

**Seleção de primers para o uso de RAPD na análise de diversidade genética em manga
(*Mangifera indica* L)**

Isis G B de Souza ; Janaina E. Georg-Kraemer³; Fábio M Diniz²; Valdomiro A B de Souza ; Fábio B Britto¹ ; Paulo S C Lima

1. Aluna do Curso de Biologia, Universidade Federal do Piauí Pesquisador da Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI. 3. Bolsista de Desenvolvimento Científico Regional Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI. CNPq-FAPEPI

A manga (*Mangifera indica* L) é uma das mais importantes frutas tropicais e uma das mais aceitas no mercado consumidor brasileiro, não só por suas qualidades degustativas, mas por seu alto valor nutricional. O cultivo da mangueira é uma excelente alternativa para o semi-árido nordestino, por apresentar aptidão edafo-climática adequada para o desenvolvimento de uma fruticultura moderna e competitiva. Essa região vem se destacando pela maior concentração de produção do País, correspondendo a 53% do total de manga. No Brasil, principalmente na região do vale do São Francisco, os plantios comerciais incorrem em sérios riscos biológicos (pragas e doenças) e econômicos, devido à concentração da maior parte da produção basear-se em apenas um cultivar. Desta forma, a diversificação de cultivares comercial é de fundamental importância para proporcionar maior sustentabilidade ao agronegócio da manga na região. O presente trabalho teve como objetivo selecionar primers para avaliar o potencial do marcador RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) para em seguida analisar a diversidade genética entre os acessos do banco de germoplasma da manga da Embrapa Meio-Norte. Inicialmente foram utilizadas duas variedades de manga: Rosa-10 e Rosa-49. As amostras de DNA de cada material foram amplificadas via PCR (Reação da polimerase em cadeia) para a seleção dos marcadores RAPD. 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 1.5mM; dNTPs 250µM; 0,2µM de primer, 1 U de Taq DNA Polymerase (INVITROGEN). Foram testados 23 primers (Gibco BRL). A partir de critérios como a presença de bandas polimórficas, robustas e que permitam melhor visualização para realização de futuras análises, foram selecionados os primers A01, A09, G03, G04, G09, M14, M16, N3, N5 e N15 para o estudo de diversidade e consequente o uso eficiente dos genótipos da manga que compõem a coleção da Embrapa Meio-Norte.

Palavras-Chaves: Primers, polimorfismos e DNA.

INTRODUÇÃO

Atualmente, há uma demanda insatisfeita por alimentos ricos em vitaminas e sais minerais e as frutas, como um dos alimentos que fazem parte da dieta alimentar humana, possuem estas características nutricionais. Para aumentar a oferta de qualquer produto agrícola, visando atender a necessidade de alimento à população, deve-se elevar a produtividade da cultura dentro de um determinado sistema de cultivo. Neste particular, as frutas tropicais incluem-se com muita propriedade. Entre outras frutas

tropicais, a manga é uma das mais aceitas no mercado consumidor brasileiro não só por suas qualidades degustativas, mas, por seu alto valor nutricional.

O conhecimento da variabilidade genética de populações é de fundamental importância para o sucesso de programas de melhoramento. Entre as alternativas para se determinar este parâmetro, destaca-se principalmente em espécies frutíferas a utilização de marcadores moleculares. Estas técnicas moleculares impulsionaram e revolucionaram a caracterização genética de populações naturais de espécies tropicais, após 1970.

Marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente. Técnicas que envolvem PCR geralmente são de custo menor, menos elaboradas, algumas mais fáceis de implementar e de menor tempo para obtenção dos resultados (MILACH, 1998).

Um dos marcadores moleculares mais empregados no estudo de populações naturais são os RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA). A sua utilização deve-se ao fato de serem tecnicamente mais simples, facilitando desta forma, o estudo de um grande número de locos e fornecendo uma amostragem aleatória mais ampla do genoma (LYNCH & MILLIGAN, 1994).

Os marcadores moleculares do tipo RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) se baseiam na reação de PCR, em que seqüências de DNA genômico são amplificadas ao acaso a partir de "primers" de seqüência aleatória (Williams, 1990). Entre as aplicações de RAPD estão: a determinação da identidade (taxonomia), estudos filogenéticos, avaliação da diversidade genética, obtenção de "fingerprints" de DNA para o registro de cultivares, entre outros (TIMMERMAN & MCCALLUM, 1993). O nível de polimorfismo obtido com RAPDs varia grandemente com a espécie em questão (PENNER CHONG, WIGHT, MOLNAR & FEDAK, 1993).

