

## CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LINHAGENS DE ALFACE UTILIZANDO MARCADOR RAPD

Fernando Garcia<sup>1</sup>, Jordhanna Marilia Silva<sup>1</sup>, Gabriel Mascarenhas Maciel<sup>1</sup>, Ana Carolina Silva Siquieroli<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais ([garcia@ufu.br](mailto:garcia@ufu.br))

**RESUMO:** A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma das hortaliças mais cultivadas e consumidas no Brasil, desempenhando um papel fundamental na economia agrícola, em razão de sua ampla aceitação no mercado, elevado valor nutricional e significativa contribuição para a geração de empregos. Diante do crescente interesse por cultivares mais adaptadas, produtivas e resistentes a estresses bióticos e abióticos, o melhoramento genético tem se mostrado uma ferramenta essencial. Nesse contexto, a análise molecular em plantas tornou-se uma ferramenta indispensável, possibilitando a caracterização genotípica e a avaliação da variabilidade genética. Dentre os marcadores moleculares, o RAPD (*Random Amplified Polymorphic*) se destaca por sua simplicidade e baixo custo. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo a caracterização molecular de linhagens de alface por meio de marcador RAPD. Para a análise dos padrões genéticos foram utilizados os marcadores OPA13, OPC15 e OPB09. Apenas o marcador OPC15 foi capaz de detectar variabilidade genética entre os genótipos indicando que as linhagens tendem a ser heterozigotas ou homozigotas dominantes. O uso do marcador molecular RAPD revelou baixa dissimilaridade genética entre as linhagens avaliadas, limitada pelas características da própria técnica. No entanto, o método foi útil para avaliações iniciais contribuindo para a caracterização dos genótipos, importante para o desenvolvimento do Programa de Melhoramento Genético de Alface da UFU.

**Palavras-chave:** *Lactuca sativa* L., DNA genômico, melhoramento genético.

### 1 INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma das hortaliças folhosas mais cultivadas e consumidas no Brasil, ocupando posição de destaque no mercado brasileiro devido ao seu valor nutricional e grande aceitação entre os consumidores. A diversidade de tipos, formas e cores contribui para sua ampla adaptação a diferentes nichos de mercado e preferências regionais (Sala; Costa, 2012).

Nos últimos anos, tem-se observado um aumento expressivo na demanda por cultivares mais produtivas, com resistência a doenças, tolerância a estresses abióticos e maior adaptabilidade a diferentes condições edafoclimáticas. Nesse cenário, o melhoramento genético torna-se essencial para garantir a sustentabilidade, eficiência produtiva e competitividade da cadeia produtiva da alface (Spagnuolo *et al.*, 2016).

Para o sucesso de programas de melhoramento, a identificação de variabilidade genética entre os genótipos do banco de germoplasma disponível é uma etapa crucial. Essa análise permite identificar genótipos superiores, selecionar genitores divergentes para cruzamentos dirigidos, conservar recursos genéticos e ampliar a base genética utilizada em programas de seleção (Barrado, 2023).

Entre as ferramentas empregadas para esse fim, os marcadores moleculares vêm ganhando destaque por sua capacidade de detectar polimorfismos genéticos de forma precisa. Dentre os diversos tipos, os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) são amplamente utilizados em espécies olerícolas por sua simplicidade metodológica, rapidez de execução, baixo custo e por não exigirem conhecimento prévio da sequência do DNA (Nagel, 2022).

Apesar de algumas limitações, como baixa reprodutibilidade e dominância dos alelos, os marcadores RAPD continuam sendo úteis em análises iniciais de diversidade genética, especialmente em culturas com poucos recursos genômicos disponíveis, como ocorre com a alface. Tais análises fornecem subsídios importantes para a tomada de decisões em programas de melhoramento genético e conservação de germoplasma (Lacerda *et al.*, 2002).

Diante desse contexto, o presente trabalho teve como objetivo a caracterização molecular de linhagens de alface por meio de marcador RAPD, visando contribuir com informações que possam subsidiar estratégias de melhoramento genético e conservação da variabilidade dessa hortaliça.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido na Estação Experimental de Hortaliças e no Laboratório de Biotecnologia (LABIOTEC) da Universidade Federal de Uberlândia, campus Monte Carmelo – MG. Foram avaliadas cinco linhagens de alface (UFUMC12, 2: UFUMC34, 3: UFUMC53, UFUMC54, UFUMC55), provenientes do Programa de Melhoramento Genético de Alface Tropicalizada da UFU.

As linhagens foram semeadas em março de 2025 em bandejas de poliestireno de 200 células preenchidas com substrato à base de fibra de coco. Após a semeadura, as bandejas permaneceram em uma estufa por 33 dias até serem transplantados para o campo em canteiros previamente preparados. Decorridos 68 DAS folhas de cinco plantas de cada genótipo foram colhidas e levadas ao LABIOTEC onde foram lavadas e maceradas em N<sub>2</sub> líquido.

