

## SELEÇÃO DE INICIADORES PARA ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Fimbristylis miliacea* UTILIZANDO A TÉCNICA RAPD

Lilian Gonçalves Ribeiro Urbinati<sup>(1)</sup>, Marina Juliana Batista<sup>(1)</sup>, Maycon Eduardo Nicoletti<sup>(2)</sup>, José Alberto Noldin<sup>(3)</sup>, Fernando Adami Tcacenco<sup>(4)</sup>. <sup>1</sup>Graduandas em Ciências Biológicas, Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), Rua Uruguai, 458, CEP 88302-202, Itajaí, SC; Bolsistas de Pesquisa do Artigo 170/UNIVALI/Governo de Santa Catarina. Email: urbinati@univali.br. <sup>2</sup>Biólogo, Bacharel, Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Epagri – Estação Experimental de Itajaí. <sup>3</sup>Eng. Agr., Ph. D., Epagri – Estação Experimental de Itajaí. <sup>4</sup>Eng. Agr., Ph. D., Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Epagri – Estação Experimental de Itajaí.

A orizicultura é uma atividade de grande importância nos países em desenvolvimento, tanto pelo seu valor econômico quanto pela contribuição na dieta alimentar. O aumento da demanda, não compatível com a produção, intensifica a busca por métodos que aumentem a produtividade. As plantas daninhas, em áreas de plantio, afetam diretamente a produtividade, reduzindo-a, devido à competição por água, luz e nutrientes. *Echinochloa* spp, arroz-vermelho (*Oryza sativa* L.), *Sagittaria montevidensis*, *Cyperus difformis* e *Fimbristylis miliacea* estão entre as espécies invasoras que ocorrem com maior frequência nos arrozais de Santa Catarina.

O manejo das plantas daninhas visa a eliminar a população de invasoras, diminuindo assim as perdas de produção, e o controle químico com herbicidas tornou-se o método mais utilizado devido à praticidade e eficiência. No entanto, o uso intensivo de herbicidas com o mesmo modo de ação pode levar à seleção de indivíduos resistentes, que em uma próxima safra podem se multiplicar e infestar as áreas de cultivo. Noldin *et al.* (1999, 2002 a,b) relataram a ocorrência, em Santa Catarina, de ecótipos de *S. montevidensis*, *C. difformis* e *F. miliacea* resistentes a herbicidas.

A busca por ferramentas que proporcionem avanços no conhecimento sobre os mecanismos de resistência das plantas daninhas é de suma importância para o manejo adequado das populações resistentes. Neste sentido, destaca-se a busca por marcadores genéticos ligados a resistência ou suscetibilidade de ecótipos a um determinado herbicida. O uso de marcadores moleculares é útil para a realização de levantamentos e avaliação de medidas de controle, por meio da ocorrência de determinados marcadores em indivíduos de populações resistentes.

A técnica RAPD-PCR consiste na amplificação de fragmentos de DNA, utilizando iniciadores aleatórios. Lacerda e colaboradores (2002) elucidam que a técnica de RAPD-PCR é indicada para estudos com espécies desconhecidas geneticamente, pois utiliza iniciadores pequenos e aleatórios, sendo uma técnica com grande potencial para detectar polimorfismo genético. Além disso, é de baixo custo, e permite a obtenção rápida de resultados. Esta técnica tem se mostrado eficiente na caracterização de diversas espécies, das quais podemos citar *Pennisetum purpureum* (Daher *et al.*, 2002), *Oryza sativa* (Ferreira *et al.*, 2004), *Eucalyptus sp.* (Ferreira *et al.*, 2005) e *Musa sp.* (Tcacenco *et al.*, 2006).

Para a adequação do protocolo de RAPD, viabilizando ao estudo genético de *Fimbristylis miliacea*, são necessários testes de amplificação com iniciadores aleatórios, na busca daqueles iniciadores que sejam capazes de gerar um nível satisfatório de polimorfismo. O objetivo deste trabalho foi definir iniciadores aplicáveis no estudo de diversidade genética de *F. miliacea*, através da técnica RAPD-PCR.

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Estação Experimental de Itajaí (EEI). Folhas jovens de *F. miliacea* foram coletadas, desinfestadas superficialmente, e processadas em microtubos de 1,5 mL com N líquido para a extração de DNA. O protocolo utilizado para extração de DNA foi baseado em Doyle e Doyle (1990), seguindo testes de protocolos para RAPD-PCR.

As reações de PCR contiveram aproximadamente 25 ng de DNA e PCR-MIX constituído de 2 µL de dNTP (10 mM), 1 U de *Taq* DNA polimerase recombinante, 2,5 µL de PCR buffer (10X), 2,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 5% DMSO, água ultra pura autoclavada, e 5 µL de iniciadores, totalizando um volume final de 25 µL. Foram utilizados cinco iniciadores aleatórios, OP R1, OP R2, OP R7, OP F4 e OP F7, e amostras de DNA de três indivíduos de *F. miliacea*, escolhidos aleatoriamente.

