

**"DNA FINGERPRINT" EM MAMÃO (*Carica papaya* L.): CLONAGEM
DE MARCAS RAPD EM VETORES pBLUESCRIPT II KS.**

Luisa Brito Paiva

634.651
P149d
MON

UENF - CCT - BIBLIOTECA	
N.º	Data
9837	13/09/05



01615520009837 - CCT
"DNA fingerprint" em mamão (Ca
634.651 P149d MON

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MARÇO de 2005

634.651
P149d
MON

**“DNA FINGERPRINT” EM MAMÃO (*Carica papaya* L.): CLONAGEM
DE MARCAS RAPD EM VETORES pBLUESCRIPT II KS.**

Luisa Brito Paiva

Monografia apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de Licenciado em Química.

Orientadora: Prof. Dra. Angela Pierre Vitória

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO de 2005**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal, no Centro de Ciências e Tecnologia Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, sob orientação da Prof. Dra. Angela Pierre Vitória.

Financiamento: CNPq / PIBIC
FINEP

Paiva, L.B., "DNA fingerprint" em mamão (*Carica papaya* L.): clonagem de marcas RAPD em vetores pBluescript II KS.
Campos dos Goytacazes, CCT- UENF, 2005
Total de páginas: 78
Monografia: Licenciatura em Química
Palavras chaves: RAPD, mamão, clonagem, SCAR.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO de 2005

“E se alguém ama a justiça,
seus trabalhos são virtudes,
ela ensina a temperança e a prudência,
a justiça e a força,
não há ninguém que seja mais útil aos homens na vida”.

Livro da Sabedoria 8,7.

Aos meus pais, Maria da Penha e Clementino
Ao meu irmão Alexandre
Aos meus amigos e mestres

A decorative graphic consisting of a vertical line and a horizontal line intersecting at a point. The vertical line is on the left, and the horizontal line is on the bottom. The intersection point is to the left of the text.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

A Deus por conceder a minha vida, pela oportunidade de crescer a cada dia e alcançar meus objetivos através da Sua única e exclusiva força.

Aos meus maravilhosos pais, Maria da Penha e Clementino, que amo infinitamente e são meus exemplos de luta e perseverança. Por confiarem em mim e por me apoiarem em todos os momentos da vida.

Ao meu irmão Alexandre, a minha avó Maria de Lourdes, também por confiarem em mim e estarem sempre ao meu lado nos momentos em que preciso. Aos meus tios e tias, primos e primas, simplesmente pelo fato de existirem e fazerem parte da minha família. A Lyana, minha prima, que dividiu e dividi comigo grandes momentos da minha vida.

As minhas amigas Michelle, Paula, Fernanda, Ana Paula e Laíse por terem me dado o prazer de compartilhar de suas presenças no meu dia-a-dia. Trabalhando, dando força, aconselhando, brincando e etc. A essas pessoas maravilhosas que tanto respeito, admiro e amo e que, graças a Deus, passaram pelo meu caminho e fazem parte de um dos melhores momentos da minha vida.

A minha amiga especial, Juliana, por tantos anos de amizade abençoada por Deus, pela compreensão mútua e pelo carinho. Essa que, mesmo tenha escolhido caminhos tão diferentes dos meus, continuou sempre ao meu lado, torcendo, incentivando e sendo exemplo de iniciativa e luta pelos sonhos.

A Alzira, Viviane, Débora e Marcelo pelos quais tenho uma amizade infinitamente grande e especial. Por amá-los e admirá-los pelas qualidades tão particulares e diferentes que cada um possui. Por todos os momentos que tivemos de alegria e “estresse”, de vitórias e derrotas, de entusiasmo e cansaço, de companheirismo, de aprendizagem, de muita e nenhuma compreensão. Enfim, de convivência mesmo e tudo que ela me trouxe.

A todos os colegas de turma aos quais respeito e prezo. Pelos anos de estudo, luta e diversão.



SUMÁRIO

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	xii
Lista de Tabelas.....	xv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xx
Lista de Abreviaturas.....	xxii
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1. Aspectos Gerais da Cultura do Mamoeiro.....	2
1.2. O Cultivo do mamão.....	3
1.3. O Programa de Melhoramento Genético do mamoeiro da UENF.....	4
1.4. Marcadores moleculares.....	5
2. OBJETIVOS.....	10
2.1. Objetivos Gerais.....	10
2.2. Objetivos Específicos.....	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3.1. Materiais Biológicos.....	12
3.1.1. Material Vegetal.....	12
3.1.2. Material Bacteriano.....	12
3.2. "DNAFingerprints".....	12
3.2.1. Marcas RAPD.....	12
3.2.2. Purificação e reamplificação das marcas RAPD com Pfu.....	14
3.2.3. Clonagem.....	14
3.2.3.1. Produção de células competentes.....	15
3.2.3.2. Transformação.....	15
3.2.3.3. Vetor de Clonagem.....	16
3.2.3.4. Ligação do plasmídeo pKS com fragmentos RAPD.....	17
3.2.3.5. Extração de DNA plasmídial.....	18
3.2.3.6. Confirmação dos clones.....	18
3.2.3.7. Purificação de DNA plasmídial.....	19

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	21
4.1. "DNA Fingerprint"	21
4.2. Clonagem.....	25
5. CONCLUSÕES.....	32
6. BIBLIOGRAFIA.....	34
7. ANEXO.....	41



LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema do plasmídeo “pBluescript II KS” evidenciando os sítios de clonagem.....17
- Figura 2.** Gel de agarose contendo diferentes genótipos de *Carica papaya* L. amplificados com “primer” OPD 20. Marca OPD 20 B1 exclusiva do genótipo UENF 1594 e seus híbridos (seta). 1- UENF 1589, 2- UENF 1594, 3- UENF 1596, 4- UENF 1592, 5- UENF 1595, 6- UENF 1602, 7- UENF 1590, 8- UENF 1594, 9- UENF 1597, 10- UENF 1593, 11- UENF 1591, 12- Branco, 13- Marcador de DNA (Fago Lambda clivado com PST I).PB – Pares de Base.....22
- Figura 3.** Gel de agarose contendo diferentes genótipos de *Carica papaya* L. amplificados com “primer” OPAF 17. Marca OPAF 17 B1 ausente para o genótipo UENF 1593 (seta). 1- Marcador de DNA (Fago Lambda clivado com PST I), 2- UENF 1594, 3- UENF 1596, 4- UENF 1592, 5- UENF 1595, 6- UENF 1593, 7- UENF 1590, 8- UENF 1594, 9- UENF 1597, 10- UENF 1602, 11- UENF 1591, 12- UENF 1589, 13- Branco. PB – Pares de Base.....23
- Figura 4.** Gel de agarose contendo as marcas RAPD reamplificados com Pfu (Cada fragmento leva o nome do “primer” que o gerou). 1 – Quantificador de DNA, 2 - OPN 09 B1, 3 - OPD 20 B1, 4 - OPAF 17 B1, 5 – OPS 03 B2, 6 - OPAF 17 B2, 7 - OPS 03 B1–, 8 – OPO 10 B2, 9 – OPO 10 B1, 10 - Padrão de DNA com fragmentos variando em 250 pb (banda escura – 1000 pb). PB – Pares de Base.....24
- Figura 5.** Placas de Petri contendo meio sólido LB com colônias de *E. coli* XL 1-Blue transformadas com pKS ligado ao fragmento OPS 03 B2 (ausente apenas no genótipo UENF 1594). A) Visão geral da placa e B) Visão ampliada. Setas indicam colônia potencialmente positiva (branca).....26

Figura 6. Gel de agarose mostrando a liberação de fragmentos clonados (seta) em colônias de *E. coli* XL1 – Blue transformadas com pKS contendo estes insertos. As colônias foram submetidas a dupla digestão com Eco RI e Xho I para liberação dos fragmentos. 1-DNA marcador de 250 pb; 2 e 3 - colônias não transformadas (sem liberação do fragmento); 4 a 6 – clones contendo inserto OPS 03 B2; 7 – pKS digerido com Eco R V, 8 – pKS íntegro. PB – Pares de Base.....27

Figura 7. Gel de agarose mostrando a liberação de fragmentos clonados (chave) em colônias de *E. coli* DH5 α transformadas com pKS contendo diferentes insertos. 1 a 6 – clones contendo inserto OPN 09 B1 (notar em 2 a não digestão do plasmídeo), 7, 8, 9 e 14 - colônias não transformadas, 10 a 13 – clones contendo inserto OPD 20 B1 (notar em 11 a não digestão do clone), 15 – clone contendo fragmento OPO 10 B1, 16 e 17 – clones contendo fragmento OPAF 17 B2, 18 - pKS digerido com ECO RV, 19 – pKS íntegro, 20 -DNA marcador de 250 pb.....29



LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Conjunto de marcas RAPD capazes de diferenciar os parentais e híbridos de mamão (*Carica papaya* L.).....13

Tabela 2. Listagem com as oito marcas RAPD capazes de diferenciar os genótipos de mamão com seus respectivos tamanhos em pares de base (pb) e o número de clones obtidos.....30



RESUMO

extração e purificação do DNA plasmidial para futuros sequenciamentos. Diferentes números de clones foram obtidos para cada um dos fragmentos RAPD de interesse. O processo de clonagem foi uma etapa de suma importância para os futuros trabalhos de sequenciamento e síntese de iniciadores SCAR, o que garantirá a total confiabilidade na identificação dos genótipos estudados no programa de melhoramento genético do mamoeiro da UENF.



ABSTRACT

ABSTRACT

ABSTRACT

The papaya (*Carica papaya* L.) crop is widely used in tropical regions. Brazil is one of the most important exporter of this fruit, growing genotypes originally developed in other countries (USA and China), adapted to our climatic conditions. Two major papaya groups 'Solo' and 'Formosa' were used in the UENF Papaya Breeding Program for the development of national hybrids. The developed genotypes constitute a good alternative for the national and regional agriculture diversification. This work used molecular markers aiming in the future, to give support for the respective breeding program in the sense to ascertain the genetic purity of the produced seeds and the correct identification of the papaya cultivars morphologically alike. As a first step, RAPD markers were developed with established the DNA fingerprinting of the interested genotypes. Despite the advantages of these markers, a few disadvantages, especially the low reproducibility has limited their use for genotype identification. Thus, the objective of this investigation was to clone eight RAPD markers (capable to differentiate among the genotypes) in pKS plasmid. The final intent is the sequencing and the conversion of these markers in SCAR. To clone these markers, it was necessary to proceed the reamplification of each fragment with Taq Pfu. Competent cells of *Escherichia coli* bacteria (XL1- Blue and DH5 α) were used and the recombinants (positive clones) were selected from the growth medium using X-Gal. Fragments with size varying from 650 to 1700 bp were cloned. The evaluation of the positive clones were done by double digestion reaction of the pKS plasmid, with the Eco R I and Xho I enzymes. For those clones that showed the liberation of the insert, it was made the purification of the vector pKS for future sequencing. Different numbers of clones were obtained for each one of the interested fragments. The cloning process constituted one step of major importance for future jobs of sequencing and synthesis of SCAR primers, which will guarantee total confidence on the identification of those genotypes developed by the UENF papaya breeding program.



LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA – Albumina Sérica Bovina

dATP – desoxiadenosina 5'- trifosfato

dCTP - desoxicitidina 5'- trifosfato

dGTP – desoxiguanosina 5'- trifosfato

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DMSO – Dimetil sulfóxido

dTTP - desoxitimidina 5'- trifosfato

EDTA – Ácido tetraacético etilenodiamina

LB – *Luria-Bertani*

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pKS - pBluescript II KS

Pipes – ácido piperazina-N, N' – bis (2- etanosulfônico)

RAPD – DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso

SCAR – Regiões Amplificadas de Seqüências Caracterizadas

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

TE – Tris- HCl -EDTA

TENS – Tris- HCl- EDTA- NaOH- SDS

X-Gal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranoside

A decorative graphic consisting of a vertical line and a horizontal line intersecting at a point. The vertical line is on the left, and the horizontal line is below the text. The text 'INTRODUÇÃO' is positioned to the right of the vertical line and above the horizontal line.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Aspectos Gerais da Cultura do Mamoeiro

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma planta diplóide ($2n = 18$), pertencente à classe Dicotyledoneae, ordem Violales e à família Caricaceae. Esta família apresenta quatro gêneros, com 31 espécies, distribuídas em *Carica* (22 espécies), *Jacaratia* (6 espécies), *Cylicomorpha* (2 espécies) e *Jarilla* (1 espécie) (JOLY, 1993; DANTAS e CASTRO, 2000).

Basicamente, o mamoeiro apresenta três tipos de flores, as quais levam à classificação de plantas como femininas, masculinas e hermafroditas. As plantas hermafroditas produzem frutos alongados, de cavidade interna menor do que os produzidos por plantas femininas, apresentando grande valor comercial (MARIN e GOMES, 1999).

De acordo com os tipos de flores produzidos, a espécie *C. papaya* possui as seguintes formas sexuais (HOROVITZ *et al.*, 1953).

- ginóica: mamoeiros com flores exclusivamente femininas;
- andróica: mamoeiros com flores exclusivamente masculinas; e
- andromonóica: mamoeiros que têm em sua inflorescência uma mistura de flores masculinas e hermafroditas.

A descrição e classificação das formas sexuais diferem amplamente porque a expressão do sexo em hermafroditas é profundamente influenciada por diferenças entre cultivares, condições climáticas, de umidade e de solo (AWADA, 1958)

Nos plantios comerciais, o mamoeiro é normalmente propagado por sementes, e a colheita dos frutos inicia-se de 10 a 15 meses após o plantio. A produção varia de 10 a 12 t/ha, no primeiro ano; 50 a 60 t/ha, no segundo e 25 a 30, no terceiro (AGRINUAL, 2002; BALBINOT *et al.*, 2004). Apresenta frutos cujo aroma provém de compostos voláteis, principalmente ésteres de baixo peso molecular (FLATH e FORREY, 1977). Mostra-se com grande importância para a dieta humana, fornecendo ácido ascórbico (vitamina C), além de possuir alto valor nutritivo e

digestivo (WILLS *et al.*, 1984). Os frutos verdes são usados como fonte de enzima proteolítica papaína (DANTAS *et al.*, 2002). Na medicina é utilizado como droga antimalárica (BHAT e SUROLIA, 2001) e as sementes, como anticoncepcivo (LOHIYA *et al.*, 2000).

