



Uso de Marcadores RAPD para Avaliar a Divergência Genética em Mamoneira

Máira Milani¹
Fabianne Vasconcelos Dantas²
Walter Fabrício Silva Martins³
Paulo Geovani Silva Martins²

A mamoneira (*R. communis* L.) é uma planta com grande variabilidade genética, aspecto essencial para o melhoramento genético em plantas. Esta variabilidade é armazenada nos Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs), onde os acessos são rotineiramente usadas para propósitos de pesquisa, caracterização, avaliação e utilização de materiais (VALOIS et al., 2006).

Segundo Rangel et al. (2005), as técnicas de genética molecular vêm auxiliando na caracterização dos acessos presentes nos bancos de germoplasma, permitindo orientar os cruzamentos para que sejam promissores dentro dos programas de melhoramento, com base na dissimilaridade ou semelhança entre os acessos, melhorando o conhecimento e a caracterização do germoplasma.

Inúmeros estudos de diversidade genética, identificação de genes de interesse, análises filogenéticas e caracterização de germoplasma, foram conduzidos com sucesso pela técnica de RAPD, uma tecnologia amplamente utilizada entre os demais marcadores baseados em PCR (CUNHA et al., 2006). Na caracterização de germoplasma, tem sido empregado para estimativa de variabilidade em

BAG, diferenciação de acessos da coleção de germoplasma, estudos de genética de populações e agrupamentos em coleções de germoplasma, e identificação de acessos duplicados (FERREIRA et al., 2007)

Objetivou-se com este trabalho avaliar preliminarmente a divergência genética através da caracterização molecular de um conjunto de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Mamona da Embrapa Algodão. Foram utilizados 32 acessos de mamona do BAG da Embrapa Algodão. (Tabela 1). A análise molecular foi realizada no Laboratório de Biotecnologia, da Embrapa Algodão em Campina Grande, PB.

Os acessos foram semeados em novembro de 2007, em recipientes plásticos de 400 mL, contendo areia e mantidas no telado até a obtenção do material para extração. As folhas permanentes em estágio inicial de plântula foram coletadas e armazenadas em tubos *Falcon*, contendo sílica gel para absorção da umidade das folhas. Após 24h as amostras desidratadas foram transferidas para outros tubos, contendo sílica gel desidratada para conservar as folhas.

¹Eng. Agrôn. M.Sc. da Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário, CEP: 58.428-095, Campina Grande, PB. E-mail: maira@cnpa.embrapa.br.

²Biólogos, estagiários da Embrapa Algodão, E-mail: fabiannevdantas@hotmail.com; paulo_geo@yahoo.com.br

³Professor M.Sc. da Universidade Estadual da Paraíba.

Tabela 1. Material utilizado na caracterização molecular do BAG mamona.

Nº de ordem	Registros dos acessos (BRA)	Nº de ordem	Registros dos acessos (BRA)
01	3000	17	10.537 B
02	4561 A	18	10.596 B
03	4502 A1	19	10.791 B
04	4502 B	20	10.863 B
05	5762 A	21	10.332 A
06	7919	22	10.499 A
07	BRS Energia	23	10.375 A1
08	10.863 A	24	10.341 A
09	10.723 B	25	10.715 B
10	10.634 A2	26	10.901 B
11	10.405 A	27	10.669 B
12	10.651 C	28	10.707 B
13	10.472	29	11.037 A1
14	10.421 B	30	11.061
15	10.731 B	31	11.053 B
16	10.651B	32	11.002 A

O DNA genômico foi extraído segundo protocolo 2, preconizado por Vidal et al. (2005), com algumas modificações. Após a desidratação do tecido foliar, as amostras foram maceradas em tubos de microcentrífuga de 2 mL com o auxílio de esferas metálicas. Adicionou-se, em seguida 600 µL de tampão de extração (CTAB 2%; NaCl 1,4M; EDTA 0,02M; Tris-HCl 0,1M, pH 8,0; PVP 2%, β-mercaptoetanol 0,2%). As amostras foram submetidas à agitação e incubadas a 65 °C durante 30 minutos, durante esse período, foram agitadas por inversão a cada 5 minutos. Após o resfriamento do macerado a temperatura ambiente, foram adicionados 4 µL de RNase e mantidos em temperatura ambiente por 30 minutos e adicionou-se 600 µL de CIA (clorofórmio - álcool isoamílico, 24:1 v/v) para formar uma emulsão. Após centrifugar a 7.000 xg por 5 min/4 °C, a parte superior aquosa foi cuidadosamente transferida para novos tubos onde foram adicionados 600 µL de isopropanol gelado (-20 °C) e misturados lentamente por inversão dos tubos, o que ocasionou a precipitação do DNA.

