

**UTILIZAÇÃO DE PRIMERS RAPD PARA ESTUDO DE DIVERSIDADE
GENÉTICA DE ACESSOS DE BABAÇU (*Orbignya phalerata* Mart)
COLETADOS DE DIFERENTES REGIÕES**

Michelli Ferreira dos Santos, UESPI, michelly_m_santos@yahoo.com.br

Fábio Mendonça Diniz, EMBRAPA MEIO-NORTE, fmd1@cpamn.embrapa.com.br

Ilza Maria Sittolin, EMBRAPA MEIO-NORTE, ilza@cpamn.embrapa.com.br

Eugênio Celso Emérito Araújo, EMBRAPA MEIO-NORTE, emerito@cpamn.embrapa.com.br

Valdomiro Aurélio Barbosa de Souza, EMBRAPA MEIO-NORTE, valdo@cpamn.embrapa.com.br

Paulo Sarmanho Lima, EMBRAPA MEIO-NORTE, paulosarmanho@cpamn.embrapa.com.br

RESUMO: A caracterização genética é importante para os programas de conservação de recursos genéticos vegetal, pois avalia a distância entre as populações em estudo e pode auxiliar na escolha das espécies a serem utilizadas na conservação mediante a estimativa de índices de similaridade entre os indivíduos analisados. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade genética de acessos de babaçu (*Orbignya phalerata* Mart.) do banco de germoplasma da Embrapa Meio-Norte, oriundos de Tocantinópolis, Balsas, Teresina, Ubajara e Ipú por meio de marcadores RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso). A amplificação das amostras de DNA de cada material foi feita via PCR (Random Amplified Polymorphic DNA), as reações foram preparadas em volume final de 20µl, 1X [20Mm Tris-HCL ph 8,0; 0,1Mm EDTA; 1Mm DTT; 50% (v/v) glicerol]; MgCl₂ 1,5Mm; dNTPs 250mM de primer, 1U de Taq DNA Polymerase (REAL TAQ). Foi feita uma seleção de 5 primers (M16, M20, A03, A05, A15) dos 22 testados dos quais apresentaram bandas polimórficas indicando a existência de variabilidade genética entre os acessos utilizados.

Palavras-Chave: Marcadores Moleculares; Polimorfismo; Variabilidade Genética.

INTRODUÇÃO

O babaçu (*Orbignya phalerata* Mart.) constitui um recurso natural de elevada importância no Nordeste do Brasil, como fonte de óleo industrial, alimento e diversos outros produtos comerciais e de subsistência. Atualmente, no Brasil, encontram-se vastos babaçuais espalhados ao sul da bacia amazônica, onde a floresta úmida cede lugar à vegetação típica dos cerrados. São os Estados do Maranhão, Piauí e Tocantins que concentram as maiores extensões de matas onde predominam os babaçuais, formando, muitas vezes e espontaneamente, agrupamentos homogêneos, bastante densos e escuros, tal a proximidade entre os grandes coqueiros.

A prática da agricultura rudimentar e nômade e a proliferação de projetos agropecuários e industriais que desbastam irracionalmente ou erradicam por completo as palmeiras, provoca a diminuição da produtividade ou a redução das reservas de babaçu que em locais de maior densidade demográfica e também de maior unidade animal bovino, tem o número médio de palmeira adulta reduzido. A expansão da fronteira agrícola também contribui para a erosão genética do babaçu implicando na redução da variabilidade e perda de genes que podem ser importantes em futuros programas de melhoramento.

A caracterização genética é importante para os programas de conservação de recursos genéticos vegetal, pois avalia a distância entre as populações em estudo e pode auxiliar na escolha das espécies a serem utilizadas na conservação mediante a estimativa de índices de similaridade entre os indivíduos analisados. Além disso, possibilita cruzamentos que favorecerão a manutenção da máxima variabilidade genética e evita esforços na manutenção de amostras que geneticamente seriam similares. (Egito *et al.*, 2001).