O mamão é produzido durante todo o ano e, dependendo da variedade a que pertence, assume tamanho, peso, sabor, formato e coloração diferentes. As variedades mais consumidas são: 'papaya' ou 'Solo', de formato piriforme, tamanho e peso reduzidos (entre 400 e 500 g) e sabor adocicado; e 'Formosa', de formato alongado e peso médio variando entre 800 e 1100g.

1.2 – O Cultivo do Mamão

O mamão *Carica papaya* L. é um fruto nativo de regiões tropicais, ocorrendo originalmente com máxima diversidade genética no noroeste da América do Sul (BADILLO, 1971). É largamente cultivado em vários países do mundo como Nigéria, Índia, Brasil, México, Peru, Colômbia, Tailândia, China e Indonésia (SOUZA, 2000).

O Brasil é atualmente o maior produtor da fruta (40% da produção global) vindo a seguir a Nigéria (14%), México (10%) e Indonésia (9%). É também um dos principais exportadores mundiais, cultivando genótipos provenientes dos EUA e China, adaptados às nossas condições climáticas. De acordo com a FAO (2001), o mercado interno absorve aproximadamente 90% da produção brasileira e no ano de 2001 o Brasil exportou cerca de 22.000 toneladas de mamão, o equivalente US\$ 18,503 milhões.

No Nordeste, mais especificamente no Estado da Bahia, está concentrada a maior área de plantio ocupando cerca de trinta mil hectares. A região Sudeste é a segunda maior produtora, com sete mil hectares. Destaca-se nessa região o rendimento das lavouras de boas condições tecnológicas do Norte do Estado do Espírito Santo (ALVES, 2003), onde são produzidos cerca de 330.000 t/ano de mamão, gerando uma renda bruta de R\$ 50 milhões/ano e empregando cerca de 9.000 pessoas no processo de produção e comercialização (RUGGIERO *et al.*, 2003).

Na região Norte e Noroeste do Estado do Rio de Janeiro a atividade agrícola está apoiada no monocultivo da cana-de-açúcar, porém a introdução de cultivares havaiana do grupo 'Solo' e de híbridos chineses do grupo 'Formosa', representam uma excelente alternativa para diversificação agrícola da mesma. Entretanto, para cultivar esta espécie nestas regiões, torna-se necessário escolher variedades que possam ter melhor desenvolvimento, resistência a doenças e que, sobretudo, atendam as exigências agrônômicas desejáveis, tanto do mercado nacional, quanto internacional.

1.3 – O Programa de Melhoramento Genético do Mamoeiro da UENF

As características agrônômicas mais relevantes para a cultura do mamoeiro são a ausência ou a ocorrência mínima de flores hermafroditas estéreis, frutificação precoce abundante e com início em altura inferior a 90 cm do solo, casca lisa e sem manchas, polpa vermelho-alaranjada, cavidade ovariana pequena e em formato de estrela, polpa com espessura superior a 20 mm, sólidos solúveis acima de 14° Brix e maior longevidade pós-colheita (PÉREZ, 2004).

O cultivo desta fruta apresenta várias limitações. Dentre elas podem-se destacar a falta de alternativas de genótipos para escolha de cultivares e/ou híbridos comerciais nacionais, a suscetibilidade de algumas cultivares ao vírus do mosaico e à mancha fisiológica, o rendimento limitado, polpas pouco consistentes e o preço muito elevado (3.500 a 4.000 U\$/kg) das sementes híbridas do mamoeiro 'Formosa' importadas de Kaohsiung/Taiwan (LUNA, 1976; MARIN *et al*, 2000; GIACOMETTI e FERREIRA, 1988)

Tendo em vista tais limitações, pesquisadores da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) em parceria com a empresa privada nacional CALIMAN AGRÍCOLA S.A. e com suporte financeiro da FINEP iniciaram em 1996 um Programa de Melhoramento Genético do Mamoeiro. Um dos objetivos principais do referido programa é desenvolver genótipos superiores, capazes de contribuir expressivamente com o agronegócio do mamão e com o desenvolvimento regional. Até o momento, foram desenvolvidos nove híbridos, que já estão registrados no Serviço de Proteção de Cultivares do Ministério da Agricultura,

Pecuária e Abastecimento (PEREIRA, 2003). Esses híbridos são provenientes do cruzamento entre parentais dos grupos 'Solo' e 'Formosa' e apresentam qualidade e produtividade superiores aos materiais em cultivo no país.

Para dar suporte ao Programa de Melhoramento Genético do Mamoeiro desenvolvido na UENF estão sendo implementadas várias técnicas moleculares que permitem estabelecer a diferenciação genética dos materiais em estudo.

A utilização de técnicas biotecnológicas é de extrema importância nos processos de melhoramento. Elas têm permitido realizar análises filogenéticas e caracterização de genótipos para plantas de interesse comercial, além de acelerar o tempo para se chegar ao genótipo melhorado.

Características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente são conhecidas como marcadores moleculares ou marcadores de DNA.

1.4– Marcadores moleculares

Os marcadores moleculares são classificados em dois grupos de acordo com método pelos quais são obtidos: 1) hibridização de DNA: RFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição) e minissatélites ou VNTR (Número Variável de Sequências Repetidas umas após as outras); e 2) amplificação de DNA: RAPD (DNA Polimórfico Amplificado ao acaso), SCAR (Região Amplificada de Sequência Caracterizada), microsatélite ou SSR (Sequências Simples Repetidas umas após as outras) e AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados). Para cada tipo de marcador de DNA existem vantagens e limitações (FERREIRA E GRATTAPAGLIA, 1995).

Os marcadores obtidos por amplificação de DNA são obtidos por uma técnica conhecida como reação em cadeia da polimerase (PCR – "Polymerase Chain Reaction"). Esta técnica se baseia na amplificação de um segmento de DNA na qual uma sequência de oligonucleotídeos iniciadores ("primers") se para à sequência complementar do DNA molde e promove a extensão da fita complementar de DNA através da enzima DNA polimerase termoestável.

Marcadores RAPD vêm sendo amplamente utilizados em pesquisas genéticas de plantas para análise de divergência (CATTANEO, 2001), identificação de cultivares (BAUM *et al.*, 2000), mapeamento (RAFALSKI, 2002; BRESSAN-SMITH, 1998), melhoramento genético visando resistência a doenças (Santos, 2000), sexagem (URASAKI *et al.*, 2002; SONDUR *et al.*, 1996) e “fingerprints” (BAUM *et al.*, 2001; VIDAL *et al.*, 2000; XU *et al.*, 1995; SHARON *et al.*, 1995). Apesar de apresentarem controvérsias em relação a confiabilidade dos dados obtidos, a facilidade de execução, rapidez e geração considerável de polimorfismo fazem destes marcadores uma boa opção, principalmente, em culturas pouco estudadas, como é o caso do mamão.

VITÓRIA *et al* (2004) estabeleceram o “DNA fingerprint” e relações filogenéticas para dez genótipos de mamão (*Carica papaya* L.) baseados em marcadores RAPD. Os materiais vegetais incluíram sete parentais dos grupos ‘Solo’ e ‘Formosa’ e três híbridos provenientes do cruzamento entre estes dois grupos. Alguns genótipos puderam ser caracterizados apenas pela presença ou ausência de bandas, mas em geral, o “DNA fingerprint” pôde ser obtido pelo conjunto das marcas RAPD. As análises filogenéticas mostraram maior similaridade entre os parentais de cada grupo e uma posição intermediária para os híbridos, como esperado.

Para aumentar o nível de segurança de identificação dos materiais em estudo e proporcionar maior suporte ao Programa de Melhoramento Genético do Mamoeiro da UENF, marcadores RAPD estão sendo convertidos em marcadores SCAR, que são mais vantajosos que o anterior quanto a repetibilidade das análises.

Marcadores SCAR são obtidos a partir da amplificação de fragmentos com “primers” sintetizados com base em uma seqüência específica de nucleotídeos de aproximadamente 20 pares de base. Para que sejam desenvolvidas marcas SCAR é necessário que se conheçam seqüências de DNA específicas dos genótipos que se tem interesse. Estas seqüências podem ser obtidas, por exemplo, a partir da clonagem e do sequenciamento de marcas RAPD (MILACH, 1998).

A origem do termo clonagem vem da Genética Bacteriana que considera uma colônia de bactérias como um clone porque todos os indivíduos são geneticamente idênticos à bactéria inicial. Resumidamente, a clonagem compreende pelo menos dois estágios importantes. Primeiro, o fragmento do DNA de interesse, chamado de

inserto, é ligado a uma outra molécula de DNA (vetor de clonagem) para formar o que se chama de DNA recombinante. Segundo, a molécula do DNA recombinante é introduzida em uma célula hospedeira compatível, num processo conhecido como transformação. A célula hospedeira que adquiriu a molécula do DNA recombinante é, agora, chamada de transformante ou célula transformada. Um único transformante, em condições ideais, sofre muitos ciclos de divisão celular, produzindo uma colônia que contém milhares de cópias do DNA recombinante (NASCIMENTO *et al*, 2003). Uma vez que a sequência de DNA de interesse é inserida em um vetor de clonagem, a mesma pode ser seqüenciada e a partir destas informações, "primers" podem ser deduzidos e sintetizados.

A conversão de marcadores RAPD em SCAR, em geral, resulta na diminuição do nível de polimorfismo obtido para o marcador SCAR. Contudo, isso pode ser amenizado com a digestão dos produtos amplificados utilizando-se enzimas de restrição ou com o sequenciamento das bandas monomórficas e subsequente desenvolvimento de "primers" que amplificam seqüências mais variáveis entre os genótipos (MILACH, 1999).

JIANG e SINK (1997) utilizaram marcadores RAPD e SCAR para obtenção de marcas para o loco sexual M (masculino) em aspargos. As plantas masculinas são preferidas por apresentarem maior produtividade e vigor do que as plantas femininas. Um total de 760 "primers" RAPD foram testados em um parental masculino, um feminino e em 63 progênies. O "primer" OPC 15 produziu duas marcas RAPD (OPC 15₃₀ e OPC 15₉₈) ligadas ao loco M (fenótipo masculino). Posteriormente o fragmento dominante amplificado OPC 15₉₈ foi clonado e seqüenciado. A seqüência foi usada para construir "primers" SCAR. Estes amplificaram um único fragmento de 980 pb em indivíduos masculinos. As marcas RAPD e SCAR obtidas puderam ser usadas para proceder a diferenciação sexual da progênie da população em estudo, mas não foram aplicáveis à outros germoplasmas de aspargos.

PARASNIS *et al.* (2000) desenvolveram para plantas masculinas de mamão um marcador SCAR específico, possibilitando a sua sexagem precoce. Este marcador foi obtido a partir da conversão de uma marca RAPD específica para

plantas masculinas. O fragmento composto por 831 pares de base foi clonado, seqüenciado e um par de "primer" SCAR foi sintetizado a partir da seqüência obtida.

Um marcador de DNA PSDM (Papaya Sex Determination Marker) de 450 pb foi descoberto para genótipos de mamão andróicos e andromonóicos. Através desse foi desenvolvido um marcador SCAR e os resultados obtidos sugerem que o PSDM esteja localizado na região do cromossomo que é específica para os genótipos mencionados, não existindo em genótipos ginóicos (URASAKI *et al.*, 2002).

Dois marcadores dominantes SCAR foram construídos para o gene *Rpf1* de morango (*Fragaria anassa* Duch.). Este gene confere resistência a uma doença conhecida como podridão da *Phytophthora* causada pelo fungo *Phytophthora fragariae* var. *fragariae*. Os marcadores SCAR foram desenvolvidos a partir dos marcadores RAPD obtidos com o "primer" OPO-16C. Estes marcadores (RAPD e SCAR) estão sendo utilizados em programas de melhoramento para a seleção de genes de resistência a podridão da *Phytophthora* (HAYMES *et al.*, 2000).

Como discutido acima, marcadores SCAR têm uma ampla utilização no suporte à programas de melhoramento genético. As informações e as tecnologias geradas pelo grupo de pesquisa de Melhoramento Genético do Mamoeiro da UENF são, sem dúvidas, avanços importantes para o melhoramento da cultura no âmbito nacional. Portanto, faz-se necessário cada vez mais o aprimoramento dos dados, assim como das técnicas, e a ampliação dos conhecimentos em prol da confiabilidade e subsequente desenvolvimento da cultura em questão no país.

De um modo geral, o potencial de uso de marcadores moleculares para a caracterização de variedades comerciais é enorme, e nas últimas décadas vem adquirindo grande espaço no mundo inteiro, mostrando-se como ferramenta indispensável para tal desenvolvimento.



OBJETIVOS

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 – Objetivos Gerais

Este projeto teve por objetivo clonar em plasmídeo pBluescript II KS oito marcas RAPD com tamanhos variando entre 650 e 1700 pb. Estas marcas, previamente caracterizadas pelo nosso grupo de pesquisa, são capazes de diferenciar os parentais e os híbridos de mamão em estudo.

2.2 – Objetivos Específicos

- 1 - Produção de células competentes de *Escherichia coli*;
- 2 - Manipulação de DNA plasmidial (clivagem, ligação, extração e purificação);
- 3 - Confirmação dos clones através de dupla digestão;
- 4 - Produção de clones contendo os insertos de interesse.



MATERIAS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Materiais Biológicos

3.1.1 – Material Vegetal

Foram avaliados 10 genótipos de mamoeiros (*Carica papaya* L.), sendo 7 (sete) parentais e 3 (três) híbridos. Estes materiais encontram-se estabelecidos no município de Linhares (ES), na Fazenda Santa Terezinha, pertencente à empresa CALIMAN AGRÍCOLA S. A e estão cadastrados no Livro de Introdução do Banco Germoplasma do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV), CCTA/ UENF. Abaixo estão listados os genótipos estudados neste trabalho:

Parentais:

Formosa: UENF 1594 e UENF 1595

Solo: UENF 1589, UENF 1590, UENF 1591, UENF 1592 e UENF 1593

Combinações híbridas:

UENF 1596 (UENF 1589 x UENF 1594)

UENF 1597 (UENF 1590 x UENF 1594)

UENF 1602 (UENF 1592 x UENF 1595)

3.1.2 – Material Bacteriano

Foram utilizadas células competentes de bactérias *E. coli* cepa XL1-Blue e DH5 α obtidas junto ao Laboratório de Biotecnologia (LBT), CBB/UENF.

