

OTIMIZAÇÃO DE REAÇÃO E SELEÇÃO DE PRIMERS RAPD PARA ESTUDO DE VARIABILIDADE GENÉTICA EM *Spondias mombin* L.

Aline Teixeira Barbosa Lima¹, Valdomiro Aurélio Barbosa de Souza², Sulymary Oliveira Gomes³, Michelli Ferreira dos Santos⁴, Isis Gomes de Brito Souza⁴ e Paulo Sarmanho da Costa Lima².

Resumo

A cajazeira é um fruto apreciado especialmente no Norte e Nordeste brasileiro, onde recebe diferentes denominações e tem grande importância agroeconômica, sendo usado para o processamento de polpas, sucos, geléias, néctares e sorvetes de qualidade e alto valor comercial. O objetivo desse trabalho foi otimizar a reação de amplificação e selecionar *primers* RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*) para análises de variabilidade genética em cajá. Foram testadas concentrações de MgCl₂, temperaturas de anelamento e número de ciclos da reação de amplificação. Na seleção, 42 *primers* foram testados em reações de RAPD e com base no padrão de bandas obtidas, 17 *primers* se revelaram polimórficos em reações otimizadas com 3,0 mM de MgCl₂, temperatura de anelamento a 35°C e com o número de ciclos igual a 45. Os resultados demonstraram haver uma variabilidade genética dentre os acessos de cajá da coleção da Embrapa Meio-Norte e permitiram a otimização da reação para futuros ensaios com marcadores RAPD.

Introdução

A cajazeira (*Spondias mombin* L.) é originária da América Tropical (LEON; SHAW, 1990) e pertence à família Anacardiaceae, cujo gênero compreende cerca de 20 espécies, incluindo sete taxa nos Neotrópicos e cerca de 10 espécies na Ásia (MILLER; SCHAAL, 2005). O fruto de cajá é bastante apreciado em todo o Brasil, em especial, nas regiões Norte e Nordeste, onde recebe diferentes denominações (cajá, cajá verdadeira, cajá-mirim, taperebá) e tem grande importância agroeconômica, sendo usado para processamento na forma de polpa, sucos, geléias, néctares e sorvetes (SOUZA, 2000). Estudos de caracterização de frutos de cajazeira foram realizados por Soares *et al* (2006), Souza *et al* (2006) e Santos, Oliveira (2008). Contudo, ainda se fazem necessários estudos mais aprofundados sobre a sua variabilidade genética.

Segundo Rao, Rodgkin (2002), para conservação e uso correto das espécies é fundamental entender melhor a sua diversidade genética e a sua distribuição, o que ajuda a determinar a maneira mais adequada e o local para conservá-la. Com o advento dos marcadores moleculares, os pesquisadores passaram a ter uma ferramenta a mais para auxiliá-los na estimativa dessa diversidade genética, a exemplo da técnica de RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*) que é uma técnica simples, prática e rápida, além de custo relativamente baixo e de permitir um número ilimitado de marcadores, decorrentes de um número maior de anelamentos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de otimizar a reação e selecionar *primers* RAPD para o estudo da variabilidade genética da Coleção de Germoplasma de Cajazeira da Embrapa Meio-Norte, Teresina-PI.

1. Estagiária da EMBRAPA Meio-Norte e Estudante de Graduação na Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI. Av. Duque de Caxias, 5650 - Buenos Aires, Caixa Postal 001, 64006-220 - Teresina, PI. *e-mail: alinetbl@hotmail.com

2. Pesquisador da Embrapa Meio-Norte, Av. Duque de Caxias, 5650 - Buenos Aires, Caixa Postal 001, 64006-220 - Teresina, PI., E-mail: sarmanho@cpamn.embrapa.br, valdo@cpamn.embrapa.br

3. Estagiária da EMBRAPA Meio-Norte e Estudante de Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Av. Duque de Caxias, 5650 - Buenos Aires, Caixa Postal 001, 64006-220 - Teresina, PI. E-mail: s_gomespi@hotmail.com

4. Estagiária da EMBRAPA Meio-Norte e Mestranda em Genética e Melhoramento, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Av. Duque de Caxias, 5650 - Buenos Aires, Caixa Postal 001, 64006-220 - Teresina, PI. E-mail: michelly_m_santos@yahoo.com.br, isigomesmd@hotmail.com

Apoio financeiro: BNB, PAC/ EMBRAPA.

Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular da EMBRAPA Meio-Norte, Teresina-PI, durante os meses de abril e maio de 2009. Foram realizadas extrações de DNA genômico de tecido foliar jovem de plantas de cajá com o kit de purificação Qiagen (DNEASY, 2006). A quantificação foi realizada em gel de agarose a 0,8% com TBE (Tris-Borato-EDTA) 0,5× corado com SYBR Safe DNA Gel Stain a 10.000× (Invitrogen), comparando o DNA das amostras com o DNA-λ na concentração de 150 ng.

Na otimização da reação de amplificação foram testadas quatro concentrações de MgCl₂ (1,5 mM; 2,0 mM; 2,5 mM e 3,0 mM), duas temperaturas de anelamento (32 e 35°C) e dois ciclos (40 e 45). Usaram-se os *primers* A10 e M03 com temperatura de fusão de 22,26°C e 26,36°C, respectivamente, avaliando o seu comportamento conforme as modificações na reação.

Após a otimização da reação foram testados 42 *primers* RAPD: A (06, 10, 13, 14, 18, 19, 80), F (03, 06, 07, 10, 15, 17), G (06, 08, 18), L (01, 03, 05, 13, 14, 16), M (01, 05, 07, 11, 15, 19), N (06, 13, 14, 16, 18, 19, 20), T (01, 02, 12, 14, 15, 17, 18), utilizando-se dois genótipos (M01 e M28) da Coleção de Germoplasma de Cajazeira da Embrapa Meio-Norte, em reações de amplificações preparadas com um volume final de 20μl, contendo 15ng de DNA, 0,25mM de dNTP, 1U de *Taq* Polimerase (Invitrogen), 0,2 μM de *primer*, 3,0mM de MgCl₂, 2,0μl de tampão 10X e H₂O ultrapura. Essas reações foram realizadas com uma etapa inicial de desnaturação de 1 min a 92°C, seguida de 45 ciclos de 1 min a 92°C para desnaturação, 1 min a 35°C para anelamento, 2 min a 72°C e uma extensão final de 5 min a 72°C. Os produtos das reações foram visualizados em gel de agarose a 1,5%, corado com SYBR Safe DNA Gel Stain a 10.000× (Invitrogen) e fotodocumentados sob luz ultravioleta.

Resultados e Discussão

As bandas com melhores definição e resolução (Figura 1) foram obtidas com a otimização a reação de amplificação com a concentração de 3,0 mM de MgCl₂, temperatura de anelamento de 35°C e 45 ciclos. De acordo com Freitas (2005), para oligonucleotídeos de 15 *mers* o ideal é usar temperaturas de anelamento entre 40 e 50°C. Para *primers* menores, como os de RAPD, recomendam-se temperaturas mais baixas, em torno de 35°C. Temperaturas muito baixas favorecem ligações inespecíficas, resultando em padrões de amplificação inadequados. A otimização da concentração de magnésio na reação de amplificação é essencial, pois é um dos fatores que influenciam diretamente na reprodutibilidade do ensaio RAPD, porquanto afeta a eficiência da amplificação pela *Taq* polimerase e, conseqüentemente, a intensidade com a qual os fragmentos aparecem no gel (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

Os *primers* A (10, 14, 18), F (03, 15, 17), G (08, 18), L (03, 14), M (01, 07), N (14, 16, 18, 20), T (12) se revelaram polimórficos para os genótipos de cajazeira avaliados e foram selecionados para análises de variabilidade genética na espécie. O número de bandas polimórficas variou de 9,0% (M07) a 100% (F17), conforme demonstrado na Tabela 1. A Figura 2 mostra o perfil eletroforético das amplificações com os *primers* selecionados.

Conclusões

A diferença das temperaturas de fusão dos *primers* utilizados nos ensaios de otimização não influenciou na definição da temperatura de anelamento.

O polimorfismo identificado nos *primers* selecionados demonstra haver variabilidade genética entre os genótipos da Coleção de Germoplasma de Cajazeira da Embrapa Meio-Norte.

Referências

DNEASY Plant Mini Kit for miniprep purification of total cellular DNA from plant cells and tissues, or fungi. *DNeasy Plant Handbook*. Qiagen, 2006.

FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética*. Brasília: EMBRPA-CENARGEN, 1995. 220p.

FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas*. 3.ed. Brasília: EMBRAPA – CERNAGEN, 1998. 220 p.