Uma seleção de primers torna-se necessária na tentativa de otimização da qualidade e quantidade dos dados a serem obtidos. A ausência de correlação entre estas variáveis impossibilitou a utilização de critérios puramente quantitativos para a seleção de primers que apresentassem maior poder de detecção da divergência genética. Os 'primers' testados serão avaliados quanto ao número total de bandas geradas, número de marcadores encontrados e intensidade das bandas polimórficas. As amplificações polimórficas visíveis de pouca intensidade e nitidez não serão consideradas.

O presente trabalho teve como objetivo selecionar primers para avaliar o potencial do marcador RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) para em seguida analisar a diversidade genética entre os acessos do banco de germoplasma da manga da Embrapa Meio-Norte.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de tecido foliar jovem de manga, provenientes de 2 genótipos da variedade rosa que compõem a coleção de germoplasma de manga da Embrapa Meio-Norte, em Teresina, PI.

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-λ diluído, nas concentrações de 50ng, 100ng e 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, FRISTSH & MANIATS, 1989).

Uma prévia seleção de marcadores moleculares foi realizada objetivando-se maior polimorfismo para os acessos de manga. Foram testados 23 primers (Gibco BRL). 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"; 1 U de Taq DNA Polymerase (INVITROGEN).

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 23 iniciadores utilizados, dez foram selecionados (Tabela 01) por apresentarem bandas polimórficas, robustas e que permitam melhor visualização para realização de futuras análises. Um total de 97 bandas foi gerado, das quais 17 (17,52%) apresentaram polimorfismo. O número de bandas produzidas, por iniciador, variou de 3(M16) a 17(A01), com média de 10 bandas por iniciador. A taxa de polimorfismo por iniciador foi de aproximadamente três bandas, com uma variação de 1(G03, G04, G09, M14 e M16) a 5 bandas polimórficas(N05). O tamanho dos fragmentos amplificados variou de 396 a 2036 pb (Figura 01).

Apesar de apresentar algumas limitações como problemas relacionados com a padronização de condições de amplificação, dentre outros, a técnica de RAPD não requer conhecimento prévio sobre o genoma da espécie vegetal a ser analisada, o que representa um benefício desta técnica na análise inicial de acessos de manga.

Para ser possível, a seleção do número de primers utilizados, são necessários testes preliminares para se ter conhecimento dos primers que promovem boa

amplificação do DNA da espécie em estudo. Para isso, há necessidade de se testar vários primers em alguns genótipos dentre as de interesse e realizar o estudo de seleção proposto neste trabalho. Na seqüência, analisam-se todos os genótipos de interesse, utilizando-se apenas os primers obtidos na seleção. A seleção proposta permitirá economizar custos e tempo para estimar a variabilidade genética de uma espécie.

A otimização de primers, normalmente, refere-se à seleção de primers que produzam maior número de bandas (5; 10; 15) (LI & MIDMORE, 1999). Na espécie *Mangifera indica* L., foi observado que os primers de RAPD A01, A09, G03, G04, G09, G10, M14, M16, N3 e N5, foram responsáveis pela máxima produção de fragmentos de DNA quando a variedade avaliada foi a manga Rosa 10 e a manga Rosa 49.

Tabela 1 Seqüência de nucleotídeos, número total de bandas, número de bandas polimórficas e porcentagem de bandas polimórficas para iniciadores RAPD utilizados para estimativa da diversidade genética dos dois genótipos de manga do Banco de Germoplasma da Embrapa Meio-norte.

Iniciador	Seqüência de nucleotídeos	No total de bandas	No total de bandas polimórficas	Porcentagem de bandas polimórficas
A01	CAGGCCCTTC	17	2	11.76
A09	GGGTAACGCC	8	2	25.00
G03	GAGCCCTCCA	7	1	14.28
G04	AGCGTGTCTG	7	1	14.28
G09	CTGACGTCAC	5	1	20.00
N03	GGTACTCCCC	14	2	14.28
N05	ACTGAACGCC	15	5	33.33
N15	CAGCGACTGT	16	2	12.50
M14	AGGGTCGTTC	5	1	20.00
M16	GTAACCAGCC	3	1	33.33
Total		97	17	1.75

