

## SELEÇÃO DE MARCADORES TRAP E SSR PARA MAPEAMENTO GENÉTICO DA TANGERINA FREMONT E DO TANGOR MURCOTT

MARIELLA T. VITORINO<sup>1</sup>; MARINÊS BASTIANEL<sup>2</sup>; SALETE ROCHA<sup>3</sup>; HEMILLY S.  
MUTTI<sup>3</sup>; MARIÂNGELA CRISTOFANI-YALY<sup>3</sup>; VALDENICE M. NOVELLI<sup>3</sup>; MARCOS  
A. MACHADO<sup>3</sup>

Nº 11144

### RESUMO

O mapeamento genético de citros tem contribuído para os estudos dos mecanismos genéticos envolvidos na resistência de muitas doenças importantes para a cultura. As principais variedades de tangerinas atualmente cultivadas no estado de São Paulo são altamente suscetíveis à mancha marrom de alternaria (MMA), acarretando redução significativa de produção e de área plantada. A doença, causada pelo fungo *Alternaria alternata* patótipo tangerina, é endêmica nas regiões produtoras, demandando controle químico sistemático – com uso de fungicidas. O objetivo do presente trabalho foi selecionar marcadores TRAP (*target region amplification polymorphism*) e SSR (*simple sequence repeats*) ou microsatélites para mapeamento genético da tangerina Fremont x tangor Murcott com vistas à identificação e localização de QTL (*quantitative traits loci*) envolvidos na resistência e suscetibilidade de tangerinas à MMA. Inicialmente, cerca de 200 híbridos foram selecionados com marcadores SSR dentre a população obtida por cruzamento dirigido. Um total de 105 *primers* SSR e 56 TRAP foram avaliados nos genitores e alguns híbridos, sendo, respectivamente, 5 e 8 polimórficos. A genotipagem dos híbridos realizada através destes marcadores nos híbridos gerou 5 locos SSR e 21 TRAP que segregaram na população. Novos *primers* estão sendo selecionados. Estes resultados sugerem um baixo nível de polimorfismo entre os genótipos genitores.

<sup>1</sup> Bolsista CNPq: Graduação em Ciências Biológicas, UNIARARAS Araras-SP, marielatvit@zipmail.com.br.

<sup>2</sup> Orientadora: Pesquisadora Centro APTA Citros "Sylvio Moreira"/IAC, Cordeirópolis-SP.

<sup>3</sup> Colaborador: Centro APTA Citros "Sylvio Moreira"/IAC, Cordeirópolis-SP.

## ABSTRACT

The citrus genetic map has contributed to the study of genetic mechanisms involved in resistance to many diseases important to the culture. The main varieties of mandarins currently grown in the state of Sao Paulo are highly susceptible to *Alternaria* brown spot (ABS), resulting in significant reduction of production and area planted. The disease, caused by the fungus *Alternaria alternata* tangerine pathotype, is endemic in the producing regions, requiring systematic chemical control - with the use of fungicides. The objective of this work was select TRAP (target region amplification polymorphism) and SSR (simple sequence repeats) or microsatellites for genetic mapping of Fremont mandarin x Murcott tangor with a view to identify and localize QTL (quantitative trait loci) involved in resistance and susceptibility of the MMA mandarins. Initially, about 200 hybrids were selected as SSR markers among the population obtained by controlled crossing. A total of 105 SSR and 56 TRAP were evaluated in parental and some hybrids, being, respectively, 5 and 8 polymorphic. Genotyping with these markers in hybrids generated 5 SSR and 31 TRAP loci that segregated in the population. New primers are being selected. These results suggested a low level of polymorphism between the parental genotypes.

## INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de citros e exportador de suco concentrado de laranjas (*Citrus sinensis*). Por ser uma atividade basicamente voltada à indústria, a laranja doce é a espécie de maior expressão na citricultura brasileira. Para o mercado interno de fruta fresca, as tangerinas e alguns híbridos como o tangor Murcott (*C. sinensis* x *C. reticulata*) são responsáveis por grande parte da produção.

A mancha marrom de alternária, causada por *Alternaria alternata* patótipo tangerina, afeta principalmente as tangerinas e seus híbridos na maioria das regiões úmidas ou semi-áridas de cultivo dos citros (TIMMER et al., 2003). No Brasil, a ocorrência da doença foi observada em 2001, afetando principalmente a tangerina Ponkan (*C. reticulata*) e o tangor Murcott (GÓES et al., 2001; PERES et al., 2003), as mais importantes variedades comerciais para o mercado de fruta fresca. Desde então, vem causando sérios prejuízos econômicos nos pomares, tanto pelo aumento de custo de produção pelo uso sistemático de fungicidas, como pela redução no volume e qualidade da produção (BASTIANEL et al., 2005; AZEVEDO et al., 2010).

