



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**  
**CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Marcadores moleculares em alface**  
**(*Lactuca sativa* L., vr. Uberlândia 10.000)**

**Andreia Lelis Pena**

Monografia apresentada à Coordenação do Curso  
de Ciências Biológicas da Universidade Federal  
de Uberlândia para obtenção do grau de Bacharel  
em Ciências Biológicas.

**Uberlândia – MG**  
**Dezembro - 1999**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**  
**CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Marcadores moleculares em alface**  
**(*Lactuca sativa* L., vr. Uberlândia 10.000)**

**Andreia Lelis Pena**

**Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr**  
(Orientador)

Monografia apresentada à Coordenação do Curso  
de Ciências Biológicas da Universidade Federal  
de Uberlândia para obtenção do grau de Bacharel  
em Ciências Biológicas.

**Uberlândia – MG**  
**Dezembro - 1999**

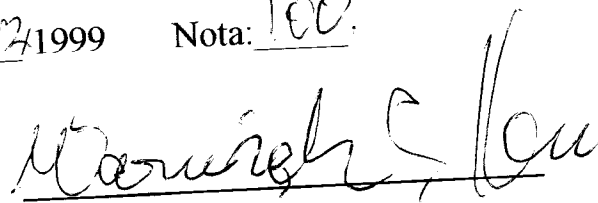


**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**  
**CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Marcadores moleculares em alface**  
**(*Lactuca sativa* L., vr. Uberlândia 10.000)**

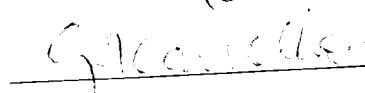
**Andreia Lelis Pena**

Aprovada pela banca examinadora em 13/12 1999 Nota: 100.



Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr

(Orientador)



MSc. Gislene Almeida Carvalho

(Co - Orientadora)



MSc. Soraya Matos de Vasconcelos

(Co - Orientadora)

Uberlândia, 03 de dezembro de 1999

Aos meus pais  
Rita e Antonio

“O temor do Senhor é o princípio da sabedoria,  
revelam prudência todos os que praticam.” (Sl 111:10)

## Agradecimentos

A Deus, nosso Pai, que sempre esteve presente ajudando-me em todos os momentos difíceis e comemorando os momentos de alegrias e conquistas.

Tenho muito a agradecer à todos que de alguma maneira contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Meus pais, Antonio e Rita, meus irmãos Adriano e Adelino, minha cunhada Beth, minha sobrinha e afilhada Adrianny aos quais, palavras jamais seriam suficientes para agradecer, pois nunca mediram esforços para que eu pudesse concluir meu curso. Sempre de braços abertos e com um sorriso no rosto esperando a oportunidade de estarmos juntos novamente.

Ao meu orientador Dr. Warwick Estevam Kerr pelo exemplo de vida e incentivo ao meu trabalho.

Às minhas co-orientadoras Gislene Almeida Carvalho e Soraya Matos de Vasconcelos por tudo que me ensinaram, pela paciência ao ler e discutir meus projetos de pesquisa, trabalhos científicos e esta monografia.

Aos amigos de sempre Leonardo, Cássia, Leonardo Jr., Lucas e Tássia pelo carinho e compreensão.

Aos amigos do Laboratório de Genética e todos os demais fica a gratidão pelos conselhos e presteza em sempre esclarecer minhas dúvidas: Dalcio Rodrigues, Alessandra Rocha, Vania Nascimento, Rosana Oliveira, Katiere Soares, Marcos Marcolino, Vanessa Spini, Ana Paula Campos, Cícero Donizete, Brunno Ribeiro, Viviane Brandão, Cristinas Lima e Soares, Jairo Mata, Juliana Côbo, Anastassios Theodoropoulos, Frederico Ferreira.

A professora Vera Brites que, além de professora, tornou-se uma grande amiga.

Ao Alexandre Coletto e a Gislene Carvalho fica o agradecimento pelas fotografias, as quais ilustram esta monografia.

Aos professores do curso de Ciências Biológicas que de alguma maneira contribuíram para minha formação profissional.

Ao Sr. Paulo Roberto Moderno pelo preparo dos canteiros e irrigação das alfaves.

# Sumário

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 - INTRODUÇÃO</b>  | <b>1</b>  |
| 1-1 OBJETIVO   | 6         |
| <b>2 - MATERIAL E MÉTODOS</b>  | <b>7</b>  |
| 2.1 - MATERIAL BIOLÓGICO   | 8         |
| 2.2 - EXTRAÇÃO DE DNA  | 9         |
| 2.3 - QUANTIFICAÇÃO E QUALIFICAÇÃO DO DNA  | 10        |
| 2.4 - "BULKS"  | 10        |
| 2.5 - AMPLIFICAÇÃO DO DNA VIA PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) UTILIZANDO A<br>TÉCNICA RAPD | 11        |
| 2.6 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE   | 12        |
| 2.7 - ANÁLISE ESTATÍSTICA  | 13        |
| <b>3-RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>  | <b>14</b> |
| <b>4-CONCLUSÃO</b>   | <b>19</b> |
| <b>5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>  | <b>20</b> |

