

UTILIZAÇÃO DO RAPD PARA IDENTIFICAR PLÂNTULAS EM SEMENTES POLIEMBRIÔNICAS DE MANGUEIRA PARA A FORMAÇÃO DE PORTA-ENXERTOS

Cordeiro, M.C.R.; Pinto, A.C.Q.; Ramos, V.H.V.; Fraga, L.M.S; Lopes, G.K.B. & Dias, J.N.

Embrapa Cerrados, Rod. BR 020, Km 18, Caixa Postal 08223, Planaltina-DF, CEP 73310-970

cristina@cpac.embrapa.br

Introdução

A manga (*Mangifera indica*, L.) representa atualmente uma das maiores *commodities* brasileiras com contribuições significativas para a balança comercial de produtos exportados (Pinto et al, 2002).

A mangueira é comercialmente propagada por enxertia, uma vez que este processo de propagação resulta em um produto uniforme em suas características agrônomicas, pois os propágulos possuem as mesmas características da planta-mãe. Além disso a enxertia favorece a precocidade de produção. Na propagação por enxertia é necessário uma variedade que é usada como porta-enxerto e a outra como enxerto. O porta-enxerto deve ser originário de sementes poliembriônicas, de variedades que são resistentes a doenças, adaptadas a diferentes tipos de solo e serem de preferência, de porte baixo. A poliembrião da semente é uma característica importante, pois estas sementes apresentam além do embrião zigótico (produto de fecundação), embriões nucelares, os quais são de formação partenogenética do tecido nucelar materno e, herdadas as características genéticas de resistência ou de porte da planta-mãe.

Tradicionalmente os viveiristas consideram que as plântulas de origem nucelares são as mais vigorosas em porte e diâmetro do caule, o que favorece a compatibilidade com o enxerto. A hipótese é de que as plântulas mais vigorosas são provenientes de embriões nucelares. Portanto, o objetivo deste estudo foi a de testar esta hipótese usando a metodologia do RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) para a identificação das plântulas de origem nucelares e zigóticas em sementes poliembriônicas da variedade de manga Rosinha.

Material e Métodos

Material vegetal - Sementes originadas de polinização aberta e retiradas de uma mesma planta da variedade Rosinha estabelecida na área experimental de fruticultura da Embrapa Cerrados, obtidas das colheitas de 2002 e 2003. As sementes foram colocadas para germinar em sacos plásticos pretos de polietileno (40 X 25 X 0,2 cm com perfurações laterais e sanfonados) contendo uma mistura de terra e areia (1 : 1) e mantidas no viveiro, com irrigação e 75% de sombreamento. A identificação do posicionamento de cada plântula foi realizada nas sementes recém germinadas de forma que a primeira plântula (posição 1) foi considerada aquela presente no extremo mais basal da semente.

Extração de DNA - Folhas das plântulas mais vigorosas provenientes das amostras de sementes obtidas em 2002 e 2003 com 20 e 8 meses respectivamente, bem como da planta-mãe, foram coletadas e o DNA genômico extraído utilizando o método do CTAB (Doyle & Doyle, 1990) com algumas modificações (Faleiro et al., 2003). Após a extração, a concentração e pureza do DNA foi estimada por espectrofotometria (Sambrook et al, 1989) e as amostras diluídas para a concentração de 5 ng/L. Também foi observada a integridade do DNA em gel de agarose a 0,8%.

Análise em RAPD - as amostras de DNA de cada plântula vigorosa (20 plântulas de cada ano) e da planta-mãe foram amplificadas pela técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) segundo a metodologia descrita por Welsh &

McClelland (1990) e Williams et al. (1990), utilizando-se 18 *primers* decâmeros (OPD15, OPD18, OPE1, OPE6, OPF3, OPF4, OPF7, OPF8, OPG2, OPG3, OPG4, OPG6, OPG12, OPG13, OPG18, OPG19, OPH4, OPH19.). As ampliações foram efetuadas em termociclador (MJRes.), programado para 40 ciclos de: 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 35 °C e 90 segundos a 72 °C. Após os 40 ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final de 6 minutos a 72 °C. Após a amplificação, as amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2%) em TBE (Tris-Borato 100 mM, pH 8,3; EDTA 2 mM) e corado com brometo de etídio. A separação eletroforética foi de, aproximadamente, quatro horas, a 85 volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta. Para a seleção das plântulas mais vigorosas foram utilizados dois parâmetros : diâmetro do caule e altura.

Análise dos dados - a identificação da origem zigótica ou nucelar das plântulas foi realizada por comparação do perfil de fragmentos amplificados em cada amostra em relação ao perfil encontrado na planta-mãe utilizando-se o mesmo *primer*. Perfis diferentes da planta-mãe caracterizaram as plântulas zigóticas e perfis iguais, as plântulas nucelares. Cada *primer* decâmero foi utilizado em, pelo menos, duas reações diferentes para confirmação de dados e, para o resultado final foram utilizados apenas os *primers* decâmeros OPE6, OPF3, OPF7, OPG6, OPH4, OPG12, OPG13, OPG18, OPG19 que geraram os marcadores mais reprodutíveis. Cada gel foi analisado por três pessoas diferentes.