Com o constante surgimento de novas pragas e doenças na citricultura brasileira, fica evidente a necessidade de diversificação do atual quadro varietal. Para tal, a existência de variedades resistentes e o entendimento dos mecanismos genéticos envolvidos na resistência ou suscetibilidade para as doenças nos citros é um passo fundamental para o estabelecimento de programas de melhoramento genético visando à obtenção de novas variedades de citros.

Os desafios ao melhoramento com estratégias tradicionais em plantas lenhosas e perenes são grandes e impõem a agregação de novas ferramentas no estudo da variabilidade e da herança a fatores bióticos. Marcadores moleculares vêm sendo utilizados rotineiramente como ferramentas importantes em estudos genéticos e programas de melhoramento de citros. Diferentes marcadores moleculares podem ser usados em citros para a identificação de plantas híbridas e para o mapeamento. Os marcadores microssatélites ou *simple sequence repeats* (SSR) são codominantes e constituídos por sequências curtas de DNA repetitivo, em *tandem*, com distribuição em regiões codificantes ou não-codificantes do genoma (LI et al., 2004). O uso dos marcadores microssatélites permite a integração e seleção assistida por marcadores num amplo espectro de populações.

Marcadores TRAP (*target region amplification polymorphism*) são dominantes e possibilitam encontrar polimorfismos de DNA próximos de regiões-alvo utilizando dois *primers* de 18 nucleotídeos, um *primer* chamado de fixo, desenhado a partir de uma sequência expressa, gerada de bancos de dados de EST's (*Expressed Sequence Tag*) e um segundo *primer*, o arbitrário, formado por uma sequência rica em AT ou GC. Esta técnica tem sido utilizada tendo como alvos, genes que governam características agrônômicas de interesse, e por isto apresentam grande potencial, já que agregam as seguintes vantagens: alta reprodutibilidade, a simplicidade dos marcadores RAPD e a capacidade de produzir padrão de bandas semelhantes ao da técnica de AFLP (HU & VICK, 2003).

O objetivo do presente trabalho foi selecionar marcadores TRAP e SSR ou microssatélites para mapeamento genético da tangerina Fremont (*Citrus reticulata* x *C. clementina*) - resistente ao fungo x tangor Murcott com vistas à identificação e localização de QTL (*quantitative traits loci*) envolvidos na resistência e susceptibilidade de tangerinas à MMA.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Material vegetal:** Foi utilizada uma população de híbridos recíprocos dos cruzamentos realizados entre tangor Murcott e tangerina Fremont, obtidas em estudos anteriores e mantidos em casa de vegetação.

**Extração do DNA:** O DNA genômico foi extraído de folhas frescas de cada planta, utilizando protocolo padrão com modificações (MACHADO et al., 1996).

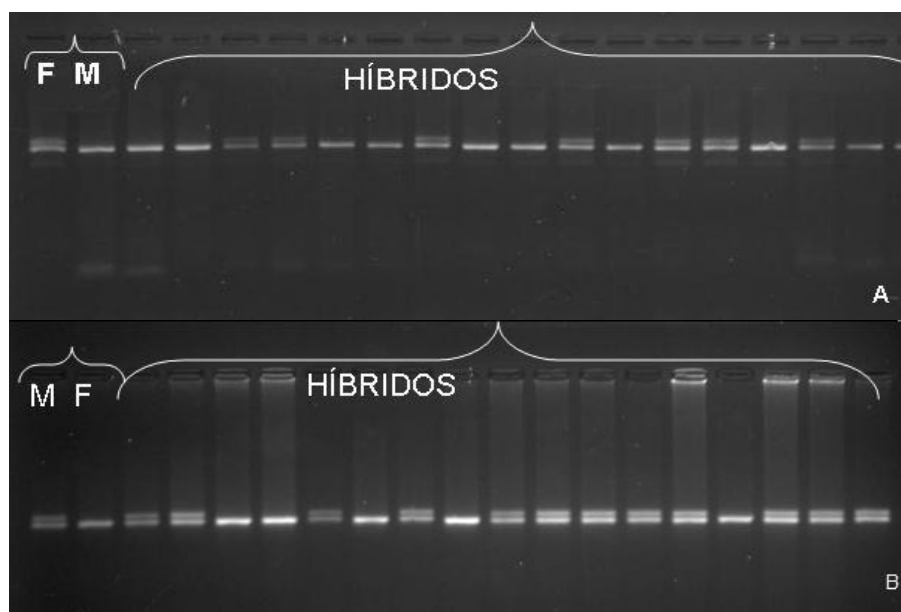
**Marcadores moleculares:** Foram testados 105 pares de SSR, desenhados a partir de informações de sequências expressas (-CitEST) e 56 pares de *primers* TRAP. Aqueles em que apresentaram polimorfismo entre tangor Murcott e tangerina Fremont foram utilizados para genotipagem da população de híbridos.

