



I CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA

Energia e Sustentabilidade

23 a 26 de novembro de 2004 - Campina Grande - PB

SELEÇÃO DE MARCADORES DO TIPO RAPD PARA CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA *Ricinus communis* L.

MENESES, C.H.S.G.¹; BEZERRA, C.S.¹; TAVARES, A.C.¹; COUTINHO, T.C.²; SILVA, S.C.³; MILANI, M.³; VIDAL, M.S.³ 1- Estagiários da Embrapa Algodão e alunos de Graduação da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande - PB. 2- Aluna de Pós-Graduação, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal – RN. 3 - Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário, 58107-720, Campina Grande - PB. mvidal@cnpa.embrapa.br

RESUMO

O cultivo da mamona está em expansão no Brasil, tanto no cerrado, com cultivos mecanizados em grandes áreas, quanto em regiões mais secas, como o Nordeste brasileiro, com áreas menores e mão-de-obra familiar. O interesse crescente por esta se dá pelo fato desta cultura ser geradora de biodiesel, combustível não fóssil e menos poluente. Os programas de melhoramento estão voltados, principalmente, para a obtenção de cultivares com boa quantidade e qualidade de óleo a partir da indução de híbridos simples com boa capacidade produtiva, para isso há necessidade de se contar com linhagens geneticamente divergentes. Uma das formas de se melhorar as características desta espécie é através do melhoramento genético, portanto, faz-se necessário conhecer a variabilidade genética existente entre acessos de mamona. Uma forma eficiente de se estudar a variabilidade genética é através da utilização de marcadores moleculares. O objetivo deste trabalho foi selecionar marcadores do tipo RAPD para serem empregados na caracterização genética de acessos de mamoneira do BAG da Embrapa Algodão, para tal foi realizada PCR utilizando 77 oligonucleotídeos randômicos da linha OPERON. Quarenta e sete dos 67 oligonucleotídeos testados produziram um total de 105 bandas, selecionadas para a futura genotipagem do BAG de mamona.

INTRODUÇÃO

A demanda industrial por óleos vegetais cresce a cada ano, e o interesse mundial pelos oleoquímicos (ácidos graxos, ésteres graxos metílicos, álcoois, glicerina e amins graxas) está em alta, haja visto a sua forma diversificada de aplicações, sendo usados na indústria de transformação em três fases como matéria prima industrial; síntese de produtos intermediários e aplicações finais (FREIRE, 2001).

O óleo da mamona (*Ricinus communis* L.) é a base para a obtenção de uma diversificada linha de matérias-primas utilizadas na fabricação de plásticos e plastificantes, fibras sintéticas, tintas, esmaltes, coberturas protetoras, resinas, lubrificantes e biodiesel. A partir da ricinoquímica, que é a química do óleo de mamona, pode-se chegar à geração de outros produtos bem mais sofisticados, como é o caso das próteses humanas, e dos produtos utilizados nas indústrias farmacêuticas, de



I CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA

Energia e Sustentabilidade

23 a 26 de novembro de 2004 - Campina Grande - PB

cosméticos e aeronáutica (SAVI FILHO e BANZATTO, 1983).

No Brasil, a ricinocultura esta amplamente distribuída tendo como destaque o cerrado, com produção altamente mecanizada, e o Nordeste com o papel social de grande relevância, assegurando uma continua fonte de renda, esta sustentada sob o modelo do triconsórcio (feijão, milho e mamona).

Segundo Beltrão *et al* (2001), há ocorrência de centenas de cultivares de mamona como: Sipeal 28, IAC 38, Campinas, BRS 149 (Nordestina), BRS 188 (Paraguaçu), Guarani, Baker 415-9, LC 5116, IAC 80, EPABA 02, Azeitona, Sangue-de-boi, Canela-de-juriti e Anã CIA, entre outras. Há também, a existência de híbridos como Baker H. 66, Baker H. 72, híbrido 415, dentre outras variedades. Algumas das diferenças entre os acessos residem na grande variação no hábito de crescimento, cor da folhagem e caule, tamanho das sementes, conteúdo do óleo e coloração e porte.

Os estudos de caracterização, através de marcadores moleculares em associação com avaliação da divergência genética nesta espécie, são bastante limitados. Assim o presente trabalho tem como principal meta selecionar oligonucleotídeos do tipo RAPD, com padrão de bandas polimórficas para caracterização molecular dos acessos existentes no BAG da mamoneira da Embrapa Algodão. Isso permitirá a verificação da similaridade entre eles a fim de sanar as duvidas quanto à origem e o uso nos cruzamentos, além de auxiliar na escolha de acessos potenciais para o enriquecimento da variabilidade genética no próprio Banco Ativo de Germoplasma. O uso combinado de marcadores morfológicos e moleculares subsidiará os trabalhos de melhoramento por meio da obtenção da variabilidade genética; seleção de indivíduos superiores e avaliação de materiais genéticos promissores para lançamento comercial, em busca de cultivares mais produtivos e com características de qualidade que atendam demandas do setor produtivo, contribuindo, ainda, para o intercambio de material e de informações entre instituições de pesquisa. A essência deste processo está em quanto o fenótipo de um indivíduo expressa o seu genótipo, é neste ponto que o uso de marcadores moleculares pode auxiliar o melhoramento de plantas, pois possibilita acessar diretamente o genótipo de um individuo, assim permitindo o monitoramento e organização da variabilidade genética; a seleção assistida por marcadores moleculares; e a proteção de cultivares (MILACH, 1998).

