

Transposição de Marcadores Microssatélites Derivados de Mamona em Tungue

Raquel Bartz Kneib¹, Juliana Severo Castelo Branco Villela², Roberta Bartz Kneib¹, Mariane da Rosa Schüller³, Natércia Lobato Pinheiro⁴, Sérgio Delmar do Anjos Silva⁵

Resumo

Entre as culturas oleaginosas, o tungue é uma alternativa de grande potencial econômico para o sul do Brasil por apresentar elevado rendimento de óleo. Embora genótipos introduzidos no Estado tenham demonstrado adaptação, é fundamental desenvolver um programa de melhoramento genético para a cultura, a fim de oferecer cultivares mais produtivas. Uma forma eficiente de auxiliar os programas de melhoramento é a análise da variabilidade genética por meio de marcadores moleculares. Muitos estudos têm mostrado que grande parte dos marcadores SSR encontrados numa espécie podem ser transferidos para espécies correlatas. Tanto a mamona (*Ricinus communis* L.) como o tungue (*Aleurites fordii*), pertencem à família Euphorbiaceae, o que pode facilitar a transposição de *primers* microssatélites de mamona para tungue. O presente trabalho teve como objetivo testar a transposição de marcadores microssatélites do genoma de mamona para tungue. Foram utilizados 74 pares de *primers* sintetizados a partir do genoma da mamona. Os resultados demonstram ser possível utilizar marcadores microssatélites em genótipos de tungue desenvolvidos a partir do genoma de mamona.

Introdução

O tungue (*Aleurites fordii*) é uma cultura originária da Ásia, sendo plantada comercialmente na América do Sul, África, Estados Unidos e China. No Brasil foi introduzida no início do século XX (Gruszynsk et al. 2003). Dentre as culturas oleaginosas, o tungue é uma alternativa de grande potencial econômico para o sul do Brasil por apresentar elevado rendimento de óleo, entre 40 e 45% de teor de óleo na amêndoa, segundo Casagrande Júnior et al. (2006, 2008).

No Rio Grande do Sul esta espécie ainda é pouco explorada comercialmente, concentrando-se apenas na Serra Gaúcha, em 27 municípios, onde é plantada há mais de 30 anos. Embora genótipos introduzidos no Estado tenham demonstrado adaptação, é fundamental desenvolver um programa de melhoramento genético para a cultura, a fim de oferecer cultivares mais produtivas e com elevado teor de óleo além de uniformidade na floração e maturação dos frutos (Lemões et al. 2007).

Uma forma eficiente de auxiliar os programas de melhoramento é a análise da variabilidade genética por meio de marcadores moleculares, pois detectam diferenças mínimas em nível de DNA. Dentre eles, destacam-se os marcadores microssatélites ou *SingleSequence Repeat* (SSR) por serem altamente polimórficos e de herança co-dominante (Peixoto et al. 2009). Logo, inicialmente, é necessário desenvolver os *primers* específicos para cada espécie o que demanda alto custo e muito trabalho envolvido (Ferreira and Grattapaglia 1998). Segundo MISTURA et al. (2006), muitos estudos têm mostrado que grande parte dos marcadores SSR encontrados numa espécie podem ser transferidos para espécies correlatas.

Sendo assim, tanto a mamona (*Ricinus communis* L.) como o tungue (*A. fordii*), pertencem à família Euphorbiaceae, o que pode facilitar a transposição de *primers* microssatélites de mamona para tungue. O presente trabalho teve como objetivo testar a transposição de marcadores microssatélites do genoma de mamona para tungue.