A extração do DNA foi realizada usando o método CTAB (Ferreira; Grattapaglia, 1998). Ao tecido foliar macerado foram adicionados 700 µL de tampão CTAB (NaCl 1,4M; Tris HCl pH 8,0 100 mM; EDTA 20 mM; CTAB 2%; β-Mercaptoetanol 0,2% e água Milli-Q). A solução foi incubada em banho-maria por 60 minutos a 65°C. Ao homogeneizado foram adicionados 600 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e agitado manualmente; em seguida, centrifugou-se por dez minutos a 5.220 x g. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e adicionado 400 µL de isopropanol gelado. As amostras foram submetidas à -20 °C por 24 horas e, posteriormente centrifugado por 20 minutos a 11.750 x g descartando o sobrenadante. O precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70%, por três minutos. O precipitado foi ressuscitado em 50 µL de TE (TrisHCl 1M, EDTA 500 mM) pH 8,0.

As reações de amplificação foram preparadas de acordo com o protocolo de Williams et al. (1990), em um volume de 10 µL contendo 2,4 Mmol/L de MgCl<sub>2</sub>, 100 µM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP; 0,3 µM de primer; 20 ng de DNA genômico; 1 unidade de Taq DNA polimerase e tampão de PCR 1X. Foram selecionados três primers (série Operon Technologies - Alameda, CA, EUA) com as seguintes sequências (5'-3'): OPA13 (CAGCACCCAC); OPC15 (GACGGATCAG); OPB09 (GACGGATCAG).

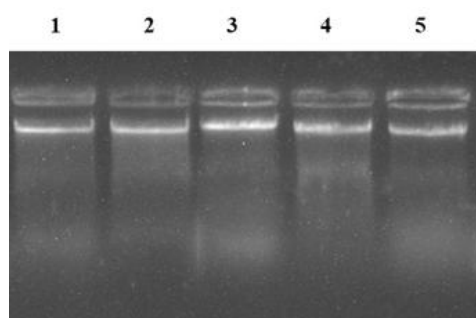
As reações de PCR foram realizadas em termociclador automático SLLB 036 (Scienlabor, São Paulo, Brasil) nas seguintes condições: 95 °C por 1 minuto, seguido de 45 ciclos (1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 36 °C e 2 minutos a 72 °C) e uma etapa final de 7 minutos a 72 °C para extensão final. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro UV5NANO (Mettler Toledo, Selangor, Malásia).

Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose (1 %) em tampão TBE 1X (1M de base Tris, 500mM de ácido bórico e EDTA), corados com corantes fluorescentes. Para estimar o tamanho dos fragmentos, foi utilizado um marcador de DNA Ladder de 100 pares de bases (pb). Os géis foram submetidos à luz ultravioleta em um fotodocumentador para análise. Com os resultados da PCR, foi criada uma matriz binária, onde o número um correspondeu à presença da banda e os zeros à ausência, para cada acesso.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O protocolo utilizado para a extração de DNA das amostras de alface apresentou uma eficiência média de 3 mg de DNA/300 mg de folha fresca. O DNA extraído foi de boa qualidade, indicando baixo nível de degradação (Figura 1).

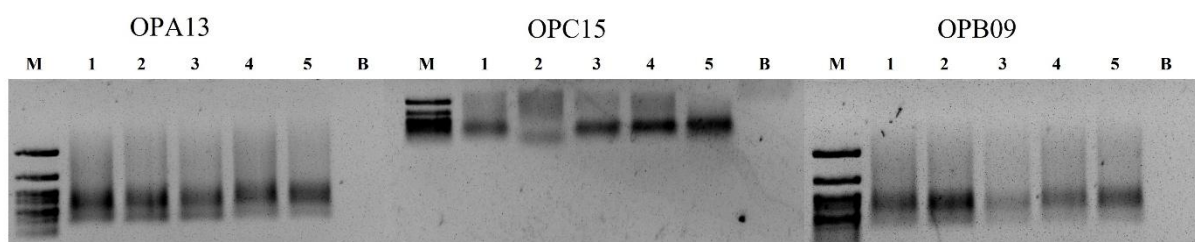
Figura 1 – DNA total extraído das linhagens de alface e visualizados em gel de agarose 1 % com corante fluorescente.



Amostras: 1- UFUMC12, 2- UFUMC34, 3- UFUMC53, 4-UFUMC54 e 5- UFUMC55.

Os marcadores RAPD OPA13, OPC15 e OPB09 foram eficientes na amplificação do DNA das diferentes cultivares, amplificando em média duas bandas por primer (Figura 2).

Figura 2 – Reações de amplificação das linhagens de alface com os primers OPA13, OPC15 e OPB09 visualizados em gel de agarose 1 % com corante fluorescente.