As reações de amplificação SSR foram conduzidas em 25 µl contendo 50ng de DNA, 1,5U de Taq polimerase (Fermentas), tampão da reação 10X, MgCl<sub>2</sub> (1,0-2,0 mM), dNTP (0,2 mM) e 0,1 µM de cada *primer* (10mM). A amplificação foi realizada em termocicladores MJ Research Thermocycler (em placas de 96 poços) programados para 30 ciclos de 94°C por 30s, 65-56°C por 30s e 72°C por 5s. A temperatura de anelamento iniciou-se a 65°C decrescendo 0,3°C a cada ciclo seguido por três ciclos de anelamento a 56°C. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 3% com brometo de etídio (0,5 ng/mL).

As reações de amplificação TRAP foram conduzidas a um volume final de 15 µL com os seguintes componentes: 2 µL da amostra de DNA (30-50 ng/mL), 1,5 µL do tampão de reação 10 X, 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µL de dNTPs (5 mM), 10 nmol dos *primers* arbitrários e 10 nmol dos *primers* fixos e 1,5 U de Taq DNA polimerase. A PCR foi realizada com temperatura de desnaturação do DNA a 94°C por 2 min. A seguir, 5 ciclos a 94°C por 45 s, 35°C por 45 s, e 72°C por 1 min, seguido de 35 ciclos a 94°C por 45 s, 50°C por 45 s, e 72°C por 1 min e uma etapa de extensão a 72°C por 7 min. Para a eletroforese dos produtos amplificados primeiramente foi realizada a desnaturação da amostra com a adição de tampão de carregamento (mesmo volume), à amostra amplificada. O tampão de carregamento é composto de formamida (a 99,8%), 0,2% de EDTA 0,5M, pH8,0 e 0,05% azul de bromofenol. A desnaturação da amostra foi realizada em termociclador a 94°C, durante 4 minutos. Uma alíquota de 10 µL foi aplicada no gel de sequenciamento (poliacrilamida 8%) conforme recomendações do fabricante.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

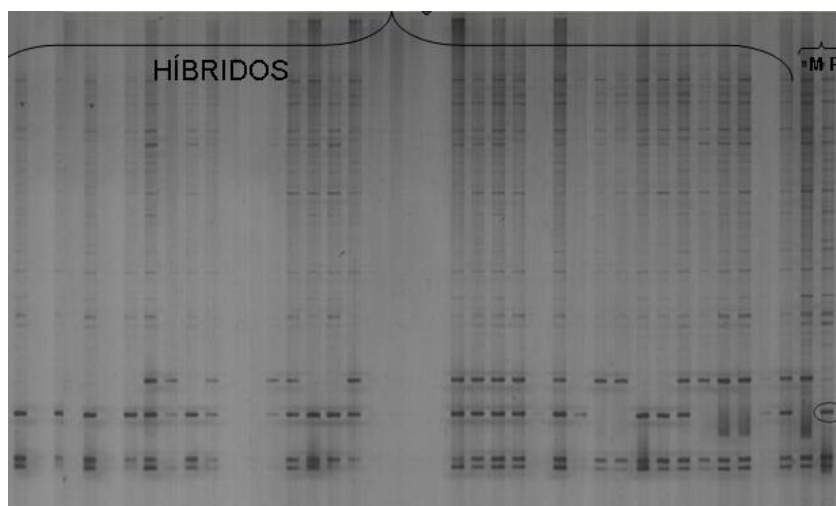
Dentre as plantas avaliadas foi possível identificar 253 híbridos de tangerina Fremont e tangor Murcott. Dentre os 105 locos SSR analisados, foram selecionados apenas cinco locos que apresentaram polimorfismo entre os genitores e que foram utilizados para avaliar a segregação na progênie. O número de locos polimórficos foi muito baixo (cerca de 5%) e inferior ao encontrado em outros estudos desta natureza em citros. A Figura 1 um padrão de amplificação dos locos 199 e 201 nos parentais e em alguns híbridos da progênie.



