

# SELEÇÃO DE *PRIMERS* RAPD PARA CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA EM *Oenocarpus mapora*

Jean Roberto Silva da Costa<sup>1</sup>, Elisa Ferreira Moura<sup>2</sup>, Maria do Socorro Padilha de Oliveira<sup>3</sup>, Natália Padilha de Oliveira<sup>4</sup>

## Resumo

A bacaby (*Oenocarpus mapora*) é uma palmeira produtora de frutos que produzem óleo de excelente qualidade e refresco de alto valor nutricional. A seleção de *primers* RAPD foi realizada visando à análise de divergência genética entre acessos do Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental. Foram testados 106 *primers* RAPD em cinco genótipos de *O. mapora*. 65,1% dos *primers* foram polimórficos, os quais geraram 307 bandas, com 71,3% delas polimórficas. Dos *primers* testados, 24 foram selecionados para a análise de divergência genética, os quais apresentaram boa amplificação e considerável polimorfismo. Os *primers* selecionados foram: OPA-04, OPA-06, OPA-12, OPAB-01, OPAB-02, OPAB-11, OPAB-12, OPAB-19, OPAZ-04, OPAZ-11, OPAR-07, OPB-11, OPJ-12, OPM-07, OPN-11, OPO-03, OPO-12, OPO-16, OPU-01, OPU-06, OPU-16, OPU-17, OPS-13, OPS-15.

## Introdução

*Oenocarpus mapora*, conhecida como bacaby, é uma palmeira nativa da Amazônia que produz frutos cujas polpas podem ser utilizadas na produção de refresco, geléias e óleo comestível semelhante ao do azeite de oliva, além das amêndoas permitirem a extração de óleo com a mesma característica. Essa palmeira é bastante empregada por comunidades que moram próximas aos locais com alta densidade da espécie e, apesar de produzir refresco com qualidades e uso similar ao do açazeiro (*Euterpe oleracea*), seu mercado ainda é local. O consumo dos frutos na forma natural ou processada serve como complemento nutricional, além de gerar divisas com a venda desses produtos.

A possibilidade de manter uma parte da variabilidade genética da espécie em foco em banco de germoplasma reduz os riscos de perda por degradação ambiental. Para que isso seja realizado de maneira proveitosa, a etapa de avaliação da amostra de variabilidade genética torna-se primordial para o estabelecimento de estratégias de coleta, conservação e manejo.

Marcadores moleculares são ferramentas úteis na quantificação da variabilidade, pois apresentam a vantagem de não sofrerem influência ambiental e serem capazes de amostrar uma porcentagem maior do genoma em comparação aos marcadores fenotípicos (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), foram descritos por Williams et al. (1990) e têm a vantagem de serem pouco onerosos e possuem alto grau de polimorfismo.

Para realizar as reações de RAPD, se faz necessário uma seleção prévia de *primers*. O sucesso na aplicação desses marcadores depende de boa amplificação e da geração de polimorfismo. Com base nessa premissa o objetivo desse trabalho foi realizar a seleção de *primers* RAPD para *O. mapora*.

<sup>1</sup>. Primeiro Autor é aluno de graduação em Licenciatura em Biologia, Universidade Federal de Pará e Bolsista da Embrapa Amazônia Oriental, Trav. Enéas Pinheiro s/n, Belém, PA, CEP: 66095-100. E-mail: [jeancosta\\_bio@yahoo.com.br](mailto:jeancosta_bio@yahoo.com.br)

<sup>2</sup>. Segundo Autor é Bolsista de Desenvolvimento Científico Regional do convênio CNPq/FAPESPA, Embrapa Amazônia Oriental, Trav. Enéas Pinheiro s/n, Belém, PA, CEP: 66095-100. E-mail: [ferrmoura@hotmail.com](mailto:ferrmoura@hotmail.com)

<sup>3</sup>. Terceiro Autor é Pesquisador A da Embrapa Amazônia Oriental, Trav. Enéas Pinheiro s/n, Belém, PA, CEP: 66095-100. E-mail: [spadilha@cpatu.embrapa.br](mailto:spadilha@cpatu.embrapa.br)

<sup>4</sup>. Quarto Autor é aluno de graduação em Licenciatura em Biologia, Universidade Federal de Pará, Bolsista do CNPq, Belém, PA, CEP: 66095-100. E-mail: [natybiologia2006@gmail.com](mailto:natybiologia2006@gmail.com)  
Apoio financeiro: FAPESPA, CNPq e Embrapa.