## Resumo

A alface (*Lactuca* sp) não se destacava como fonte de vitamina A até o momento em que a variedade Uberlândia 10.000 foi selecionada por Kerr e colaboradores (inf. pessoal) a partir do cruzamento entre as variedades Moreninha de Uberlândia e Vitória de Santo Antão e seus F1 até F8 selecionados para alto teor de vitamina A e características olerícolas. Esta alface recebeu tal denominação por possuir 10.000 unidades de vitamina A por 100 gramas de folha. Considerando a importância de tal característica, surgiu a necessidade de se encontrar marcadores moleculares para a referida variedade. Para isso fez-se a extração de DNA utilizando o protocolo de FERREIRA & GRATTAPAGLIA (1996) com pequenas modificações. A técnica do DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD- "Random Amplified Polymorphic DNA") foi utilizada para buscar tais marcadores, os quais permitem verificar as relações filogenéticas entre diferentes espécies e cultivares, como também a estrutura e diversidade para construção de mapas genéticos e localização de genes de interesse econômico. Foram testados 38 "primers" de sequência aleatória (Op. Tech.) dentre os quais, sete produziram bons produtos amplificados dos "bulks" das cultivares testadas (Babá de Verão, Salad Bowl, Black Seeded Simpson, Aurélia e Uberlândia 10.000). Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose. A divergência entre as cultivares foi verificada pela análise de UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Average) sendo que os resultados revelaram que quatro "primers" mostraram ser marcadores exclusivos para a variedade Uberlândia 10.000 e analisando-se os 7 "primers" em conjunto observa-se uma diferença de 18,8% entre a variedade Uberlândia 10.000 e as variedades testadas.



## 1 - INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L. 1754) pertence à divisão Anthophyta, classe Dicotyledoneae, família Asteraceae (RYDER e WHITAKER, 1990 *apud* SANTOS, 1996). As diversas cultivares de alface estão agrupadas em cinco tipos, sendo eles: 1) de cabeça crespa; 2) de cabeça lisa; 3) romana (de cabeça fofa e alongada); 4) de folha (não forma cabeça) e, 5) de caule (sem valor comercial) (CAMARGO, 1992).

A temperatura ideal para o cultivo de cultivares de alface não tropicais varia entre 7<sup>o</sup>C e 24<sup>o</sup>C. Estes valores predominam durante o período de inverno, portanto a alface é considerada uma hortaliça de inverno (CAMARGO, 1992) característica esta perfeitamente alterável com o avanço das técnicas de melhoramento genético.

A alface (*Lactuca sativa*) possui vitaminas A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, e C, além de sais de cálcio e ferro. PRANCE (1986) não a considera uma hortaliça de destaque como fonte de vitaminas e sais minerais; porém BALBACH (1995) cita que em 100 gramas de alface, com coloração de folha verde escuro podemos encontrar 4.500 unidades internacionais de vitamina A (quanto mais escuro o verde, maior a quantidade de vitamina A).

Em vegetais, a vitamina A é encontrada sob a forma de beta- carotenos (pigmentos que absorvem luz), considerados *pró-vitaminas*. Estes beta-carotenos são enzimaticamente convertidos pelo fígado em vitamina A. A única

via metabólica conhecida para utilização da vitamina A, em humanos, é a formação dos pigmentos visuais da retina. Na formação de retinol há um precursor chamado de *trans-retinol* que é uma forma de vitamina A (GUYTON, 1992).

Problemas em função da deficiência em vitamina A são comumente relatados, sendo a cegueira noturna o mais conhecido popularmente. A carência desta vitamina prejudica o crescimento normal da maioria das células do organismo, principalmente o crescimento e proliferação das células epiteliais; que se tornam estratificadas e queratinizadas. Os problemas associados à reprodução devem-se especialmente a atrofia do epitélio germinativo dos testículos e a interrupção sexual do ciclo feminino (GUYTON, 1992). Esta vitamina confere, ainda, elementos de defesa ao nosso organismo evitando infecções, sendo considerada como anti-infecciosa.

Nossa alimentação diária precisa ser composta em média por 5.000 U.I. de vitamina A para que ocorra um bom funcionamento do organismo. No entanto, a alimentação humana no Brasil é pobre em diversidade de espécies vegetais consumidas.

Considerando estas duas realidades, pequena variedade de espécies disponíveis para a alimentação e a carência vitamínica no Brasil (KERR *et al.*, 1986), KERR e colaboradores, desde de 1981, vem desenvolvendo pesquisas em melhoramento genético de hortaliças ricas em vitamina A. Dentre elas, foi obtida a variedade de alface Uberlândia 10.000 (Fig. 1), a partir do cruzamento das cultivares Moreninha de Uberlândia (pai) com Vitória de Santo Antão (mãe). A Uberlândia 10.000 recebeu tal denominação, dentre outros fatores, por possuir 10.000 unidades internacionais de vitamina A. Considerando a importância de tal característica surgiu a necessidade de se encontrar marcadores moleculares para a referida variedade.