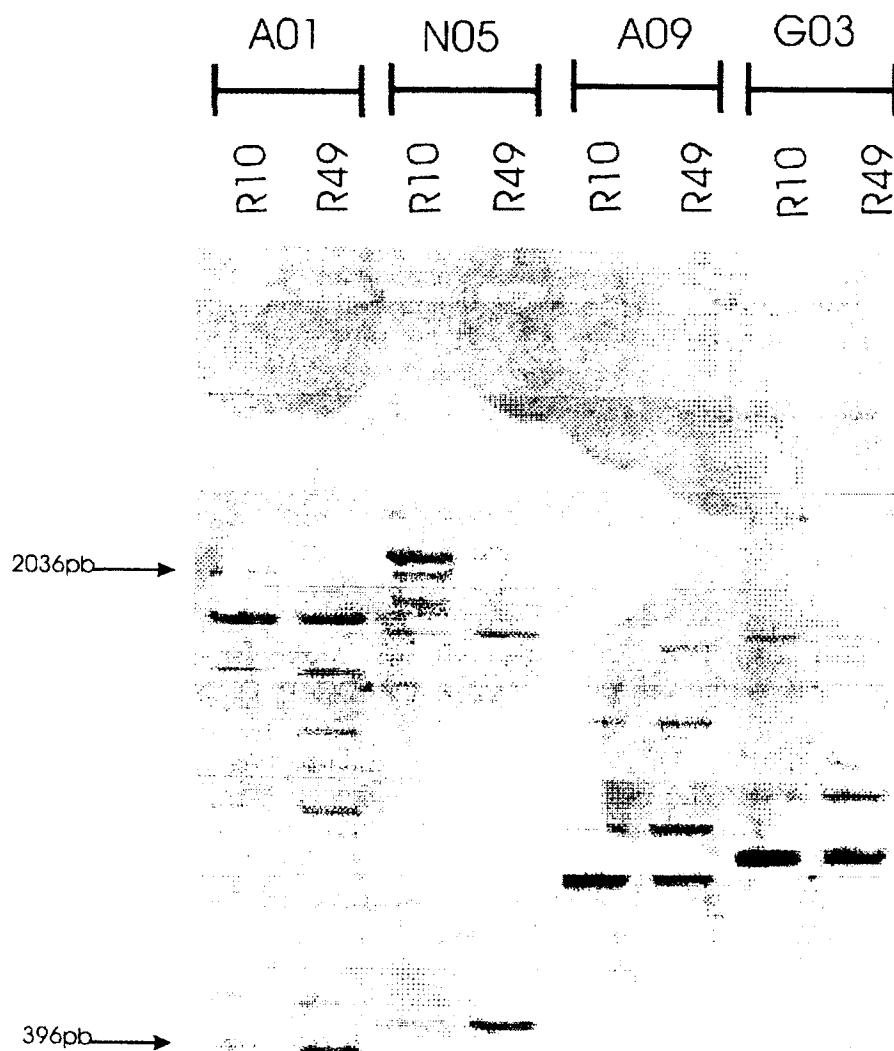


Figura 01 - Gel de Agarose (imagem invertida) 1.4% dos produtos de amplificação das amostras de DNA (Rosa 10 e Rosa 49) obtidas por meio da seleção dos Primers: A01, NO5, A09 e G03.

Os resultados são promissores, permitindo que esses primers selecionados sejam testados para que se possa detectar em análises posteriores uma diversidade genética entre as variedades da manga.

CONCLUSÃO

A RAPD permitiu a obtenção de maior número de informações em menor tempo, além da praticidade e economia fornecida pela mesma Portanto os resultados encontrados nessa pré-análise demonstraram uma boa capacidade informativa para estimativas futuras da diversidade genética entre variedades de manga, podendo, dessa forma, ser indicado para este tipo de estudo.

REFERÊNCIAS

- LI, M.; MIDMORE, D. J. Estimating the genetic relationships of Chinese water chestnut (*Eleocharis dulcis* (Burm. f.) Hensch) cultivated in Australia, using random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Rockhampton, v.74, n.2, p.224-231, 1999.
- LYNCH, M.; MILLIGAN, B.G. Analysis of population genetic struture with RAPD markers. **Molecular Ecology**, n.3, p.91-99, 1994.
- MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 141p.
- PENNER GA, CHONG J, WIGHT CP, MOLNAR SJ, FEDAK G. 1993. Identification of a RAPD marker for the crown rust resistance gene *Pc68* in oats. **Genome**, 36: 818-820.
- SAMBROOK, J.; FRISTSH, E. F.; MANIATS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2. ed. New York: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989. v. 2.
- TIMMERMAN, G. M.; MCCALLUM, J. A. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in plant biology. In: **International Grassland Congress**, 17. 1993. Proceedings... 1993. p.1025 - 1031.
- WILLIAMS, J. G. K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.