

MARCADORES RAPD EM ACEROLA PARA ANÁLISE DE DIVERGÊNCIA GENÉTICA

Maria Raquel Veras de Carvalho (ICV/UFPI), Francilene Leonel Campos (Orientadora, Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas – Campus Parnaíba, UFPI)

Introdução

A acerola (*Malpighia emarginata*) é uma planta típica de países de clima tropical, com seu centro de origem na região do Mar das Antilhas, Norte da América do Sul e América Central (SALLA et al., 2002). Com o crescente interesse internacional no produto acerola por parte de consumidores, industriais e exportadores, devido ao seu alto teor de vitamina C, seu cultivo intensificou-se rapidamente no Brasil, no período de 1988 a 1992, principalmente pela adaptação da planta ao clima tropical e a subtropical. (PAIVA et al., 2001).

A inexistência de variedades definidas de acerola no Brasil é um dos principais fatores que, aliados ao plantio de mudas obtidas por sementes, leva à grande desuniformidade na produção anual de frutos por planta. Este fato tem causado sérias dificuldades para os produtores, gerando perdas na produtividade e na qualidade dos frutos (SALLA et al., 2002). Com a ocorrência dessa variabilidade, surge a necessidade de entender melhor sobre a distribuição da variabilidade genética existente nas diferentes populações destas espécies, permitindo à identificação de genótipos agronomicamente superiores, com características de interesse do mercado consumidor e materiais adaptados as diversas regiões do país, sendo explorado em programas de melhoramento genético.

Atualmente, os programas de melhoramento genético têm utilizado a associação de técnicas clássicas a ferramentas biotecnológicas como, por exemplo, o uso de marcadores moleculares (GOMES FILHO, 2010). Um dos marcadores moleculares mais utilizados é o RAPD (amplificação arbitrária polimórfica de DNA) por ser uma técnica rápida e de custo relativamente baixo, porém com potencial informativo (AREIAS et al., 2006). Este trabalho tem como objetivo sugerir marcadores moleculares RAPD a serem utilizados em estudo de divergência genética em genótipos de acerola.

Metodologia

A coleta dos acessos de acerola foi realizada no Distrito de Irrigação Tabuleiros Litorâneos do Piauí (DITALPI), localizado no município de Parnaíba, com latitude de 2°55' S, 41°50' W e altitude de 40 m, no norte do estado do Piauí.

O procedimento de extração de DNA foi o descrito por Doyle & Doyle (1987) com modificações. O DNA extraído foi corado com GelRed™, numa proporção de 1 µl de GelRed™, 2 µl de corante (azul de bromotimol) e 5 µl de amostra no poço do gel de agarose (0,8%). Os acessos

foram expostos à corrida em eletroforese, a 120 V, observadas em transluminador e registrados em sistema de foto documentação.

O procedimento utilizado para a amplificação pela técnica RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*) foi o de Williams et al. (1990), com modificações. As reações foram feitas em um volume final de 15 µL, contendo 7,8 µL de água estéril; 1,5 µL de tampão de amplificação (KCl 50 mM, MgCl₂ 15 mM, Tris-Cl 100mM, pH 9,0); 1,5 µL de dNTPs (10mM de cada dGTP, dATP, dCTP, dTTP); 2µL de primer (4 mM) da Operon Technologies; 1U de Taq DNA polimerase e 2 µL de DNA. As reações de amplificação foram conduzidas em um térmico ciclador Amplitherm ThermalCycler. O programa de amplificação para as reações consistiu de uma desnaturação inicial do DNA a 94°C por 4 min, seguido de 48 ciclos que inclui 60 seg a 94°C (desnaturação), 1 min e 45 s. a 38°C (anelamento), 2 min a 72°C (polimerização) seguido de uma extensão final de 7 min a 72°C. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese conduzida em cuba horizontal, em gel de agarose 0,8%, a 90V durante 40 minutos, corado com Gelred™ visualizado sob luz UV e fotodocumentados.