3.2 - “DNA Fingerprints”

3.2.1 - Marcas RAPD

Em estudos anteriores, oito marcas RAPD foram desenvolvidas pelo nosso grupo de pesquisa (VITORIA *et al.*, 2004), como pode ser visualizado na Tabela 1.

Tabela 1 – Conjunto de marcas RAPD capazes de diferenciar os parentais e híbridos de mamão (*Carica papaya* L).

PARENTAL SOLO					HÍBRIDOS			PARENTAL FORMOSA		Tamanho
UENF	UENF	UENF	UENF	UENF	UENF	UENF	UENF	UENF	UENF	em pb
1591	1589	1590	1593	1592	1602	1596	1597	1594	1595	
						OPD 20 B1	OPD 20 B1	OPD 20 B1		1200
OPO 10 B1		OPO10 B1								1300
					OPO 10 B2	OPO 10 B2	OPO 10 B2	OPO 10 B2	OPO 10 B2	1500
OPS 03 B1	OPS 03 B1	OPS 03 B1	OPS 03 B1	OPS 03 B1	OPS 03 B1	OPS 03 B1	OPS 03 B1			1100
OPS 03 B2	OPS 03 B2	OPS 03 B2	OPS 03 B2	OPS 03 B2	OPS 03 B2	OPS 03 B2	OPS 03 B2		OPS 03 B2	650
			OPAF 17 B1							950
	OPAF 17 B2	OPAF 17 B2		OPAF 17 B2	OPAF 17 B2	OPAF 17 B2		OPAF 17 B2		1700
			OPN 09 B1							700

pb – pares de bases

B1 e B2 – utilizado para diferenciar marcas com pesos moleculares diferentes geradas pelo mesmo “primer”.

Como evidenciado na tabela acima, apenas os genótipos UENF 1589 e UENF 1592 não puderam ser diferenciados do ponto de vista molecular, uma vez que as mesmas marcas (OPS 03 B1, OPS 03 B2 e OPAF 17 B2) estão presentes em ambos os genótipos.

Fragmentos de gel contendo as marcas acima descritas foram recortados e congelados. O DNA das bandas foi purificado, reamplificado e clonado conforme descrito a seguir.

3.2.2 – Purificação e reamplificação das marcas RAPD com Pfu

Para purificação dos fragmentos contidos no gel de agarose foi utilizado o kit de purificação de DNA Wizard SV Gel (PROMEGA). Os procedimentos de purificação foram feitos segundo recomendações do fabricante.

Uma vez purificados os fragmentos, os mesmos foram reamplificados com DNA Polimerase termoestável (Pfu). Esta enzima não deixa extremidades com cauda Poli A, portanto as extremidades são cegas, facilitando a clonagem de fragmentos.

Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) foram realizadas de acordo com Williams et al. (1990) com modificações. As amplificações foram conduzidas em volume final de 50 μ l, contendo 60ng de DNA genômico e duas unidades de Pfu em Tris-HCl 10mM (pH 8.3) acrescido de 2mM MgCl₂, 50mM de KCl, 200 μ M de dATP, dCTP, dGTP, dTTP e 5 μ M de "primer" (OPERON TECHNOLOGIES, USA). Foram utilizados termocicladores PERKIN ELMER GeneAmp PCR System, modelos 9600 e 9700. O programa de amplificação submetia a mistura citada acima a 95° C por um minuto (para desnaturação inicial do DNA), seguido de 45 ciclos, com cada ciclo constituído de um minuto a 94° C (para desnaturação), um minuto a 36° C (para o anelamento dos "primers") e dois minutos a 72° C (para a extensão da fita de DNA complementar).

Após a reação de amplificação, os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% a 0.23 mA e corados com brometo de etídeo (0,75 mg/ μ L) durante 20 minutos para serem visualizados em ultra-violeta (Sistema Eagle Eye). Após a visualização, as bandas foram isoladas do gel e novamente purificadas utilizando o Kit Wizard SV Gel (PROMEGA).

3.2.3 – Clonagem

Para a futura obtenção de marcas SCAR, foi necessário proceder a clonagem das marcas RAPD reamplificadas com Pfu em plasmídeos pKS e produzir células competentes de *E. coli* cepas XL1- Blue e DH5 α para transformação com os insertos.

3.2.3.1 - Produção de células competentes

Uma colônia da bactéria *E. coli* cepa XL1 - Blue foi inoculada em 10 mL de meio LB (triptona 10g/L, extrato de levedura 5 g/L e NaCl 10 g/L - pH 7.0) contendo tetraciclina na concentração final de 50 µg/mL. O pré-inóculo foi incubado a 37°C por 8 horas com agitação constante. Diferentes volumes do pré-inóculo (1,5; 1,0; 0,5 mL) foram crescidos em frascos distintos contendo 65 mL de meio SOB líquido (triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 0,5 g/L, KCl 250mM, MgCl₂ 2M - pH 7.0) com tetraciclina, na concentração já citada, por aproximadamente 16 horas a 22°C com agitação constante.

Após este período foi medida a densidade óptica a 600 nm. A cultura que apresentou valor de absorvância em torno de 0,55 foi colocada em gelo por 10 minutos e, posteriormente, centrifugada a 2500 x g por dez minutos a 4°C em tubo de 50 mL estéril. O precipitado foi ressuspensão em 20 mL de solução Pipes (MgCl₂ 4. H₂O – 126 mM; CaCl₂ 2. H₂O – 18 mM; KCl – 518mM; Pipes – 20 mL; H₂O – para um litro) e centrifugado novamente por 10 minutos a 2500 x g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensão em 10 mL da solução Pipes.

Trezentos e setenta e três µL de DMSO foram adicionados à amostra e incubados por 10 minutos no gelo. Posteriormente, as células foram aliqüotadas em frações de 200 µL em tubos de 1,5 mL, congelado em nitrogênio líquido e mantido em biofreezer a -70°C.

Para obtenção das células competentes de *E. coli* DH5 α foi utilizado o mesmo procedimento, com exceção da presença da tetraciclina nos meios de crescimento.

3.2.3.2 – Transformação

Três amostras contendo as células produzidas como descrito no item 3.2.3.1 foram retiradas do biofreezer e mantidas no gelo por 20 minutos. Para testar a competência dessas células foi necessário submetê-las a choque térmico na presença do plamídeo pKS. A alteração da temperatura promove a abertura de poros da membrana, propiciando a entrada do DNA plasmidial.

Às três amostras contendo células competentes foram adicionadas concentrações diferentes de plasmídeos pKS (10, 20, 50ng) obtidos no LBT. A mistura contendo *E. coli* e pKS foi submetida a choque térmico a 42°C por 2 minutos e, posteriormente mantida no gelo por 2 minutos. Após este período foram colocados 800µl da solução SOC (SOB líquido acrescido de Glicose 20 mM) em cada tubo e mantidas as condições de crescimento por 40 minutos a 37°C. Essa solução foi centrifugada por 1 minuto a 13.000 x g. Foram retirados 800µl do sobrenadante restando apenas 200µl, no qual as células foram ressuspensas agitando-se suavemente.

Foram preparadas três placas de Petri contendo 25mL de meio SOB sólido (SOB líquido acrescido de Ágar - 15 g/L,) com ampicilina e tetraciclina nas concentrações finais de 60 e 50 µg/mL, respectivamente. Os 200µl da cultura foram colocados nas placas preparadas e espalhados com a alça de Drigalski, sendo mantida em estufa por doze horas a 37°C para possibilitar o crescimento das colônias.

Após este período foi feita a contagem das colônias e o resultado utilizado para calcular a competência de acordo com a fórmula: competência = número de colônias/ concentração de DNA em µg.

Para o teste de células competentes de *E. coli* DH5 α foram utilizados os mesmos procedimentos, entretanto não foi acrescentada tetraciclina no meio de crescimento.

3.2.3.3 – Vetor de clonagem

Para a clonagem dos fragmentos utilizamos o plasmídeo pKS (Figura 1) digerido com enzima Eco RV que deixa extremidades cegas e, portanto, compatíveis com as extremidades dos fragmentos. A reação de digestão foi conduzida em volume final de 100 µl, adicionando 5,0 µg de DNA plasmidial, 10 mM de tampão Tris-HCl pH 8.0, 100 µg/mL de BSA, 2,5 U de enzima Eco RV. A digestão foi processada a 37°C por 2 horas e sua eficiência, verificada através de eletroforese em gel de agarose 1% a 0.23 mA. O gel foi visualizado em ultra-violeta (Sistema Eagle Eye) após imersão em brometo de etídeo (0,75 mg/µL) por 20 minutos.

Após este procedimento, a banda correspondente ao plasmídeo digerido foi recortada do gel e purificada com o Kit Wizard SV Gel (PROMEGA), segundo recomendações do fabricante. A amostra contendo o pKS foi purificada e dessalinizada utilizando-se colunas de sephadex G-25 centrifugadas a 2000 x g por 2 minutos.

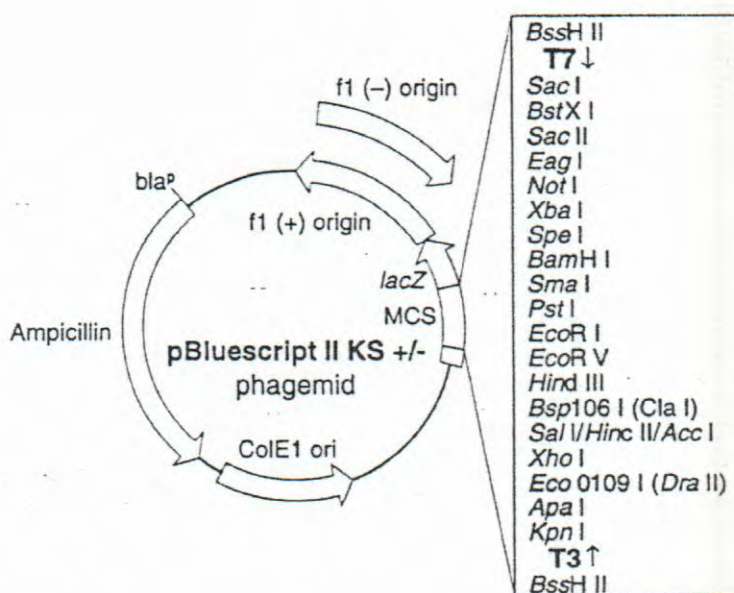


Figura 1 – Esquema do plasmídeo “pBluescript II KS” evidenciando os sítios de clonagem

3.2.3.4 - Ligação do plasmídeo pKS com fragmentos RAPD

Para a reação de ligação do plasmídeo linear com os fragmentos RAPD foram utilizadas 15 unidades da enzima T4 DNA ligase em volume final de 10 μ l de Tampão Tris-Acetato 200mM (pH 7.5) contendo ATP 1mM, 50 ng de plasmídeo pKS (digerido com Eco RV) e 50 ng do fragmento de interesse. A reação se processou a 16°C por 16 horas. Após este período, a mistura acima citada foi inserida em células competentes de *E. coli* por transformação conforme descrito em 3.2.3.2.

A eficiência da ligação e transformação foi avaliada por seleção dos recombinantes em placas contendo LB acrescido de ágar 1,5% e antibiótico (para XL1- Blue, ampicilina 60 ug/mL e tetraciclina 50 ug/mL, e para DH5 α somente ampicilina 60 ug/mL) e 40 μ l de X-Gal 50 mg/mL. As colônias transformantes (brancas) foram retiradas das placas de Petri com auxílio de ponteira e crescidas em tubos de 50 mL contendo 5 mL meio de cultura LB líquido e com os antibióticos citados por 16h a 37°C. Após este período, foi feita a extração do plasmídeo pKS.

3.2.3.5 - Extração de DNA plasmidial

Após o crescimento bacteriano, o plasmídeo foi extraído das bactérias procedendo-se a centrifugação de 1,5 μ L do meio a 13.000 x g por 30 segundos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas no restante do meio de cultura que permaneceu no tubo. Foram adicionados 300 μ L de solução TENS (Tris HCl 10 mM, EDTA 500 mM, NaOH 100 mM e SDS 0,5%) e o tubo foi vortexado por 10 segundos. A este foram acrescentados 150 μ L de acetato de sódio ou potássio 3M pH 5.2, sendo, novamente, vortexado por 10 segundos e centrifugado durante três minutos a 13.000 x g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foram adicionados 1000 μ L de etanol absoluto gelado. O material foi incubado por 1 minuto e centrifugado a 13.000 x g durante 1 minuto e o sobrenadante foi descartado. As amostras foram lavadas com etanol 70% gelado, como descrito no passo anterior, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado levado ao banho seco a 60°C por 15 minutos. O DNA plasmidial foi ressuspenso em 40 μ L de TE e RNase na concentração final de 40 μ g/mL e incubado por 1 hora à 37° C. Em seguida o material foi armazenado à - 20° C.

3.2.3.6 – Confirmação dos clones

O DNA plasmidial das colônias transformantes positivas (brancas) foi submetido a liberação do inserto através de reações com enzimas de restrição que flanqueavam o sítio da Eco RV no sítio de clonagem do plasmídeo KS. As enzimas utilizadas nesta etapa foram Eco RI e Xho I. A reação de dupla digestão foi conduzida em volume final de 10 μ l, contendo 100 ng de pKS (1 μ l), 20 mM de

tampão Tris-HCl pH 8.0 (4 μ l), 0,5 U de enzima Eco RI e 0,5 U da enzima Xho I. A digestão foi processada a 37°C por 2 horas e sua eficiência verificada através de eletroforese em gel de agarose 1% a 0.23 mA corado com brometo de etídeo (0,75 mg/ μ L) e visualizado em ultra-violeta. Para os clones que mostraram a liberação do inserto, foi feita a purificação do vetor pKS para futuro sequenciamento.