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

O material estudado foi composto por sementes de cinco acessos de mamona provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Algodão (Guarani; SMS Pernambucana; Nordestina; CSRN 379; CM 2000), que foram germinadas em copos plásticos de 500mL contendo substrato e mantidos



I CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA

Energia e Sustentabilidade

23 a 26 de novembro de 2004 - Campina Grande - PB

em câmara de crescimento à 25°C, até a obtenção do material para extração.

Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído segundo protocolo descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998), com algumas modificações. As folhas permanentes em estágio inicial de desenvolvimento, recém coletadas, foram maceradas em tubos de microcentrífuga de 1,5mL em presença de nitrogênio líquido, isso com o auxílio de bastão de vidro. Adicionou-se, em seguida, 600µL 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%), pré-aquecida a 65°C. 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 extrato a temperatura ambiente, foram adicionados 600µL de CIA (clorofórmio – álcool isoamílico, 24:1) para formar uma emulsão. Após centrifugar por 10 minutos a 4°C e 7.000 g, a parte superior aquosa (600µL) foi cuidadosamente transferida para novos tubos onde foram adicionados 600µL de isopropanol frio (-20°C), o que ocasionou a precipitação do DNA.

O material foi incubado em freezer -20°C por pelo menos 30 minutos, sendo, em seguida, centrifugado por 10 minutos a 4°C e 7.000g, lavado com 500µL de etanol 70% e 300µL de etanol 95%, para remover sais, e posteriormente, foi secado a temperatura ambiente, até a total evaporação do álcool do tubo. O DNA foi ressuscitado com 200µL de água MilliQ™ contendo 10mg/mL de RNase A e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida adicionaram-se 200µL de clorofórmio-álcool isoamílico 24:1 e os tubos foram agitados por inversão durante 5 minutos até obter uma emulsão homogênea. Após centrifugar por 5 minutos a 4°C e 7.000g, a parte superior aquosa (200µL) foi transferida para novo tubo onde foram adicionados 20µL de NH₄OAc 3,5M, homogeneizado e adicionados 500µL de isopropanol frio (-20°C), o que ocasionou a precipitação do DNA. O material foi colocado em freezer (-20°C) por pelo menos 30 minutos, sendo, em seguida, centrifugado por 10 minutos a 4°C e 7.000g, lavado com 500µL de etanol 70% e 300µL de etanol 95%, para remover sais, e posteriormente, foi seco a temperatura ambiente. O DNA foi ressuscitado com 100µL de água MilliQ™. A concentração de DNA foi estimada pela migração das amostras em gel de agarose [agarose 0,8%, tampão TBE 1X (10,8 g de TRIS Base; 5,5 g de ácido bórico e 4mL de 0,5 M EDTA pH 8,0) e brometo de etídio (0,012ng/mL)] visualizadas em transiluminador (Hing Performace Ultraviolet Transilluminator) e documentadas. Foi aplicado 1µL de cada um dos DNAs totais isolados juntamente com 2µL de tampão de amostra (sacarose 4 g, azul de bromofenol 0,025 g) e 7µL de água MilliQ™, que foram então comparados com DNA do bacteriófago lambda (25ng, 50ng e 100ng).



I CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA

Energia e Sustentabilidade

23 a 26 de novembro de 2004 - Campina Grande - PB

Reações RAPD

Após a quantificação, as amostras foram diluídas para 5ng/ μ L com água MilliQ™, e foram armazenadas a -20°C. Foram utilizados oligonucleotídeos com 10 pares de base, pertencentes aos kits OPA, OPE, OPM, OPN e OPP (OPERON Technologies, Inc. Alameda, CA), totalizando 67 oligonucleotídeos. As reações foram desenvolvidas, num volume final de 25 μ L, está contendo Tampão PCR 1X (0,2M de TRIS-HCl pH 8,4; 0,5M de KCl); 3mM de $MgCl_2$; 0,2 mM de dNTP; 0,3 μ M do oligonucleotídeo arbitrário; 1 μ L de Taq DNA polimerase, produzida no Laboratório de Biotecnologia, e 10 ng do DNA genômico. As amplificações foram realizadas em termociclador de DNA Eppendorf - Mastercycle, sendo a temperatura elevada para 94° C por 5 minutos e em seguida realizados 44 ciclos com a seguinte programação: 1. 94°C por 60 segundos; 2. 35°C por 60 segundos; 3. 72°C por 2 minutos, terminado os 44 ciclos a temperatura permaneceu a 72°C por 5 minutos para a completa extensão dos produtos amplificados e, em seguida, baixou-se para 4°C. Às reações foram acrescentados 4 μ L de tampão de amostra e então, os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal, em gel de agarose (agarose 1%, tampão TBE 1X e brometo de etídio) visualizados em transiluminador e fotografados em equipamento de foto documentação. Aplicou-se como marcador de peso molecular o DNA do bacteriófago lambda digerido com *Pst*I no início e no final do gel para definir o tamanho aproximado dos fragmentos gerados nas PCRs.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 77 oligonucleotídeos testados com os kits OPA, OPE, OPM, OPN e OPP, 47 produziram um total de 105 bandas polimórficas, como pode ser observado na tabela 1. Nesta análise foram eliminadas bandas fracas e que não pudessem gerar dúvidas com relação a genotipagem. Os oligonucleotídeos OP-E05, OP-E08 e OP-M01 não amplificaram nenhuma das amostras empregadas nas reações de RAPD e, as reações realizadas com os oligonucleotídeos OP-E10, OP-E13, OP-P03, OP-P10, OP-P18, OP-P20 e OP-M09 geraram dados não conclusivos, por isso foram eliminadas das análises. As reações com estes oligonucleotídeos devem ser refeitas, de modo a gerarem dados mais consistentes, que possam ser então empregados na seleção de novos marcadores do tipo RAPD. Os oligonucleotídeos que geraram marcadores de DNA que puderam ser analisados, com os respectivos número de bandas e número de bandas que foram polimórficas entre os acessos analisados estão apresentados na Tabela 1.



I CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA

Energia e Sustentabilidade

23 a 26 de novembro de 2004 - Campina Grande - PB

Tabela 1. Número de marcadores do tipo RAPD amplificados por oligonucleotídeo, número de bandas analisadas e número de bandas polimórficas.

Oligo	Nº de Bandas analisáveis	Bandas Polimórficas	Oligo	Nº de Bandas analisáveis	Bandas Polimórficas	Oligo	Nº de Bandas analisáveis	Bandas Polimórficas
OP-E01	8	1	OP-P08	5	1	OP-M20	14	0
OP-E02	9	1	OP-P09	6	1	OP-A01	8	1
OP-E03	8	1	OP-P11	3	0	OP-A03	7	5
OP-E04	6	4	OP-P12	5	0	OP-N01	10	7
OP-E06	8	0	OP-P13	8	0	OP-N02	6	2
OP-E07	10	1	OP-P14	13	0	OP-N03	4	2
OP-E09	13	2	OP-P15	10	0	OP-N04	6	1
OP-E11	10	3	OP-P16	9	2	OP-N05	5	2
OP-E12	6	2	OP-P17	15	5	OP-N07	5	4
OP-E14	7	1	OP-P19	7	1	OP-N08	8	1
OP-E15	13	2	OP-M03	8	0	OP-N09	9	1
OP-E16	8	2	OP-M04	13	3	OP-N10	6	1
OP-E17	10	3	OP-M05	9	1	OP-N11	4	0
OP-E18	8	4	OP-M12	5	2	OP-N12	8	0
OP-E19	9	3	OP-M02	3	1	OP-N13	7	2
OP-E20	10	2	OP-M06	5	0	OP-N15	5	1
OP-P01	6	0	OP-M07	7	3	OP-N16	5	0
OP-P02	3	0	OP-M08	1	0	OP-N17	8	6
OP-P03	1	0	OP-M11	1	0	OP-N18	3	0
OP-P04	6	0	OP-M13	6	3	OP-N19	5	3
OP-P05	5	2	OP-M14	6	3	OP-N20	6	2
OP-P06	5	1	OP-M15	3	1			
OP-P07	7	0	OP-M19	6	2			

CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível selecionar 47 oligonucleotídeos da linha OPERON capazes de gerar bandas com padrão polimórfico.

REFERÊNCIAS

- BELTRÃO, N. E. M.; SILVA, L. C.; VASCONCELOS, O. L.; AZEVEDO, D. M. P.; VIEIRA, D. J. Fitologia. In: AZEVEDO, D. M. P. ; LIMA, E. F. **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2001. p. 37-61.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília: Embrapa - Cenargen, 1998. 220p.
- FREIRE, R. M. M. Ricinoquímica. In: AZEVEDO, D. M. P. ; LIMA, E. F. **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2001. p. 295-335.
- MILACH, S. C. K. Marcadores de DNA: aplicações no melhoramento de plantas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 5, p.14-17, 1998.



I CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA

Energia e Sustentabilidade

23 a 26 de novembro de 2004 - Campina Grande - PB

SAVI FILHO, A.; BANZATTO, N. V. O mercado está para mamona. **Casa da Agricultura**, v. 5, n. 5, p. 12-15, 1983.