M: marcador de DNA de 100 pb, 1: UFUMC12, 2: UFUMC34, 3: UFUMC53, 4: UFUMC54, 5: UFUMC55, B: controle da reação.

Os três primers produziram um total de seis bandas, das quais duas foram polimórficas (33,3%) e quatro monomórficas (66,7%). Apenas o marcador OPC15 foi capaz de detectar variabilidade genética entre os genótipos. Assim, pôde-se observar que houve um maior número de linhagens com os loci tendendo à heterozigose ou homozigose dominante.

Os baixos níveis de polimorfismo observados podem ser atribuídos a limitações inerentes à técnica de RAPD que é um marcador dominante, não diferenciando homozigotos de heterozigotos (Zande; Bijlsma, 1995; Lopes *et al.*, 2003). Em adição, é importante destacar que as linhagens foram obtidas após uma hibridação entre as cultivares Pira 72 × Uberlândia 10000, ricas em carotenoides (Sousa *et al.*, 2007), seguida de onze autopolinizações sucessivas realizadas de 2013 a 2024.

Apesar das limitações, os dados obtidos permitiram uma caracterização inicial dos genótipos. Contudo, recomenda-se o uso complementar de marcadores codominantes, os quais apresentam maior precisão, reprodutibilidade e poder de discriminação (Serra *et al.*, 2007; Bidyananda *et al.*, 2024).

## 4 CONCLUSÕES

O uso do marcador molecular RAPD revelou baixa dissimilaridade genética entre as linhagens de alface limitada pelas características da própria técnica. No entanto, o método foi útil para caracterização dos genótipos, embora sejam recomendadas avaliações adicionais com marcadores codominantes. As informações obtidas podem contribuir para o desenvolvimento do Programa de Melhoramento Genético de Alface da UFU.

**AGRADECIMENTOS:** os autores agradecem ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Informações Geoespaciais da UFU, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo 302734/2023-6; a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG); e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e colaboração na realização deste estudo.

## REFERÊNCIAS

BARRADO, L.C. **Dissimilaridade genética para compostos bioativos em híbridos de alfaces biofortificadas**. 2023. 17 f. TCC (Graduação) - Curso de Agronomia, Universidade Federal de Uberlândia, Monte Carmelo, 2023.

BIDYANANDA, N.; JAMIR, I.; NOWAKOWSKA, K.; VARTE, V.; VENDRAME, W. A.; DEVI, R.S.; NONGDAM, P. Plant Genetic Diversity Studies: Insights from DNA Marker Analyses. **International Journal of Plant Biology**, [S.L], v. 15, p. 607-640, julho, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijpb15030046>.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. (1998). **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3rd Edition, EMBRAPA—CENARGEN, Brasília.

LACERDA, D.R.; ACEDO, M.D. P.; LEMOS FILHO, J.P.; LOVATO, M.B. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. **Lundiana**, Belo Horizonte, v. 2, n. 3, p. 1676-6180, 2002.

LOPES, R. *et al.* Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP): aspectos técnicos e interpretação genética. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 5, n. 29, p. 64–68, 2003.

NAGEL, J.C. **Caracterização da diversidade molecular de noqueira-pecã (*Carya illinoensis*) baseada em marcadores moleculares**. 2022. 119 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, 2022.

SALA, F.C.; COSTA, C.P. Retrospective and trends of Brazilian lettuce crop. **Horticultura brasileira**, v. 30, n. 2, p. 187-194, 2012. DOI: 10.1590/S0102-05362012000200002.

SERRA.; PROCACCINI, G; INTRIERI, M.; MIGLIACCIO, M.; MAZZUCA, S.; AMINNOCENTI. Comparison of ISSR and SSR markers for analysis of genetic diversity in the seagrass *Posidonia oceanica*. **Marine Ecology Progress Series**, [S.L.], v. 338, p. 71-79, 24 maio 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.3354/meps338071>.

SOUSA, C. S. *et al.* Divergência genética entre genótipos de alface por meio de marcadores AFLP. **Bragantia**, v. 66, n. 1, p. 11–16, 2007. DOI: [10.1590/S0006-87052007000100002](http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052007000100002).

SPAGNUOLO, F. A., GONÇALVES, L. S., DE FREITAS, F. M., VENTURA, M. U., MIGUEL, A. L. A., DE SOUZA, N. V., HATA, F. T. Melhoramento participativo do tomateiro sob manejo orgânico. **Horticultura Brasileira**, v. 34, n. 2, 2016. DOI: 10.1590/S0102-053620160000200006.

WILLIAMS, J. G. K. *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531–6535, 1990.

ZANDE, L.; BIJLSMA, R. Limitations of the RAPD technique in phylogeny reconstruction in *Drosophila*. **Journal of Evolutionary Biology**, [S.L.], v. 8, n. 5, p. 645-656, set. 1995. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1420-9101.1995.8050645.x>.