

Otimização de Protocolo para Análise de RAPD em Manga (*Mangifera indica* L.)

Isis G. B. de Souza¹, Janaina E. Georg-Kraemer², Fábio M. Diniz³, Valdomiro A. B. de Souza³, Paulo S. C. Lima³

Introdução

A mangueira (*Mangifera indica* L.), frutífera da família Anacardiaceae, é conhecida há mais de 4.000 anos. Originária do sul da Ásia, a mangueira dispersou-se por todos os continentes, sendo cultivada, atualmente, na maioria dos países de clima tropical e subtropical, Rosseto, *et al* [1].

A grande expansão da cultura da mangueira, verificada nos últimos anos, se, por um lado, dá uma boa perspectiva à produção de frutos, por outro, faz prever também o surgimento de diversos problemas provenientes do desconhecimento de características das novas variedades introduzidas, da planta, da frutificação e dos frutos, Yamashiro & Myazaki [2]. Para que essas características sejam passíveis de melhoramento é necessário avaliar o nível de variabilidade genética na espécie.

Diversos marcadores moleculares têm sido utilizados como ferramenta em programas de melhoramento, permitindo a caracterização genética de um grande número de genótipos por meio de procedimentos relativamente simples, rápidos e sem interferência ambiental, Caixeta, *et al.* [3]. Os marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA - fragmentos de DNA amplificados ao acaso) consistem em um dos mais utilizados, por se tratar de uma técnica simples, de baixo custo e relativamente menos exigente em mão-de-obra, Vos *et al.* [4]. O polimorfismo de RAPD é detectado pela amplificação, de forma arbitrária, de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos, pela reação de polimerase em cadeia (PCR), na presença da enzima termoestável DNA polimerase, Williams *et al.* [5].

Esse trabalho teve como objetivo a otimização de protocolo para a análise de RAPD em manga, afim de selecionar o melhor protocolo e utilizá-lo para estimar a variabilidade e a divergência genética dentro e entre os genótipos da manga.

Material e Métodos

A. Amostras

Foram coletadas amostras de tecido foliar jovem de manga, provenientes de 45 genótipos da coleção de

germoplasma de manga da Embrapa Meio-Norte, em Teresina, PI.

B. Extração de DNA genômico

O DNA foi extraído de folhas frescas e jovens, maceradas com nitrogênio líquido, e utilizando-se o PUREGENE® DNA Purification Kit, com algumas modificações. Na amostras de manga da variedade rosa utilizou-se 60mg de tecido macerado e nas variedades tipo americana utilizou-se 80mg. As amostras foram tratadas com RNase ao final da extração.

A quantificação do DNA extraído foi feita em gel de agarose 0,8%, com TBE (Tris-Borato-EDTA) 1X e corado com brometo de etídio (10mg/mL). O DNA das amostras foi quantificado comparando-o com o DNA-? diluído nas concentrações de 50ng, 100ng, 150ng. A qualidade do DNA foi avaliada com base na ausência/presença e intensidade de rastro no gel, o que indicaria degradação de DNA e a ausência/presença de DNA retido no poço de aplicação no gel o que indicaria presença de polissacarídeos, Sambrook *et al.* [6].

C. Amplificação de DNA

As reações de amplificação foram preparadas em um volume final de 20 µL, com Tampão 1X [20mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1mM EDTA; 1mM DTT; 50% (v/v) glicerol]; MgCl₂ 50mM; dNTPs 200µM; 0,2µM de "primer"; BSA 0,02mg/µl (albumina do soro bovino); 1U de Taq DNA Polymerase (INVITROGEN). Para otimização do protocolo de RAPD foi utilizado 1 "primer" decâmero de seqüência arbitrária: N03 (GIBCO), com diferentes concentrações de DNA: 15 e 30ng. Foi testado também a eficiência de amplificação na ausência/presença de BSA.

As amplificações foram realizadas em termociclador Perkin Elmer®, modelo Gene Amp PCR System 2400. O programa consta de 1 ciclo de 1 min a 92°C, 40 ciclos de 1 min a 92°C, 1 min a 35°C e 2 min a 72°C, finalizando com 10 minutos de extensão a 72°C. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,4 %, contendo brometo de etídio. A corrida foi realizada a 60 Volts, por aproximadamente 2 horas, em tampão TBE 1X. Foram aplicados 11 µL da solução de amplificação com 2 µL de tampão de carregamento BFF por canaleta do gel. O marcador "DNA Ladder" de 1 Kb (GIBCO BRL) foi

1. Aluna do Curso de biologia, Universidade Federal do Piauí. E-mail: isisgomesmd@hotmail.com

2. Bolsista de Desenvolvimento Científico Regional - Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI. CNPq-FAPEPI. E-mail: janaina.kraemer@terra.com.br

3. Pesquisador da Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI. sarmanho@cpamn.embrapa.br

utilizado como padrão para cálculo do tamanho dos fragmentos. A visualização das bandas foi realizada sob luz ultravioleta.