## Material e métodos

Foram selecionados cinco genótipos de *O. mapora* pertencentes ao Banco de Germoplasma do Complexo *Oenocarpus/Jessenia* da Embrapa Amazônia Oriental. Esses genótipos foram coletados em diferentes locais: Cruzeiro do Sul (AC), Sena Madureira (AC), Santo Antonio do Tauá (PA), Abaetetuba (PA) e Parintins (AM). De cada genótipo foi coletado uma amostra fresca (folíolo) de folha recém-aberta para a extração de DNA.

O DNA genômico total foi extraído pelo procedimento semelhante ao de Doyle & Doyle (1990). Posteriormente, foi diluído para a concentração de trabalho de  $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ . Nas cinco amostras foram testados 112 *primers* RAPD. As reações de PCR foram preparadas para volume final de 15  $\mu\text{l}$ , contendo 35 ng de DNA genômico, 1mM de cada um dos desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1,3 mM de um oligonucleotídeo iniciador (*primer*), 10  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  de BSA (bovine serum albumin), 1 unidade da enzima *Taq* polimerase (InVitrogen, Brasil) e tampão de reação contendo  $\text{MgCl}_2$  fornecido pelo fabricante da enzima.

As reações foram preparadas em microtubo de 0,2 ml e amplificadas em termociclador Amplitherm TX96 programado para 40 ciclos, conforme Oliveira (2005) e em cada ciclo, a desnaturação do DNA ocorreu a  $94^\circ\text{C}$  por 1 minuto, o anelamento ocorreu a  $37^\circ\text{C}$  por 1 minuto e a alongação ocorreu a  $72^\circ\text{C}$  por 2 minutos. Após os 40 ciclos, ocorreu a etapa de extensão final realizada a  $72^\circ\text{C}$  por 7 minutos.

Os produtos da reação foram aplicados em gel de agarose Invitrogen na concentração de 1% e preparado com tampão TBE (0,45 M de Tris-Borato e 0,01 M de EDTA) 1,0X. Em seguida, os produtos foram separados por eletroforese, em cuba horizontal contendo TBE 1,0X, conduzida em voltagem constante de 100 V por 1 hora e 30 minutos.

Os géis foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e as imagens foram capturadas digitalmente.

## Resultados e Discussão

Dos 106 *primers* testados, 8 não amplificaram e 10 tiveram amplificação fraca. Dos que amplificaram, apenas 19 foram monomórficos e, conseqüentemente, do total de *primers* avaliados 65,1% apresentaram polimorfismo. O número de bandas polimórficas detectadas nos *primers* variou de 1 a 10, com média de 3,17 bandas polimórficas por *primer*.

Levando em consideração somente os *primers* polimórficos, foram amplificadas 307 bandas, das quais 219 foram polimórficas, gerando 71,3% de polimorfismo. Com um número maior de genótipos, Loo et al. (1999) obtiveram 74% de polimorfismo em *Licuala glabra*, enquanto Oliveira (2005) obteve 100% de polimorfismo quando aplicou 28 *primers* RAPD previamente selecionados em 116 acessos de *Euterpe oleracea*. Como foram utilizados apenas cinco genótipos, é esperado que com o uso de mais genótipos e de diferentes locais, o polimorfismo e a média de bandas polimórficas por *primer* para *O. mapora* sejam bem maiores.

Dos 69 *primers* que geraram bandas nítidas e polimórficas, 24 foram selecionados para serem aplicados nos demais acessos, com base na sua amplificação e número de bandas polimórficas (Tabela 1). Estes *primers* geraram um total de 126 bandas polimórficas, com no mínimo 4 bandas e com média de 5,25 bandas por *primer*. Oliveira (2005) quando aplicou 120 *primers* RAPD em cinco genótipos de acaizeiro selecionou 28 deles que revelaram bandas nítidas e alto grau de polimorfismo.

