

02-AJUSTES NO PROTOCOLO PARA REAÇÕES DE RAPD EM MANGUEIRA SEM QUANTIFICAÇÃO PRÉVIA DE DNA

R.S.N.Lima; C.A.F. Santos; A.K.N.S. Coelho; I.C.N. Santos; M.A.Rodrigues.

Embrapa Semi-Árido, BR 428, Km 152, Zona Rural - Caixa Postal 23, Petrolina, PE. E-mail: betamau@yahoo.com.br

A tecnologia da reação de polimerase (PCR) em cadeia foi concebida em meados da década de 80. Esta tecnologia causou uma verdadeira revolução na biologia, tanto na pesquisa visando o entendimento de processos biológicos fundamentais, como nas áreas aplicadas envolvendo diagnósticos e melhoramento genético de plantas e animais domésticos. A reação do PCR para RAPD é simples e está estabelecida para muitas espécies. Contudo, são necessários alguns cuidados, como a quantificação do DNA prévia para a obtenção de uma concentração adequada do mesmo. O objetivo deste trabalho foi o ajuste no volume a ser aliquoteado por reação de PCR, sem o conhecimento da concentração das amostras de DNA. DNA genômico total foi isolado de folhas verdes e sadias, segundo protocolo do CTAB 2x ((500 mM Tris pH 8,0, 1,4 M NaCl, CTAB 2% (p/v), 0,2 % beta-mercaptoethanol, 20 mM de EDTA). Dois coquetéis, com volume final diferente foram preparados, sendo um com 12,5 ul e outro com 25 ul. O volume da solução de DNA foi de 0,7 ul, 1,4 ul e 2,1 ul para a reação de 12,5 ul e de 1,4 ul, 2,8 ul e 4,2 ul para a reação de 25,0 ul. As reações de PCR foram realizadas adicionando-se o volume variável de DNA para os dois coquetéis: água (ajustado para o volume do DNA total adicionado), dNTPs (2,5 mM), solução tampão da enzima Taq DNA polimerase, MgCl₂ (25 mM), Taq DNA Polimerase (0,2 U) e primer RAPD (4 mM). As reações de PCR foram realizadas em termocicladores PTC 100 MJ Research: a) dois ciclos de 94 oC por 1 min, 35 oC por 30 segundos e 72 oC por 1 min, b) 40 ciclos de 94 oC por 15 segundos, 35 oC por 30 segundos e 72 oC por 1 min e c) um ciclo de 72 oC por 7 min. O primer OPD11 foi usado para cinco acessos de mangueira do BAG da Embrapa Semi-Arido, em cada um dos seis testes. Todas as reações dos menores volumes de DNA, ou seja, 0,7 ul e 1,4 ul apresentaram ampliações consistentes e bem definidas, enquanto nos demais volumes ocorreu reações falhas nas ampliações. Sugere-se testes preliminares no volume de DNA, quando equipamentos ou softwares não estão disponíveis para quantificações.

Palavras-chaves: *Mangifera indica*, CTAB, PCR.

Apoio financeiro: FACEPE e CNPq.