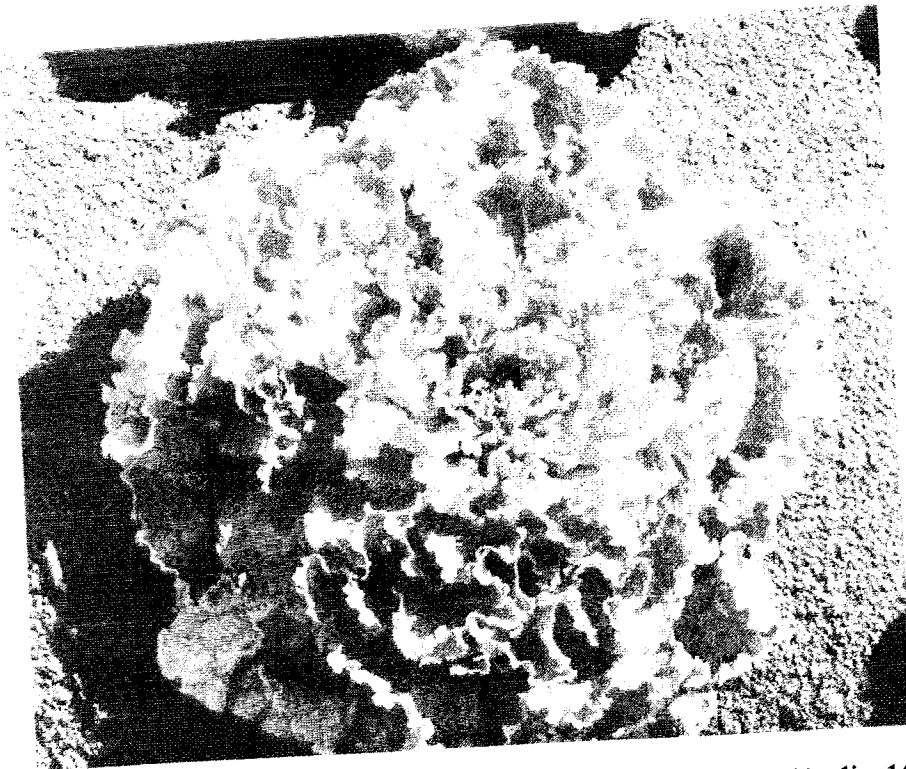


Figura 1 – Variedade de alface (*Lactuca sativa* L.) Uberlândia 10.000

Entende-se por marcador molecular um segmento específico de DNA, relacionado a qualquer fenótipo molecular. “Ao verificar a segregação de acordo com as leis básicas de herança mendeliana, um marcador molecular é adicionalmente definido como marcador genético” (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996).

Testes RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) têm sido utilizados na avaliação de variação genética, obtenção de “fingerprints” genômicos de indivíduos, cultivares e populações. Relações filogenéticas podem ser estabelecidas entre diferentes espécies, além de permitirem a construção de mapas genéticos e a localização de genes de interesse econômico (KAZAN *et al.*, 1993).

Mapas de ligação detalhados são importantes instrumentos para estudos de seleção, identificação e organização de genomas de plantas, sendo estes obtidos com certa facilidade por meio de marcadores RAPD (LANDRY *et*

al.,1987).

A base genética dos marcadores RAPD está na utilização de um “primer” único com seqüência arbitrária, portanto, a sua seqüência alvo é desconhecida, porém frequentemente muito polimórfica. Tais marcadores comportam-se como marcadores genéticos dominantes, devido à falta de sensibilidade quantitativa. A análise do gel não nos permite diferenciar o indivíduo heterozigoto (Aa), que possui um “alelo” (A) que é amplificado, e o outro (a) que não o é, do indivíduo homozigoto (AA) onde ambos os “alelos” servirão de molde para a amplificação e; portanto, deveria apresentar o dobro de produto amplificado. O genótipo homozigoto recessivo (aa) é identificado pela ausência da banda no gel, os genótipos homozigoto dominante (AA) e heterozigoto (Aa) pela presença da mesma, o que os inclui em uma mesma classe fenotípica (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996).

O comportamento codominante dos marcadores RAPD pode ser verificado em 3 a 5% destes. Em um estudo para diferenciação de linhagens de soja, foram realizados testes RAPD de duas cultivares e do híbrido obtido a partir do cruzamento das mesmas. Na comparação das seqüências das bandas heteromórficas entre os genitores e que formaram um heteroduplex no híbrido, verificou-se que essas bandas apresentaram homologia entre si, diferindo em pequenas regiões de inserção ou deleção (CORRÊA *et al.*, 1998).

A utilização de “primers” com seqüência arbitrária de nucleotídeos foi um grande avanço da técnica RAPD (CHALMERS *et al.*,1992). Outras vantagens da técnica são: uma enorme quantidade de “primers” que podem ser utilizados para análise genômica de uma grande variedade de espécies e sem necessidade de clonagem prévia de sondas de DNA, o que significa economia de tempo e recursos financeiros (WILLIANS *et al.*, 1990).

Variações mínimas nas concentrações dos reagentes utilizados para execução dos ensaios podem provocar alterações no perfil do produto

amplificado. A redução da quantidade de *Taq* DNA polimerase bem como da concentração de DNA causam redução no número de produtos amplificados (KHANDKA *et al.*, 1997). Devido à estas possibilidades de alterações, faz-se necessário um rigoroso controle das condições para que a repetibilidade do teste seja garantida.