3.2.3.7 – Purificação de DNA plasmidial

Para a purificação do plasmídeo foram utilizados 30 μ L do pKS íntegro contendo o inserto (como avaliado em 3.2.3.6) e adicionados a este 270 μ L de água milli-Q, 30 μ L de NaCl 5 M e 300 μ L de isopropanol gelado. A mistura foi vortexada e incubada no freezer por 40 minutos. Após este período foi procedida a centrifugação a 13.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Foram adicionados ao sedimento 1000 μ L de etanol 70% gelado e o material novamente centrifugado nas condições descritas acima. O álcool foi descartado e a amostra levada ao banho seco à 60° C por 15 minutos. O DNA foi ressuspenso em 10 μ l de água ultra-pura e mantido em freezer a -20° C para sequenciamento em trabalhos futuros.



RESULTADOS E DISCUSSÕES

RESULTADOS E DISCUSSÕES

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 – “DNA Fingerprint”

Os genótipos de *Carica papaya* L. estudados já haviam sido diferenciados com base em marcas RAPD pelo nosso grupo de pesquisa (VITORIA *et al.*, 2004) (Anexo 1). Neste trabalho, dezenove marcas obtidas com diferentes “primers” puderam promover a caracterização molecular de nove dos dez genótipos. A obtenção de “DNA fingerprint” através destas marcas RAPD possibilitou a diferenciação entre os materiais vegetais de mamão dos grupos ‘Solo’ e ‘Formosa’ e os híbridos resultantes do cruzamento entre estes parentais. A escolha por este marcador foi feita devido ao fato de não ser necessário nenhum conhecimento prévio acerca da seqüência alvo de DNA em estudo, já que o genoma do mamão é pouco conhecido.

Embora tenha sido possível diferenciar alguns genótipos pela presença ou ausência de bandas, a maioria das diferenciações só foi possível quando um conjunto das marcas foi utilizado. Esta estratégia foi muito útil na identificação da maioria dos parentais ‘Solo’ e de todos os híbridos (Tabela 1).

Algumas marcas exclusivas de apenas um parental foram herdadas por seus híbridos, como já era esperado. Para exemplificar, podemos citar a marca OPD 20 B1 presente apenas no genótipo UENF 1594 e nos híbridos UENF 1596 e UENF 1597, oriundos do parental UENF 1594 (Figura 2).

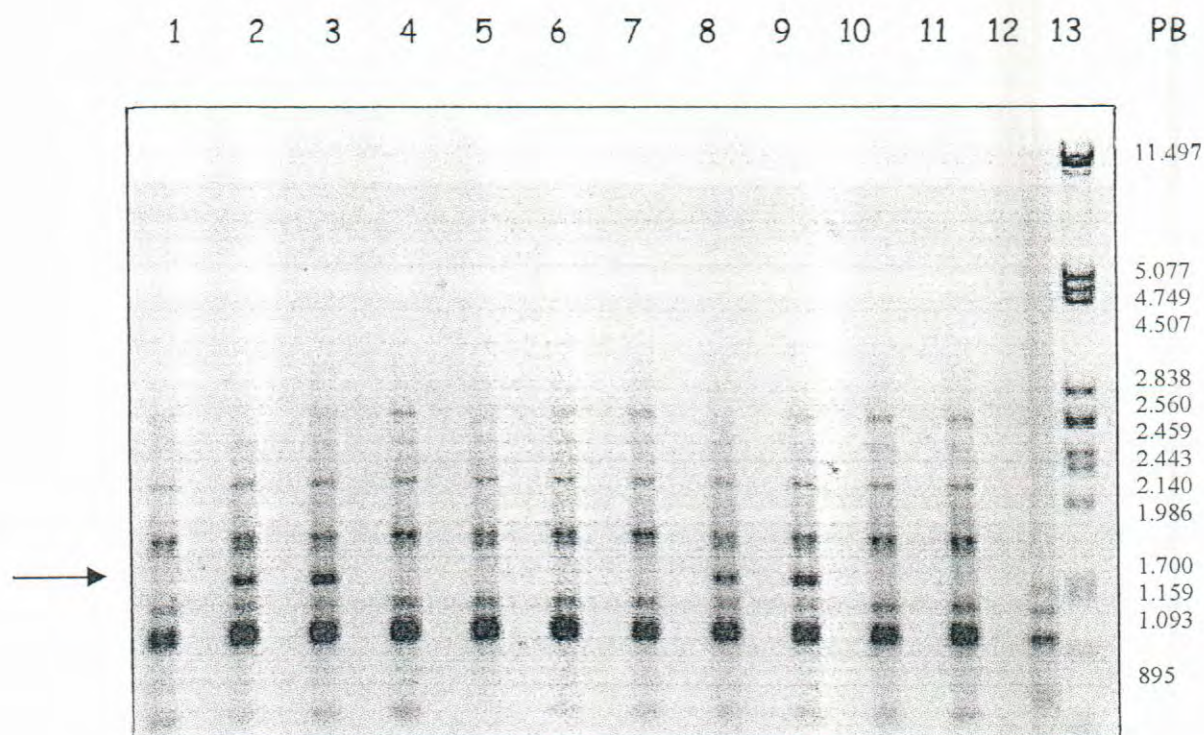


Figura 2 – Gel de agarose contendo diferentes genótipos de *Carica papaya* L. amplificados com “primer” OPD 20. Marca OPD 20 B1 exclusiva do genótipo UENF 1594 e seus híbridos (seta). 1- UENF 1589, 2- UENF 1594, 3- UENF 1596, 4- UENF 1592, 5- UENF 1595, 6- UENF 1602, 7- UENF 1590, 8- UENF 1594, 9- UENF 1597, 10- UENF 1593, 11- UENF 1591, 12- Branco, 13- Marcador de DNA (Fago Lambda clivado com PST I). PB – Pares de Base.

Outras marcas, porém, contribuíram na caracterização dos genótipos devido a sua ausência, como pode ser evidenciado pela figura 3

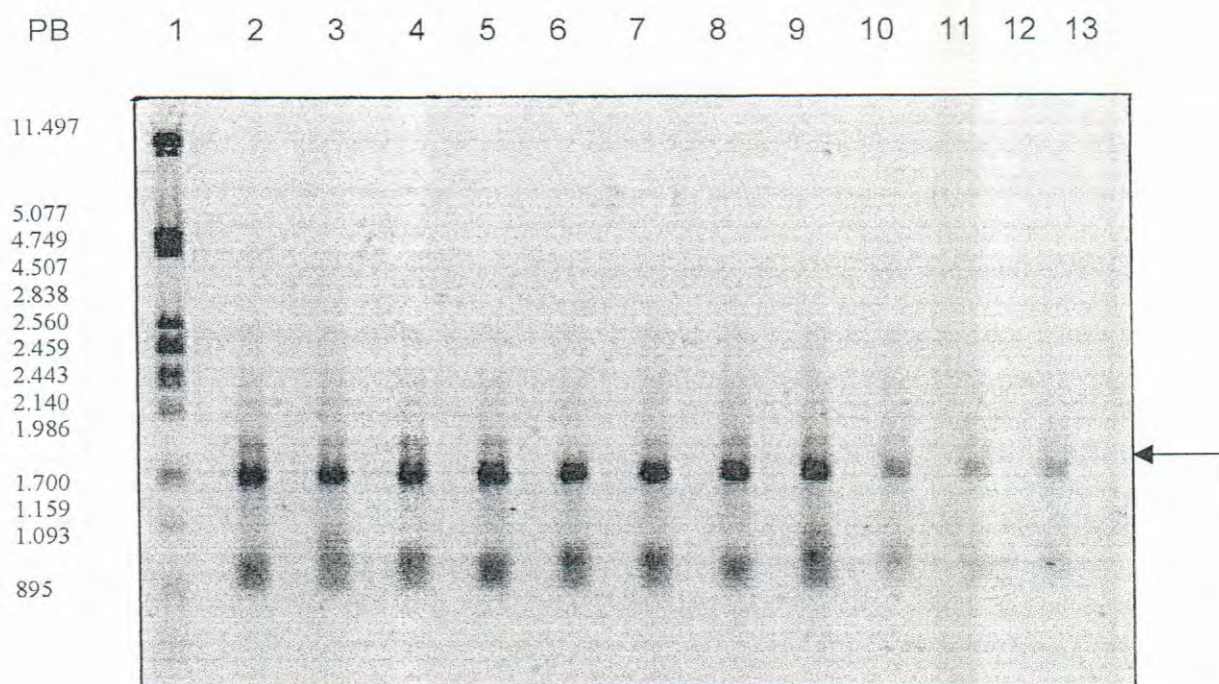


Figura 3 – Gel de agarose contendo diferentes genótipos de *Carica papaya* L. amplificados com “primer” OPAF 17. Marca OPAF 17 B1 ausente para o genótipo UENF 1593 (seta). 1- Marcador de DNA (Fago Lambda clivado com PST I), 2- UENF 1594, 3- UENF 1596, 4- UENF 1592, 5- UENF 1595, 6- UENF 1593, 7- UENF 1590, 8- UENF 1594, 9- UENF 1597, 10- UENF 1602, 11- UENF 1591, 12- UENF 1589, 13- Branco. PB – Pares de Base.

Desta forma, as associações das diversas marcas RAPD são eficientes na diferenciação entre os genótipos.

No intuito de converter estas marcas RAPD em SCAR, buscou-se neste trabalho clonar os fragmentos de interesse em plasmídeo pKS. Para tanto, as oito marcas RAPD foram reamplificadas utilizando enzima DNA polimerase Pfu. Através da figura 4 verificamos que todos os fragmentos puderam ser reamplificados e quantificados.

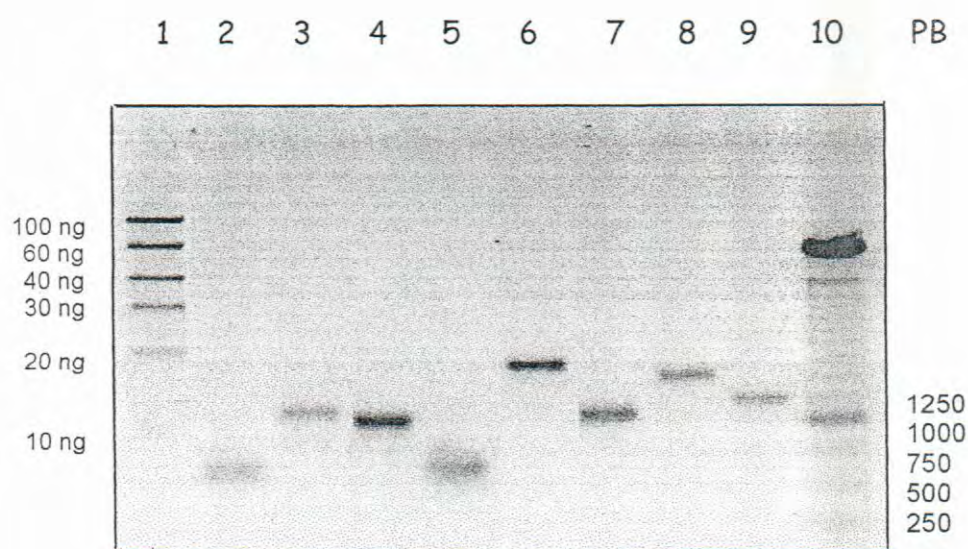


Figura 4 - Gel de agarose contendo as marcas RAPD reamplificados com Pfu (Cada fragmento leva o nome do “primer” que o gerou). 1 – Quantificador de DNA, 2 - OPN 09 B1, 3 - OPD 20 B1, 4 - OPAF 17 B1, 5 – OPS 03 B2, 6 - OPAF 17 B2, 7 - OPS 03 B1–, 8 – OPO 10 B2, 9 – OPO 10 B1, 10 - Padrão de DNA com fragmentos variando em 250 pb (banda escura – 1000 pb). PB – Pares de Base.

A partir deste gel, as bandas contendo o DNA foram isoladas e purificadas, tomando-se áptas à clonagem.

4.2 – Clonagem

Os fragmentos reamplificados, mostrados na figura 4, foram purificados e ligados a vetores de clonagem pBluescript II KS previamente linearizados através da digestão com a enzima Eco RV. Após ligação vetor + fragmento, transformações foram feitas e a seleção dos clones positivos, conduzidas em meio de crescimento contendo X-gal (Figura 5). A figura 5 ilustra a clonagem e seleção visual da marca OPS 03 B2, ausente apenas no genitor UENF 1594.

Os mesmos procedimentos descritos anteriormente (purificação dos fragmentos de DNA, ligação com o vetor, transformação com *E. coli* e seleção dos clones positivos) foram feitos para as outras sete marcas RAPD restantes.

A porcentagem de sucesso na obtenção de clones positivos diferiu grandemente entre os fragmentos RAPD, não sendo possível estabelecer relações do tipo tamanho do fragmento/ porcentagem de sucesso. Isso sugere que o fator determinante do sucesso da ligação e da transformação foi o grau de pureza obtido no processo de extração de DNA do gel de agarose. Fragmentos que ficaram mais diluídos, e portanto necessitaram de um volume maior na reação de ligação, apresentaram um rendimento, em termos de sucesso de clonagem, menor.

Após a obtenção de clones de todas as oito marcas RAPD, os mesmos foram avaliados no sentido de se confirmar a presença do inserto.

A partir da dupla digestão do DNA plasmidial das colônias positivas (brancas) com as enzimas Eco RI e Xho I houve a liberação do fragmento OPS 03 B2 (Figura 6). Através desta figura pôde ser observado a liberação de um fragmento de aproximadamente 650 pb, visualizado em 3 das 5 colônias, até então, potencialmente positivas para os clones contendo tal inserto.