Os marcadores moleculares surgiram como uma nova ferramenta no processo de melhoramento genético (Moreira, 2001). A técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) utiliza primers únicos de seqüência simples e arbitrária para amplificar fragmentos de DNA por PCR (Polymerase Chain Reaction) (Williams *et al.*, 1990) possibilitando detectar o polimorfismo do DNA, amplificado ao acaso em múltiplas regiões do genoma (Dinesh *et al.*, 1993). Essa técnica é a de menor custo, de menor número de etapas, menor tempo para se obter os resultados e maior facilidade de implementar, o que a torna um dos marcadores mais utilizado e difundido (Milach, 1998).

A Embrapa Meio-Norte possui um banco de germoplasma de babaçu composto de 185 acessos de babaçu que necessitam ser caracterizados para melhor uso da diversidade. Dessa forma este trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética de 5 acessos de babaçu

coletados em Tocantinópolis-TO, Balsas-MA, Teresina-PI, Ubajara-CE e Ipú-CE, por meio de marcadores RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) .

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas folhas jovens de 5 acessos de babaçu, BRA-000078/1 (TO), BRA-000086/9(BA), BRA-000094/4(TE), BRA-0000108/1(CE) e BRA-0000116/2(CE) oriundos do banco de germoplasma da Embrapa Meio-Norte, Teresina-PI.

A extração de DNA foi feita com material devidamente desidratado, macerado em nitrogênio líquido, utilizando-se DNeasy® Plant Mini Kit. A quantificação do DNA extraído foi feita em gel de agarose a 0,8% com TBE (Tris-Borato-EDTA) 1X e corado com brometo de etídio, foi feita a quantificação comparando o DNA das amostras com o DNA-λ na concentração de 100ng.

Para a análise de marcadores RAPD foram testados 22 primers (Gibco BRL) dos quais 5 foram selecionados. As reações de amplificação foram preparadas em volume final de 20μl com Tampão 1X [20Mm Tris-HCL ph 8,0; 0,1Mm EDTA; 1Mm DTT; 50% (v/v) glicerol]; MgCl₂ 1,5Mm; dNTPs 250μM de primer, 1U de Taq DNA Polymerase (INVITROGEN).

As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti seguindo um programa de 1 min a 92°C para completa desnaturação do DNA molde, foram efetuados 40 ciclos de 1 min a 92°C, 1 min a 35°C e 2 min a 72°C, seguindo-se de 5 min a 72°C para completa extensão dos produtos amplificados, que foram separados eletroforéticamente em gel de agarose (1,4%) com tampão TBE 1X., em voltagem constante de 60 Volts, por aproximadamente 2 horas. Utilizou-se como marcador de massa molecular o *ladder* de 1Kb (Gibco-BRL). A coloração do gel foi feita com brometo de etídio, sendo este, em seguida, fotografado sob luz ultravioleta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliados 5 primers RAPD que proporcionaram bandas polimórficas (Figura 1) e (Figura 2), indicando a existência de variabilidade genética entre os acessos utilizados conforme foi observado por Gottardi et al, 2001 em matrizes de abacaxi e Hoffmann et al, 2005 em algumas variedades brasileiras de algodão. O número de bandas geradas por cada primers variou de 4 (M20 e A03) a 9 (A05). A porcentagem de polimorfismo por primers foi de 57,1%(Tabela 1).

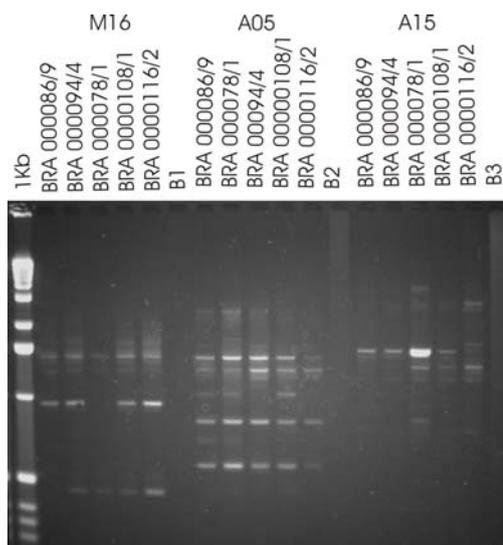


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose, mostrando o polimorfismo de acessos de babaçu, pela técnica de RAPD com o iniciador M16, A05 e A15; os genótipos são de Balsas-MA 000086/9, Teresina-PI 000094/4, Tocantinópolis-TO 000078/1, Ubajara-CE 0000108/1 e Ipú-CE 0000116/2.