As ampliações foram realizadas em termociclador PTC-100™ (M.J. Research, Inc.), nas seguintes condições: desnaturação inicial de 1 min a 94 °C; 40 ciclos de 1 min a 92 °C, 1 min a 35 °C e 2 min a 72 °C; e extensão final de 5 min a 72 °C. Os fragmentos obtidos foram submetidos a corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE pH 8,4 (Tris 89 mM; ácido bórico 88,9 mM; Na<sub>2</sub>EDTA 2 mM), sob voltagem constante de 70 V durante aproximadamente 150 minutos. O gel foi corado com SYBR® Safe (Invitrogen) e visualizado sob luz ultravioleta.

Observou-se repetibilidade dos resultados entre os indivíduos (Figura 1). Foram observados 29 fragmentos, variando entre aproximadamente 250 pb e 1.800 pb. Houve polimorfismo entre os iniciadores testados, porém não houve diferença genética entre os indivíduos. O iniciador OP R2 foi o mais polimórfico, apresentando 14 fragmentos, variando entre 500 pb a 1500 pb; o iniciador OP R7 apresentou 13 fragmentos, OP F7, nove fragmentos e OP R1, seis fragmentos. O iniciador OP F4 não apresentou boa visualização dos fragmentos amplificados em nenhum dos indivíduos, sendo necessárias otimizações no protocolo de RAPD para este iniciador.

Pela alta amplificabilidade, os iniciadores testados podem ser utilizados em pesquisas futuras visando ao estudo populacional de *F. miliacea*, para a caracterização molecular da espécie, buscando marcadores moleculares associados à resistência a herbicidas.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DAHER R.F.; PEREIRA, M.G.; PEREIRA, A.V.; AMARAL Jr., A.T. Genetic divergence among elephantgrass cultivars assessed by RAPD markers in composit samples. *Scientia Agricola*, v.59, n. 4, p. 623-627, 2002.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v. 12, p.13-15. 1990.
- FERREIRA, A.; PAULI, K.S.; TCACENCO, F.A. Estudos genéticos na conservação de germoplasma de Eucalyptus. In: SIMPOSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA Y EL CARIBE, 5., 2005, Montevideo, Uruguai. **Resúmenes...** Montevideo, Uruguai: Inst. Nac. Invest. Agropec. (INIA) / Fac. Agronomía, Univ. República / Comité Nac. Recurs. Fitogen., 2005. p. 55.
- FERREIRA, A.; TCACENCO, F.A.; NOLDIN, J.A. Caracterização molecular de acessos de arroz-vermelho utilizando a técnica RAPD. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 24., 2004, São Pedro, SP. **Anais...** Londrina, PR: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, 2004.
- LACERDA D.R.; ACEDO D.P.M.; FILHO J.P.L.; LOVATO, M.B. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. *Lundiana*, v. 3, n. 2, p. 87-92, 2002.
- NOLDIN, J.A.; EBEHERDT, D.S.; KNOBLAUCH, R. Resistência à herbicidas em *Sagittaria montevidensis*: primeiras evidências. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 1., 1999, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Embrapa, 1999. p. 566-567.
- NOLDIN, J.A.; EBEHERDT, D.S.; RAMPELOTTI, F.T. *Cyperus difformis* L. resistente a herbicidas inibidores da ALS em Santa Catarina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 23., 2002, Gramado. **Anais...** Londrina: SBPCD, 2002a. p. 198.
- NOLDIN, J.A.; EBEHERDT, D.S.; RAMPELOTTI, F.T. *Fimbristylis miliacea* (L.) Vahl resistente a herbicidas inibidores da ALS em Santa Catarina. In: CONGRESSO

BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 23., 2002, Gramado. **Anais...** Londrina: SBCPD, 2002b. p. 199.  
TCACENCO, F.A.; PAULI, K.S.; NICOLETTI, M.E.; RAMPELOTTI, F.T.; FERREIRA, A.; LICHTENBERG, L.A. Diversidade genética de germoplasma de *Musa* da Epagri usando marcadores RAPD. In: REUNIÃO INTERNACIONAL ACORBAT, 17., 2006, Joinville, Santa Catarina. Brasil. Bananicultura: um negócio sustentável. **Anais...** Itajaí, Santa Catarina: ACORBAT/ACAFRUTA, 2006. v.2., p.464-467.

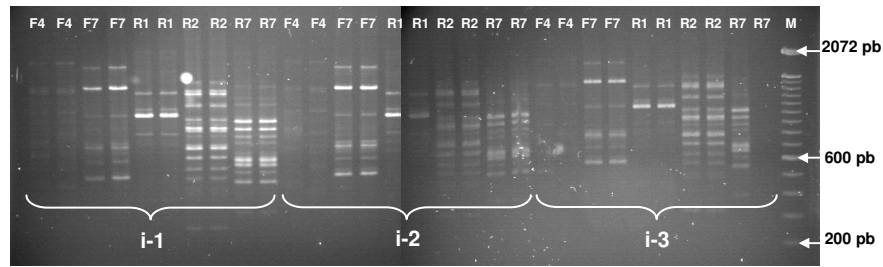


Figura 1. Produtos de amplificação de DNA de *F. moliacea* por RAPD-PCR com diferentes iniciadores. As corridas eletroforéticas foram realizadas em géis de agarose 1,5%, por 150 minutos, corados com SYBR® Safe. F4, F7, R1, R2, R7 = iniciadores. i = indivíduo. M = marcador molecular de 100 pb (Invitrogen®).