



TESTE DE REPETIBILIDADE DO MARCADOR RAPD EM MANGA.

Isis Gomes de Brito Souza¹; Fábio Mendonça Diniz²; Valdomiro Aurélio Barbosa de Souza²;
Sérgio Emílio dos Santos Valente³; Paulo Sarmanho da Costa Lima².

Bolsista de graduação CNPq/Departamento de Biologia (UFPI) isisgomesmd@hotmail.com;
Pesquisadores da Embrapa Meio-Norte, E-mail: fmd1@cpamn.embrapa.br,
valdo@cpamn.embrapa.br, sarmanho@cpamn.embrapa.br, ³Professor Adjunto (UFPI).
svalente2@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

A manga (*Mangifera indica* L.) é uma das mais populares frutas tropicais produzidas no Brasil e é a terceira na pauta de exportações brasileiras de frutas. Para atendimento crescente da demanda por frutos dessa espécie há necessidade da incorporação de novas técnicas que proporcionem a superação de alguns problemas relacionados ao cultivo da manga e resultem em aumento da produtividade.

Os marcadores moleculares são ferramentas importantes no auxílio do melhoramento genético dessa cultura. Os marcadores RAPD em razão da simplicidade, rapidez, baixo custo e uso de quantidade mínima de DNA são utilizados com grande frequência em estudos de diversidade genética (GOULÃO, 2001)

A baixa repetibilidade de algumas bandas é frequentemente citada na literatura como uma das principais limitações da técnica (Blixt et al., 2003). Muitos estudos apontam como causa para o aparecimento de bandas inespecíficas da necessidade de otimização das concentrações de reagentes e do DNA utilizados além da otimização dos ciclos de temperaturas. Assim, esse trabalho teve por objetivo testar a repetibilidade da técnica de RAPD em manga.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste teste utilizou-se DNA do acesso de manga (Jarbas), pertencente ao Banco Ativo de Germoplasma de Manga da Embrapa Meio-Norte.

As reações foram realizadas, com um único *primer* escolhido aleatoriamente, conforme preconizado por Clark e Lanigan (1993). Foram feitas 10 repetições da reação, tendo-se o

cuidado de manter todas as concentrações dos reagentes padronizadas, bem como usar o mesmo termociclador, de forma a assegurar uma melhor precisão dos resultados.

O volume final utilizado nas reações foi de 20 μ L, contendo os seguintes componentes: tampão 1,0x [20 Mm Tris HCl, Ph 8,0; 0,1 Mm EDTA; 1 Mm DTT; 50% (v/v) glicerol], 1,0 Mm MgCl₂, 800 Mm Dntp, 0,4 pMol de “*primer*”, 1U de Taq DNA polimerase e 1 μ L de DNA genômico (~15 ng).

As reações foram preparadas em tubos de 0,2mL, sendo realizadas no termociclador Veriti (Applied Biosystems), com uma fase inicial de desnaturação a 92°C por 1 minuto, seguida de 40 ciclos nas seguintes condições: 1 minuto para desnaturação a 92°C; 1 minuto para anelamento (t_a) a 35°C; 2 minutos para extensão a 72 °C. A extensão final foi realizada a 72°C por cinco minutos.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese horizontal, com tampão TBE 1X (89 Mm Tris, 89 Mm ácido bórico e 2 Mm EDTA, pH 8.0), em gel de agarose 1,4%, conduzida em voltagem de 80 V por 3 horas e 30 minutos. Os géis foram tratados com brometo de etídio à concentração de 0,5 μ L/mL, por 40 minutos, visualizados em transluminador de luz ultravioleta, fotografados e as fotos arquivadas em computador para posterior avaliação dos padrões de bandas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os fragmentos amplificados e polimórficos identificados pelo primer G03 (Gibco BRL) estão ilustrados na Figura 1.

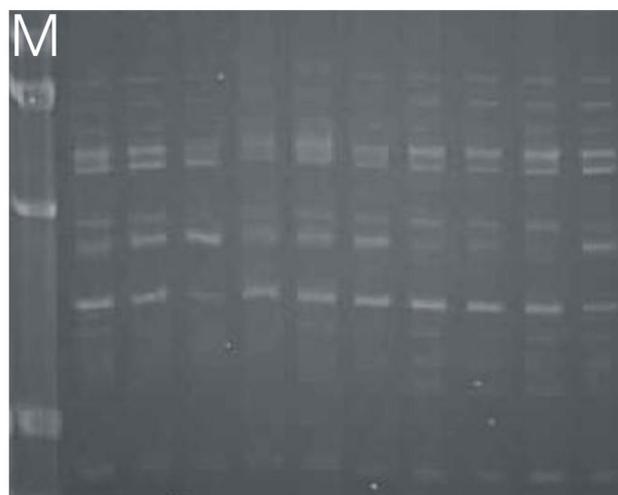


FIGURA 1 - Fragmentos amplificados de DNA de manga, acesso Jarbas, em 10 repetições. M. Marcador molecular Ladder 1kb.



Com base nos testes realizados, utilizando genótipo e *primers* únicos, porém com 10 repetições do último, observou-se que todos os testes apresentaram os mesmos marcadores RAPD e foram capazes de minimizar a questão da repetibilidade dessa técnica, conforme resultados obtidos por Telles (2006), com *Physalaemus cuvieri*, e Vieira; Nodari (2007), com *Alium sativum*.

CONCLUSÃO

A técnica RAPD mostrou-se eficiente no teste de repetibilidade, gerando bandas com mesmo padrão de resolução nas reações realizadas, indicando que se otimizando o programa de reação, as concentrações dos reagentes e do DNA, é possível aumentar a repetibilidade dessa técnica.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq pela concessão da bolsa da primeira autora e pelo financiamento das pesquisas conduzidas no Laboratório de biologia Molecular da Embrapa meio-Norte.

REFERÊNCIAS

BLIXT, Y., KNUTSSON, R., BORCH, E., RADSTROM, P. Interlaboratory random amplified polymorphic DNA typing of *Yersinia enterocolitica* and *Y. enterocolitica*-like bacteria.

International Journal of Food Microbiology, v. 83, p.15–26, 2003.

CLARK, A.G.; LANIGAN, C.M.S. Prospects for estimating nucleotide divergence with RAPDS. **Molecular Biology Evolution**, v.10, n.5, p.1096-1111,1993.

GOULÃO, L.; CABRITA, L.; OLIVEIRA, M. C.; LEITÃO, J.M. Comparing RAPD and AFLP analysis in discrimination and estimation of genetic similarities among apples (*Malus domestica* Borkh) cultivars. **Euphytica**, v.119, p.259-270, 2001.



XX Congresso Brasileiro de Fruticultura
54th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture
12 a 17 de Outubro de 2008 - Centro de Convenções – Vitória/ES

TELLES, M.P.C.; BASTOS, R.P. ; SOARES, N.; RESENDE, L.V. ; DINIZ, F.J.A.F. RAPD variation and population genetic structure of *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae) in Central Brazil. **Genetica (The Hague)**, v.128, p.323-332, 2006.

VIEIRA, R.L.; NODARI, R.O., Diversidade genética de alho avaliada por marcadores RAPD. **Ciência Rural**, v.37, n.1, 2007.

WELSH, L.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary *primers*. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.24, p.7213-7218,1990.

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.8, p.6531-6535, 1990.

20080725_090107