

IDENTIFICAÇÃO DE PLANTAS ZIGÓTICAS EM *SEEDLINGS* DE VARIEDADES DE LARANJA DOCE COM USO DE MARCADORES MOLECULARES TRAPS

MARCELA KLEY¹; RODRIGO R. LATADO²

Nº11134

RESUMO

A instalação de programas de melhoramento de laranjeiras com uso de cruzamentos controlados é dificultada principalmente pelos problemas de poliembrião nas sementes e pela presença de ciclo juvenil longo nas plantas, o que ocasiona muito tempo para a conclusão de um ciclo de recombinação e seleção. O objetivo deste trabalho foi determinar a porcentagem de embriões zigóticos presentes em sementes de quatro variedades identificadas previamente como sendo altamente monoembriônicas, com uso de marcadores moleculares TRAPs. A laranjeira Amber Sweet apresentou todas as plantas de origem zigótica, deste modo é uma variedade potencial para uso como progenitora feminina no programa de cruzamento de laranjas doces.

ABSTRACT

The plant of orange breeding programs with the use of controlled crossings is mainly hampered by polyembryony problems in the seeds and the presence of a huge youth cycle of the plants, which causes a lot of time to complete a cycle recombination and selection. The aim of this study was to determine percentage of zygotic embryos found in seeds of four varieties previously identified as being highly monoembryonic, using molecular markers TRAPs. All Amber Sweet orange plants presented zygotic origin, being a potential variety for use as the female parent in the breeding program for sweet oranges.

INTRODUÇÃO

A poliembrião é definida como o desenvolvimento de dois ou mais embriões em uma única semente. A maioria das plantas cítricas é considerada como poliembriônica por produzir sementes contendo geralmente um embrião zigótico e, os

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Biotecnologia, UFSCar, Araras-SP, marcela_kley@hotmail.com

²Orientador: Pesquisador do Centro APTA de Citros Sylvio Moreira, IAC, Cordeirópolis-SP

outros, de origem apomítica, a partir do tecido nucelar do saco embrionário (Dorneles, 1977).

Os embriões sexuais geralmente são menos vigorosos que os embriões nucleares (Frost, 1943). O mesmo autor cita que três fatores importantes desfavorecem o desenvolvimento de embriões zigóticos: a) a maioria dos embriões nucleares já está constituído de várias células quando a oosfera é fecundada e o embrião zigótico começa a se desenvolver; b) o embrião zigótico, geralmente situado próximo ao ápice do saco embrionário, possui posição desfavorável, tanto para a obtenção de nutrientes quanto na facilidade de ocupar o espaço no interior do saco e c) na maioria dos casos, os embriões zigóticos possuem constituição genética mais débil que os nucleares.

Para Webber (1932) e Toxopeus (1933), a embrionia nucelar em sementes possibilita o seu uso para a obtenção de plantas de porta-enxertos uniformes, com características idênticas a planta-mãe.

Weathers & Calavan (1959) relataram que a embrionia nucelar em citros pode ser utilizada com o objetivo de limpar os clones das viroses não-transmissíveis por vetor. Deste modo, as plantas nucleares reproduzem as características da planta-mãe, apresentam maiores vigor, rusticidade e produtividade que os clones velhos (geralmente contaminados com vírus e viróides).

A principal desvantagem da poliembria se refere à dificuldade de obtenção e detecção de híbridos em programas de melhoramento via hibridação sexual, uma vez que os embriões nucleares, geralmente em maior número e mais vigorosos, competem com o embrião zigótico e podem suprimi-lo (Frost & Soost, 1968).

Apesar do melhoramento genético via hibridação controlada ser uma das principais formas de se obter variabilidade nos citros, existem duas grandes barreiras biológicas que dificultam os cruzamentos, a ocorrência de poliembria nas sementes e o longo período juvenil de plantas provenientes de sementes (Frost, 1926; Frost & Soost, 1968).

