

Seleção e Otimização de Primers RAPD para Análise de Diversidade Genética em Pinha (*Annona squamosa* L.)

Francinalva de Moraes Sousa⁽¹⁾, Sulimary Oliveira Gomes⁽²⁾, Michelli Ferreira dos Santos⁽³⁾, Isis Gomes de Brito Souza⁽³⁾, Valdomiro Aurélio Barbosa de Souza⁽⁴⁾ e Paulo Sarmanho da Costa Lima⁽⁴⁾.

RESUMO - O Brasil tem se destacado como grande produtor de frutas, especialmente tropicais e subtropicais. Entre as tropicais, encontra-se a pinha (*Annona squamosa* L.), conhecida pela qualidade de seus frutos, apresentado um grande incremento na aceitação pelo consumidor e mercado interno. Apesar de sua importância são escassos os trabalhos de melhoramento, inexistindo variedades melhoradas de pinha, havendo necessidade do conhecimento da variabilidade existente para implementação de programa de melhoramento. Os marcadores moleculares surgiram como uma ferramenta importante na determinação da variabilidade e diversidade genética das espécies. O presente trabalho teve como objetivos otimizar a reação de amplificação e selecionar *primers* RAPD informativos para análise de variabilidade genética em pinha. Para tanto, foi realizada uma otimização da reação variando concentração de MgCl₂ (1,0mM e 2,0mM), temperatura de anelamento (31°C e 35°C) e o número de ciclos (40 e 45). Ainda foram testados 59 *primers*, nos acessos de pinha G08 e G15. Dos quais, 18 produziram fragmentos de maior nitidez de amplificação, em reações otimizadas com 1,0 mM de MgCl₂, temperatura de anelamento a 35°C e com o número de ciclos igual a 45. Os resultados obtidos indicam a presença de diversidade entre os acessos estudados, mostrando que os marcadores RAPD tem potencial para caracterização molecular dos acessos de pinha da coleção da Embrapa Meio-Norte.

Introdução

A *Annona squamosa* L., vulgarmente conhecida por ata, pinha ou fruta-do-conde, é planta tropical muito conhecida no Nordeste brasileiro, desperta grande interesse nos mercados consumidores de todo país pelo sabor de seus frutos. Apesar do interesse despertado no Brasil não existem variedades melhoradas de pinha. Sabe-se que sua propagação é feita exclusivamente por semente o que resulta em pomares com grande variabilidade. Entretanto para implantação de programas de melhoramento de pinha há necessidade de melhor conhecimento da variabilidade genética existente.

Os marcadores moleculares surgiram como uma nova ferramenta no processo de melhoramento genético (MOREIRA, 2003). Permitem aos melhoristas entender a distribuição da variabilidade entre e dentro populações de plantas e em consequência auxiliam na obtenção de genótipos superiores de uma maneira eficaz, rápida, precisa e a custos mais baixos do que o melhoramento convencional, que normalmente demanda um longo período pra ser concluído quando se trata de espécies de ciclos mais longos. A técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) utiliza primers únicos de sequência 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., 1996).

Os objetivos desse trabalho foram a otimização da reação de amplificação e seleção de *primers* RAPD para estudo da diversidade genética em pinha da coleção de germoplasma da Embrapa Meio-Norte, Teresina - PI.

Palavras chaves: Marcadores moleculares, acessos, polimorfismo.

Material e método

Foram coletadas folhas jovens de dois acessos de pinha, G08 e G15, oriundos do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Meio-Norte, Teresina-PI. A extração de DNA genômico foi realizada com material fresco, utilizando-se DNeasy® Plant Mini Kit. A quantificação do DNA extraído foi realizada em gel de agarose a 0,8% com TBE (Tris-Borato-EDTA) 0,5X e corado com SYBR Safe DNA Gel Stain a 10.000x, comparando o DNA das amostras com o DNA-λ na concentração de 100 ng.