A técnica de RAPD foi utilizada por COLOMBO *et al.* (1998) para investigar diversidade genética de trinta e um clones de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). As descrições botânicas não foram suficientes para diferenciar treze pares de cultivares comparadas duas-a-duas, enquanto por marcadores RAPD apenas um par não foi diferenciado. Estes resultados revelaram o poder dos marcadores RAPD no estudo da diversidade genética, identificação de duplicações, bem como confirmar ou refutar uma correlação. Esta tecnologia tem sido amplamente aplicada objetivando a obtenção de “impressões digitais” de uma ampla gama de culturas, dentre elas arroz, café, papaia, maçã e algodão.

A aplicação de técnicas moleculares para análises de populações pode ter seu custo reduzido por meio da utilização de “bulks”, onde 5 a 15 reações são substituídas por uma única. Entende-se por “bulk” o conjunto de DNA de vários indivíduos representados numa única amostragem.

Na utilização de “bulks” é importante igualar a concentração dos DNAs moldes a serem analisados. As bandas amplificadas são diretamente proporcionais a quantidade de cada DNA utilizado no “bulk”. Quando o objetivo é a detecção de polimorfismos, o “bulk” pode produzir falsos resultados, se houver variações nas concentrações do DNA dos diferentes indivíduos, devido a competição do molde por “primer” (WILLIAMS, *et al.*).

## 1-1 Objetivo

O presente trabalho teve por objetivo identificar marcadores moleculares (RAPD- “Random Amplified Polymorphic DNA”) para a variedade de alface Uberlândia 10.000, em comparação com outras quatro cultivares comerciais: “Black Seeded Simpson”, Babá de Verão, Mimosa (conhecida como “Salad Bowl”) e Aurélia (Fig. 2).

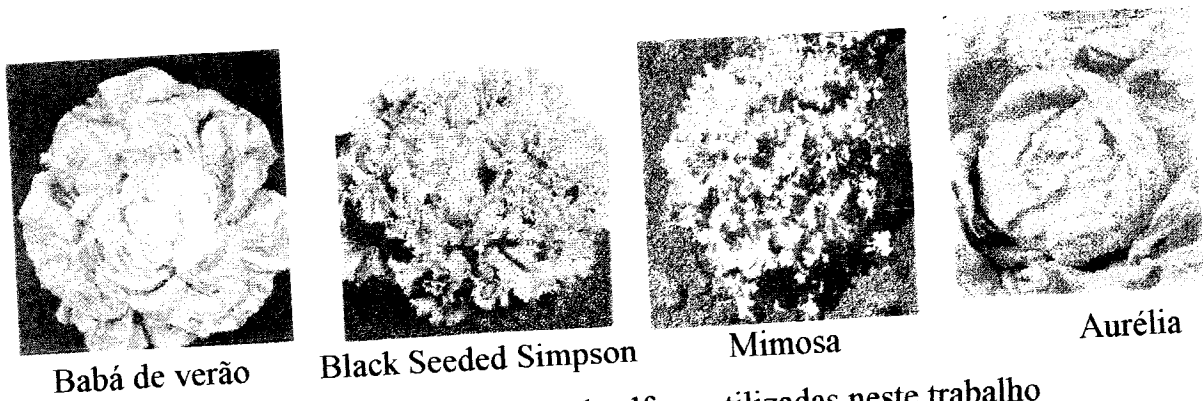


Figura 2 – Cultivares comerciais de alface utilizadas neste trabalho

## **2 - MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos de análise molecular foram realizados no Laboratório de Genética do Departamento de Genética e Bioquímica, enquanto os de campo foram conduzidos em Casa de Vegetação e na Área Experimental (Fig. 3), ambas da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama.



Figura 3 – Vista geral da Área Experimental localizada no Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, destacando-se o primeiro canteiro com todas as cultivares de alface utilizadas no experimento.

## 2.1 - Material biológico

Primeiramente foi realizado o plantio de cada variedade, sendo semeadas em bandejas de isopor (Fig. 4) com 200 células de 3,5 x 3,5 cm, preenchidas com substrato vegetal (vermiculita expandida e material orgânico vegetal), à aproximadamente 2 mm de profundidade, em julho de 1999.



Figura 4 – Bandeja utilizada para semeadura das cultivares de alface.

Trinta dias após a semeadura, doze mudas de cada variedade comercial testada e trinta mudas da Uberlândia 10.000 foram transferidas para um canteiro (10m x 60cm) previamente preparados na Área Experimental.

Para extração do DNA, as amostras constituíram-se de folhas jovens (30-60 dias) de alface (*Lactuca sativa* L vr. Uberlândia 10.000). As amostras foram imediatamente levadas ao laboratório, sendo rigorosamente lavadas em água corrente, enxaguadas em água destilada e devidamente secas por papel toalha.



## 2.2 - Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada segundo o protocolo de FERREIRA e GRATTAPAGLIA (1996) com algumas modificações.