O objetivo deste trabalho foi, com uso de marcadores moleculares TRAPs, determinar a porcentagem de embriões zigóticos presentes em sementes de quatro variedades de laranja doce identificadas previamente como sendo altamente monoembriônicas. Dessa forma, foi possível identificar variedades de laranjeira com potencial para serem utilizadas como progenitoras femininas em programas de melhoramento por cruzamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e semeadura das sementes

Quinze variedades que apresentaram baixas taxas de poliembrionia na média de quatro avaliações (anos) foram selecionadas para serem utilizadas nos experimentos de determinação da porcentagem de plantas zigóticas: Amber Sweet (CN 1428), Pêra CENA-3 (CN 1398), Mediterrânea (CN 454), Mediterranean xiloporose (CN 427), Valência late (CN 190), Lambsummer (CN 174), Sanguinelli Marrocos (CN 73), Lima Verde (CN 415), Ovale (CN 172), Hale (CN 447), With's late Valência (CN 1373), Açoriana (CN 134), Feijão Cru (CN 7), Valência (CN 476) e Santa Lúcia (CV 82).

Aproximadamente 50 sementes de cada variedade foram extraídas de frutos maduros, seguido de lavagem em água corrente e secagem a temperatura ambiente. Os tegumentos externos das sementes foram retirados, mas mantendo-se os tégmens.

A seguir, as sementes foram semeadas uma a uma em tubetes contendo substrato comercial. Após 60 dias da semeadura, cada tubete foi avaliado individualmente com a contagem do número de plântulas emergidas. Assim, foi possível determinar a taxa de poliembrionia pelo método de germinação de sementes.

Experimentos de screening de primers de marcadores moleculares TRAPS

Na primeira etapa foram escolhidos os pares de *primers* de marcadores moleculares TRAP's. Foram testadas 120 combinações de pares de *primers*, sendo vinte *primers* fixos e seis *primers* arbitrários.

Os *primers* fixos de marcadores moleculares TRAPs utilizados foram desenhados a partir dos genes diferencialmente expressos detectados nos trabalhos com hibridização *in silico* a partir da identificação da sequência no CitEST (Citrus EST) (CRISTOFANI-YALI et al., 2007). São eles:

Primer 01F: 5' TCCCCGAGGCACAGCATC 3'

Primer 01R: 5' TCGGGGAGTAGCATCAA 3'

Primer 02F: 5' ACAGGGCCAAAGGTAAAC 3'

Primer 02R: 5' AGCGCGTCCTGGTGATGC 3'

Primer 03F: 5' CAATCGTGGCTGTCGTGA 3'

Primer 03R: 5' ATATACCCCAGCCAATGT 3'
Primer 04F: 5' AATGGGGGTTTCGGTTTGT 3'
Primer 04R: 5' GATCATCATGGGGGTTAC 3'
Primer 05F: 5' ACGCGTCCGCCACTCTCA 3'
Primer 05R: 5' CCTTTCCCGGTGATACAG 3'
Primer 06F: 5' TGGCAGCATCGTCAACT 3'
Primer 06R: 5' GGAGACGGCGGGCTTAGA 3'
Primer 07F: 5' GGCACCGCACTCACCATC 3'
Primer 07R: 5' TGCTCTGGTTTCGGACAA 3'
Primer 08F: 5' GTGGCGAATTTTGACTGT 3'
Primer 08R: 5' CGCGCCCATTAGTGAGAG 3'
Primer 09F: 5' GGGCGGTGATCCTGAGAA 3'
Primer 09R: 5' CGCATCCTCGCCGTATTG 3'
Primer 10F: 5' CAGTTTCTTGTTGCTACG 3'
Primer 10R: 5' TGGGGAAACTCACAGGTA 3'

Os *primers* arbitrários utilizados possuem 18 pb, três nucleotídeos seletivos na sua extremidade 3', de quatro a seis nucleotídeos no centro da sequência (rica ou em AT ou em GC), intercalada por um *intron* ou *exon*. Estes *primers* arbitrários foram escolhidos de acordo com Li & Quiros (2001):

Primer P1: 5' GAC.TGC.GTA.CGA.ATT.AAT 3'
Primer P2: 5' GAC.TGC.GTA.CGA.ATT.TGC 3'
Primer P3: 5' GAC.TGC.GTA.CGA.ATT.GAC 3'
Primer P4: 5' GAC.TGC.GTA.CGA.ATT.TGA 3'
Primer P5: 5' GAC.TGC.GTA.CGA.ATT.AAC 3'
Primer P6: 5' GAC.TGC.GTA.CGA.ATT.GCA 3'

Das combinações testadas, foram escolhidas as três que produziram padrão de bandamento mais nítido e com maior repetibilidade: 07R 04, 01F P6 e 05F P2.

As reações de PCR e a eletroforese foram feitos como descrito por SOUZA, 2010.