**FIGURA 1.** Gel de agarose 3% ilustrando padrão de segregação na progênie em avaliação. A: loco EST-SSR 199, B: loco EST-SSR 201; M: Murcott, F: Fremont e alguns híbridos.

Para os marcadores TRAP foram avaliadas até o momento 56 combinações de *primers*, sendo selecionado 8 combinações (14,3%) que mostraram polimorfismo entre os parentais e segregaram na progênie. Foram obtidos um total de 21 marcadores TRAP que podem ser utilizados para a obtenção dos mapas genéticos, sendo 04 heterozigotos (Aa) em tangor Murcott e homozigotos (aa) em tangerina Fremont e 17 heterozigotos (Aa) em tangerina Fremont e homozigotos (aa) em Murcott. A Figura 2 mostra os fragmentos amplificados pela combinação de *primers* TRAP nos genitores e alguns híbridos da progênie. O número de marcadores obtidos ainda é muito incipiente para a obtenção de mapas genéticos e novas combinações estão em processo de

avaliação. Uma parte da população foi avaliada para a resposta a inoculação do fungo *Alternaria alternata* e os resultados mostraram que há híbridos que permanecem assintomáticos mesmo sob inoculação *in vitro* (VITORINO et al., 2011).



**FIGURA 2.** Gel de acrilamida 8% ilustrando padrão de amplificação obtido através do *primer* 05FP2 (5'GACTGCGTACGAATTTGC 3'; 5'ACGCGTCCGCGCACTCTCA 3') M: Murcott, F: Fremont e alguns híbridos da progênie.

## CONCLUSÕES

Foram selecionados mais de 200 híbridos de tangerina Fremont e tangor Murcott. Foram obtidos 5 locos SSR e 21 TRAP que segregaram na população. Novos pares de *primers* estão sendo selecionados. O número de marcadores obtidos ainda é muito incipiente para a obtenção de mapas genéticos e novas combinações de *primers* TRAP estão em processo de avaliação.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.

Ao IAC – CENTRO DE CITRICULTURA, pela oportunidade de estágio.

## REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, F.A.; POLYDORO, D.A.; BASTIANEL, M.; KUPPER, K.C.; STUART, R. M.; COSTA, F. P.; PIO, R.M. Resposta de diferentes genótipos de tangerinas e seus híbridos à inoculação in vitro e in vivo de *Alternaria alternata*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p.1-10, 2010.
- BASTIANEL, M.; AZEVEDO, F.A.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A. Mancha marrom de alternária: uma interação fungo, toxina e tangerina. **Laranja**, v.26, p. 323-336, 2005.
- MACHADO, M.A., H.D. COLLETA FILHO, M.L.N.P. TARGON, J. POMPEU JR. Genetic relationship of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. **Euphytica**, v. 92, p.321-326, 1996.
- GOES, A.; MONTES DE OCA, A.G.; REIS, R.F. Ocorrência de la mancha de alternaria em mandarina 'Dancy' en el Estado de Rio de Janeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.386-386, 2001 (Suplemento).
- HU, J.; VICK, B.A. Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 21, p.289-294, 2003.
- LI, Y-C; KOROL, A.B.; FAHIMA, T.; NEVO, E. Micosatellites within genes: Structure, fuction, and evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v.21, p.991-1007, 2004.
- PERES, N.A.R.; AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W. Outbreaks of *Aternaria* brown spot of citrus in Brazil and Argentina. **Plant Disease**, v.87, p.750-750, 2003.
- PEEVER, T.L; CANIHOS, Y.; OLSEN, L. IBÁÑEZ, A.; LIU, Y.C.; TIMMER, L.W. Population genetic structure and host specificity of *Alternaria spp.* Causing brown spot of Minneola tangelo and rough lemon in Florida. **Phytopathology**, v. 89, p.851-860, 2001.
- TIMMER, L.W.; PEEVER, T.L.; SOLEIL, Z.; AZUYA, K.; KIMITSU, A. Alternaria diseases of citrus-novel pathosystems. **Phytopathologia Mediterranea**, v.42, p.99-112, 2003.
- VITORINO, M.T.; MISSIATO, A.; SANTOS JUNIOR, J.A.; CRISTOFANI-YALI, M. ; NOVELLI, V.M.; AZEVEDO, F.A.; MACHADO, M.A.; BASTIANEL, M. Seleção de híbridos de tangerinas para resistência a mancha marrom de Alternaria. **Summa Phytopathologica**, v.37, 2011.