Material e Métodos

¹ Estudante de Agronomia FAEM/UFPel, Bolsista Embrapa Clima Temperado, Universidade Federal de Pelotas, caixa postal 354 – Pelotas, RS, CEP:96010-900. E-mail: raquelkneib@yahoo.com.br, robertakneib@yahoo.com.br

² Bióloga, Bolsista Pós-Doutor PNPd/CNPq, Embrapa Clima Temperado. E-mail: jcbrancov@gmail.com

³ Bióloga, Bolsista Embrapa Clima Temperado. E-mail: mariane-rs@hotmail.com

⁴ Química, Analista Laboratório de Biologia Molecular, Embrapa Clima Temperado. E-mail: natercia@cpact.embrapa.br

⁵ Engenheiro Agrônomo, Doutor em Melhoramento Genético, Pesquisador, Embrapa Clima Temperado BR 392 Km 78, caixa postal 403 – Pelotas, RS, CEP: 96010-97. E-mail: sergio@cpact.embrapa.br

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Clima Temperado, Pelotas - RS. A extração do DNA foi realizada a partir de folhas jovens de plantas de tungue cultivadas nos campos experimentais da Embrapa Clima Temperado, segundo o protocolo descrito por Doyle and Doyle (1987).

O SSR PCR foi desenvolvido numa reação de 12,5 µl contendo 6,25 µl de GoTaq Green Master Mix, 50 ng de DNA, 2,5 µl de *primer* (*Forward* e *Reverse*) na concentração de 10 µM. O programa de amplificação foi executado como segue: 1ª etapa - ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos; 2ª etapa - ciclo de desnaturação a 94 °C por 15 segundos; 3ª etapa - anelamento a 52 °C por 10 segundos; 4ª etapa - extensão a 72 °C por 15 segundos. Foram repetidas a segunda, terceira e quarta etapas por 40 vezes, finalizando com um ciclo de extensão a 72 °C por 5 minutos. Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 3% utilizando como marcador 1 *Kb plus*, corados com Gel Red e a revelação da imagem foi feita com luz ultravioleta com sistema de fotodocumentação.

Foram utilizados 74 pares de *primers* sintetizados a partir do genoma da mamona.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos na eletroforese em gel de agarose permitiram observar que, dos 74 pares de *primers* de mamona, 12 *primers* mostram eficiência na transposição dos SSRs para tungue (Figura 1). Os demais *primers* utilizados não amplificaram, possivelmente porque as regiões genômicas complementares a estes *primers* não apresentaram homologia entre estas espécies. Resultados semelhantes foram obtidos por Mistura et al. (2006), que testaram 21 pares de *primers* de milho em arroz e obtiveram a amplificação de três deles.

A transposição dos *primers*, portanto, foi eficiente para 16% dos *primers* testados.