As folhas jovens de alface (*Lactuca sativa*) que foram coletadas e previamente lavadas, foram pesadas e separadas em microtubos (1,5 ml) em porções de 150mg. As amostras foram maceradas na presença de nitrogênio líquido, com auxílio de pistões de PVC de tamanho adequado ao microtubo. Adicionou-se 900µl de tampão de extração (2% de PVP-10-polivinilpirrolidone, NaCl 500mM, 100mM de Tris-HCl pH 8,0, 50mM de EDTA, 2% de CTAB e 0,2% de 2-Mercaptoetanol) e 900µl de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1). A solução foi incubada em temperatura ambiente por 5 minutos com suaves inversões. Procedeu-se a centrifugação por 10 minutos a 8.000 rpm sendo o sobrenadante transferido para outro microtubo. Adicionou-se 10µl RNase (10mg/ml) e a solução foi incubada por uma hora, em banho maria, a 37°C, com elevação da temperatura a 65 °C por 15 minutos. Após o período de incubação acrescentou-se igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e a solução foi agitada com suaves inversões por aproximadamente 5 minutos. Procedeu-se nova centrifugação por 10 minutos a 8.000rpm. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo e o último procedimento repetido. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo onde o DNA foi precipitado com isopropanol gelado (2/3 do volume total) e acetato de sódio 3M (1:10). Em seguida centrifugada a 13.000 rpm por 5 minutos, sendo o sobrenadante descartado. O “pellet” (DNA) foi lavado com etanol 70% e seco em estufa a 37°C por duas horas, aproximadamente; ou em bomba de vácuo por pelo menos 24 horas. O “pellet” seco foi ressuscitado em 100µl de TE (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1mM - pH 8,0) e, quando necessário, aquecido a 65°C para a total dissolução do mesmo. Em seguida as amostras de DNA foram armazenadas em

freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3 - Quantificação e qualificação do DNA

O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro, modelo GBC-UV/VIS911A, por leitura de absorvância (260nm). O cálculo da concentração de DNA feito a partir da seguinte fórmula:

$$[\text{DNA}] = \text{ABS}(260\text{nm}) \times \text{fc} \times \text{fd},$$

Onde:

**[DNA]**- concentração de DNA em ng/ $\mu\text{l}$

**ABS(260)**- leitura da absorvância do DNA, a 260nm

**fc**- fator de conversão da cubeta (50)

**fd**- fator de diluição da amostra (10 $\mu\text{l}$  de amostra em 990 $\mu\text{l}$  de água destilada ou TE)

A qualificação do DNA foi obtida por eletroforese, utilizando-se gel de agarose 0,8%. Uma vez quantificada e avaliada, a amostra foi diluída em TE (10mM Tris-HCl e 1mM EDTA pH 8,0) para a concentração de trabalho de 10ng/ $\mu\text{l}$ , a qual foi mantida em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.4 – “Bulks”

Os “bulks” utilizados neste experimento foram obtidos a partir da mistura de quantidades equivalentes de DNA de cinco indivíduos. A concentração final na solução de trabalho foi de 10 ng/ $\mu\text{l}$  de DNA (cada indivíduo contribuindo com 2ng/ $\mu\text{l}$ ). As concentrações foram iguais para evitar a competição entre os moldes dos diferentes indivíduos, evitando assim falsos positivos.

## 2.5 - Amplificação do DNA via PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizando a técnica RAPD

A reação de PCR foi caracterizada por três etapas, que aconteceram de forma cíclica, obedecendo a seguinte sequência: a) desnaturação da dupla fita de DNA, b) anelamento dos “primers” e c) extensão dos “primers”. A desnaturação do DNA acontece à 94 °C, em seguida a temperatura foi reduzida a 40 °C para que o anelamento dos “primers” se tornasse possível, por fim a temperatura alcançou os 72 °C quando ocorreu a extensão das fitas de DNA. Estas três etapas foram repetidas por 35 vezes, sendo que os dois primeiros ciclos foram realizados num tempo maior para cada etapa (para aumentar o número de fitas moldes de DNA) e os demais 33 ciclos se processaram conforme os passos especificados na Tabela I.

Tabela I - Tempo e temperatura de desnaturação, anelamento e extensão do DNA via PCR, utilizando a técnica RAPD.

|             | Desnaturação |       | Anelamento |       | Extensão |       |
|-------------|--------------|-------|------------|-------|----------|-------|
|             | Tempo        | Temp. | Tempo      | Temp. | Tempo    | Temp. |
| Ciclos 1-2  | 1min.        | 94 °C | 1min.      | 37 °C | 2min.    | 72 °C |
| Ciclos 3-35 | 10Seg.       | 94 °C | 20Seg.     | 40 °C | 2min.    | 72 °C |

Concluída a sequência de 35 ciclos o termociclador manteve-se a temperatura de 72 °C por cinco minutos. Decorrido este tempo a temperatura caiu a 4 °C, quando a reação pode ser retirada do termociclador e aplicada em

gel de agarose para a observação dos resultados. O termociclador utilizado na amplificação foi o PTC – 100, MJ. Research, Inc.

A reação de PCR utilizando a técnica de RAPD, foi otimizada, obedecendo as seguintes concentrações dos reagentes: 400 $\mu$ M de dNTPs (Pharmacia), 3,0mM de MgCl<sub>2</sub> (Pharmacia), 1,5 unidades de *Taq* DNA polimerase (UFMG), tampão da *Taq* DNA polimerase 1X (UFMG), 10 pmol de “primers” (Op. Tech.), BSA (10mg/ml) (1:20) e água ultrapura até completar o volume de 18  $\mu$ l.