Resultados

Nos testes realizados foi possível verificar que para as mangas das variedades tipo americana não existe diferença para a amplificação quando foram consideradas a quantidade de DNA e presença/ausência de BSA (Fig.1). Já para os genótipos da variedade rosa a quantidade de DNA foi decisiva para a amplificação, onde o uso de 15ng de DNA permite uma boa amplificação e 30ng apresenta total ausência de amplificação. Neste caso também a presença de BSA não influencia no padrão de amplificação.

Discussão

Estudos com marcadores moleculares requerem um DNA de qualidade e um protocolo de amplificação ótimo para o sucesso da análise. Para isso é necessário utilizar um protocolo de extração e de amplificação de DNA que geralmente deve ser adaptado para cada espécie.

Na presente análise, para otimização da amplificação para marcadores RAPD, dois fatores que afetam a amplificação do DNA já foram testados: concentração de DNA e presença/ausência de BSA.

A concentração ideal de DNA em uma reação muitas vezes não está somente relacionada à quantidade de DNA molde que seria suficiente para ocorrer tal reação, mas também a presença de contaminantes que podem ser co-extraídos com o DNA como: taninos, polifenóis e polissacarídeos. Estes contaminantes estariam presentes em quantidades não detectáveis no gel de quantificação, mas estariam em quantidade suficiente para impedir reações enzimáticas. Possivelmente este seja o caso verificado nos genótipos de manga Rosa, onde se obtém amplificação somente quando se utiliza 15ng de DNA. Nesta situação não só o DNA apresenta-se diluído na reação, como também os contaminantes, permitindo-se assim que a reação de amplificação ocorra. No caso das demais variedades de manga esta

situação não se verifica, ocorrendo amplificação de DNA em diferentes concentrações.

O BSA é um composto que estabiliza as atividades enzimáticas, protegendo a Taq Polimerase de impurezas ligadas ao DNA, Ferreira & Grattapaglia [7]. Nos testes a presença de BSA não tem apresentado melhora na amplificação do DNA nas variedades tipo americana, mesmo em combinações com diferentes concentrações de DNA. Na variedade rosa a presença de BSA também não revelou melhora na amplificação. Caso, a não amplificação do DNA, em reações com concentrações maiores do mesmo esteja relacionada à presença de contaminantes, o uso do BSA não foi suficiente para garantir a atividade da Taq polimerase.

Para complementar a otimização deste protocolo para amplificação para marcadores RAPD mais alguns fatores que influenciam a reação de amplificação serão testados como: concentração de $MgCl_2$, concentração de DNTPs, tempo de extensão no programa de amplificação, entre outros.

Referências

- [1] ROSSETO, C.J. et al. Mango breeding for resistance to diseases and pests. *Acta Hort.* 455, 299-304.
- [2] YAMASHIRO, T. & I. MYAZAKI. 1985. Principais pragas e doenças da mangueira (*Mangifera indica* L.) no estado de São Paulo e métodos atualizados de controle. *Biológico*, 51(2): 41-50.
- [3] CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: Borém, A.; Caixeta, E.T. (eds), *Marcadores Moleculares*. 2006, p. 9-78
- [4] VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23, 4407-4414, 1995.
- [5] 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*, Oxford, v. 18, p. 6531-6535, 1990.
- [6] SAMBROOK, J.; FRISTSH, E. F.; MANIATS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. v. 2.
- [7] FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética*. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. 1998. 3ª. ed. 220p.

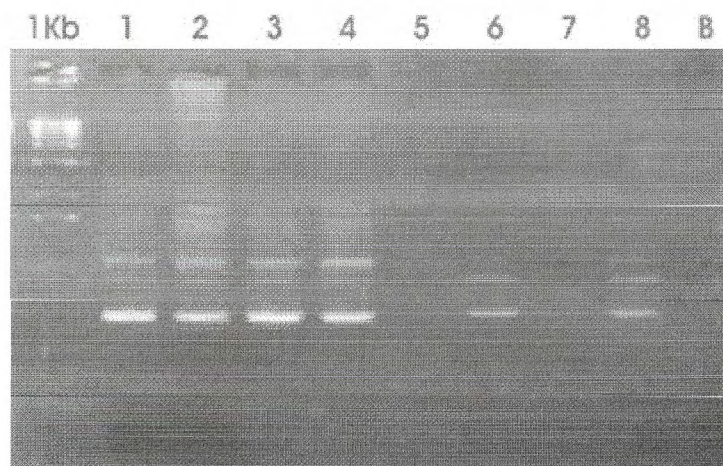


Figura 1. Perfil eletroforético das amostras de DNA de manga obtidas da otimização de protocolo. Coluna 1 marcador 1kb; colunas de 1 a 4 manga variedade Ananás e colunas de 5 a 8 manga variedade rosa (Genótipo 41). Colunas 1 e 5: 30ng de DNA com BSA; Colunas 2 e 6: 15ng de DNA com BSA; Colunas 3 e 7: 30ng de DNA sem BSA; Colunas 4 e 8: 15ng de DNA sem BSA; Última coluna é o Branco.