Resultados e discussão

Tabela 1. Número total de *primers* que caracterizaram plântulas polimórficas em relação à planta-mãe em sementes de 'Roshinha' utilizando-se 9 *primers* e a localização da plântula na semente**.

	Plântulas mais vigorosas de sementes poliembriônicas da cv. Rosinha																																							
	2002										2003																													
Localização na semente*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	4		
Número total de plântulas polimórficas	2	4	2	5	6	4	5	6	5	3	4	6	6	5	4	6	5	4	4	4	4	5	4	7	4	5	7	4	6	5	5	5	2	5	3	4	5	6	7	7
Número total de plântulas monoembriônicas	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0

* plântulas possivelmente monoembriônicas
** a primeira plântula (posição 1) foi considerada aquela presente no extremo basal da semente.

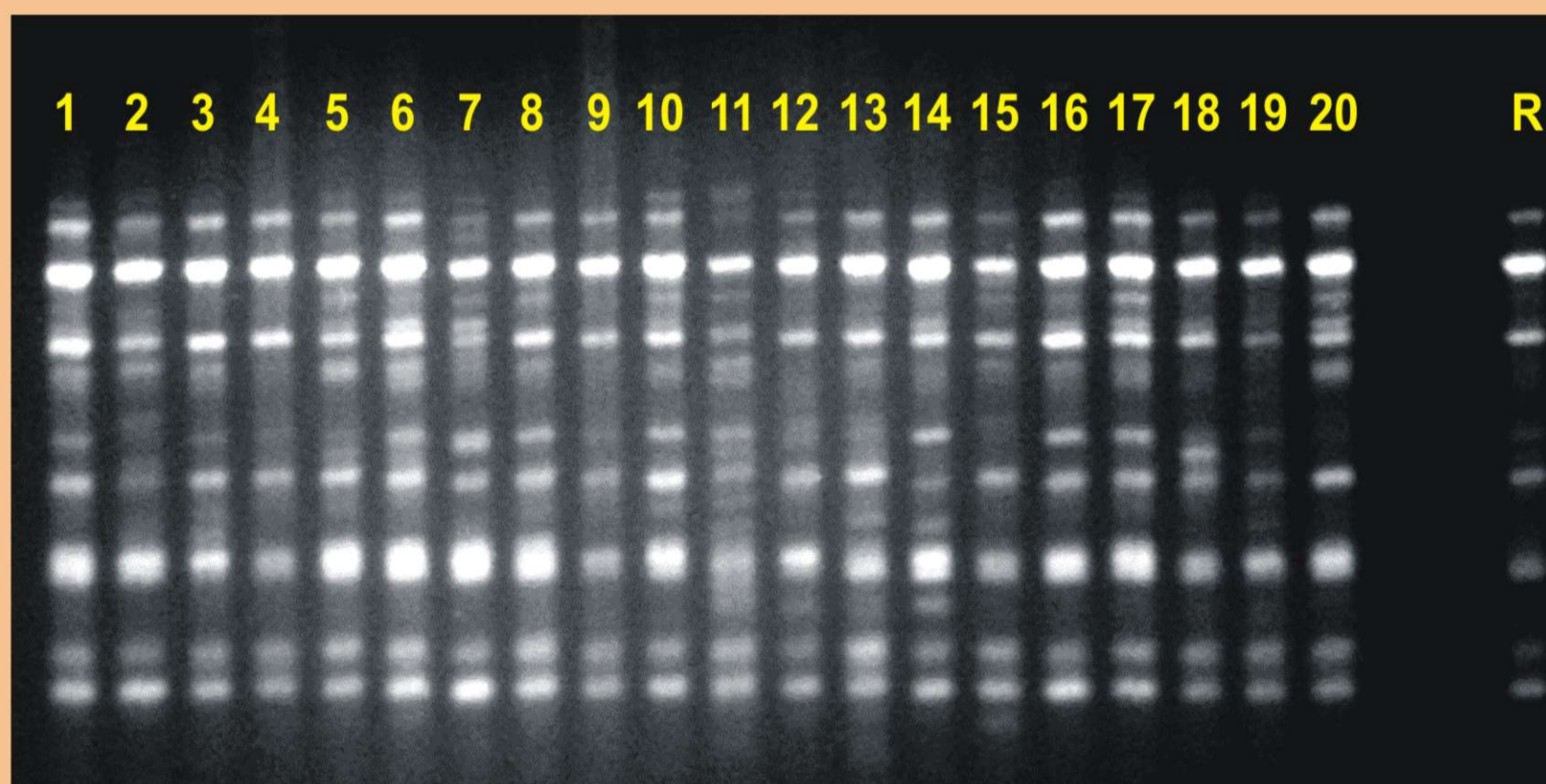


FIGURA 1. Produtos de amplificação do DNA genômico de 20 plântulas e da planta mãe (cv. Rosinha) gerados pelo *primer* OPF-03.