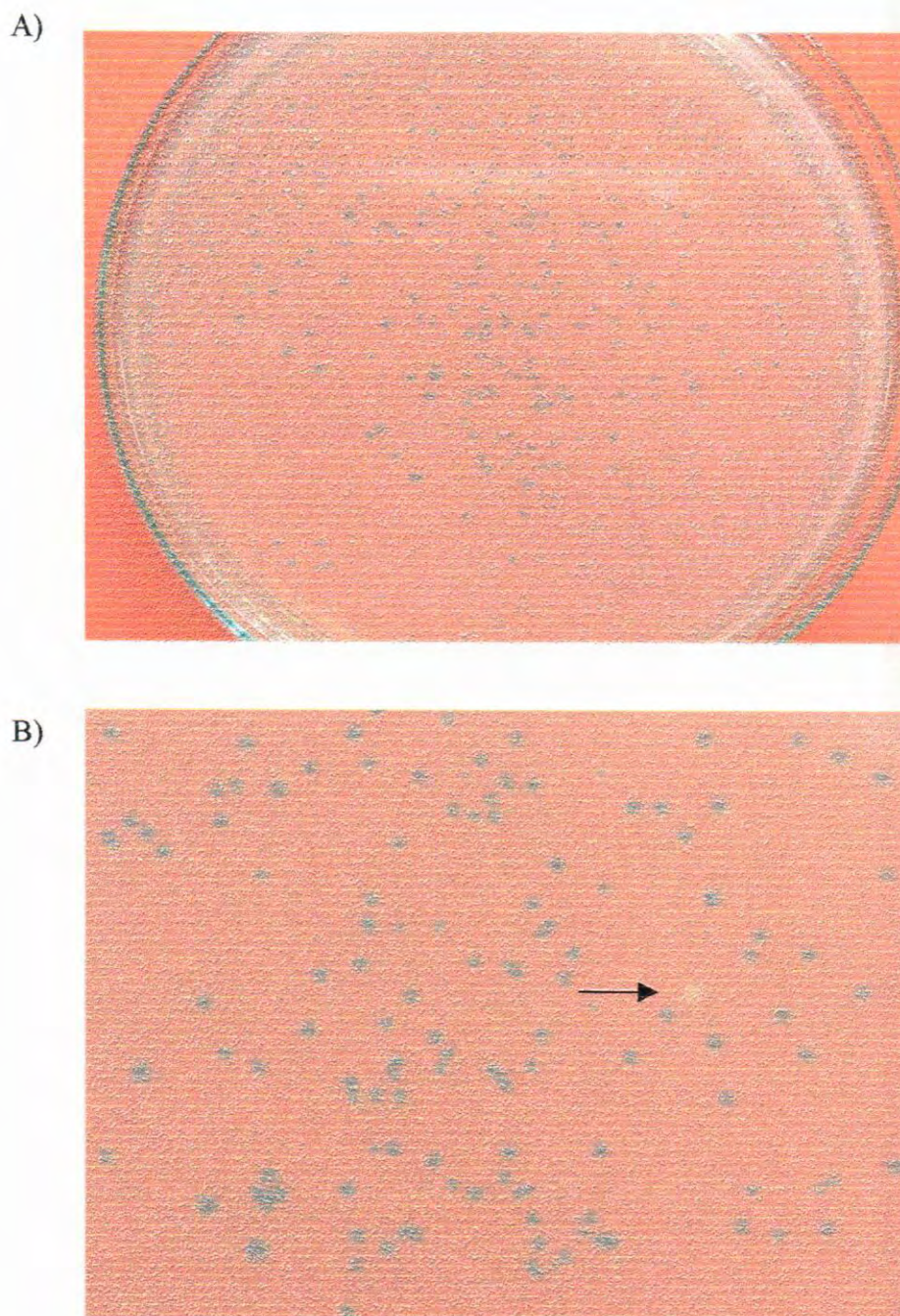


Figura 5 – Placas de Petri contendo meio sólido LB com colônias de *E. coli* XL 1-Blue transformadas com pKS ligado ao fragmento OPS 03 B2 (ausente apenas no genótipo UENF 1594). A) Visão geral da placa e B) Visão ampliada. Seta indica colônia potencialmente positiva (branca).

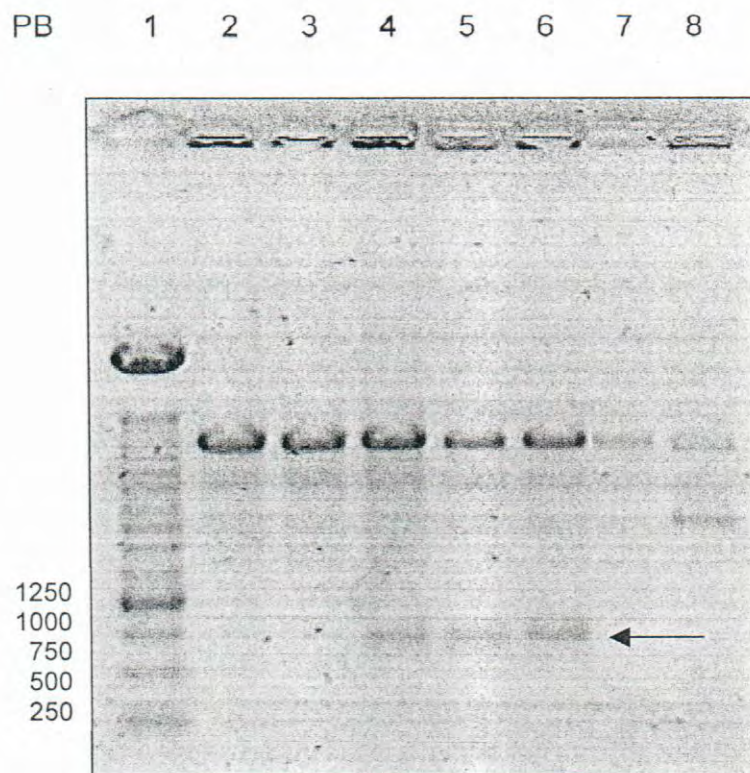


Figura 6 – Gel de agarose mostrando a liberação de fragmentos clonados (seta) em colônias de *E. coli* XL1 – Blue transformadas com pKS contendo estes insertos. As colônias foram submetidas a dupla digestão com Eco RI e Xho I para liberação dos fragmentos. 1-DNA marcador de 250 pb; 2 e 3 - colônias não transformadas (sem liberação do fragmento); 4 a 6 – clones contendo inserto OPS 03 B2; 7 – pKS digerido com Eco R V, 8 – pKS íntegro. PB – Pares de Base.

Como a figura 6 ilustra, os clones referentes às raias 2 e 3 não liberaram os fragmentos, apesar de serem colônias brancas. Estas colônias são as chamadas falso-positivas, ou seja, não possuem o inserto. Uma das explicações para a presença de colônias falso-positivas é a possível ligação que ocorra entre dois plasmídeos lineares sem a presença do inserto.

O plasmídeo utilizado possui uma pequena parte do gene da β -galactosidase e um trecho de DNA chamado de sítio de clonagem múltipla, que contém vários sítios-alvos de restrição utilizados para inserir fragmentos de DNA exógenos (Figura 1).

As células de *E. coli* utilizadas no processo de transformação também possuem o gene da β -galactosidase em seu DNA cromossômico. Quando o plasmídeo pKS é inserido nestas células ocorre uma complementação no qual as proteínas parciais codificadas pelos dois genes (plasmídeo e célula de *E. coli*) se unem para formar uma β -galactosidase funcional (GRIFFITHS *et al.*, 2000).

A inserção de fragmentos de DNA neste plasmídeo pode ser detectada pela inativação do gene responsável pela produção da β -galactosidase proveniente do plasmídeo pKS, resultando na incapacidade para converter o substrato artificial X-Gal em um produto de cor azul.

Para os clones referentes ao fragmento OPS 03 B2 da figura 6 (raias 2 e 3), provavelmente houve a ligação de um plasmídeo linear com outro. Isto fez com que houvesse uma modificação na seqüência de leitura do DNA que codificava a enzima β -galactosidase, não sendo esta mais produzida, resultando em colônias brancas.

Desta forma, a confirmação entre clones positivos e falso-positivos deve ser efetuada após a extração do plasmídeo, através da dupla digestão e eletroforese para visualização da liberação do inserto.

Para a clonagem dos demais fragmentos foram feitos os mesmos procedimentos de transformação, seleção dos recombinantes e confirmação da presença do inserto.

A figura 7 evidencia a liberação dos insertos para os clones obtidos das marcas OPN 09 B1 (700 pb), exclusiva para o genótipo UENF 1593 e seus híbridos; OPD 20 B1 (1200 pb), que identifica UENF 1594 ('Formosa') e seus híbridos; OPO

10 B1 (1300 pb), presente apenas nos genótipos UENF 1590 e 1591 ('Solo'); OPAF 17 B2 (1700 pb), que caracteriza UENF 1589,1590 e 1592 ('Solo') e seus híbridos.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

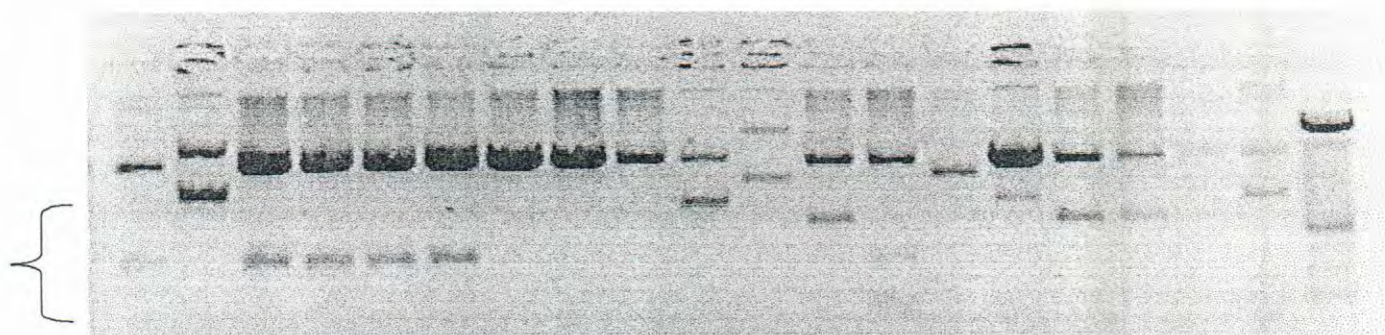


Figura 7 – Gel de agarose mostrando a liberação de fragmentos clonados (chave) em colônias de *E. coli* DH5 α transformadas com pKS contendo diferentes insertos. 1 a 6 – clones contendo inserto OPN 09 B1 (notar em 2 a não digestão do plasmídeo), 7, 8, 9 e 14 - colônias não transformadas, 10 a 13 – clones contendo inserto OPD 20 B1 (notar em 11 a não digestão do clone), 15 – clone contendo fragmento OPO 10 B1, 16 e 17 – clones contendo fragmento OPAF 17 B2, 18 - pKS digerido com ECO RV, 19 – pKS íntegro, 20 -DNA marcador de 250 pb.

Como pode ser visualizado nas figuras 6 e 7, para cada marca foram obtidos números diferentes de clones (Tabela 2).

Tabela 2 – Listagem com as oito marcas RAPD capazes de diferenciar os genótipos de mamão com seus respectivos tamanhos em pares de base (pb) e o número de clones obtidos.

Marcas RAPD	Tamanho (pb)	Número de Clones
OPS 03 B2	650	3
OPN 09 B1	700	5
OPAF 17 B1	950	1
OPS 03 B1	1100	1
OPD 20 B1	1200	9
OPO 10 B1	1300	1
OPO 10 B2	1500	2
OPAF 17 B2	1700	2

Após a determinação dos clones positivos (em número total de vinte e quatro), os mesmos foram purificados, como descrito no item 3.2.3.7.

A partir destas clonagens, trabalhos futuros serão realizados no sentido de sequenciar os fragmentos, e "primers" específicos serão sintetizados, possibilitando o desenvolvimento de marcas SCAR".

Baseados nos marcadores SCARs poderemos garantir com segurança a identificação dos genótipos estudados, quando em comparação com os demais materiais já existentes no Brasil. Adicionalmente, as marcas SCAR poderão auxiliar no monitoramento do grau de pureza das sementes a serem produzidas e comercializadas.



CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

Foi possível proceder com sucesso a clonagem das marcas RAPD capazes de diferenciar os genótipos dos parentais e híbridos de mamão em estudo.



BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

- AGRINUAL (2002) Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 535p.
- ALVES, F. L. (2003) A cultura do mamão *Carica papaya* L. no mundo. In.: MARTINS, D. S.; COSTA, A. F. S. (Eds) A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção. Vitória-ES, p. 13-30.
- AWADA, M. (1958) Relationships of minimum temperature and growth rate with sex expression of papaya plants (*Carica papaya* L.). Hawaii Agricultural Experiment Station, 16p.
- BADILLO, V. M. (1971) Monografía de la familia Caricaceae. Maracay, Venezuela: Editora Nuestra América C. A., 22p.
- BALBINOT, E.; SILVA, R. F. Da.; BERBERT, P. A. (2004) Secagem de sementes e manejo dos frutos de mamão (*Carica Papaya* L.). In: Boletim técnico da II Reunião de Pesquisa do Fritimamão do Norte/Noroeste fluminense, Campos dos Goytacazes, 91p.
- BAUM, B. R.; MECHANDA, S.; LIVESEY, J. F.; BINNS, S. E.; ARNASON, J. T. (2001) Predicting quantitative phytochemical markers in single Echinaceae plants or clones from their DNA fingerprints. *Phytochemistry* 56:543 – 549.
- BAUM, B. R.; MECHANDA, S.; SOLEIMANI, V. (2000) Identification of Canadian six row barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars with primers derived from STSs obtained from RAPD diagnostic bands. *Seed Science and Technology* 28 (2): 445 – 466.

