa espécie de bacaba, assim como a maioria das espécies amazônicas, tem potencial de exploração econômico, além da contribuição para o bem-estar humano, mas tem conhecimento restrito (CLEMENT et al., 1982). Desta forma, para proporcionar o aproveitamento do potencial econômico das palmeiras regionais como a bacaba-de-azeite e a sua incorporação à lista de produtos comerciais, torna-se necessária a ampliação dos estudos básicos e aplicados para o melhor conhecimento de sua diversidade, ocupação no ecossistema, evolução, adaptação e desenvolvimento de métodos adequados para o manejo e utilização de seu potencial (MIRANDA et al., 2001).

Marcadores moleculares são ferramentas úteis no estudo da diversidade e na quantificação da variabilidade genética de germoplasma de qualquer espécie conservada em Bancos ou Coleções de Germoplasma. Os marcadores RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) têm a vantagem de serem pouco onerosos e gerarem alto grau de polimorfismo. Para a espécie em questão não há relatos na literatura disponível sobre a utilização desses marcadores.

O presente trabalho teve por objetivo selecionar *primers* RAPD para aplicação em estudos de variabilidade do germoplasma de *O. distichus* conservado no Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental.

Material e métodos

Foram coletados folíolos de folhas jovens de cinco indivíduos de *O. distichus* pertencentes ao Banco de Germoplasma do complexo *Oenocarpus/Jessenia* da Embrapa Amazônia Oriental, localizado a 15 km da sede para a extração de DNA genômico total.

A extração de DNA foi efetuada em 100 mg de folíolo com base no protocolo CTAB de Doyle e Doyle (1990) com modificações. O DNA genômico total foi ressuspenso em 400 µl TE (pH 8,0). A

quantificação do DNA foi feita em gel de agarose a 1% pela comparação com três concentrações de DNA lambda (50, 100 e 200 ng/μl).

Foram testados 120 *primers* RAPD nas cinco amostras de DNA. O volume total das reações de PCR foi de 15 μL, contendo 30 ng de DNA genômico, 50 μM de cada um dos desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,4 μM do oligonucleotídeo iniciador (*primer*), 1 unidade de enzima Taq polimerase (InVitrogen, Brasil) e tampão de reação contendo MgCl₂ fornecido pelo fabricante da enzima.

As reações PCR-RAPD foram preparadas em microtubos de 0,2 mL e efetuadas em termociclador Amplitherm TX96 programado para 40 ciclos, conforme Oliveira et al. (2007). Em cada ciclo, a desnaturação do DNA foi efetuada a 94°C por um minuto, o anelamento a 37°C por 1 minuto e a elongação a 72°C por dois minutos. Após os 40 ciclos, ocorreu a etapa de extensão final realizada a 72°C por 7 minutos.

Os produtos das reações foram aplicados em gel de agarose (InVitrogen, Brasil) a 1%, preparado com TBE (0,45 M de Tris-Borato e 0,01 M de EDTA)1,0X e corados com brometo de etídio. A separação dos produtos amplificados foi realizada em cuba de eletroforese horizontal a 100V por um período de 1 hora e 30 minutos.

Os géis foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e as imagens foram capturadas digitalmente e arquivadas para avaliação dos padrões de bandas.

Os *primers* que geraram maior polimorfismo e que apresentaram bandas nítidas foram selecionados para serem, posteriormente, aplicados na análise do germoplasma de *O. distichus* conservado *in vivo*.

Resultados e Discussão

Dos 120 primers RAPD testados, apenas 43 amplificaram de forma satisfatória. Dos *primers* que apresentaram bandas nítidas dois geraram bandas monomórficas e 39 amplificaram bandas polimórficas. Os primers polimórficos revelaram perfis com até oito bandas por *primer*, com média de 5,22 bandas.

Encontram-se listados na Tabela 1, os 22 *primers* selecionados que apresentaram os maiores números de bandas polimórficas. Esses *primers* geraram 145 produtos de amplificação, sendo 79,31% polimórficos e com média de 5,22 bandas polimórficas. O *primer* OPBA-02 gerou o maior número de bandas, sendo oito bandas polimórficas, enquanto o menor polimorfismo aconteceu no *primer* OPL-15, com três bandas. Resultados similares foram obtidos por Oliveira (2005) ao utilizar 120 *primers* RAPD em cinco genótipos de açaizeiro, tendo selecionado 28 deles que exibiram bandas nítidas e um bom polimorfismo. Por outro lado, Costa et al. (2001, 2004) encontraram número similar de bandas polimórficas (177 e 161) quando aplicaram em dez indivíduos de diferentes procedências e quinze indivíduos de *Euterpe oleracea* com variação para perfilhamento e coloração dos frutos, respectivamente.

Com base nos resultados obtidos, espera-se que os 22 *primers* selecionados possam gerar alto grau de polimorfismo ao serem aplicados em todos os acessos do BAG dessa espécie da Embrapa Amazônia Oriental.