Resultados e Discussão

A classe de marcadores conhecidas como RAPD permite identificar o grau de similaridade entre os genótipos de organismos de interesse. A técnica se baseia na amplificação de fragmentos não específicos de DNA, distribuídos de forma aleatória no genoma do organismo alvo. Esta metodologia utiliza oligonucleotídeos iniciadores (primers) de 10 bases para amplificar, via PCR fragmentos de DNA gnômico.

Para as reações de amplificação por RAPD foram utilizados 6 primers, da “Operon Technologies” (Tabela1).

Tabela 1. Identificação dos iniciadores utilizados para estudo RAPD seguido da sequência de nucleotídeos.

Identificação Iniciador	Sequência
OPA-01	5'-CAGGCCCTTC-3'
OPA-02	5'-TGCCGAGCTG-3'
OPA-03	5'-AGTCAGCCAC-3'
OPA-04	5'-AATCGGGCTG-3'
OPA-05	5'-AGGGGTCTTG-3'
OPA-13	5'-CAGCACCCAC-3'

Conforme os resultados obtidos na figura 1, os 4 primers testados nos dois indivíduos distintos apresentaram amplificação de fragmentos.

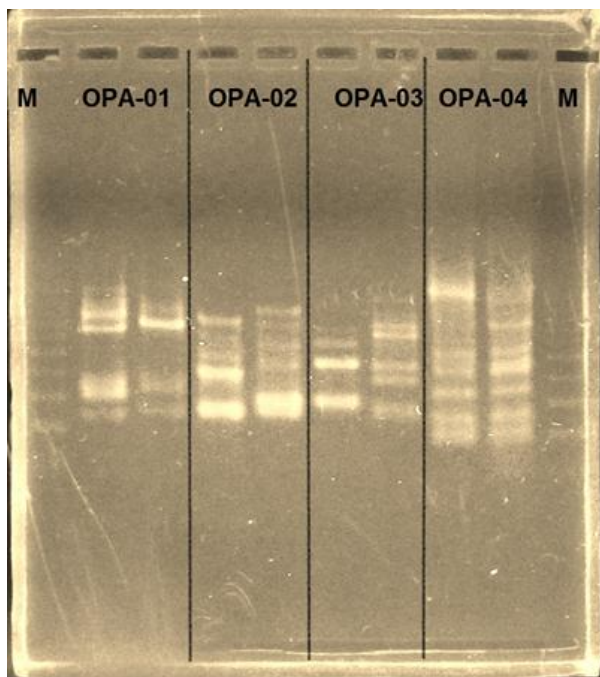


Figura 1 – Padrão eletroforéticos obtido pela amplificação do DNA de em 2 genótipos utilizando os primers OPA-01, OPA-02, OPA-03 e OPA-04. M: Marcador de peso molecular Ladder 100 pb

A Figura 2 ilustram as amplificações obtidas com os primers OPA-04, OPA-05 e OPA-13 com 5 indivíduos distintos, nesta reação o primer OPA-04 não apresentou banda em 1 dos 5 indivíduos testados podendo ter sido ocasionado por um deficiência na extração de DNA ou mesmo pela falta de anelamento do primer com a sequencia de DNA.

Para a determinação de melhores resultados, as condições de amplificação devem ser otimizadas, incluindo a seleção de primers e a concentração de DNA na reação.

A adequação da concentração de DNA é muito importante, uma vez que seu excesso pode resultar ou na falha completa da reação devido à alta concentração de impurezas agregadas, ou a perfis eletroforéticos com arraste e bandas pouco definidas. Por outro lado, baixa concentração do DNA resulta em amplificação errática ou não amplificação de certos fragmentos com perfis de eletroforese não reproduzíveis (FERREIRA apud CARVALHO, A. O.R et al, 2001).