O material foi centrifugado a 7.000 xg por 15 min/4 °C, e descartado o sobrenadante, em

seguida foi lavado com 300 µL de etanol 70%, centrifugado a 7.000 xg por 15 min/4 °C, novamente foi adicionado 300 µL de etanol 95%, centrifugado a 7.000 xg por 15 min/4 °C, descartado o sobrenadante e em seguida desidratado a temperatura ambiente, até a total evaporação do álcool no tubo. O DNA foi ressuscitado com 70 µL de TE (Tris 10mM, EDTA 1 mM). A verificação da quantidade de DNA obtido foi realizada em gel de agarose 1,5 % submetido à eletroforese em tampão TBE (Tris 0,089 M; Ácido bórico 0,0089 M; EDTA 0,002 M, pH 8,3) corado com Sybr.

Para amplificação do material genômico foram utilizados 23 oligonucleotídeos pertencentes aos kits OPA, OPE e OPP (Operon Technologies®). As reações foram realizadas, no volume final de 25 µL, contendo Tampão de PCR 1X (0,2M de Tris-HCl pH 8,4; 0,5M de KCl); 3 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTP; 0,3 µM do oligonucleotídeo iniciador; 1,25 U de Taq DNA polimerase e 10 ng do DNA genômico. As amplificações foram realizadas em termociclador Mastercycle Eppendorf, programado para 94 °C por 5 minutos, seguido de 44 ciclos: 94 °C por 60 segundos; 35 °C por 60 segundos; 72 °C por 2 minutos, seguido por extensão final de 72 °C por 5 minutos. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal, em gel de agarose 1,5 % em tampão TBE, corado com Sybr Green, visualizados em transiluminador ultravioleta e fotografados em equipamento de fotodocumentação.

A análise dos dados moleculares foi baseada na presença (1) ou ausência (0) de bandas, não levando em consideração a intensidade das bandas. A partir dos *loci* analisados, foi construída uma matriz binária e realizada a análise de diferenciação genética através do cálculo da distância genética de Nei (1972), utilizando o programa TFGA versão 1.3 (MILLER, 1997). Posteriormente, foi realizada a representação simplificada das distâncias por meio de um dendograma obtido pelo método UPGMA no programa MEGA 3 versão 3.0 (KUMAR et al., 2004).

Dos 23 oligonucleotídeos utilizados, foram

Tabela 2. Identificação dos primers e número de bandas totais e polimórficas.

Primers	Nº de bandas	Nº de bandas polimórficas
OPA 13	7	7
OPA 18	10	9
OPA 4	20	20
OPE 15	9	9
OPP 17	11	10
Total	57	55

produzidas 57 regiões genômicas (Tabela 2), tendo os oligonucleotídeos OPA 4 e OPA 13 gerado o maior e o menor número de bandas, 20 e 7, respectivamente. Nesta análise foram eliminadas bandas fracas e que pudessem gerar dúvidas com relação à genotipagem.

O oligonucleotídeo OPA 4 apresentou o maior índice de polimorfismo 35,08%, enquanto que o OPA 13 apresentou o menor polimorfismo 12,30% de um total de 57 bandas de RAPD.

Vários trabalhos obtiveram sucesso com a técnica RAPD como: Cunha et al. (2006), identificaram polimorfismo em mamona, Cerqueira et al. (2008), utilizaram-na na identificação da similaridade entre cultivares de mamoneira, Oliveira et al. (2007), conseguiram diferenciar acessos de *Jatropha curcas* L., de acessos do gênero *Jatropha* sp na caracterização do BAG.

A proporção de *loci* polimórficos correspondeu a cerca de 96,5%, correspondendo a 55 bandas polimórficas. A dimensão dos fragmentos amplificados situou-se entre 415pb e 2500 pb. Os padrões dos *primers* obtidos estão representados na Figura 1.

A maior diferenciação genética, 1,09 foi observada entre os acessos BRA 10405 A e BRA 10707 B, e a menor diferenciação 0,05 entre BRA 10634 A e BRA 10651 C.