- BHAT, G. P.; SUROLIA, N. (2001). In vitro antimalarial activity of extracts of three plants used in the traditional medicine of India. *Am. J. Med. Hyg.* 65 (4): 304-308.
- BRESSAN-SMITH, R. E. (1998) Mapeamento de locos de características quantitativas associadas com a morfologia, a fotossíntese e o rendimento do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Tese (doutorado em produção vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 99p.
- CATTANEO, L. F. (2001) Avaliação da divergência genética e análise de gerações em mamoeiro (*Carica papaya* L.). Tese (doutorado em produção vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 94p.
- DANTAS, L.L.D.; DANTAS, A.C.V.L.; LIMA, J.F. (2002) Mamoeiro. *In: Bruckner, C.H. Melhoramento de fruteiras tropicais.* Viçosa: UFV, p. 309-349.
- DANTAS, J. L. L.; CASTRO NETO, M. T. (2000) Aspectos Botânicos e Fisiológicos. *In: Trindade, A. V. Mamão. Produção: aspectos técnicos.* Brasília: EMBRAPA – CNPMFT, p. 11-14.
- FAO (Food Agriculture Organization), (2001): productions yearbook. Rome: FAO, 1999. v. 53, p. 179.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. (1995) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2ed. Brasília: EMBRAPA – CENARGEN, 1995. pp. 220.
- FLATH, R. A.; FORREY, R. R. (1977) Volatile components of papaya (*Carica papaya* L., Solo variety). *J. Agric. Food Chem.* 25: 103 – 109.

- GIACOMETTI, D.C.; FERREIRA, F. R. **(1988)** Melhoramento genético do mamoeiro no Brasil e perspectivas. In: Simpósio Brasileiro Sobre Cultura do Mamoeiro 2., Jaboticabal, SP. Anais... Jaboticabal, SP: FCAV-UNESP, p.363-370.
- GRIFFITHS, A. J. F.; SUZUKI, D. T.; MILLER, J. H.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M. **(2000)** Introdução à Genética. 7º ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S. A., p. 345-350.
- JOLY, A. B. **(1993)** Botânica: Introdução à taxonomia vegetal. 11ªed. São Paulo, Nacional, 777 p.
- HAYMES, K. M.; VAN de WEG, W. E.; ARENS, P.; MAAS, J. L.; VOSMAN, B.; DEN NIJS, A. P. M. **(2000)** Development of SCAR markers linked to a *Phytophthora fragariae* resistance gene and their assessment in European and North American strawberry genotypes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 125 (3): 330-339.
- HOROVITZ, S.; ZERPA, D. M. ARNAL, H. **(1953)** Freqüências de equilibrio de las formas sexuales em poblaciones de *Carica papaya* L. *Agricultura Tropical, Venezuela*, v.3, n.3, p. 149-155.
- JIANG, C.; SINK, K. **(1997)** RAPD e SCAR markers linked to the sex expression locus M in asparagus. *Euphytica*, v. 94, p. 329-332.
- LOHIYA, N. K.; PATHAK, N.; MISHARA, P. K.; MANIVANNAN, B. **(2000)**. Contraceptive evaluation and toxicological study of aqueous extract of the seeds of *Carica papaya* in male rabbits. *Journal of Ethnopharmacology* 70: 17 – 27.
- LUNA, J. V.U. **(1976)** Comportamento de variedades e seleções de mamoeiro (*Carica papaya* L.) no estado da Bahia. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura 3., (1975 – Rio de Janeiro). Anais...Campinas: SBF, v.2, p. 525 – 533.

- MARIN, S. L. D.; GOMES, J. A. **(1999)** Biologia floral do mamoeiro: aplicação na sexagem e no raleio de flores e frutos. Vitória, E.S. Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuária, 19p. (EMCAPA. Circular Técnica).
- MARIN, S. L. D.; GOMES, J. A. **(2000)** Técnicas de Cultivo do Mamão. In: SALES, R. de O. Semana Internacional de Fruticultura e Agroindústria, 7., Fortaleza: SINDIFRUTA – FRUTAL, 5p.
- MILACH, S. C. K. **(1999)** Disponibilidade de técnicas moleculares para a identificação varietal. *Calidad genética y sanitaria: un instrumento para la competitividad de la cadena agroindustrial - IICA-PROCISUR*. 1: 32-35.
- MILACH, S. C. K. **(1998)** Principais Tipos de Marcadores Moleculares e Suas Características. In: S. C. K. Milach (ed). *Marcadores Moleculares em Plantas*. Porto Alegre, UFRGS, p. 17-28.
- NASCIMENTO, A. A. C.; ESPREAFICO, E. M.; LARSON, M. L. P.; MONEÉIS, N.; ROSSI, N. M. M.; RODRIGUES, V. **(2003)** Tecnologia do DNA Recombinante. Ribeirão Preto, SP. Universidade de São Paulo – USP/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 3p.
- PARASNIS, A. S.; GUPTA, S. A.; TAMHANKAR & RANJEKAR, P. K. **(2000)** A highly reliable sex diagnostic PCR assay for mass screening of papaya seedlings. *Molecular Breeding* 6: 337-344.
- PEREIRA, M. G. **(2003)** caracterização do padrão de amadurecimento de frutos de mamão (*Carica papaya* L.) do programa de melhoramento do mamoeiro da UENF: conteúdo de pigmentos. In: Boletim técnico da II Reunião de Pesquisa do Fritimamão do Norte/Noroeste fluminense, Campos dos Goytacazes, 163p.

- PÉREZ, E. G. (2004) Melhoramento Genético do Mamoeiro (Doutorando em Produção Vegetal e bolsista de CONACYT-CP, MEXICO, FCAV-UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.
- RAFALSKI, J. A. (2002) Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches. *Plant Science* 162: 329 – 333.
- RUGGIERO, C.; DURIGAN, J.F.; GOES, A.; NATALE, W.; BENASSI, A.C. (2003) Panorama da cultura do mamão no Brasil e no mundo: situação atual e tendências. In: *Papaya Brasil: Qualidade do mamão para o mercado interno*, Vitória, ES, Incaper, v.1. 728p. (Anais 1º Simpósio Papaya Brasil).
- SANTOS, A. S. (2000) Marcador de DNA no melhoramento genético do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) visando resistência à *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Tese (doutorado em produção vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 140p.
- SHARON, D.; ADATO, A.; MHAMEED, S.; LAVI, U.; HILLEL, J.; GOMOLKA, M.; EPPLER, C.; EPPLER, J. T. (1995) DNA fingerprintis in plants using simple-sequence repeat and minisatellite probes. *Hortscience* 30 (1): 109 – 112. 1995
- SONDUR, S. N.; MANSARDT, R. M.; STILES, J. I. (1996) A genetic linkage map of papaya based n randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theoretical and Applied Genetics* 93 (4): 547 – 553.
- SOUZA, J. S. (2000) Aspectos socioeconômicos. In: Trindade, A. V. *Produção de mamão: aspectos técnicos*. Brasília: EMBRAPA-CNPMT, 10p.
- URASAKI, N.; TOKUMOTO, M.; TORORA, K.; BAN, Y.; KAYANO, T.; TANAKA, H.; OKU, H.; CHINEN, I.; TERAUCHI, R. (2002). A male and hermaphrodite specific RAPD markers for papaya (*Carica papaya* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 104 (2-3): 281 – 285.

- VIDAL, J. R.; DELAVault, P. COARER, M.; DEFONTAINE, A. **(2000)** Design of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivar-specific SCAR primers for PCR fingerprinting. *Theoretical and Applied Genetics* 101 (8): 1194 – 1201.
- VITÓRIA, A. P.; SOUZA FILHO, G. A.; BRESSAN-SMITH, R.E.; PINTO, F.O.; PAIVA, L.B.; GUIMARÃES, P.S.; ABREU DE OLIVEIRA, M.P.; DAHER, R.F.; PEREIRA, M.G. **(2004)** DNA Fingerprint of *Carica papaya* L. Genotypes by RAPD Markers. *Journal of New Seeds*. 6 (1): 51-65.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELICK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TIGEY, S. V. **(1990)** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531 – 6535.
- WILLS, R. B. H.; WIMALASIRI, P.; GREENFIELD, H. **(1984)** Dehydroascorbic acid levels in fresh fruit and vegetables in relation to total vitamin C activity. *J. agric. Food Chem.* 32: 836-838.
- XU, H.; WILSON, D. J.; ARULSEKAR, S.; BAKALINSKY, A. T. **(1995)** Sequence-specific polymerase chain-reaction markers derived from randomly amplified polymorphic DNA markers for fingerprints grape (*Vitis*) rootstocks. *Journal of the American Society for Horticulture Science* 120 (5): 714 – 720.



ANEXO

DNA Fingerprint of *Carica papaya* L. Genotypes by RAPD Markers

Angela Pierre Vitória
Gonçalo Apolinário de Souza Filho
Ricardo Enrique Bressan-Smith
Fernanda Oliveira Pinto
Luisa Brito Paiva
Paula Souza Guimarães
Michelle de Paula Abreu de Oliveira
Rogério Figueiredo Daher
Messias Gonzaga Pereira

ABSTRACT. DNA fingerprints and phylogenetic relationships were established for ten *Carica papaya* L. genotypes based on RAPD markers. The plant materials included seven parents from the Solo and

Angela Pierre Vitória is Post-Doctoral Student, Laboratory for Plant Genetics and Breeding, Norte Fluminense State University, 28015-620 Campos (RJ), Brazil.

Gonçalo Apolinário de Souza Filho is Associate Professor, Laboratory Biosciences and Biotechnology, Norte Fluminense State University, 28015-620 Campos (RJ), Brazil.

Ricardo Enrique Bressan-Smith and Messias Gonzaga Pereira are Associate Professors, Laboratory for Plant Genetics and Breeding, Norte Fluminense State University, 28015-620 Campos (RJ), Brazil.

Fernanda Oliveira Pinto, Luisa Brito Paiva, Paula Souza Guimarães, and Michelle de Paula Abreu de Oliveira are Undergraduate Students, Norte Fluminense State University.

Rogério Figueiredo Daher is Researcher of Plant Production, Laboratory for Plant Genetics and Breeding, Norte Fluminense State University, 28013-602 Campos (RJ), Brazil.

Address correspondence to: Messias Gonzaga Pereira, Universidade Estadual do Norte Fluminense-CCTA, 28015-620 Campos (RJ), Brasil (E-mail: messias@uenf.br).

The authors are grateful to Calimam Agrícola. This work was supported by FAPERJ and FINEP.

Formosa groups and three hybrids from the cross between these two groups. Some genotypes could be fingerprinted by the presence or absence alone of some bands, but in general the DNA fingerprint could only be obtained by a set of RAPD markers. The phylogenetic analyses showed greater similarity among the parents of each group and the intermediary position of the hybrids, as expected. [Article copies available for a fee from The Haworth Document Delivery Service: 1-800-HAWORTH. E-mail address: <docdelivery@haworthpress.com> Website: <<http://www.HaworthPress.com>> © 2004 by The Haworth Press, Inc. All rights reserved.]

KEYWORDS. RAPD, "DNA fingerprints," *Carica papaya*, phylogenetic relationships

INTRODUCTION

The papaya (*Carica papaya* L.) is one of the main crops in tropical and subtropical regions of the world. Besides fruit consumption *in natura*, the use of the milky juice is also reported in cooking as a meat tenderizer due to its proteolytic action and in popular medicine as an anti-malaria drug (Bhat and Surolia, 2001). It was also found that seeds have an spermicide effect and that the unripe fruit is widely used by women in Sri Lanka as a contraceptive (Pathak et al. 2000; Lohiya et al. 2000).

The papaya tree was first mentioned in Europe in 1535 by the Spaniard G. H. de Viedo in his book, *The general and natural history of the Indies* (De Candolle quoted by Lassoudière, 1968). Since then the papaya has been cultivated and in the last century several breeding programs improved the crop.

Currently there are two large groups of papaya used extensively in breeding programs: Solo, from Hawaii with small fruit weighing about 0.5 kg and Formosa from China, whose fruit weighs from 0.8 to 2 kg. The Hawaiian solo produced today is the result of about three centuries' research, whose data enabled the breeding of the papaya in various regions of the world. This is the only group of papaya with small fruits that have remained stable over many years in the various locations where they are cropped (Mekako and Nakasone, 1976).

Recently DNA marker technology has allowed precise indication of the genetic variations present in the DNA in any organism. The use of DNA markers has helped genetic papaya breeding programs by providing information on sexing (Urasaki et al. 2002; Sondur et al. 1996), link-

age map (Sondur et al. 1996), QTLs (Sondur et al. 1995), and DNA fingerprint (Sharon et al. 1992). Other applications for these markers would be in determining the genetic purity of seeds, systematized germplasm sampling and phylogenetic analyses (Sharon et al. 1992).

Sharon et al. (1992) used DNA fingerprints detected by microsatellite probes (CA)₁₂ and (GTG)₅ and minisatellites for identification and genetics analysis in papaya and another nine species of the *Carica* species. The results suggested that these techniques were efficacious in identifying hybrid species in papaya. Later, Sharon et al. (1995) obtained DNA fingerprints for papaya by hybridization by Southern Blot with probes (GAT)₄ and (GACA)₄.

RAPD markers (Williams et al. 1990) have been used for genetic analysis and genome characterization for cultivated plants (Sawazaki et al. 2002; Devos and Galé, 1992). RAPD has been widely used in plant genetic research, including papaya, because it is easy to perform and generates considerable polymorphism. This fact is especially important in papaya where the available genetic variability is limited (Stiles et al. 1993).

On this investigation, ten papaya genotypes were used in order to generate DNA fingerprints aiming the correct identification of progenitors and their respective hybrids as well as to monitor the genetic purity of the hybrid seeds and yet to establish the genetic divergence in these materials.

MATERIALS AND METHODS

Genetic Material

Seven progenitors and three hybrids of papaya (*Carica papaya* L.) were utilized in the experiments. Five of the progenitors belong to Solo group, in S2 generation: UENF 1589, UENF 1590, UENF 1591, UENF 1592 and UENF 1593, and two belong to Formosa group, in S2 generation: UENF 1594, UENF 1595. The three hybrids (UENF 1596, UENF 1597 and UENF 1602) were originated from the crosses between UENF 1589 × UENF 1594, UENF 1590 × UENF 1594 e UENF 1592 × UENF 1595, respectively, and are registered in the Agricultural Ministry named as UENF/CALIMAM 01, UENF/CALIMAM 02, and UENF/CALIMAM 07, respectively.

Young leaves of each genotype were harvested directly from plants grown in the field, frozen immediately in liquid N₂ and stored at -70°C until DNA extraction. The study was carried out at the Laboratory of Plant Genetic Breeding at the Center of Agricultural Sciences and Technologies at the North Fluminense State University (LMGV/CCTA/UENF) in Campos dos Goytacazes, RJ.

