



REPETIBILIDADE DE MARCADORES RAPD EM GERMOPLASMA DE TUCUMÃ - DO - PARÁ.

Resumo: Marcadores RAPD, apesar de terem baixo custo, serem de fácil aplicação e aleatórios permitindo seus usos em qualquer espécie, são relatados como tendo baixa repetibilidade dos resultados, ocasionados por vários fatores, como a variação entre termocicladores. O tucumã-do-pará (*Astrocaryum vulgare* Mart.), palmeira nativa da Amazônia, tem forte ocorrência e utilidade no lado Oriental, cujo germoplasma tem sido pouco estudado. Assim, avaliou-se a repetibilidade do padrão de amplificação de marcadores RAPD em germoplasma de tucumã-do-pará. Foram utilizadas cinco amostras de DNA de tucumã-do-pará, conservadas sob baixa temperatura no laboratório de genética molecular da Embrapa Amazônia Oriental, em testes de amplificação de cinco *primers* RAPD. As reações de PCR foram repetidas três vezes no mesmo termociclador para a comprovação da confiabilidade dos dados gerados, tendo-se o cuidado de manter as mesmas concentrações dos componentes de preparo das reações para minimizar erros. Os géis foram usados na contagem da ausência e presença de banda para o cálculo da taxa de repetibilidade. Foi detectado em todos os *primers* um padrão de amplificação possível de ser codificado. Os marcadores produziram 28,6% de bandas que não se repetiram. A repetição por *primer* foi alta, variando de 50,3% a 100% e com médias de 61,3% (OPAB-01) a 93,9% (OPA-14). A repetibilidade de marcadores RAPD em germoplasma de tucumã-do-pará pode ser considerada alta, com um padrão de amplificação possível de ser codificado. Logo, podem ser usados na caracterização genética dessa espécie.

Palavras-chave: Amazônia, palmeira nativa, *Astrocaryum Vulgare*, marcador molecular

Introdução

O tucumã (*Astrocaryum vulgare*, Mart.) é uma palmeira perene que produz frutos oleaginosos, possuindo grande importância à região Amazônica, principalmente na alimentação humana e de animais, em artesanatos, em cosméticos e, atualmente, como matéria prima para biodiesel (SHANLEY; MEDINA, 2005). Mesmo com essa potencialidade, os mercados ainda são abastecidos pelo extrativismo, aonde suas populações vêm sendo ameaçadas pela implantação de pastos sem conhecimentos sobre as mesmas, além de existir escassez de informações sobre o germoplasma conservado em coleções e bancos que possam estimular cultivos em escala comercial e fornecer subsídios ao desenvolvimento de tecnologias.



Marcadores moleculares são eficientes ferramentas no estudo de análise genética de germoplasma de diferentes espécies, principalmente os RAPD, cuja técnica é simples, rápida, de baixo custo e demandam de quantidades mínimas de DNA, além de utilizar *primer* de seqüência arbitrária (LACERDA *et al.*, 2002). Esse tipo de marcador molecular tem sido aplicado com freqüência no estudo de caracterização genética de espécies sobre as quais não se tem nenhuma informação genética (RAMOS *et al.*, 2008). Apesar das críticas sobre a confiabilidade, em vista da baixa repetibilidade e reprodutibilidade das bandas, quando algumas medidas de padronização são adotadas, garantem o máximo de repetibilidade de locos. Assim, a técnica de RAPD se torna uma excelente ferramenta no estudo de caracterização de germoplasma de espécies pouco conhecidas a um custo relativamente baixo e de rápida obtenção de resultados (RAMOS *et al.*, 2008), como é o caso da espécie em foco.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a repetibilidade de marcadores RAPD em germoplasma de tucumã-do-pará.

Material e Métodos

Foram escolhidas ao acaso cinco amostras de DNA genômico de *A. vulgare* de um total de 30 amostras coletadas em Salvaterra, PA, as quais se encontram conservadas sob baixa temperatura (-80°C) no banco de DNA da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, PA.

As reações de PCR foram preparadas com a utilização de cinco *primers* RAPD da Operon: OPAB-01, OPAZ-04, OPAZ-05, OPA-11 e OPA-14, previamente selecionados para essa espécie. O volume final das reações foi de 15 µl, contendo 3,5 µl de DNA genômico, 1,04 µl de DNTP, 3,5 µl de um iniciador, 1,04 µl de BSA (bovine serum albumin), 1 unidade da enzima *Taq* polimerase (Invitrogen, Brasil) e tampão de reação contendo MgCl₂ fornecido pelo fabricante da enzima.

As reações PCR-RAPD foram colocadas em microtubos de 0,2 mL e realizadas em termociclador My Genie™ 96. Gradient Th programado para 40 ciclos. 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 alongação a 72°C por dois minutos. Após os 40 ciclos, ocorreu a etapa de extensão final realizada a 72°C por 7 minutos. Cada reação foi repetida três vezes no mesmo termociclador, mantendo-se os mesmos procedimentos e a mesma concentração dos reagentes para assegurar a confiabilidade dos resultados.

