

NÚMERO ÓTIMO DE MARCADORES RAPD PARA ESTUDO DE DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM GENÓTIPOS DE TUCUMÃ (*Astrocaryum vulgare* Mart.)

Natália Padilha de Oliveira¹; Maria do Socorro Padilha de Oliveira²; Elisa Ferreira Moura³

¹ Mestranda em Genética e Melhoramento de Plantas da Universidade Federal de Lavras. Bolsista do CNPq. natybiologia2006@gmail.com; ² Eng^a. Agr^a. Dr^a. Pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental. Belém/PA. spadilha@cpatu.embrapa.br; ³: Bióloga, Dr^a. Pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental. Belém/PA. elisa@cpatu.embrapa.br

INTRODUÇÃO

O tucumã-do-Pará (*Astrocaryum vulgare* Mart.) é uma palmeira nativa da Amazônia de importância sócio-econômica, por ter uso múltiplo, mas, suas potencialidades estão centradas nas folhas e nos frutos. Nos frutos, o mesocarpo rico em vitamina A é utilizado *in natura* e em refrescos e na culinária em geral; o endocarpo na confecção de bijóias e o mesocarpo e a amêndoa na extração de azeite de propriedades distintas. Entretanto, ainda é explorado pelo extrativismo e devido à escassez de conhecimentos, estudos necessitam ser realizados para fornecer subsídios ao melhoramento e, conseqüentemente, a obtenção de sementes de qualidade para seu cultivo (Villachica *et al.*, 1996).

Diversas técnicas moleculares podem ser utilizadas em estudos de diversidade genética, particularmente, aquelas que utilizam marcadores moleculares. Assim, a escolha do marcador depende de vários critérios, como praticidade, custo e disponibilidade. Os marcadores RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) são bastante úteis para espécies pouco conhecidas, como a espécie em questão, por terem baixo custo e existir um grande número no mercado, além de permitir a análise de marcas polimórficas em um curto espaço de tempo (Grattapaglia, 2007). Entretanto, faz-se necessário identificar o número de marcas polimórficas necessárias para amostrar satisfatoriamente o genoma da espécie, pois o uso de um número pequeno pode comprometer a precisão das inferências, já número alto além de aumentar os custos pode inviabilizar a utilização de um grande número de genótipos. O número ideal de marcadores pode ser obtido pelo método *bootstrap* que faz uso de reamostragens dos dados reais até revelar um padrão entre eles (Kruskal, 1964).

Com base no exposto, este trabalho teve por objetivo determinar o número ótimo de marcadores RAPD para ser utilizado em estudos de divergência genética em genótipos de tucumã-do-Pará.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados folíolos de 29 genótipos de tucumã com boa produção de frutos, selecionados no Banco Ativo da Embrapa Amazônia Oriental. O DNA foi extraído de 100 mg de folíolo fresco de cada genótipo, pelo protocolo CTAB estabelecido por Doyle & Doyle (1990), com modificações. As amostras de DNA foram quantificadas em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio pela comparação três concentrações diferentes de DNA do fago λ (50, 100 e 200 ng. μl^{-1}) e, depois, diluídas para a concentração de 10 ng. μl^{-1} .

A genotipagem foi realizada pela aplicação de 24 *primers* RAPD de kits da *Operon Technologies* (INVITROGEN), selecionados por Oliveira *et al.* (2009). As reações foram preparadas em microtubos de 0,2 ml com volume final de 15 μl e amplificadas em termociclador *Amplitherm* TX96 por 40 ciclos de acordo com Oliveira *et al.* (2007). Os produtos das reações foram aplicados em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio e separados por eletroforese horizontal. Os géis foram visualizados em transiluminador de luz UV e as imagens capturadas digitalmente. Os padrões de bandas foram analisados de acordo com a presença (1) ou ausência (0) em cada genótipo para cada *primer* e utilizados para a construção da matriz binária.

O número ótimo de bandas polimórficas foi estimado pelo método de reamostragem *bootstrap* com base nas 332 bandas obtidas, sendo as similaridades genéticas estimadas pelo coeficiente de Jaccard. As reamostragens das estimativas das similaridades genéticas foram feitas no aplicativo GENES (Cruz, 1997) para diferentes números de bandas (10, 20, 30,..., 310, 320, 330 bandas) para cada par de genótipos, sendo cada simulação repetida 10.000 vezes. Este aplicativo disponibiliza três parâmetros: a correlação; a soma dos quadrados dos desvios e o estresse, que indica o ajuste entre a matriz original e a amostral. O número ideal de bandas foi considerado quando o valor do estresse (E) foi inferior a 0,05 (Kruskal, 1964).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi constatada uma associação direta entre as magnitudes das correlações obtidas dos valores da matriz de similaridades original obtida a partir de reamostragens para os diferentes números de bandas (Figura 1). A partir de 220 bandas polimórficas, a magnitude da correlação já se apresentou alta ($r=0,94$), no entanto o valor do estresse ainda foi considerado alto ($E=0,057$). Tal resultado sugere que esse número de bandas ainda não tenha alcançado o valor o ideal para avaliar a divergência entre os genótipos com confiabilidade.