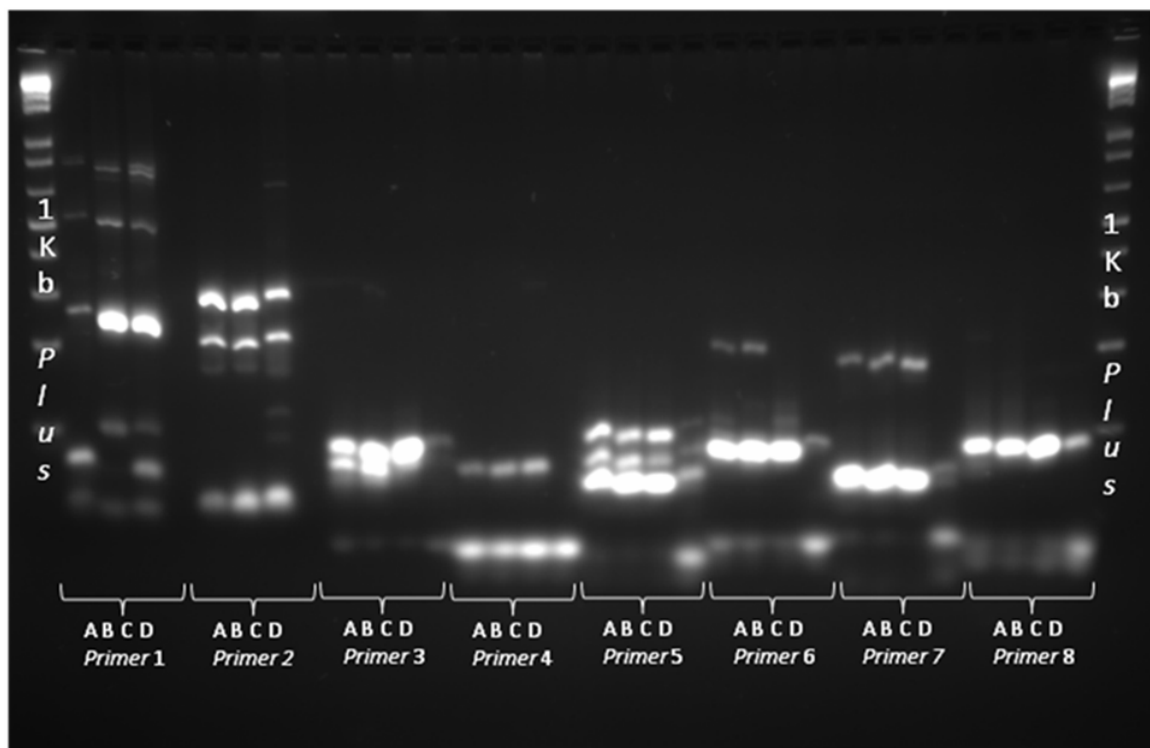


Figura 1- Eletroforese em gel de agarose 3%, corado com Gel Red, evidenciando o padrão de bandas obtido por meio de amplificação de regiões genômicas de tungue utilizando *primers* SSR de mamona. Embrapa Clima Temperado, Pelotas – RS, 2011.

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências de fomento CNPq e MDA pelo auxílio financeiro fornecido e bolsas de graduação e de pós-graduação, que viabilizaram a realização do trabalho.

Referências

Casagrande Júnior JG, Ávila DT, Silva DAS, Ávila TT and Aires RF (2008) Produtividade de Tungue em plantios comerciais na Serra Gaúcha. In: **Simpósio Estadual de Agroenergia e Reunião Técnica Anual de Agroenergia do Rio Grande do Sul**. Pelotas Embrapa Clima Temperado, CD-ROM.

Casagrande Júnior JG Silva DAS, Moreira LL and Aires RF (2006) Avaliação de métodos para acelerar o processo de obtenção de mudas de tungue. In: **Encontro de Iniciação Científica e Pós Graduação da Embrapa Clima Temperado 1**:135-137.

Doyle JJ and Doyle JL (1987) A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. **Phytochemical Bulletin** **19**:11-15.

Ferreira ME and Grattapaglia D (1998) **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética** Editora EMBRAPA-CENARGEN, Brasília, 220p.

Gruszynski C, Anghinoni I, Meurer EJ and Kämpf AN (2003) Misturas de casca de tungue e casca de arroz carbonizada no enraizamento de *Dendranthema morifolium* Tzevelev 'golden polaris' sob método de transpiração. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental** **9**:63-70.

Lemões JS, Kneib RB, Moreira LL, Silva DAS, Anthoniesen DG and Fonseca CP (2007) Seleção de *primers* para estudo de variabilidade genética de genótipos de tungue utilizando marcadores RAPD. In: **Simpósio Estadual de Agroenergia e Reunião Técnica Anual de Agroenergia do Rio Grande do Sul**. Pelotas Embrapa Clima Temperado, CD-ROM.

Mistura CC, Castelo Branco JS, Maia L, Farias D, Ahlert RJ, Marini N, Carvalho FIF and Oliveira AC (2006) Transposição de marcadores microssatélites derivados de milho em arroz. In: **Congresso de Iniciação Científica**. CIC, Pelotas ,CD-ROM.

Peixoto AA, Villela JL, Ferreira MAJF, Ferreira MA, Amaral ZPS, Vieira RRT, Lira MTR and Buso GSC (2009) Transferibilidade de *primers* microssatélites de *Cucumis melo* para *Luffa cylindrica*. In: **Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**. Guarapari, CD-ROM.