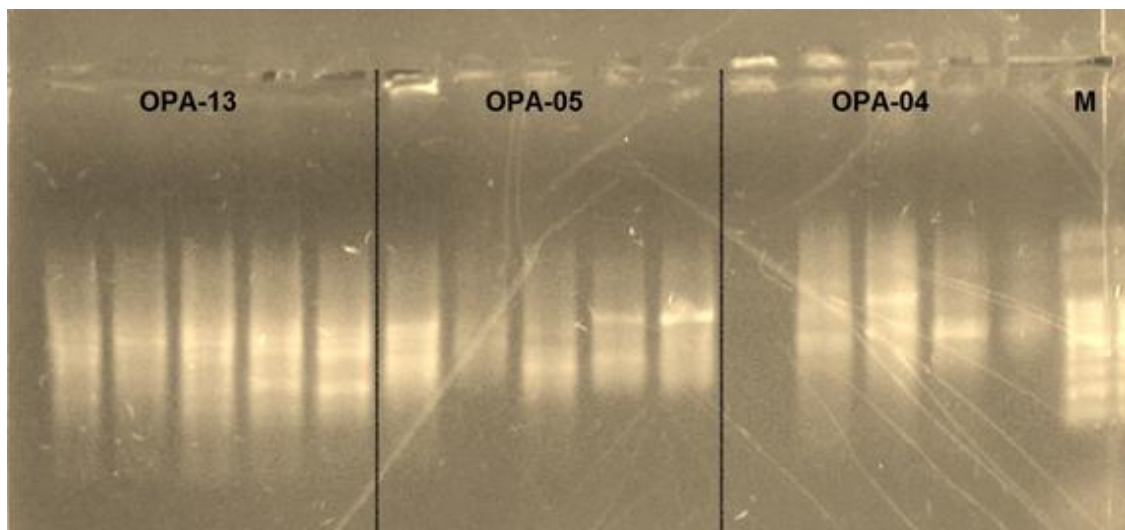


Figura 2 – Padrão eletroforéticos obtido pela amplificação do DNA de em 5 genótipos utilizando os primers OPA-04, OPA-05, OPA-13. M: Marcador de peso molecular Ladder 100 pb

Conclusões

Assim com base nos resultados obtidos o protocolo usado se mostrou eficiente, pois permitiu a obtenção de bandas de DNA a partir de reações de amplificações (PCR). Nos primers utilizados (OPA-01, OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-05, OPA-13), pode-se observar que são consistentes e merecem atenção para a análise de diversidade genética de aceroleiras. O principal foco deste trabalho é estudar a variabilidade genética de aceroleiras. Portanto, os resultados deste trabalho se mostram promissores e o uso de ferramentas biotecnológicas podem trazer benefícios e auxiliar na definição de estratégias mais eficientes a serem utilizadas nos programas de melhoramento genético. No entanto, ainda é preciso otimizar a técnica aqui utilizada.

Apoio: Universidade Federal do Piauí - UFPI

Referencias

AREIAS, R. G. B. M.; PAIVA, D. M.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Similaridade genética de variedades crioulas de arroz, em função da morfologia, marcadores RAPD e acúmulo de proteínas nos grãos. **Bragantia**, v. 65, n. 1, p. 19-28, 2006.

CARVALHO, A. O.R. ; VIEIRA, L. G.E..Determinação das Condições Ótimas para Análises de PCR-RAPD em *Atta sexdensrubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Neotrop. Entomol.** vol.30 no.4 Londrina Dec. 2001. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519566X2001000400013&lng=en&nrm=is> . Acessoem: 08 Ago. 2012

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L.A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15. 1987.

GOMES FILHO, A.; OLIVEIRA, J.G.; VIANA, A. P.; SIQUEIRA, A. P. O.; OLIVEIRA, M. G.; PEREIRA, M. G. Marcadores moleculares RAPD e descritores morfológicos na avaliação da diversidade genética de goiabeiras (*Psidiumguajava* L.). **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, p. 627-633, 2010

PAIVA, J. R.; CAVALCANTE, J. J. V.; SABRY NETO, H.; FREITAS, A. S. M.; SOUSA, F.H.L. Variabilidade genética em caracteres morfológicos de populações de plantas jovens de acerola. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 350-352, 2001.

SALLA, M.F.S.; RUAS, C.de F.; RUAS, P.M.; CARPENTIERI-PIPOLO, V, Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighiaemarginata* D.C.), **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 1, p. 15-22,2002.

WILLIAMS, J. K. G.; KUBELI, 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.

Palavras-chave: Primers. *Malpighia emarginata*. Polimorfismo.