Os acessos se agruparam em 9 grupos distintos, sendo 3% dos genótipos no grupo I, 19% dos no

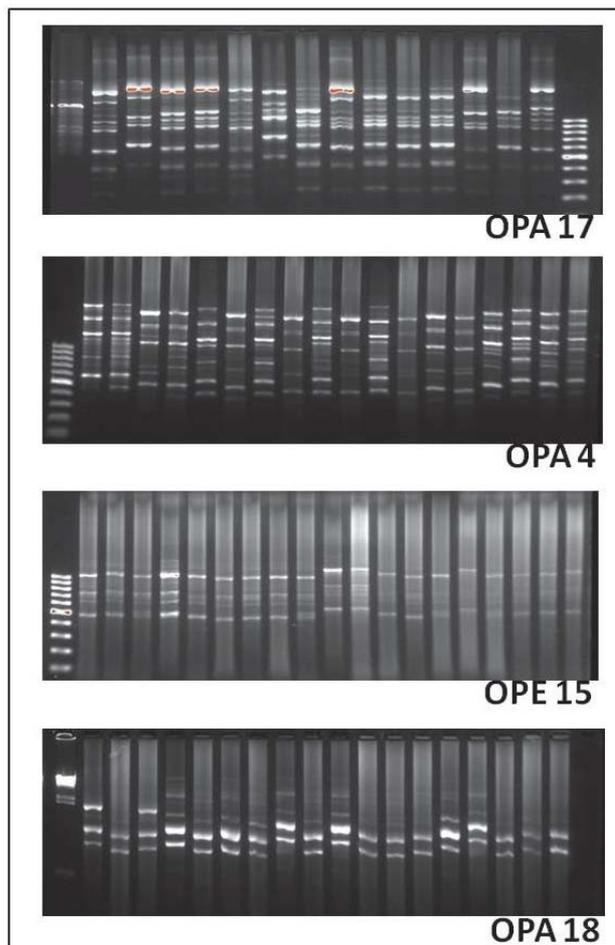


Fig. 1. Géis de agarose 1,5% corado com Sybr green mostrando o padrão dos primers utilizados na análise.

grupo II, 35% no grupo III, 9% no grupo IV, 3% no grupo V, 22% no grupo VI e 3% nos grupos VII, VIII e IX (Figura 2).

Esta avaliação inicial possibilitou verificar que é possível avaliar a divergência genética em genótipos de mamona. Há poucos trabalhos com avaliação de divergência genética em mamona com uso de marcadores moleculares e é praticamente escassa a informação sobre o número de marcadores ou de alelos que seriam necessários para uma estimativa precisa da divergência genética. Haverá continuidade deste trabalho utilizando-se maior número de iniciadores e de acessos do BAG, buscando definir qual seria o menor número de iniciadores que poderiam ser utilizados para avaliar a divergência genética, além, é claro, de estimar a própria.

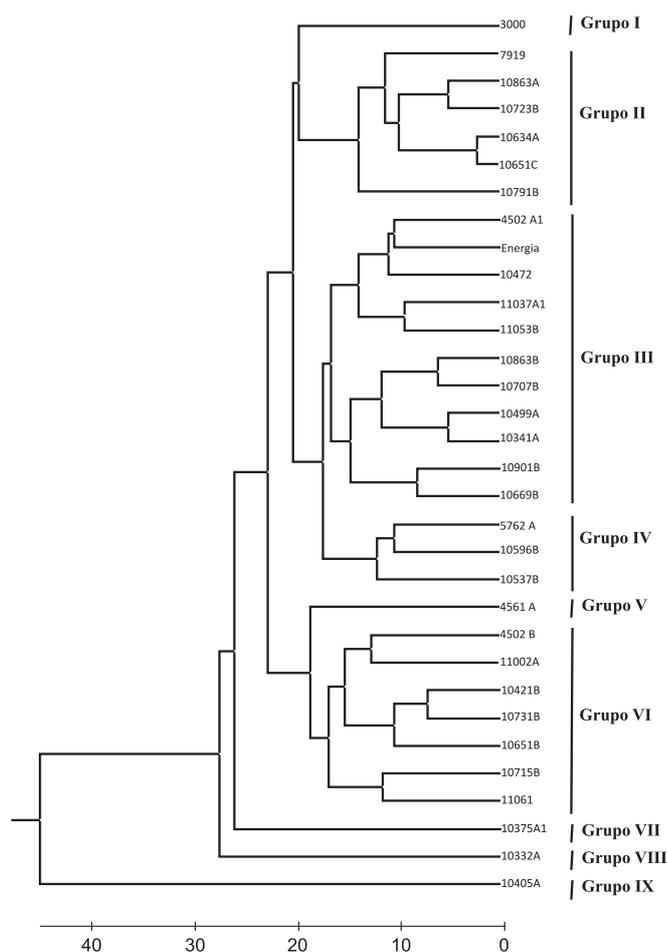


Fig. 2. Dendrograma dos 32 acessos de *Ricinus communis* L. obtido, utilizando o método de agrupamento UPGMA, através da distância genética de Nei (1972).