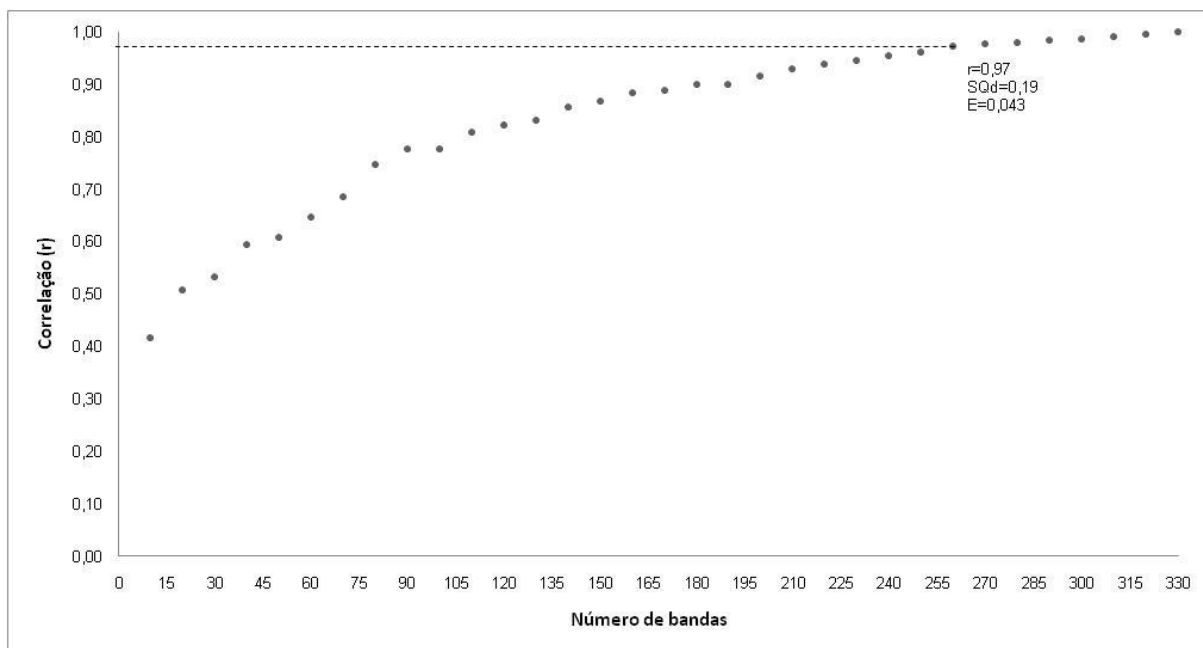


Figura 1. Estimativas das correlações entre as similaridades genéticas obtidas pela análise *bootstrap* para números crescentes de bandas polimórficas de marcadores RAPD em 29 genótipos de tucumã-do-Pará.

O número ótimo foi considerado quando atingiu 260 bandas (Figura 1), pois neste ponto, o valor de estresse (E) foi 0,043 e a correlação alcançou magnitude próxima do valor máximo ($r=0,97$), representando alto grau de ajustes das matrizes. A partir desse número de marcadores o aumento da correlação e a diminuição do estresse tornam-se insignificantes contribuindo muito pouco na precisão das estimativas. Para Kruskal (1964) o número ideal de bandas deve ser aquele em que o estresse assume valor inferior a 0,05. Colombo *et al.* (2000) relata que intervalos de 50 a 100 bandas são capazes de estimar relações genéticas entre e dentro de populações naturais de espécies vegetais com boa confiabilidade. Oliveira *et al.* (2007) relataram 180 marcadores como o número ideal para estudos de diversidade genética em 116 acessos de *Euterpe oleracea* com base em 28 *primers* RAPD, valor bem abaixo do detectado no estudo em foco.

CONCLUSÕES

O número ideal de marcadores RAPD para estudos de divergência genética em genótipos de tucumã-do-Pará é 260 bandas, o que deve garantir eficiência na separação dos grupos divergentes.

AGRADECIMENTOS

Aos trabalhadores de campo da Embrapa Amazônia Oriental pelo auxílio na coleta dos folíolos e aos laboratoristas do laboratório de Genética Molecular dessa instituição pela ajuda na realização das reações de RAPD.

REFERÊNCIAS

COLOMBO, C.; SECOND, G.; CHARRIER, A. Diversity within American cassava germplasm based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 1, p. 189-199, 2000.

CRUZ, C.D. **Programa GENES**: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV. 1997. 442p.

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

GRATTAPAGLIA, D. **Aplicações operacionais de marcadores**. In: Biotecnologia florestal. BORÉM, A (ed.). Viçosa: (s.n.), 2007. p 175-200.

KRUSKAL, J.B. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a no metric hypothesis. **Psychometrika**, **29**: 1-27, 1964.

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. **Ciência Agrotécnica**, **31**: 1645-1653, nov./dez., 2007.

OLIVEIRA, N. P.; OLIVEIRA, M. do S. P. de; MOURA, E. F. Seleção de marcadores RAPD para análise genética em germoplasma de tucumã-do-Pará (*Astrocaryum vulgare* Mart.). In: Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 5, 2009, Guarapari - ES. **Anais...**, O melhoramento e os novos cenários da agricultura. Vitória-ES : Incaper, 2009. v. 1. p. 1-4. CD-rom.

VILLACHICA, H.; CARVALHO, J. E. U.; MÜLLER, C. H.; DÍAZ, S. C. & ALMANZA, M. **Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonia**. p. 264-267. Tratado de Cooperación Amazonica, (TCA-SPT, 44). Lima: FAO. 1996.