Inicialmente foram testados 38 “primers” em um indivíduo da Uberlândia 10.000 e da Black Seeded Simpson: 36 “primers” curtos (Operon Technologies) e 2 “primers” longos. A partir deste resultado foi feita uma seleção prévia onde apenas os “primers” que revelaram bom padrão de amplificação entre os indivíduos testados foram repetidos nos demais.

Os “primers” longos foram sintetizados pela “Macromolecular Resources” e foram utilizados neste trabalho por apresentarem bons resultados de amplificação tanto em suínos quanto em abelhas, mostrando uma tendência de amplificação universal.

## 2.6 - Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo e submetido a corrida eletroforética (150V) com tampão TBE 0,5X (0,23M Tris-HCl, 0,5M EDTA pH 8,0 e 0,23M Ácido bórico), foi utilizado um marcador de 100pb (Gibco) . O tempo de corrida foi de aproximadamente duas horas. Após este tempo, o resultado foi visualizado em transluminador de luz ultravioleta, e fotografado em Image Master-VDS (Pharmacia Biotech).

## **2.7 - Análise estatística**

O programa utilizado para análise estatística foi o STAT 4.5, e a distância entre os grupos dada pela análise UPGMA (Unweighted Pair-Group method using Arithmetic Average --Método de Pareamento de Grupos usando Média Aritmética Não Ponderada).

### 3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a extração do DNA total de folhas de alface foram testados quatro protocolos sendo eles: “protocolo de extração de DNA de abacaxi” (PEREIRA, informação pessoal), “protocolo de extração de DNA de feijoeiro para amplificação via PCR (GOULART-FILHO, informação pessoal), “protocolo de extração de DNA de tecidos” (GOULART-FILHO, informação pessoal) e “extração de DNA genômico total de plantas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996), sendo o último o que apresentou melhor resultado com as seguintes alterações:

- ↳ foram utilizados 900µl de tampão de extração, ao qual foi acrescentado PVP 2%, para cada amostra;
- ↳ logo após ter sido adicionado o tampão de extração, acrescentou-se 900µl de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1);
- ↳ a solução anterior foi incubada por apenas 5 minutos em temperatura ambiente;
- ↳ o tempo e velocidade de centrifugação para extração de proteínas com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) foi de 10 minutos a 8.000rpm e para precipitar o DNA 5 minutos a 13.000rpm;
- ↳ Foi incluído o passo de tratamento com 10µl de RNase (10mg/ml).

Um componente fundamental para melhoria da definição dos produtos amplificados foi a BSA (soro albumina bovina- 10mg/ml) (1:20) a qual atua

estabilizando a *Taq* DNA polimerase.

Nas reações de amplificação foram analisados 38 “primers”, sendo que sete apresentaram melhor resolução no padrão de bandas e amplificações eficientes para todos os “bulks” analisados. As reações de amplificação foram devidamente otimizadas para que a repetição não se fizesse necessária. Dentre os “primers” escolhidos, quatro apresentaram bandas polimórficas.

Os sete “primers” com seus respectivos tamanhos e números de bandas amplificadas estão na tabela-II. O número, tamanho, presença ou ausência das bandas polimórficas nas cultivares analisadas está representado na tabela-III.

Tabela II - Número e tamanho das bandas avaliadas em cada “primer”.

| <b>“Primers”</b> | <b>Bandas totais</b> | <b>Tamanho pb</b> |
|------------------|----------------------|-------------------|
| ALP01            | 12                   | 550-2100          |
| ALP02            | 12                   | 400-1400          |
| ALP03            | 12                   | 200-1500          |
| ALP04            | 11                   | 220-1500          |
| ALP05            | 7                    | 320-900           |
| ALP06            | 8                    | 400-900           |
| ALP07*           | 2                    | 650-750           |

\* - “Primer” longo

Tabela III - Número, tamanho, presença ou ausência das bandas polimórficas nas cultivares comerciais analisadas e na Uberlândia 10.000

| “Primers” | Bandas polimórficas | Tamanho pb      | Uberlândia 10.000 | Cultivares comerciais |
|-----------|---------------------|-----------------|-------------------|-----------------------|
| ALP01     | 3                   | 750, 1050, 1100 | Presentes         | Ausentes              |
| ALP03     | 1                   | 500             | Ausente           | Presente              |
| ALP04     | 2                   | 220, 700        | Presente          | Ausente               |
| ALP06     | 2                   | 620, 780        | Presente          | Ausente               |

A partir do padrão de bandas encontrado nos géis (Fig. 5) foi construída uma matriz binária para ser submetida ao programa STAT.

