

OBTENÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA CARACTERIZAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CERTIFICAÇÃO GENÉTICA DE CITROS

HÊMILY S. MUTTI¹; VALDENICE M. NOVELLI^{2,3};
MARIÂNGELA CRISTOFANI-YALY³; MARINÊS BASTIANEL³

Nº 11153

RESUMO

O programa de melhoramento genético de citros visa, entre outros, a superação de obstáculos, tais como os relacionados à poliembrionia e à elevada heterozigosidade. Muitas estratégias têm sido adotadas para superar essas barreiras, como, por exemplo, o uso de técnicas de biologia molecular, com destaque para os marcadores microssatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeats*). Diversas classes de marcadores moleculares têm sido amplamente utilizadas para agilizar os programas de melhoramento de citros, auxiliando a identificação de embriões zigóticos, caracterização de germoplasma, estudos de diversidade e filogenia, construção e saturação de mapas genéticos. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi investigar e ampliar o número de marcadores microssatélites, a partir do banco de seqüências expressas de citros (CitEST), visando identificar marcadores que permitam a seleção precoce de variedades e possam ser úteis na caracterização e na certificação de cultivares. Foram estudadas diferentes espécies e híbridos de citros, utilizando 105 marcadores SSRs-ESTs. São apresentados os resultados da seleção de novos marcadores para o grupo citros, os quais serão úteis na saturação de mapas genéticos, na identificação de acessos e em estudos de diversidade.

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Bacharelado em Biotecnologia, CCA – UFSCar, Araras – SP
hemily.mutti@gmail.com.

² Orientadora: Pesquisadora, Instituto Agrônomo de Campinas, Centro APTA Citros Sylvio Moreira – Cordeirópolis –SP.

³ Colaboradores: Pesquisadoras, Instituto Agrônomo de Campinas, Centro APTA Citros Sylvio Moreira – Cordeirópolis –SP.

ABSTRACT

The breeding program of citrus aims, among others, overcoming obstacles such as those related to polyembryony and high heterozygosity. Many strategies have been adopted to overcome these barriers, for example, the use of molecular biology techniques, especially the microsatellite markers or SSR (Simple Sequence Repeats). Several classes of molecular markers have been widely used to citrus breeding programs, aiding the identification of zygotic embryos, germplasm characterization, phylogeny and diversity studies, construction and saturation of genetic maps. This work objective was to investigate new microsatellites from expressed sequence database citrus (CitEST), to identify markers that allow early identification of varieties and may be useful in the characterization and certification of cultivars. Different citrus species and hybrids were studied using 105 SSRs-ESTs markers. The results of the selection of new markers for the citrus group are presented, which will be useful to genetic mapping, the accessions identification and diversity studies.

INTRODUÇÃO

Alguns dos fatores essenciais para a manutenção e desenvolvimento da produção agrícola, com base no melhoramento, são a conservação e utilização dos recursos genéticos de plantas (SOARES FILHO et al., 2003). Em relação à citricultura, o uso de técnicas de genética molecular tem um papel importante na conservação e caracterização da diversidade genética do Banco de Germoplasma de Citros, do Instituto Agrônomo (BAG – Citros IAC), sendo que o uso de marcadores moleculares tipo microssatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeats*) representa um grande avanço, uma vez que identifica genótipos em nível molecular, permitindo a estimativa de parâmetros genéticos para estudo de diversidade (JAUHAR, 1996). Entende-se por microssatélite regiões repetitivas em sequência no genoma de um organismo e, tais sequências, são usadas para detectar polimorfismos e servir como parâmetro de diferenciação intra ou interespecífica.

Os microssatélites utilizados, no presente trabalho, foram gerados a partir do banco de sequências expressas de citros (CitEST). A identificação de sequências expressas ESTs, ou seja, sequências obtidas a partir do mRNA correspondente a possíveis genes expressos em uma célula ou tecido, complementa as informações do genoma, podendo estabelecer ligação com o genoma funcional (ADAMS et al., 1992; 1995). Os ESTs também podem ser utilizados para identificação de polimorfismos genéticos e determinação da expressão gênica diferencial (HUANG et al., 1999).

Portanto, dada as suas particularidades os microssatélites de ESTs podem ser usados para ampliar a compreensão das relações genéticas entre espécies de citros e contribuir para a conservação e melhor uso de coleções de germoplasmas.

A partir do projeto do Instituto do Milênio (CitEST – Integração de Melhoramento Genético, Genoma Funcional e Comparativo de Citros) foi possível a identificação de marcadores microssatélites ESTs de diferentes espécies e variedades de citros (PALMIERI et al., 2007). No entanto ainda há necessidade do estabelecimento de novos marcadores que possam ser utilizados de maneira rápida e eficiente na identificação e certificação de acessos. Sendo assim, este projeto teve como objetivos: 1) validar novos marcadores microssatélites desenvolvidos a partir do banco de seqüências expressas (CitEST) em acessos de interesse comercial e potencial de citros; 2) selecionar marcadores microssatélites para a identificação precoce de acessos e que sejam úteis na caracterização e certificação de cultivares; e 3) disponibilizar marcadores para auxiliar os programas de melhoramento e mapeamento genético de citros.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal: As plantas amostradas pertencem ao Banco Ativo de Germoplasma de Citros (BAG-Citros) do Centro APTA Citros ‘Sylvio Moreira’/IAC, Cordeirópolis/SP (Tabela 1). Os marcadores foram validados nos principais genitores do programa de melhoramento genético por cruzamentos dirigidos, do CCSM-IAC. Posteriormente, após validação e seleção, os marcadores foram investigados em híbridos destes cruzamentos. Os locos considerados polimórficos também foram investigados para estudo de diversidade em acessos de tangerinas com potencial interesse comercial.

