

# IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DA ORIGEM ZIGÓTICA OU NUCELAR DE PLÂNTULAS DE SEMENTES POLIEMBRIÔNICAS DE MANGA "ROSINHA" COM BASE EM RAPD.

M.C.R. Cordeiro; V.H.V. Ramos; A.C. Q. Pinto; L.M.S. Fraga; J.N. Dias; , G.K.B. Lopes .-  
Embrapa Cerrados - Rod. BR 020, km 18 - Planaltina, DF, CEP 73310-970,  
cristina@cpac.embrapa.br

## INTRODUÇÃO

A manga representa hoje um dos maiores agronegócios de frutas para o país (Anuário de Frutas, 2004). Sua produção atende aos mercados nacional e internacional. Para a obtenção de uma produção homogênea é essencial a propagação da cultivar adequada em mudas enxertadas. Os porta-enxertos das mudas produzidas são normalmente obtidos de variedades poliembrionicas que apresentem características genéticas como a resistência a doenças, baixa altura e boa adaptação a vários tipos de solo. A poliembrionia das sementes garante a germinação de embriões (plântulas) de origem nucelar ou zigótica. As plântulas de origem nucelar mantêm as informações genéticas da planta-mãe, sendo preferidas na propagação da mangueira por enxertia. Os produtores

de mudas, em geral, tomam a plântula mais vigorosa para realizar a enxertia. Consideram que esta plântula representa o embrião nucelar. No entanto, observa-se uma certa desuniformidade das plantas no pomar, principalmente com respeito a altura das mesmas. Em trabalhos anteriores (Cordeiro et al, 2003, 2004) foi observado que a plântula mais vigorosa nem sempre é nucelar e que, a mesma pode estar na primeira, segunda, terceira ou quarta posição a tomar pelo lado mais basal da semente. Neste trabalho é apresentado a análise em três amostras de plântulas vigorosas de sementes poliembrionicas da variedade Rosinha (2002, 2003 e 2004) para verificar o percentual de aparecimento de plântulas vigorosas de origem zigótica ou nucelar.

## OBJETIVO

Realizar a identificação molecular da origem zigótica e nucelar de plântulas de sementes poliembrionicas da variedade Rosinha, analisando três amostras de sementes realizadas em 2002, 2003 e 2004.



## 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, 2003 e 2004 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 plântula mais vigorosa de cada semente foi utilizada nas análises. Para a seleção das plântulas mais vigorosas foram utilizados dois parâmetros: diâmetro do caule e altura.

Extração de DNA - folhas das plântulas mais vigorosas provenientes das amostras de sementes obtidas em 2002, 2003 e 2004 e 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 µg/ 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 dos anos de 2002 e 2003 e 8 do ano de 2004) 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 19 *primers* decâmeros (OPD15, OPD18, OPE1, OPE6, OPF3, OPF4, OPF7, OPF8, OPG2, OPG3, OPG4, OPG6, OPG12, OPG13, OPG18, OPG19, OPH4, OPH18, 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.

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 nucleares. 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, OPH18, OPH19, OPG12, OPG13, OPG18, OPG19 que geraram os marcadores mais reprodutíveis. Para o resultado final foi tomado o percentual de plantas que apresentaram-se polimórficas ou monomórficas em mais de 50% dos *primers* utilizados ou que, pelo menos satisfizeram o pressuposto de Novy et al (1994) (diferentes em 3 *primers*).

## RESULTADOS

Tabela 1 - Número total de primers que caracterizaram plântulas polimórficas ou monomórficas em relação à planta-mãe com base em marcadores RAPD\*.