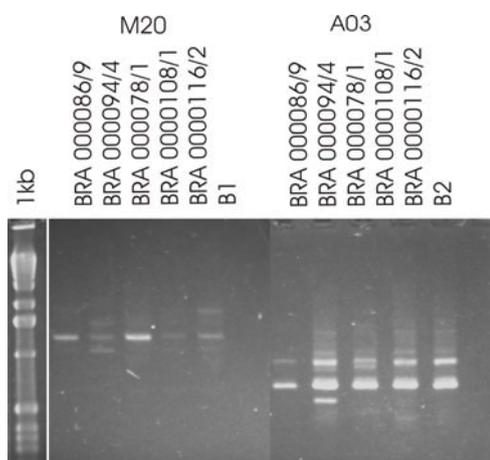


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose, mostrando o polimorfismo dos acessos de babaçu, com os iniciadores M20 e A03 pela técnica de RAPD.

Dentre os primers observados, o M16, A05 e A03 apresentaram intensidade e nitidez acentuadas nos géis de agarose e o M20 e A15 intensidade média. Não foram consideradas bandas com baixo nível de resolução para evitar erros nas interpretações. Segundo Ferreira & Grattapaglia (1998), bandas pouco consistentes ocorrem com todos os tipos de marcadores

moleculares, sendo atribuídas, em ensaios RAPDs, ao baixo poder do primer discriminar sítios de amplificação distintos, à competição entre diferentes sítios de amplificação por substrato e enzima, e à problemas na padronização das condições de amplificação.

Tabela 1: Número e porcentagem de bandas polimórficas por iniciador usado na caracterização da variabilidade genética dos acessos de babaçu.

Primer	Seqüência de nucleotídeos	Total bandas	de Total de bandas polimórficas	Porcentagem de bandas polimórficas
M16	GTAACCAGCC	6	4	66,6
M20	AGGTCTTGGG	4	3	75,0
A03	AGTCAGCCAC	4	2	50,0
A05	AGGGGTCTTG	9	4	44,4
A15	TTCCGAACCC	5	3	60,0
Total		28	16	57,1

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicam a presença de variabilidade entre os acessos estudados e que os marcadores RAPD tem potencial para caracterização molecular dos acessos do banco de germoplasma de babaçu da Embrapa Meio-Norte.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GOTTARDI, M.V.C.; LEMOS, E.G.M.; RUGGIERO, C. Avaliação de plantas matrizes de abacaxizeiro cv Smooth Cayenne utilizando marcadores RAPD e padrões isoenzimáticos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.3, p.463-467, 2001.

DINESH, K.R.; LIM, T.M.; CHAN, W.K.; PHANG, V.P.E. **Genetic variation inferred from RAPD fingerprinting in three species of tilapia**. *Aquaculture international*, v. 4, 19-30, 1996.

EGITO, A. de: ALBUQUERQUE. M. S.: MARIANTE, A da S. Caracterização genética

de raças naturalizadas. In: **Simpósio de recursos genéticos para América latina e Caribe**, 3., 2001, Londrina. Anais...Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná, 2001

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

HOFFMANN, Lúcia Vieira ; ANDRADE, Andrezza M ; BATISTA, Carlos Eduardo de Araújo ; ARAÚJO, Fábio Rodrigo ; JÁCOME, Roseane Gomes ; BARROSO, P. A. V. . Distância genética entre algumas variedades brasileiras de algodão medida por marcadores RAPDs e microsátélites. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004 (Série Comunicado Técnico).

MILACH, S. **Principais tipos de marcadores moleculares e suas características**. In:MILACH, S.C.K. (Ed.). Marcadores moleculares em plantas. Porto Alegre: Sandra Milach, 1998.p. 17-28.

Moreira, H.L.M., S. Zimmermann, R.P. Ribeiro,R.G. Bastos, L.D. Vargas, and J.A. Povh.2003. The use of RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) for genetic monitoring in breeding programs of tilapia. Page 460.In: World Aquaculture, Salvador, Brasil(Abstract).

Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.Nucleic Acids Res. 18(22):6531-6535.**30**