Determinação da porcentagem de plantas zigóticas originadas de sementes de quinze variedades de laranja doce com marcadores moleculares TRAPS

A extração do DNA genômico foi feita com as folhas novas da amostra mais vigorosa de cada tubete, de acordo com a metodologia descrita por Machado et al. (1996).

As reações de PCR foram conduzidas num volume final de 14 μ L com os seguintes componentes: 7,4 μ L de H₂O Mili-Q autoclavada; 2,0 μ L da amostra de DNA (30-50 ng μ L⁻¹); 1,25 μ L do tampão de reação 10 X, 1,25 μ L de MgCl₂ (25 mM); 0,5 μ L de dNTPs (2,5 mM de cada); 0,8 μ L de primer arbitrário (10 μ M); 0,8 μ L de primer fixo (10 μ M) e 1,0 U de *Taq* DNA polimerase. O programa para a amplificação dos fragmentos de DNA foi composto por ciclo inicial 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.

Após a reação de amplificação, 14 μ L de tampão de desnaturação [10 mL de formamida, 0,001 mg de azul de bromofenol, 0,001 mg de xilenocianol e 200 μ L de solução de EDTA 0,5 M pH 8,0] foram adicionados às amostras, que foram desnaturadas a 94°C durante 3 minutos. Uma alíquota de 10 μ L de cada reação de PCR foi aplicada no gel de poli(acrilamida) desnaturante a 5%.

A eletroforese foi conduzida a 75 W por 1h30, em cuba vertical para eletroforese tipo Sequi-Gen System (Bio Rad Corp.), e o gel foi corado com o método de nitrato de prata, de acordo com Creste et al. (2001).

A confirmação da origem zigótica de cada planta foi realizada na seguinte forma: o perfil molecular de cada planta foi comparado com o da respectiva planta-controle, nas três combinações de *primers* de marcadores TRAP's testadas. Foram consideradas como plantas nucelares as que possuíam padrão de bandamento idêntico ao da respectiva planta-controle. Por outro lado, as plantas que apresentaram diferenças no padrão de bandamento, em uma ou mais combinações de *primers*, foram consideradas como tendo origem zigótica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa de poliembrionia foi estimada pela relação entre o número de sementes com mais de um embrião, no total de sementes avaliadas, semelhantemente ao citado por Moreira & Gurgel (1941).

Analisando-se as 15 variedades quanto às taxas de poliembrionia em sementes pôde-se observar 3 acessos com sementes com poliembrionia entre 0 e

30%, 11 acessos com taxas de poliembrião entre 31 e 60% e o restante (1), com taxas acima de 60%. Já que estas são variedades com altas taxas de monoembrião, este resultado está de acordo com o citado por Moreira et al. (1947), que afirmou que a maioria das variedades de laranja doce apresenta sementes com altas taxas de poliembrião. Com relação ao número médio de sementes por fruto, os valores obtidos variaram entre 2,11 e 23,7 sementes.

Os valores observados para o número médio de embriões por sementes nas variedades de laranja doce avaliadas variaram entre 1,0 e 2,3 embriões, com destaque para a laranja Amber Sweet, que apresentou as 20 sementes contendo apenas um embrião cada.

De maneira geral, como esperado, as taxas de monoembrião observadas no método de observação em sementes germinadas foi, em média, maior do que as observadas no método de contagem de cotilédones em sementes (correlacionado com embriões). Isto pode ser explicado pelo fato de que nem todos os embriões presentes numa mesma semente conseguem germinar e emergir (CUNHA et al, 2010).

Nas avaliações de identificação de embriões zigóticos com uso de marcadores moleculares TRAP's em quatro variedades que apresentavam baixas taxas de poliembrião, a variedade Amber Sweet foi a que apresentou a maior porcentagem de plantas de origem zigótica (100%), seguida da laranja Pêra CENA-3 (43,5%), Mediterrânea (32,5%) e Lima Verde, com 22,7% de plantas de origem zigóticas.

CONCLUSÃO

A variedade que mais se destacou quanto à baixa taxa de poliembrião nas sementes foi a laranjeira Amber Sweet, sendo uma potencial progenitora feminina no programa de cruzamento de laranjas doces.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq – PIBIC, pela bolsa concedida.