## Conclusão

Dos 106 *primers* RAPD testados, 24 podem ser aplicados nos acessos de bacaby para estudos genéticos.

## **Agradecimentos**

Ao CNPq pela concessão de bolsa ao primeiro e quarto autores e a FAPESPA e EMBRAPA pelo financiamento do trabalho.

## **Referências**

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

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

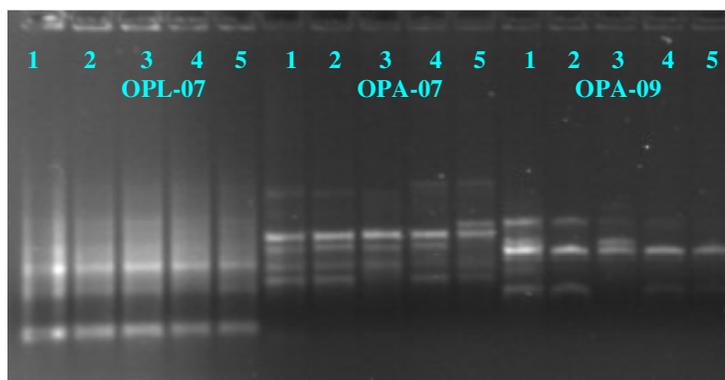
LOO, A.H.B.; TAN, H.T.W.; KUMAR, P.P.; SAW, L.G. Population analysis of *Licuala glabra* var. *glabra* (Palmae) using RAPD profiling. *Annals of Botany*, v.84, p. 421-437, 1999.

OLIVEIRA, M.S.P. *Caracterização molecular e morfo-agronômica de germoplasma de açazeiro*. 2005, 171f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, L.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, v.18, p.6531-6535, 1990.

**Tabela 1.** Primers RAPD selecionados para a análise genética em acessos de *Oenocarpus mapora*.

<i>Primers</i> selecionados	Seqüência	Número de bandas	Número de bandas polimórficas
OPA-04	5'-AATCGGGCTG-3'	8	4
OPA-06	5'-GGTCCCTGAC-3'	6	5
OPA-12	5'-TCGGCGATAG-3'	6	5
OPAB-11	5'-GTGCGCAATG-3'	7	7
OPAB-12	5'-CCTGTACCGA-3'	5	4
OPAB-01	5'-CCGTCGGTAG-3'	6	4
OPAB-02	5'-GGAAACCCCT-3'	5	4
OPAB-19	5'-ACACCGATGG-3'	5	4
OPAR-07	5'-TCCTTCGGTG-3'	6	6
OPAZ-04	5'-CCAGCCTCAG-3'	6	6
OPAZ-11	5'-TCCAGCGCGT-3'	4	4
OPB-11	5'-GTAGACCCGT-3'	6	5
OPJ-12	5'-GTCCCGTGGT-3'	11	10
OPM-07	5'-CCGTGACTCA-3'	5	5
OPN-11	5'-TCGCCGAAA-3'	9	5
OPO-03	5'-CTGTTGCTAC-3'	4	4
OPO-12	5'-CAGTGCTGTG-3'	8	5
OPO-16	5'-TCGGCGGTTTC-3'	9	8
OPS-13	5'-GTCGTTCTTG-3'	6	5
OPS-15	5'-CAGTTCACGG-3'	6	6
OPU-01	5'-ACGGACGTCA-3'	6	6
OPU-06	5'-ACCTTTGCGG-3'	6	5
OPU-16	5'-CTGCGCTGGA-3'	5	5
OPU-17	5'-ACCTGGGGAG-3'	4	4
Total		149	126
Média geral		6,21	5,25



**Figura 1.** Gel de agarose contendo exemplos de polimorfismo gerados por três *primers* RAPD nos cinco genótipos de *O. mapora*. 1, Parintins, AM; 2, Cruzeiro do Sul, AC; 3, Sena Madureira, AC; 4, Santo Antonio do Tauá, PA; 5, Abaetetuba, PA.