Na otimização da reação de amplificação foram testadas duas concentrações de MgCl₂ (1,0 mM e 2,0 mM), duas temperaturas de anelamento (31 e 35°C) e dois números de ciclos (40 e 45) com os *primers* A04 e N04 cuja a temperatura de fusão são 22,26°C e 26,36°C, respectivamente. Para a seleção de *primers* RAPD 59 foram testados: A (02, 04, 07, 08, 09, 11, 12, e 16), F (01, 02, 04, 05, 08, 09, 11, 12, 13, 14, 16, 18, 19 e 20), G (01, 04, 05, 07, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 19 e 20), L (01, 02, 05, 06, 07, 08, 10, 11, 12, 15, 17 e 19), M (02, 03, 06, 09, 12, 13 e 18), N (04) e T (03, 06 e 11), utilizando-se

⁽¹⁾ Estudante de Graduação em Agronomia, Universidade Estadual do Piauí (UESPI), União, PI. E-mail: francinalvasousa@hotmail.com

⁽²⁾ Estudante de Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, PI. E-mail: s_gomespi@hotmail.com

⁽³⁾ Mestranda em Genética e Melhoramento, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, PI. E-mail: michelly_m_santos@yahoo.com.br; isisgomesmd@hotmail.com

⁽⁴⁾ Pesquisador Embrapa Meio-Norte. Av. Duque de Caxias, 5650 - Buenos Aires, Caixa Postal 001, 64006-220 - Teresina - PI. E-mail: valdo@cpamn.embrapa.br; sarmanho@cpamn.com.br

Apoio financeiro: EMBRAPA e CNPq

dois genótipos (G08 e G15).

As reações foram preparadas em volume final de 20µL, com Tampão 1X [20mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1mM EDTA; 1,0mM DTT; 50% (v/v) glicerol]; MgCl₂ a 2,5mM-3,5mM ; dNTP a 200-800µM; 1,2 pMol de *primer*, 1 U de Taq DNA Polimerase e 1 µl de DNA genômico. O programa utilizado para amplificações compôs-se de uma etapa inicial de desnaturação de 92°C por 1min, seguida de 45 ciclos nas seguintes condições: 1min para desnaturação a 92°C, 1 min a 31°C ou 35°C para o anelamento e 2 min a 72°, seguindo-se uma etapa de extensão de 72° a 5min. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, contendo SYBR Safe DNA Gel, visualizados em transluminador UV e fotografados.

Resultados e Discussão

Foram obtidas bandas com melhor definição e resolução na reação de amplificação na qual foi usada a concentração de 2,0 mM de MgCl₂, temperatura de anelamento de 35°C e 45 ciclos. A concentração do MgCl₂ tem efeito na especificidade da reação. Segundo Ferreira & Grattapaglia (1995), a otimização da concentração de magnésio aliado a definição da temperatura de anelamento são essenciais, pois são fatores que influenciam diretamente na reprodutibilidade do ensaio RAPD, porquanto afeta a eficiência da amplificação pela *Taq* polimerase e, conseqüentemente, a intensidade com a qual os fragmentos aparecem no gel.

Dos 59 *primers* testados foram selecionados 18, segundo o polimorfismo e a definição das bandas geradas quando amplificados com os acessos G08 e

G15, como ilustrado na Fig. 1.

Os marcadores moleculares foram considerados eficientes, demonstraram haver uma variabilidade genética dentre os dois acessos de pinha oriundos do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Meio-Norte.

Agradecimentos

A Embrapa e ao CNPq por apoiar financeiramente o projeto.

Referências

- [1] 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).
- [2] WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, v.18, p.6531-6535, 1990.
- [3] 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.R.P. 1995.
- [4] FERREIRA, M.E.; GRATAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética*. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220p.



Figura 1. Eletroforese em gel de agarose, ilustrando o polimorfismo de acessos de pinha, por meio da técnica de RAPD, utilizando os genótipos (G08 e G15).