DNA Extraction

Approximately 500 mg of squashed material from the leaf blades was transferred to 1.5 ml eppendorf. DNA was extracted according to the protocol by Doyle and Doyle (1987) with modifications; 1000 µl of pre-heated extraction buffer containing 1% CTAB, 1.4 mol L⁻¹ NaCl were added to the tube containing 1% CTAB, 1.4 mol L⁻¹ NaCl, 20 mmol L⁻¹ EDTA, 100 mmol L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0), 1% PVP and 0.1% 2-mercaptoetanol. It was incubated at 65°C for 30 to 40 minutes and gently shaken every 10 minutes. It was then centrifuged at 13400×g for five minutes. The supernatant (600 µl) was transferred to new tubes and an equal volume of chloroform:isoamyl alcohol (24:1) was added and continually inverted until an emulsion formed. This step was repeated, and after new centrifuging, the supernatant was transferred to new tubes and chilled isopropanol was added, with gentle inversion and placed overnight in the refrigerator. It was centrifuged at 13400 g for 10 minutes, and a pellet obtained (precipitate) that was washed twice in 300 µl 70% ethanol and once in 300 µl 95% ethanol, dried under natural conditions, re-suspended in 200 µl Tris-EDTA solution (10 mmol L⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol L⁻¹ EDTA, pH 8.0) and incubated with RNase at a final concentration of 40 µg/ml at 37°C for 30 minutes. After adding 20 µl NaCl 5 mol L⁻¹ and 140 µl chilled isopropanol the mixture was incubated for one night at 42°C. It was then centrifuged at 13400×g for 10 minutes, dried and finally the pellet was re-suspended in 200 µl of TE solution. The DNA concentration in the samples were estimated directly in 0.8% agarosis gel, by comparing with the known concentrations of the plasmid pGEM-11Zf (Promega Biotech).

Polymerase Chain Reaction

The amplification reactions were carried out according to Williams et al. (1990) modified in a final volume of 25 µl containing the reagents at the following concentrations 10 mmol L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.3; 50 mmol L⁻¹ KCl; 2.4 mmol L⁻¹ MgCl₂; 100 µM dATP, dCTP, dGTP, and dTTP; 0.3 µM primer; 20 ng genomic DNA and a unit of *Taq* DNA

polymerase (Pharmacia Biotech, EUA). A thermal cycler was used (Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600) programmed for 95°C for 1 minute followed by 45 cycles: one minute cycles at 94°C, 1 minute at 36°C and 2 minutes at 72°C and a final step for extension of 7 minutes at 72°C, using the fastest temperature transition mode available (1°C/1seg.). The amplification products (bands) were analyzed by electrophoresis and visualized after staining by ethidium bromide.

Thirty primers (Gibco BRL Life Technologies) were utilized, as follows: OPD 02, OPD 20, OPE 06, OPF 12, OPG 10, OPN 09, OPO 10, OPO 15, OPR 03, OPR 15, OPS 03, OPS 12, OPW 02, OPAA 12, OPAA 17, OPAB 01, OPAE 01, OPAE 04, OPAE 05, OPAF 07, OPAF 17, OPAG 03, OPAG 11, OPAH 04, OPAH 14, OPAH 18, OPAI 01, OPAI 03, OPAI 05, OPAI 13.

Each RAPD marker was named in function of the respective primer. When the same primer generated more than one marker, they were distinguished by using the differential a, b or c.

Band Score and Data Analysis

The RAPD profiles of each genotype were obtained by the presence (1) or absence (0) of high intensity bands and the complement of the Nei and Li index (1-IAB) (Nei & Li, 1979) was calculated as $IAB = 2a/(2a + b + c)$ where: a = number of bands present in both accessions, simultaneously; b = number of bands present only in accession A; c = number of bands present only in accession B.

Statistical Analysis

Hierarchical clustering methods (closest neighbor) were used and optimization proposed by Tocher based on the matrix obtained from the arithmetical complement of the Nei and Li similarity index (1979). The statistical analyses were performed by the programs GENES, 0.1.0 version and STATISTICA version 95 (Statsoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

DNA Fingerprint

Forty-nine polymorphic RAPD markers were generated, capable of distinguishing among the ten genotypes. Nineteen of these presented

the same function and could differentiate only between the two groups of parents, Solo and Formosa. Fifteen of these markers were exclusive to the Formosa genotypes (UENF 1595 and UENF 1594) and consequently their hybrids. The other four markers were common to all the genotypes in the Solo group and their respective hybrids. Thus any one of these 19 markers was efficient in differentiating between the two groups of parents, but could not differentiate among the genotypes of the parents and the hybrids (because they are common to all) (Table 1).

Further to the differentiation among the groups of parents, other RAPD markers also enabled differentiations among the ten genotypes. This molecular characterization could be done based on three situations: (1) presence of RAPD markers capable of differentiating a certain genotype and its hybrids from the other genotypes; (2) by a set of markers for each genotype or (3) due to the absence of some RAPD markers in certain genotype.

Among the genotypes that could be differentiated from the others by only one marker we can mention the UENF 1594 parent and its hybrids that could be identified because they were the only ones that possessed the OPD20 marker (Figure 1-arrows). The marker OPO 10 is also included in this category, present only in the Solo parents UENF 1591 and UENF 1591 (Figure 2-arrows).

In our study, the absence of RAPD markers also could characterize a certain genotype, as in the case of the parent Formosa UENF 1595 that was easily distinguished from the other genotypes by the absence of several markers: OPE 06 (Figure 3), OPR 15, OPAI 03, OPF 12a, OPO 15a (photographs not shown). However, as these markers were present in all the other genotypes, they were not efficient in distinguishing among the hybrids, because all present the marker derived from the other parent (Solo).

Although we could differentiate some genotypes by the presence or absence of bands, most of the differentiations were possible only when a set of markers was used. This strategy was very useful in identifying most of the Solo parents and all the hybrids. The hybrids could be identified using a set of five markers shown in Table 2 that lists seven markers. But some have the same function, such as OPD 20 and OPAH 14 that differentiated UENF 1596 and UENF 1597 from UENF 1602; and OPAF 07 and OPAH 17a that differentiate UENF 1596 and UENF 1602 from UENF 1597.

Table 3 lists the RAPD markers developed to establish the differentiation among the parents. It is important to point out that in some cases only one marker characterized the genotype, as was the case of OPD 20,

TABLE 1. RAPD-PCR markers exclusive to the progenitors Formosa (UENF 1594 and UENF 1595) and Solo (UENF 1591, UENF 1589, UENF 1590, UENF 1593, and UENF 1592), detected in all papaya hybrids (UENF 1592 × UENF 1595, UENF 1589 × UENF 1594, and UENF 1590 × UENF 1594).

UENF 1591	SOLO				HYBRIDS				FORMOSA	
	UENF 1589	UENF 1590	UENF 1593	UENF 1592	UENF1592 × UENF 1595	UENF 1589 × UENF 1594	UENF 1590 × UENF 1594	UENF 1594	UENF 1595	
					OPD02	OPD02	OPD02	OPD02	OPD02	
					OPG10	OPG10	OPG10	OPG10	OPG10	
					OPG10 b	OPG10 b	OPG10 b	OPG10 b	OPG10 b	
					OPN09a	OPN09a	OPN09a	OPN09a	OPN09a	
					OPO15	OPO15	OPO15	OPO15	OPO15	
					OPS12	OPS12	OPS12	OPS12	OPS12	
					OPB17	OPB17	OPB17	OPB17	OPB17	
					OPAE05 a	OPAE05 a	OPAE05 a	OPAE05 a	OPAE05 a	
					OPAF17 b	OPAF17 b	OPAF17 b	OPAF17 b	OPAF17 b	
					OPAG11	OPAG11	OPAG11	OPAG11	OPAG11	
					OPAH04 a	OPAH04 a	OPAH04 a	OPAH04 a	OPAH04 a	
					OPAH18 a	OPAH18 a	OPAH18 a	OPAH18 a	OPAH18 a	
					OPAH18 b	OPAH18 b	OPAH18 b	OPAH18 b	OPAH18 b	
					OPAH18 c	OPAH18 c	OPAH18 c	OPAH18 c	OPAH18 c	
					OPA101	OPA101	OPA101	OPA101	OPA101	
OPS03	OPS03	OPS03	OPS03	OPS03	OPS03	OPS03	OPS03			
OPAB01 b	OPAB01 b	OPAB01 b	OPAB01 b	OPAB01 b	OPAB01 b	OPAB01 b	OPAB01 b			
OPAH04	OPAH04	OPAH04	OPAH04	OPAH04	OPAH04	OPAH04	OPAH04			
OPAH18	OPAH18	OPAH18	OPAH18	OPAH18	OPAH18	OPAH18	OPAH18			

a, b, c – When the primer produced two or more polymorphic fragments, we used a letter following the primer code.

FIGURE 1. RAPD-PCR fragments amplified from OPD20 primer in papaya plants, derived from UENF 1594 genotype and two hybrids (UENF 1594 \times UENF 1589 and UENF 1594 \times UENF 1590) (arrows). Lane 1-UENF 1589, lane 2-UENF 1594, lane 3-UENF 1596, lane 4-UENF 1592, lane 5-UENF 1595, lane 6-UENF 1602, lane 7-UENF 1590, lane 8-UENF 1594, lane 9-UENF 1597, lane 10-UENF 1593, lane 11-UENF 1591, lane 12-Control, lane 13-Molecular weight markers.

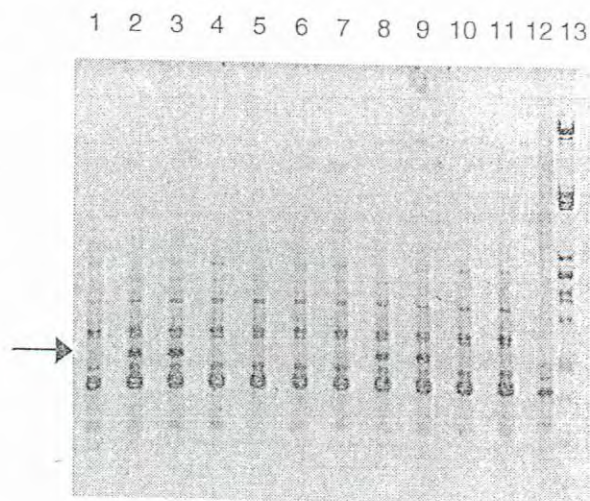


FIGURE 2. RAPD-PCR fragments amplified from OPO 10 primer in papaya plants, derived from UENF 1590 and UENF 1591 papaya genotypes (arrows). Lane 1-Molecular weight markers, lane 2-UENF 1589, lane 3-UENF 1594, lane 4-UENF 1596, lane 5-UENF 1592, lane 6-UENF 1595, lane 7-UENF 1602, lane 8-UENF 1590, lane 9-UENF 1594, lane 10-UENF 1597, lane 11-UENF 1593, lane 12-UENF 1591, lane 13-Control.

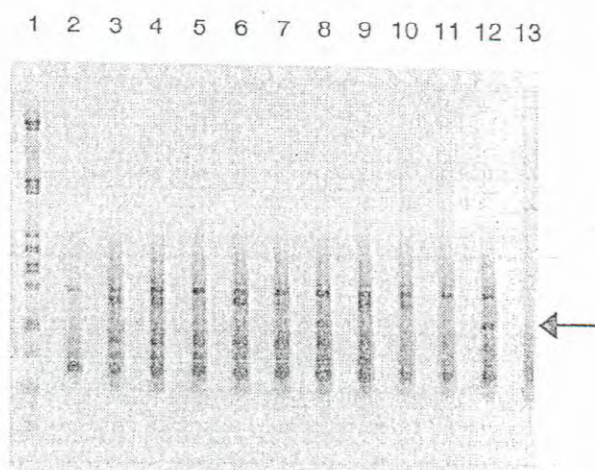


FIGURE 3. RAPD-PCR fragments amplified from OPE 06 primer. Note that an absence was detected only in the UENF 1595 papaya genotype (arrow). Lane 1-UENF 1589, lane 2-UENF 1594, lane 3-UENF 1596, lane 4-UENF 1592, lane 5-UENF 1595, lane 6-UENF 1602, lane 7-UENF 1590, lane 8-UENF 1594, lane 9-UENF 1597, lane 10-UENF 1593, lane 11-UENF 1591, lane 12-Control, lane 13-Molecular weight markers.

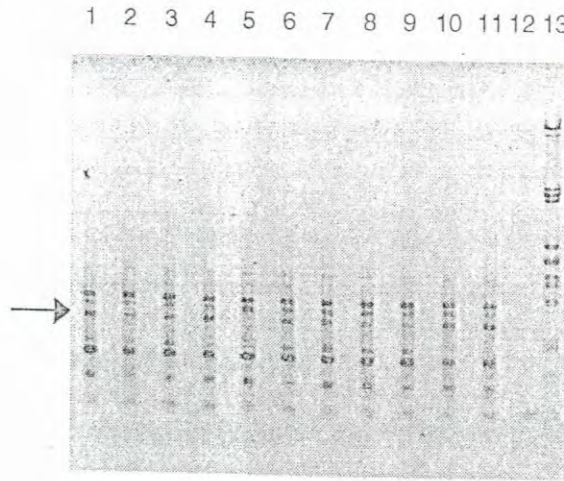


TABLE 2. Set of RAPD markers differentiating the papaya hybrids: UENF 1592 × UENF 1595, UENF 1589 × UENF 1594, and UENF 1590 × UENF 1594.

UENF 1589 × UENF 1594	UENF 1590 × UENF 1594	UENF 1592 × UENF 1595
OPD20	OPD20	
		OPF12
OPAB01a	OPAB01a	
	OPAE05	OPAE05
OPAF07		OPAF07
OPAF17a		OPAF17a
OPAH14	OPAH14	

a – When the primer produced two or more polymorphic fragments, we used a letter following the primer code.

OPR 15A OPW 02, OPAB 01A, OPAE 01, OPAH 14, OPAI 05, that belong only to the UENF 1594 parent. Other markers that can characterize a genotype are: OPF 12 for the UENF 1595 genotype, OPN 09, OPR 03, and OPAF 17 for UENF 1593.