Conclusão

Dos 120 primers RAPD avaliados 22 são desejáveis para serem aplicados na caracterização genética dos acessos de bacaba-de-azeite conservados no Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental.

Agradecimentos

À Embrapa Amazônia Oriental e ao CNPq pela concessão de bolsas ao primeiro e terceiro autores, respectivamente. À FAPESPA e Embrapa Amazônia Oriental pelo apoio financiamento do trabalho.

Referências

COSTA, M. R.; OLIVEIRA, M. do S. P.; MOURA, E. F. Variabilidade genética em açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.). *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Brasília, v. 21, p. 46-50, jul./ago. 2001.

COSTA, M. R.; OLIVEIRA, M. do S. P.; OHAZE, M. M. M. Divergência genética no açazeiro com base em marcadores RAPD. *Revista de Ciências Agrárias*, Belém, n. 41, p. 89- 95, jan./jun. 2004.

CLEMENT, C.R; MÜLLER, C.H.; FLORES, W.B.C. Recursos genéticas de espécies frutíferas da Amazônia Brasileira. *Acta Amazônica*, Manaus, v.12, n. 4, p.677-695, 1982.

CALZAVARA, B.B.G. *As possibilidades do açazeiro no estuário amazônico*. Belém: Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, 1978. 103p.

DOYLE, J.J; DOYLE, J.L. *Isolation of plant DNA from fresh tissue*. *Focus*, 12: 13-15, 1990.

FERREIRA, C.A.G. Recuperação de áreas degradadas. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 21, n. 202, p.127-130, 2000.

MIRANDA, I.P.A.; RABELO, A.; BUENO, C.R.; BARBOSA, E.M.; RIBEIRO, M.N.S. *Frutos de Palmeiras da Amazônia*. Manaus: MCT/INPA, 2001. 120p

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Brasília, DF: Embrapa/CENARGEN, 1998. 220 p.

Tabela 1. Número de bandas amplificadas e polimórficas geradas pelos 22 marcadores RAPD selecionados para serem utilizados em acessos de *O. distichus*.

Nº	Primers	Seqüência 5` → 3`	Nº. de bandas	
			Amplificadas	Polimórficas
1	OPBA02	5'CCACACTACC3'	11	8
2	OPB11	5'CCACAGCAGT3'	10	6
3	OPBA01	5'TGCTCGGCTC3'	9	7
4	OPBA03	5'GTGCGAGAAC3'	8	8
5	OPAR11	5'GGGAAGACGG3'	8	7
6	OPN03	5'GTCGTTCTTG3'	7	6
7	OPN09	5'ACCTTCGGAC3'	7	4
8	OPN11	5'GGCGAAGGTT3'	6	5
9	OPA-01	5'AGGCCCTTCG3'	6	5
10	OPA03	5'AGTCAGCCAC3'	6	5
11	OPAZ04	5'CCAGCCTCAG3'	6	5
12	OPB09	5'TGGGGGACTC3'	6	5
13	OPB18	5'TTCCCCACCC3'	6	4
14	OPM04	5'GGCGGTTGTC	6	3
15	OPAB-01	5'CCGTCTCGGTAG3'	5	5
16	OPJ-13	5'GGTACTTCCC3'	5	5
17	OPA04	5'AATCGGGCTG3'	5	4
18	OPBA07	5'GGGTCGCATC3'	5	4
19	OPS13	5'ACAGCCCCCA3'	4	4
20	OPAZ14	5'CACGGCTTCC3'	4	3
21	OPM11	5'AGCGTCACTC3'	4	3
22	OPL15	5'TGCCGGCTTG3'	3	1
TOTAL			145	115
Média			6,59	5,22

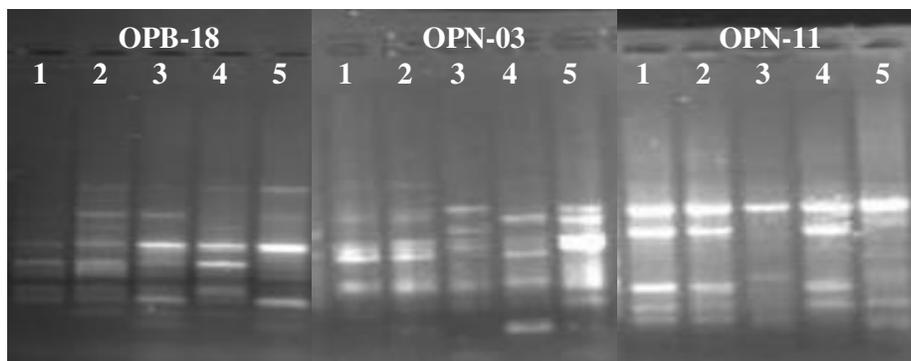


Figura 1. Gel de agarose contendo exemplos de polimorfismo gerados por três *primers* RAPD nos cinco genótipos de *O. distichus*.