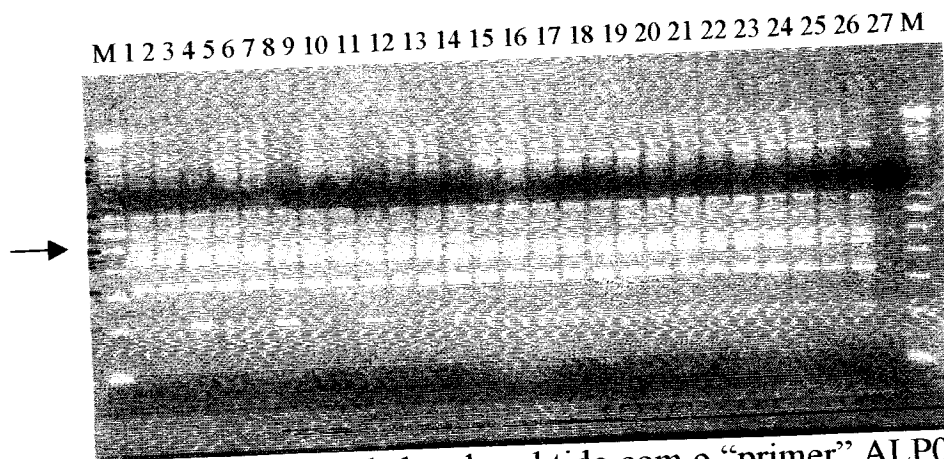


Figura 5- Padrão de bandas obtido com o “primer” ALP03.

- 1 – 3 ⇒ Black seeded simpson
- 4 – 6 ⇒ Aurélia
- 6 – 9 ⇒ Mimosa
- 10 – 12 ⇒ Babá de verão
- 13 – 26 ⇒ Uberlândia 10.000
- 27 ⇒ Branco (controle)
- M ⇒ Marcador 100pb (Gibco)
- ⇒ Banda polimórfica



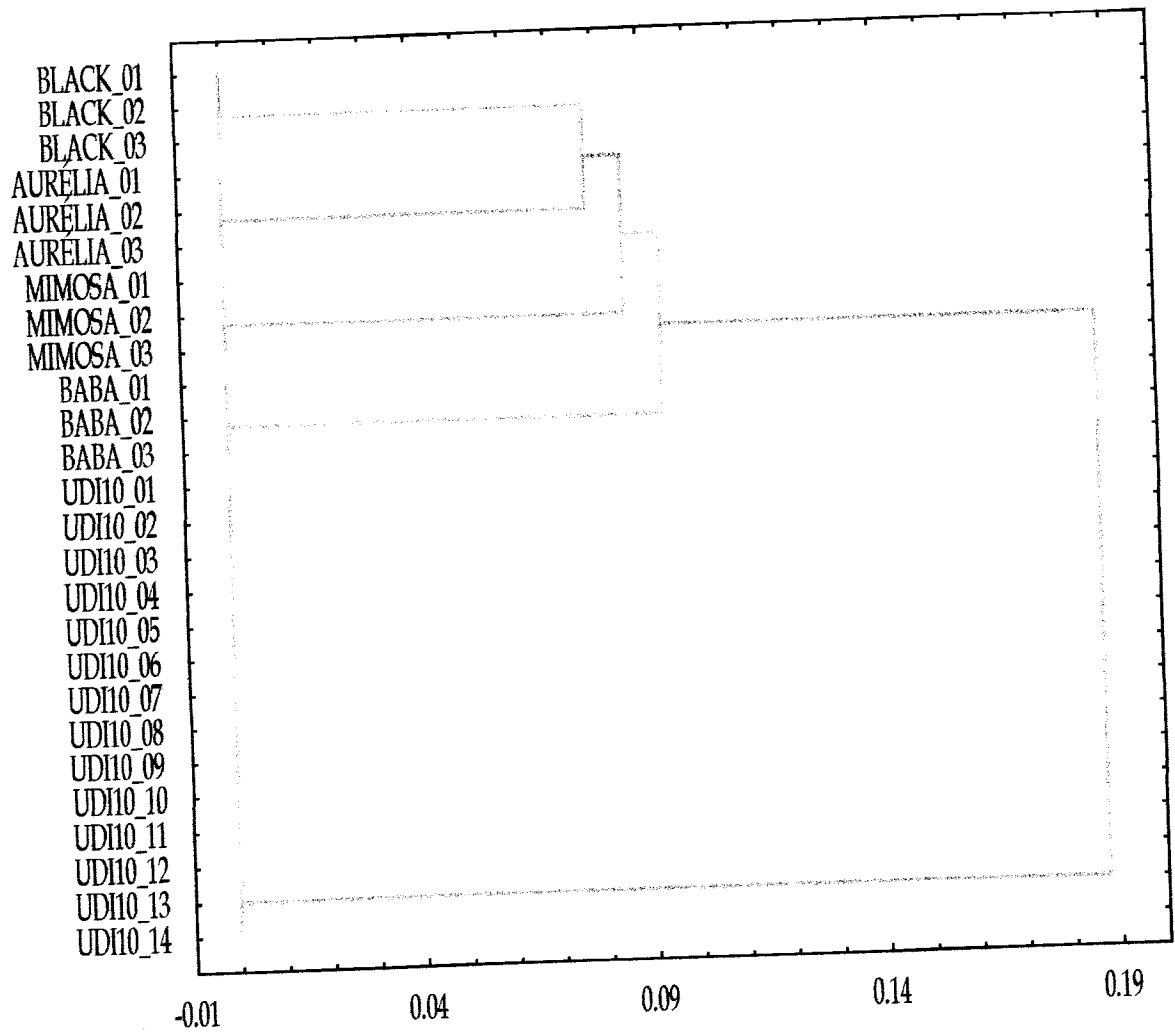
A análise estatística utilizando os sete “primers” separou as cinco cultivares analisadas em dois grupos no limite de divergência de 18,8% (Fig.6). O grupo 1 formado pelas cultivares comerciais “Black Seeded Simpson”, “Babá de Verão”, “Mimosa” e “Aurélia”. O grupo 2 é composto pela “Uberlândia 10.000”.