However, in most cases more than one marker was needed to differentiate a genotype. The solo parents characterized based only on one set

TABLE 3. Set of RAPD markers differentiating the papaya progenitors: Formosa (UENF 1594 and UENF 1595) and Solo (UENF 1591, UENF 1589, UENF 1590, UENF 1593, and UENF 1592).

SOLO					FORMOSA	
UENF 1591	UENF 1589	UENF 1590	UENF 1593	UENF 1592	UENF 1594	UENF 1595
					OPD20	
OPE06	OPE06	OPE06	OPE06	OPE06	OPE06	
						OPF12
OPF12a	OPF12a	OPF12a	OPF12a	OPF12a	OPF12a	
			OPN09a			
			OPN09b			
OPO10		OPO10				
	OPO10a				OPO10a	OPO10a
OPO15a	OPO15a	OPO15a	OPO15a	OPO15a	OPO15a	
			OPR03			
OPR15	OPR15	OPR15	OPR15	OPR15	OPR15	
					OPR15a	
OPS03a	OPS03a	OPS03a	OPS03a	OPS03a		OPS03a
					OPW02	
OPAA12a	OPAA12a	OPAA12a	OPAA12a	OPAA12a		OPAA12a
OPAB01	OPAB01	OPAB01	OPAB01	OPAB01		OPAB01
					OPAB01a	
					OPAE01	
		OPAE01a		OPAE01a	OPAE01a	
	OPAE04	OPAE04			OPAE04	OPAE04
OPAE05	OPAE05	OPAE05	OPAE05	OPAE05		
	OPAF07	OPAF07		OPAF07	OPAF07	
			OPAF17			
	OPAF17a	OPAF17a	OPAF17a	OPAF17a	OPAF17a	
OPAG03a	OPAG03a	OPAG03a	OPAG03a	OPAG03a		OPAG03a
OPAG11a	OPAG11a		OPAG11a		OPAG11a	OPAG11a
					OPAH14	
OPAI03	OPAI03	OPAI03	OPAI03	OPAI03	OPAI03	
					OPAI05	
OPAI13		OPAI13			OPAI13	OPAI13
	OPAI13 a		OPAI13 a	OPAI13 a		

a -- When the primer produced two or more polymorphic fragments, we used a letter following the primer code.

of markers are UENF 1589, UENF 1591, UENF 1590, and UENF 1592 (Table 3).

The strategy of associating RAPD markers for genotype identification and differentiation has been used in pear (*Pyrus* sp.) where the DNA was amplified with 26 pairs of primers. In the same way as the Solo and Formosa groups could be easily distinguished, the authors quoted above could differentiate among eastern and western pears from 36 accessions and also identify and confirm the parents of some hybrids.

There are about 16,000 grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars and the characterization and identification of several genotypes has been carried out successfully by RAPD markers (Siles et al. 2000; Collins and Symons, 1993; Jean-Jacques et al. 1993; Buscher et al. 1993). DNA fingerprints studies still had not yet been carried out on *Carica papaya* L. by RAPD markers and were shown to be an useful tool.

Genetic Relationships

Thirty primers generated a total of 156 markers, 49 polymorphic, and 107 monomorphic (Table 4). Each primer originated from 3 to 8 markers, and the polymorphism among the genotypes was evident, as shown in the examples of RAPD marker band patterns obtained for the primers OPD20, OPO10, and OPE06 (Figures 1, 2, and 3, respectively).

Cattaneo (2001) worked with 22 papaya genotypes and used 43 primers to obtain 155 markers, 75 of which were polymorphic. In another study on papaya, in which 11 genotypes were analyzed by RAPD markers, 102 total markers were obtained (Stiles et al. 1993).

The formation of the clusters generated from the UPGMA grouping method originated the association presented in Figure 4. Two clusters were ascertained in the dendrogram where the Formosa and Solo groups were distinct and the hybrids remained in an intermediate position, but grouped closer to the Formosa genotypes. This shows the great genetic proximity among the genotypes belonging to the Solo group and suggests the proximity among the Formosa genotypes and hybrids, although the genetic composition of the hybrid material was, obviously, 50% from each parent. The greater similarity among the hybrids and the Formosa class can be easily seen by the morphological aspects, mainly in the fruit weight and shape, since these characteristics are dominant in the Formosa class.

At the DNA level, such proximity between Formosa genotypes and hybrids may be explained by the fact that the Formosa genotypes pre-

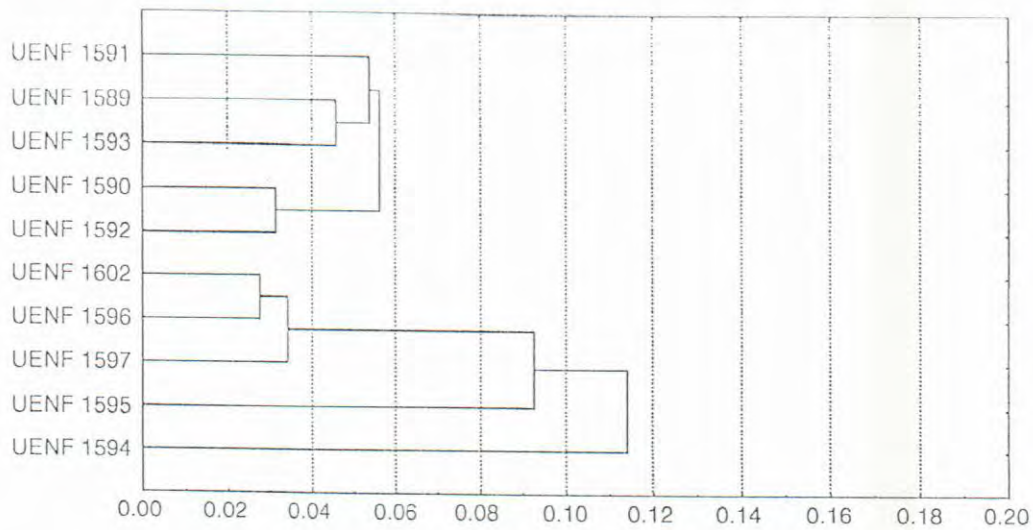
TABLE 4. Number of polymorphic and monomorphic primers obtained from Formosa (UENF 1594 and UENF 1595), Solo (UENF 1591, UENF 1589, UENF 1590, UENF 1593, and UENF 1592) or hybrids (UENF 1592 × UENF 1595, UENF 1589 × UENF 1594, and UENF 1590 × UENF 1594) of *Carica papaya* L. In the last column, the size of the fragments (bp) is shown.

Primer	Marca monom	Marca polim	Marcas totals	Tamanho marca polim (bp)
OPD 02	5	1	6	2200
OPD 20	6	1	7	1980
OPE 06	5	1	6	2000
OPF 12	2	2	4	2500/a-2100
OPG10	6	2	8	900/a-1500
OPN 09	4	2	6	2000/a-900
OPO 10	5	2	7	1900/b-2000
OPO 15	4	2	6	1200/a-2100
OPR 03	4	1	5	1100
OPR 15	3	2	5	2000/a-1000
OPS 03	2	2	4	1700/a-900
OPS 12	5	1	6	1800
OPW 02	2	1	3	2100
OPAA 12	4	1	5	2100
OPAA 17	3	1	4	950
OPAB01	3	3	6	1050/a-1200/b-2500
OPAE 01	5	2	7	2400/a-2450
OPAE 04	5	1	6	1400
OPAE 05	2	2	4	2450/a-1700
OPAF 07	2	1	3	1500
OPAF 17	4	3	7	1700/a-2100/b-1000
OPAG 03	4	1	5	1700
OPAG 11	3	1	4	1100
OPAH 04	4	3	7	2450/a-1700/b-2000
OPAH 14	6	1	7	2450
OPAH 18	1	4	5	2100/a-2050/b-1990/c-1600
OPAI 01	2	1	3	2550
OPAI 03	2	1	3	2000
OPAI 05	2	1	3	1200
OPAI 13	2	2	4	1150/a-1200
TOTAL	107	49	156	

bp: base pairs.

a, b and c – When the primer produced two or more polymorphic fragments, we used a letter following the primer code.

FIGURE 4. Dendrogram obtained by cluster analysis in several papaya genotypes (UPGMA), according to Jaccard's similarity.



sented higher proportion of band presence when in comparison to Solo genotypes. And, as RAPD markers are dominant, the bands present in Formosa as well as in Solo, are present in the hybrids.

Phylogenetic relationships have been established previously by RAPD markers, minisatellites and AFLP for some papaya genotypes, including some of those used in this study (Droogenbroeck et al. 2002; Sondur et al. 1996; Sharon et al. 1992).

Stiles et al. (1992) studied genetic diversity in ten papaya cultivars by RAPD markers and pointed to the formation of three different clusters. Wide genetic divergence was also obtained among nine papaya genotypes in the Solo and Formosa groups by RAPD markers (Cattaneo, 1999). In a recent study, RAPD markers analyses allied to techniques used to estimate the genetic distance and clustering were not efficient in discriminating the genotypes of these two groups. When the analysis was based on AFLP markers, six clusters emerged that enabled a better discrimination of the genotypes in relation to the group they belonged to. However, the integration of the RAPD markers + AFLP was more efficient in discriminating the Solo and Formosa genotypes (Cattaneo, 2001).

The *Carica papaya* L. group of genotypes studied in the present research have not yet been DNA fingerprinted via RAPD markers or any other marker. In spite of the phylogenetic proximity observed in the materials, it was possible to develop markers that could differentiate among the genotypes.

CONCLUSIONS

1. The Solo and Formosa genotypes could be clearly differentiated.
2. All the genotypes could be differentiated associating various RAPD markers.
3. The RAPD markers methodology was practical and useful in identifying papaya genotypes.
4. The genotypes studied were grouped in two clusters.

REFERENCES

- Bhat, G. P.; Surolia, N. 2001. In vitro antimalarial activity of extracts of three plants used in the traditional medicine of India. *Am. J. Med. Hyg.* 65 (4): 304-308.
- Buscher, N.; Zyprian, E.; Blaich, R. 1993. Identification of grapevine cultivars by DNA analysis: Pitfalls of random amplified polymorphic DNA techniques using 10-mer primers. *Vitis* 32: 187-188.
- Cattaneo, L. F. 2001. Avaliação da divergência genética e análise de gerações em mamoeiro (*Carica papaya* L.). Tese (doutorado em produção vegetal)-Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense-UENF, 94p.
- Cattaneo, L. F.; Daher, R. F.; Marin, S. L. D.; Pereira, M. G. 1999. Avaliação de divergência genética em mamoeiro (*Carica papaya* L.) utilizando marcadores RAPD. *Anais do Congresso Nacional de Genética*, 45, Gramado, SBG, p. 524.
- Collins, G. G.; Symons, R. H. 1993. Polymorphisms in grapevine DNA detected by the RAPD PCR technique. *Plant Mol. Biol. Rpt.* 11: 105-112.
- Devos, K. M.; Gale, M. D. 1992. The use of randomly amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 84: 567-572.
- Doyle, J. J.; Doyle, J. L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- Droogenbroeck, B. V., Breyne, P. P. Goetghebeur. 2002. AFLP analysis of the genetic relationships among papaya and its wild relatives (Caricaceae) from Ecuador. *Theoretical and Applied Genetics* 105 (2-3): 287-297.
- Jean-Jacques, I.; Defontaine, A.; Hallet, J. N. 1993. Characterization of *Vitis vinifera* cultivars by random amplified polymorphic DNA markers. *Vitis* 32: 189-190.
- Lohiya, N. K.; Pathak, N.; Mishra, P. K.; Manivannan, B. 2000. Contraceptive evaluation and toxicological study of aqueous extract of the seeds of *Carica papaya* in male rabbits. *Journal of Ethnopharmacology* 70: 17-27.
- Lassoudi'ere, A. 1968. Le papayer: description e genetique. *Fruits*, Paris 23 (11): 585-596.
- Mekako, H.U.; Nakasone, H.Y. 1976. Inheritance of eight characters in intra- and interspecific crosses among 5 *Carica* species. *ASHS* 101(1): 14-19.
- Nei, M.; Li, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 76: 5269-5273.

- Pathak, N.; Mishra, P. K.; Manivannan, B.; Lohiya, N. K. 2000. Sterility due to inhibition of sperm motility by oral administration of benzene chromatographic fraction of the chloroform extract of the seeds of *Carica papaya* in rats. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 7 (4): 325-333.
- Sawazaki, H. E.; Barbosa, W.; Colombo, C. A. 2002. Caracterização e identificação de cultivares e seleção de pereiras através de marcadores RAPD. *Ver. Bras. Frutic.* 24(2): 01-12.
- Sharon, D.; Adato, A.; Mhameed, S.; Lavi, U.; Hillel, J.; Gomolka, M.; Epplen, C.; Epplen, J. T. 1995. DNA fingerprinting in plants using simple-sequence repeat and minisatellite probes. *Hortscience* 30 (1): 109-112.
- Sharon, D.; Hillel, J.; Vainstein, A.; Lavi, U. 1992. Application of DNA fingerprints for identification and genetic-analysis of *Carica papaya* and other *Carica* species. *Euphytica* 62 (2): 119-126.
- Siles B. A.; O'Neil K. A.; Fox M. A. 2000. Genetic fingerprinting of grape plant (*Vitis vinifera*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis and dynamic size-sieving capillary electrophoresis. *J. Agr. Food Chem.* 48 (12): 5903-5912.
- Sondur, S. N.; Manshardt, R. M.; Stiles, J. I. 1996. A genetic linkage map of papaya based on randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theoretical and Applied Genetics* 93 (4): 547-553.
- Stiles, J. I.; Lemme, C.; Sondour, S.; Morshidi, M. B.; Manshardt, R. 1993. Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 85: 697-701.
- Urasaki, N.; Tokumoto, M.; Torora, K.; Ban, Y.; Kayano, T.; Tanaka, H.; Oku, H.; Chinen, I.; Terauchi, R. 2002. A male and hermaphrodite specific RAPD markers for papaya (*Carica papaya* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 104 (2-3): 281-285.
- Williams, J. G. K.; Kubelick, A. R.; Livak, K. J.; Rafalski, J. A.; Tigey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.