FREITAS, P. D., Estudos de diversidade genética em camarões utilizando marcadores moleculares. Manual Prático Marcadores de RAPD. Volume 1: 1-37. São Carlos, São Paulo, 2005. Disponível em: <http://www.shrimp.ufscar.br>.

LEON, J.; SHAW, P. E. *Spondias*: the red mombin and related fruits. In: NAGY, S.; SHAW, P.E.; WARDONSKI, F.W. (Ed.) *Fruits of tropical and subtropical origin: composition, properties and uses*. Lake Alfred: Florida Science Source, 1990, p.117-26.

MILLER, A.; SCHAAL, B. Domestication of a Mesoamerican cultivated fruit tree, *Spondias purpurea*. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, Washington, v.102, p.12801-12806, 2005.

RAO, V. R; RODGKIN, T. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 68, p. 1–19, 2002.

SANTOS, C. A. F.; OLIVEIRA, V. R.. Inter-relações genéticas entre espécies do gênero *Spondias* com base em marcadores AFLP. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v.30, n.3, 2008.

SOARES, E. B.; GOMES, R. L. F.; CARNEIRO, J. G. M; NASCIMENTO, F. N.; SILVA, I. C. V.; COSTA, J. C. L., Caracterização física e química de frutos de cajazeira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v.28, n.3, p.518-519, 2006.

SOUZA, F.X. Efeito do porta-enxerto e do método de enxertia na formação de mudas de cajazeira (*Spondias mombin* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v.22, n.2. p. 286-290, 2000.

SOUZA, F. X.; COSTA, J. T. A.; LIMA, R. N.; CRISÓSTOMO, J. R. Crescimento e desenvolvimento de clones de cajazeira cultivados na chapada do Apodi, Ceará. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v.28, n.3, p.414-420, 2006.

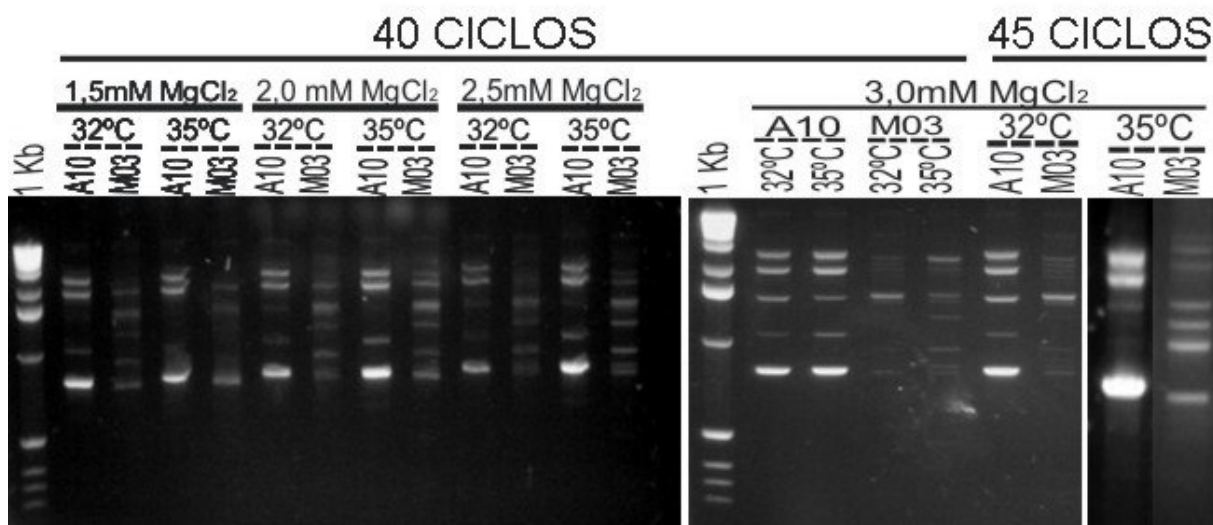


Figura 1. Otimização de reação de amplificação com alterações na concentração de Cloreto de magnésio (1,5mM, 2,0mM, 2,5mM e 3,0mM), temperatura de anelamento (32 e 35°C) e número de ciclos da reação.

Tabela 1. Sequência dos primers RAPD selecionados para estudos de variabilidade genética em *Spondias lútea* L., número total de bandas e número de bandas polimórficas amplificadas geradas.