Conclusões

Neste ensaio preliminar, os acessos avaliados mostraram diferenças entre si com o uso de marcadores moleculares RAPD.

Os genótipos BRA 10405 A e BRA 10707 B foram os mais divergentes e devem ser testados em cruzamentos para avaliação das populações segregantes e possível obtenção de heterose.

Agradecimentos:

Financiamento do Banco do Nordeste e Bom Brasil Óleo de Mamona Ltda.

Referências Bibliográficas

- CUNHA, M. A. da S.; SALES, J. S.; MORAIS, T. de A.; RAMALHO NETO, C. E. Variabilidade genética de *Ricinus communis* L. revelada por marcadores RAPD. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 2., Aracajú. **Cenário atual e perspectivas:** anais. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 1 CD-ROM.
- CERQUEIRA, L. S.; SILVA, S. A.; VILARINHOS, A. D.; AMORIM, E. P.; PALMIERI, D. A.; MOREIRA, R. F. C.; PESTANA, K. N.; SILVA, A. N. da. Seleção de primers RAPD capazes de detectar polimorfismo em mamoneira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 3, Salvador. **Energia e ricinoquímica:** anais. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2008. 1 CD-ROM.
- FERREIRA, M. E.; MORETZOHN, M. de C.; BUSO, G. S. C. Fundamentos de caracterização molecular de germoplasma vegetal. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais.** Brasília, D.F.: Embrapa **Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2007. cap. 11, p. 377-420.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v. 5, p. 150-163, 2004.
- MILLER, M. P. **Tools for populations genetic analyses (TFPGA) 1.3.** A windows program for analysis of allozyme and molecular populations genetic data. Computer software distributed by authors. 1997.
- NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, v. 106, p. 283-292, 1972.
- OLIVEIRA, A. dos S.; GÓIS, I. B.; SILVA-MANN, R.; BOARI, A. de J.; FRAGA, A. C. **Diversidade genética entre acessos de *Jatropha* sp.** Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2007/agricultura/26.pdf>> Acesso em: 01 out. 2008.
- RANGEL, P. H. N.; BUSO, G. S. C.; BRONDANI, C.; GUIMARÃES, E. P.; RANGEL, P. N.; FERREIRA, M. E. Coleta, caracterização e uso de germoplasma silvestre de arroz diplóide e tetraplóide (*oriza* spp.)

nativo do Brasil no melhoramento genético. In: WALTER, B. M. T.; CAVALCANTI, T. B. (Ed.). **Fundamentos para a coleta de germoplasma vegetal.**

Brasília, DF: Embrapa recursos genéticos e biotecnologia, 2005. cap. 20, p. 585-632.

VALOIS, A. C. C.; SALOMÃO A. N.; ALLEM, A.C. (Org.). **Glossário de recursos genéticos vegetais.** 2006. Disponível em: < <http://>

www.cenargen.embrapa.br/segbio/glossario.html > Acesso em: 12 jul. 2008.

VIDAL, M. S.; MILANI, M.; MENESES, C. H. S. G.; BEZERRA, C. de S. Comparação entre protocolos para extração de DNA total de *Ricinus communis* L. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005. 5 p. (Comunicado Técnico, 252).

**Comunicado
Técnico, 360**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Algodão
Rua Osvaldo Cruz, 1143 Centenário, CP 174
58.428-095 Campina Grande, PB
Fone: (83) 3182 4300 Fax: (83) 3182 4367
e-mail: sac@cnpa.embrapa.br
1ª Edição
Tiragem: 500

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**



**Comitê de
Publicações**

Presidente: Carlos Alberto Domingues da Silva
Secretário Executivo: Valter Freire de Castro
Membros: Fábio Aquino de Albuquerque
Giovani Greigh de Brito
João Luiz da Silva Filho
Máira Milani
João Luiz da Silva Filho
Maria da Conceição Santana Carvalho
Nair Helena Castro Arriel
Valdinei Sofiatti
Wirton Macedo Coutinho

Expedientes: Supervisor Editorial: Valter Freire de Castro
Revisão de Texto: Maria José Silva e Luz
Tratamento das ilustrações: Geraldo F. de S. Filho
Editoração Eletrônica: Geraldo F. de S. Filho