Plântulas mais vigorosas de sementes poliembrionicas da cv. Rosinha		
Avaliação 2002	Avaliação 2003	Avaliação 2004
a 1 2 3 4 5 6 7 8 9 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0	1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0	1 3 4 5 6 7 8 9
b 2 4 2 5 6 4 5 6 5 3 4 6 6 5 4 6 5 4 4 4 5 4 7 4 5 7 4 6 5 5 5 2 5 3 4 5 6 7 7	0 4 0 2 0 1 0 0	0 0 0 0
c 0 0 0 0 0 0 1 1 1 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 2 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 1 3 0 0 0 0 0 0	6 2 5 2 6 3 3 5	

\* amostras 2002 e 2003 avaliadas com 9 primers e amostra 2004 avaliada com 6 primers.  
a número de plântulas analisadas  
b número de primers polimórficos  
c número de primers monomórficos

Tabela 2 - Percentual de plântulas vigorosas de origem zigótica ou nucelar com base em marcadores RAPD.

Plântulas mais vigorosas de sementes poliembrionicas da cv. Rosinha			
	Amostra 2002	Amostra 2003	Amostra 2004
% de plântulas de origem zigótica	90	90	12,5
% de plântulas de origem nucelar	0	0	75%
Plantas polimórficas ou monomórficas duvidosas	10	10	12,5

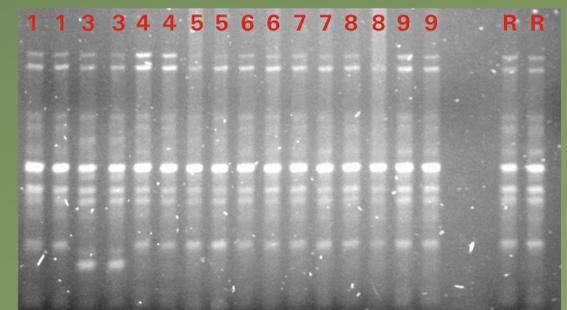


Figura 1 - Produtos de amplificação RAPD obtidos com o primer OP H18 em gel de agarose 1,2% com amostras de plântulas da var. Rosinha da avaliação 2004. Amostras analisadas em duplicatas.

## CONCLUSÃO

1 - Não há um padrão repetido entre as amostras analisadas;

2 - Todas as plântulas vigorosas analisadas em 2002 e 2003 tiveram origem zigótica sendo que ocorreu um percentual de 10% de plântulas duvidosas. Na amostra de 2004 foi observada uma maioria de plântulas vigorosas de origem nucelar;

3 - Marcadores RAPD podem ser utilizados como ferramenta diagnóstica para a identificação da origem zigótica ou nucelar de plântulas em sementes poliembrionicas porém, reações em duplicata e primers mais reprodutíveis devem ser utilizados para aumentar a acurácia da identificação;

4- A presença de plântulas vigorosas de origem zigótica pode ser explicada por um provável efeito heterótico do cruzamento entre a planta de Rosinha utilizada e as outras plantas vizinhas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anuário Brasileiro de Frutas. Brasil. p.p.30-31, 2004

Doyle, J.J. & Doyle, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12: 13-15, 1990.

CORDEIRO, M.C.R.; PINTO, A.C.Q.; VARGAS, V.H.R.; FRAGA, L.M.S.; FALEIRO, F.G.; NETO, J.; NETO, J.D. & LOPES, G.K.B. Utilização do RAPD para selecionar plântulas em porta-enxertos de mangueira para a propagação por enxertia. Santa Catarina, Caderno eletrônico do XVIII Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2004

CORDEIRO, M.C.R.; FALEIRO, F.G.; FRAGA, L.M.S.; PINTO, A.C.Q. & RAMOS, V.H.V. Identificação de Embriões Zigótico e Nucelar em Sementes Poliembrionicas de Manga (*Mangifera indica*, L.), Porto Seguro, Caderno eletrônico do II Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2003 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. Planaltina: Embrapa Cerrados, (Comunicado Técnico No.92) 6p, 2003

NOVY, R.G.; KOBAK, J.; GOFFREDA, J. & VORSA, N. RAPDs identify varietal misclassification and regional divergence in cranberry (*Vaccinium macrocarpon* (Ait.) Pursh). Theor. Appl. Genet., USA, v. 88, p. 1004-1010, 1994

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. . Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research, USA, 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, USA, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T., New York., 1989