Os produtos das reações foram aplicados em gel de agarose 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, sendo submetido a eletroforese horizontal a 100 v por um período de 1 hora e 30 minutos. Os géis foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e as imagens capturadas em meio digital.



Os géis foram avaliados visualmente para a contagem da ausência (0) e presença (1) de banda, bem como de sua intensidade (1=fraca, 2= média e 3=forte). A repetibilidade foi avaliada em cada loco, por meio da porcentagem de frequência nas três repetições.

Resultados e Discussão

Os cinco *primers* aplicados nas cinco diferentes amostras de germoplasma de tucumã-do-pará apresentaram com um padrão de amplificação possível de ser codificado (Figura 1), produzindo de bandas nítidas, consideradas fortes, a fracas. Os *primers* OPA-11 e OPAZ-04 exibiram bandas fortes nas três repetições, sendo que o primeiro gerou mais marcadores (até 7 bandas); no *primer* OPAB-01 os marcadores foram mais nítidos em duas repetições; enquanto nos demais houve inconsistência na nitidez dos marcadores. Esses *primers* forneceram até 21 marcadores, variando de um a sete e média geral de 4,9 por *primer* nas três repetições.

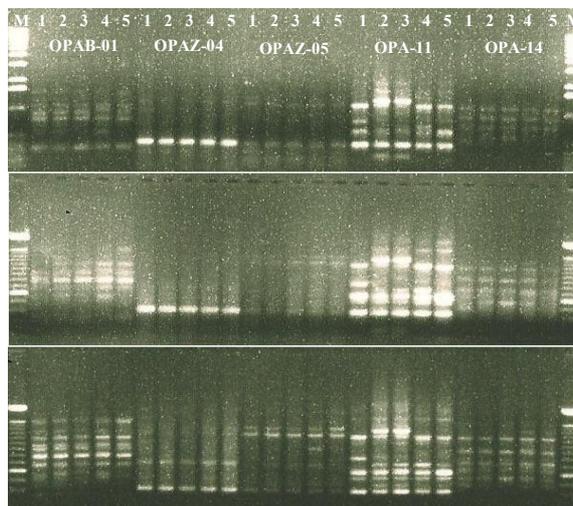


Figura 1: Perfil dos géis de agarose contendo a amplificação dos marcadores RAPD gerados nas três repetições pelos cinco *primers* aplicados nas cinco amostras de germoplasma de tucumã-do-pará.

De um modo geral, do total dos marcadores produzidos 28,6% não se repetiram. Porém quando se avalia a repetição por *primer* percebe-se que esta foi alta, variando de 50,3% a 100% e com médias de 61,3% (OPAB-01) a 93,9% (OPA-14), como consta na Tabela 1. Resultados similares foram obtidos por Gomes *et al.* (2008) e por Ramos *et al.* (2008) trabalhando com marcadores RAPD, os quais encontram 90% e 84% de repetibilidade, respectivamente.

Tabela 1: Repetibilidade de marcadores RAPD, em porcentagem, avaliada nas cinco amostras de germoplasma de tucumã-do-pará utilizando cinco *primers* selecionados para a espécie.



Amostras	Repetibilidade (%)				
	OPAB-01	OPAZ-04	OPAZ-05	OPA-11	OPA-14
1	50,3	66,7	60,0	86,7	100,0
2	54,7	66,7	58,3	85,7	100,0
3	69,5	66,7	75,0	71,4	100,0
4	66,0	66,7	91,7	83,3	91,7
5	66,3	66,7	83,3	86,7	77,8
V. mínimo	50,3	66,7	58,3	71,4	77,8
V. máximo	69,5	66,7	91,7	86,7	100,0
Média	61,3	66,7	73,7	82,8	93,9

Conclusão

A repetibilidade de marcadores RAPD em germoplasma de tucumã-do-pará pode ser considerada alta, com um padrão de amplificação possível de ser codificado. Logo, podem ser usados na caracterização genética dessa espécie.

Agradecimentos

Aos assistentes do Laboratório de Genética, pelo apoio nas reações e à Embrapa Amazônia Oriental, pelo financiamento do trabalho e concessão de bolsa ao primeiro autor e terceiro autor.

Referências Bibliográficas

- LACERDA, D. R., et al. **A Técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudo de conservação de plantas.** Instituto de Ciências Biológicas – UFMG, 2002.
- RAMOS, JR.; SOARES, T.N.; OLIVEIRA, G.; TELLES, M.P.C.; RESENDE, L.V.; DINIZ-FILHO, J.A.F. Avaliação da repetibilidade de marcadores RAPD em *Tibouchina papyrus* utilizando técnica de otimização. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 54, 2008, Salvador. **Anais...**, Salvador, BA, SBG, p. 33. 2003
- SHANLEY, P; MEDINA, G. **Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica.** Belém: CIFOR, 2005. 300p.
- TELLES, M.P.C.; SOARES, T.N.; RESENDE, L.V.; DINIZ-FILHO, J.A.F. BASTOS, R.P. Avaliação da repetibilidade do padrão de amplificação de marcadores RAPD. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 49, 2003, Águas de Lindóia. **Anais...**, Águas de Lindóia, SP, SBG, p. 316. 2003