<i>Primer</i>	Total de bandas	Nº de bandas polimórficas
A 10	12	6
A 14	5	1
A 18	14	4
F 03	7	1
F 15	5	3
F 17	5	5
G 08	6	2
G 18	12	2
L 03	13	7
L 14	11	7
M 01	18	2
M 07	11	1
N 14	3	1
N 16	10	8
N 18	4	2
N 20	3	1
T 12	12	2

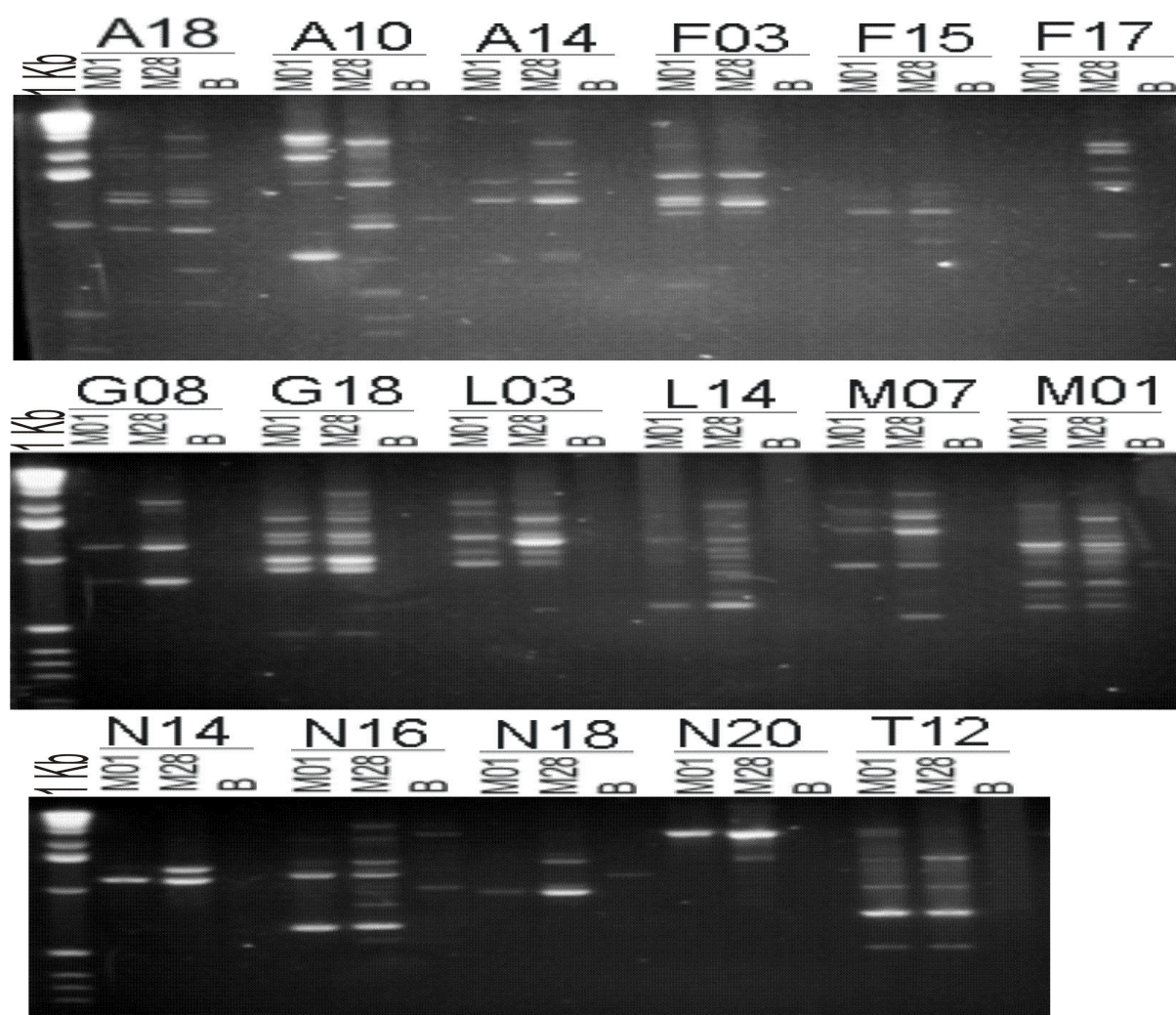


Figura 2. Perfil eletroforético dos *primers* selecionados para estudos de variabilidade genética em cajazeira.