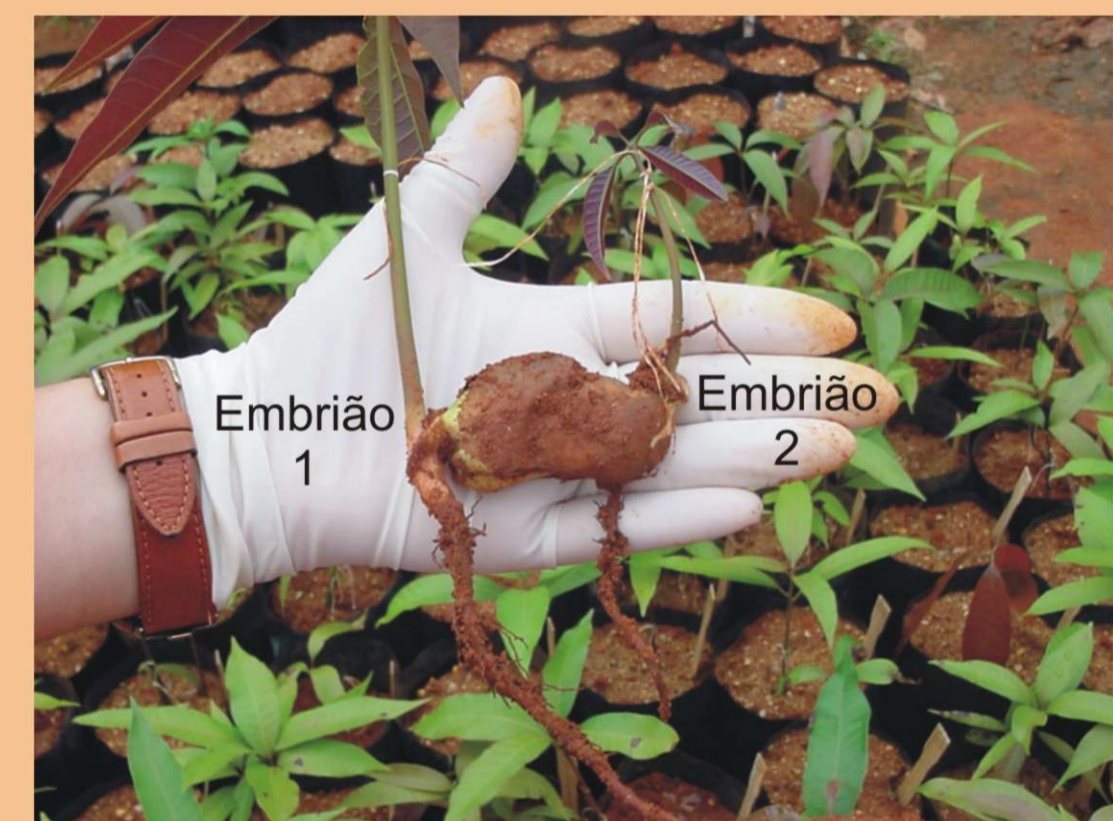


Figura 2. Demonstração do posicionamento do embrião na posição 1 (parte mais basal da semente).

Conclusões

1. As plântulas mais vigorosas das sementes de Rosinha não são necessariamente e totalmente de origem nucelar.
2. Marcadores RAPD podem ser utilizados como ferramenta diagnóstica para a identificação da origem zigótica ou nucelar de plântulas em sementes poliembriônicas porém, deve ser utilizada com cautela levando-se em consideração parâmetros como reações em duplicata e *primers* mais reprodutíveis que aumentam a veracidade da identificação.

Referências bibliográficas

CORDEIRO, M.C.R.; FALEIRO, F.G.; FRAGA, L.M.S.; VARGAS, V.H.R. & PINTO, A.C.Q. - Identificação de Embrião Zigótico e Nucelar em Semente Poliembriônica de Manga (*Mangifera indica*, L.) Utilizando RAPD - II Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, Porto Seguro, 2003.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v. 12, p. 13-15, 1990.

FALEIRO, F.G.; FALEIRO, A.S.G.; CORDEIRO, M.C.R.; KARIA, C.T. Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado. Embrapa Cerrados, Planaltina. 6p. 2003 (Comunicado Técnico N°92).

PINTO, A.C.Q.; ANDRADE, S.R.M.D de; AMARO, A.A. & GOMES, U. . Mango Industry in Brazil. 7thInternational Mango Symposium, Pernambuco, RE, p.41, 2002.

SACHHAR & CHOPRA (1957) In SRIVASTAVA, K.C.; RAJPUT, M.S.; SINGH, N.P. & LAL, B. . Rootstock Studies in Mango cv Dashehari. *Acta Horticulturae*, 231, p.p.216-219, 1988.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2ed. New York, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 653p., 1989.

SRIVASTAVA, K.C.; RAJPUT, M.S.; SINGH, N.P. & LAL, B. . Rootstock Studies In Mango cv Dashehari . *Acta Horticulturae*, vol. 231, p. 216-219, 1988.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. . Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. . DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, v. 18, p. 6531-6535, 1990.