O grupo 1 separa-se em dois subgrupos, A e B, no limite de 8,6% de divergência. Foram colocadas no subgrupo A as cultivares “Mimosa”, “Black Seeded Simpson” e a “Aurélia” e no subgrupo B a variedade “Babá de Verão”. O subgrupo A apresentou uma nova divisão no limite de divergência de 7,9% separando a “Babá de Verão” da “Aurélia” e da “Black Seeded Simpson”.

Esta separação entre a variedade “Uberlândia 10.000” e as outras quatro é considerada satisfatória para o objetivo proposto e pode indicar uma possível correlação com a quantidade de vitamina A produzida pelas mesmas já que a “Uberlândia 10.000” produz cerca de 10.000 UI enquanto que as demais variam de 350 a 4.500 UI. Isso implica em maiores estudos tanto dos genes envolvidos nesta característica como dos próprios marcadores encontrados.

Dentre os “bulks” de uma mesma variedade não houve divergência, indicando uma provável homogeneidade genética. A homogeneidade genética destas cultivares pode ser devido ao procedimento comum das mesmas serem selecionadas em gerações avançadas onde a segregação praticamente não é encontrada.

### Distância Genética entre variedades de alface usando marcadores RAPD



**Primers: ALP 01, ALP 02, ALP 03, ALP 04, ALP 05, ALP 06, ALP 07**

Figura 6 – Dendrograma das distâncias genéticas entre as cultivares de alface com base em marcadores RAPD.

#### **4-CONCLUSÃO**

Foram encontrados quatro prováveis marcadores RAPD para a variedade de alface Uberlândia 10.000 (*Lactuca sativa*). No entanto, faz-se necessário a análise de gerações futuras dos indivíduos testados para comprovar a existência de tais marcadores.

## 5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALBACH, A. 1995. **As hortaliças na medicina doméstica**. 26<sup>a</sup> ed, Edições Vida Plena, São Paulo, 407pp.
- CAMARGO, L. S. 1992. **As hortaliças e seu cultivo**. 3<sup>a</sup> ed., Fundação Cargil. Campinas, São Paulo, 252pp.
- CHALMERS, K. J.; WAUGH, R.; SPRENT, J. I.; SIMONS, A. J.; POWELL, W. 1992. Detection of genetic variation between and within populations of *Glicirida sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. **Heredity** **69**: 465-472.
- COLOMBO, C.; SECOND, G.; VALLE, T. L. e CHARRIER, A. 1998. Genetic diversity characterization of cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz). I) RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology** **21** (1): 105-113.
- CORRÊA, R. X., MOREIRA, M. A. e BARROS, E. G. 1998. Caracterização de marcadores RAPD codominantes e identificação de heterozigotos. **Genetics and Molecular Biology** **21** (3): 196.
- FERREIRA, M. E. e GRATTAPAGLIA, D. 1996. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2<sup>a</sup> ed., Embrapa, Brasília, 220pp.
- GUYTON, A. C. 1992. **Tratado de fisiologia médica**. 8<sup>a</sup> ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 864pp.

- KHANDKA, D. K.; TUNA, M.; TAL, M.; NEJIDAT, A.; GOLAN-GOLDHIRSH, A. 1997. Variability in the pattern of random amplified polymorphic DNA. **Electrophoresis** **18**: 2852-2856.
- KAZAN, K.; MANNERS, J. M. e CAMERON, D.F. 1993. Genetic relationships and variation in the *Stylosathes guianensis* species complex assessed by random amplified polymorphic DNA. **Genome** **36**: 43-49.
- KERR, W. E.; CAMPOS, F. J. e BARROS, M. J. B. 1986. Notas sobre os recursos naturais da horticultura da Amazônia. **1º Simpósio do Trópico Úmido, Vol VI**: 451-456.
- LANDRY, B. S.; KESSELI, R. V.; FARRARA, B. e MICHELMORE, W. 1987. A genetic map of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with Restriction Fragment Length Polymorphism, isozyme, disease resistance and morphological markers. **Genetics** **116**: 331-337.
- PRANCE, G. T. 1986. **Manual de Botânica Econômica do Maranhão**. Ed. Gráfica Universitária, Maranhão, 254pp.
- SANTOS, C. A. P. 1996. Melhoramento de alfaces ricas em vitamina A. **Tese de mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, MG**. 84pp.
- WILLIAMS, J.G.K.; HANAFEY, M. K.; RAFALSKI, J. A. e TINGEEY, S. V. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in enzymology**.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A. e TINGEEY, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research** **18(22)**: 6531-6535.