Ao Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC, pela oportunidade de estágio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORÉM, A. Melhoria de Plantas. Viçosa, MG, UFV, 1997. 547p.
- CAMERON & FROST, H.B. Genetics, breeding and nucellar embryony. In: Reuther, Batchelor and Webber (ed.) The Citrus industry, Univ. Calif. Press, Berkeley, 2 : 325-370, 1968.
- CARLOS, E.F., LEMOS, E.G.M.; DONADIO, L.C. O Declínio dos citros. Laranja, Cordeirópolis, v.21, n.1, p.175-203, 2000
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of Single Sequence Repeat Polymorphisms in Denaturing Polyacrylamide Sequencing Gels by Silver Staining. Plant Molecular Biology Reporter, New York, n. 19, p. 299-306, 2001.
- CRISTOFANI-YALY, M.; BERGER, I. J.; TARGON, M. L. P. N.; TAKITA, M. A.; DORTA, S. O.; FREITAS-ASTUA, J.; SOUZA, A. A.; BOSCARIOL-CAMARGO, R. L.; REIS, M. S.; MACHADO, M. A. Differential expression of genes identified from *Poncirus trifoliata* tissue inoculated with CTV through EST analysis and *in silico* hybridization. Genetics and Molecular Biology, Ribeirão Preto, v.30, p.972-979, 2007.
- CUNHA, T.; LANZA, R.; LATADO, R. R.. Caracterização de variedades de laranja doce quanto ao número de sementes e a taxa de poliembrião de sementes. In: 4º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica, Campinas, 2010.
- DORNELLES, C. M. M. Laranja Tobias Cultivar Promissora para a Indústria de Sucos. In CONG. BRAS. FRUTICULTURA, 04, 1977, Salvador, Anais... Salvador: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1977. p 369.
- FROST. H.B. Botany and Breeding. In: Reuther, Batchelor and Webber (ed.) The Citrus industry, Univ. Calif. Press, Berkeley and Los Angeles, I: 767-913, 1943.
- FROST, H.B. Polyembryony, heterozygosity and chimeras in Citrus. Hilgardia, I (16): 365-402, 1926
- FROST. H.B. & SOOST, R.K.. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In: Reuther, Batchelor and Webber (ed.) The Citrus industry, Univ. Calif. Press, Berkeley, 2 : 290-324, 1968.
- GONZAGA, D.L.; ROCHA, G.F.; FERREIRA, L.A; LATADO, R.R. Caracterização de acessos de laranja doce com relação ao número de sementes por frutos, número de embriões e taxa de poliembrião do BAG-Citros. In: 19 Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2006, Cabo Frio. JARD edit. Viçosa, 2006. v. 19. p. 1-598.

- HU, J.; VICK, B. A. Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. *Plant Molecular Biology Reporter*, New York, v. 21, p. 289-294, 2003.
- LI, G.; QUIROS, C. F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, v. 103, p. 455-461, 2001.
- MACHADO, M. A.; COLETTA FILHO, H. D.; TARGON, M. L. N.; POMPEU JUNIOR, J. Genetic relationship of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. *Euphytica*, Wageningen, v. 92, p. 321-326, 1996.
- MOREIRA. Clones nucleares: Caminho para uma nova citricultura. *Revista da Agricultura*, Piracicaba, 37 (2): 73-82, 1962.
- MOREIRA & GURGEL, J.T.A. A fertilidade do pólen e sua correlação com o número de sementes, em espécies e formas do gênero *Citrus*. *Bragantia*, Campinas, 1 669-711, 1941.
- MOREIRA, GURGEL, J.T.A ; ARRUDA, L.F.. Poliembrionia em citrus. *Bragantia*, Campinas, (7): 69-106, 1947.
- SOUZA, LAYANNE BATISTA. Mapeamento genético de híbridos intraespecíficos de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], obtidos por cruzamentos controlados. Universidade de São Paulo, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, 2010.
- TOXOPEUS, H. J. Some cases of bud variation in citrus observed on Java . *Genetica*, 15:241-252, 1933.
- WEATHERS, L. G. & CAVALAN, E.C. Nucellar embryony – a means of freeing citrus clones of viruses. In: J.M. Wallace (ed.) *Citrus Virus diseases*, Univ. Calif. Press, , Berkeley, p. 197-202, 1959.
- WEBBER, H.J. The economic importance of apogamy in citrus and mangifera. *Proceed. Amer.Soc. Hort. Sci.* 28: 57-61, 1932.
- WILLIAMS, J. G.K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research.*, London, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.