Métodos

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

Marcadores moleculares: Foram validados 105 pares de *primers* SSRs-ESTs, desenvolvidos a partir do banco de seqüências expressas (CitEST). A PCR foi feita a um volume final de 13µL, contendo 5,5µL de água mili-Q autoclavada, 1,3µL de 10X *Buffer*, 0,5µL de MgCl₂, 0,5µL de dNTP (2,5mM), 0,5µL do primer *Foward*, 0,5µL de primer *Reverse*, 0,2µL de Taq DNA Polimerase e 4µL de DNA. As condições de amplificação foram de um ciclo de 94°C por 30 segundos, seguido por programa *touchdown* (TD1) de 30 ciclos a 94°C, 30 segundos a 65-56°C (reduzindo 0,3°C a cada

ciclo) e 5 s a 72°C; 2 ciclos de 94°C por 30 s, 56°C por 30 s, 72°C por 5 s e um ciclo final de 72°C por 5 minutos. Para o teste dos parentais, o produto da amplificação foi separado em gel de agarose 3% contendo 0,5 ng/mL de brometo de etídeo.

O tamanho dos alelos em cada loco foi estimado através de marcadores de peso molecular e os padrões de amplificação caracterizados em alelos pela presença e/ou ausência de bandas. Os marcadores com perfis polimórficos em agarose foram selecionados para teste com os híbridos dos diversos cruzamentos, bem como para os acessos de tangerinas. Já para aqueles com padrões monomórficos em agarose, o *screening* foi feito em géis de acrilamida. Nessas reações foram adicionados 13µL de tampão de carregamento e, a seguir, desnaturadas por 5 minutos a 94°C, seguida de choque térmico no gelo, imediatamente antes de ser realizada a eletroforese. A PCR foi aplicada em gel de poliacrilamida 8% e os géis corados com nitrato de prata.

TABELA 1: Plantas de citros avaliadas por marcadores microssatélites ESTs.

Espécie	Nome comum	Observação
<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	laranja Pêra	Genitor
<i>Citrus limonia</i> Osbeck	limão Cravo	Genitor
<i>Citrus sunki</i> Hort. ex. Tan.	tangerina Sunki	Genitor
<i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.	Trifoliata	Genitor
<i>C. reticulata</i> x <i>C. clementina</i>	tangerina Fremont	Genitor
<i>Citrus reticulata</i> Blanco	tangerina Cravo	Genitor
idem	África do Sul	
idem	tangerina Marisol	
idem	Span Americana	
idem	Muscia	
idem	África Do Sul	
<i>C. deliciosa</i> Tenore	Mexerica Sicília	
idem	Mexerica	
	Pernambucana	
<i>C. clementina</i> Hort. ex Tan.	tangerina Clementina	
idem	Clementina de Nules	
<i>C. clementina</i> x <i>C. reticulata</i>	Clementina Caçula	
idem	Clementina Caçula 3	
Idem	Clementina Caçula 4	
Origem desconhecida	Tangerina Thomas	
<i>C. clementina</i> x (<i>C. reticulata</i> x <i>C. paradisi</i>)	tangelo Nova	
<i>C. sinensis</i> x <i>C. reticulata</i>	tangor Murcott	Genitor
<i>C. paradisi</i> x <i>P. trifoliata</i>	Citrumelo Swingle	Genitor
Híbridos de cruzamentos	Sunki x Trifoliata	Híbridos F ₁
	limão Cravo x C.	Híbridos F ₁
	Swingle	Híbridos F ₁
	tangerina Cravo x Pêra	Híbridos F ₁
	tangor Murcott x Pêra	Híbridos F ₁
	Fremont x Murcott	Híbridos F ₁
	Murcott x Pêra	Híbridos F ₁

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A validação e a seleção dos novos marcadores SSRs-ESTs, identificados como SSR-ESTs de 135 a 239, foi feita com todos parentais, com a visualização dos produtos da PCR em gel de agarose 3%. Dos 105 marcadores avaliados, 29 apresentaram polimorfismo (Tabela 2 – locos 140, 142, 149, 159, 162, 166, 167, 179, 187, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 203, 204, 205, 206, 207, 209, 210, 213, 214, 216 e 220), sendo que, entre os marcadores polimórficos, alguns apresentaram maior separação dos alelos, mesmo em géis de agarose, enquanto outros apresentaram pequenas diferenças de tamanho entre os alelos.

TABELA 2: Locos polimórficos validados em todos parentais.

Loco SSR-EST	Forward 5' - 3'	Reverse 5' - 3'	nº de pares de bases
140	ACCATCGAAGACTCCGTCAC	ACGCTTTATCACGGGTTTTG	222
142	TGAAGTCCCTCCAAGAAAGC	AGTCAGAGCCAGAGCCAGAG	119
149	CTGAGCCAAAGGGATGAAAA	TGGGTTTATTGTTGGGCTGT	220
159	TGGGTCATTGATGTTGTGCT	CACAGATGCAGAAGGGGATT	173
162	CCTCACTGCTAAGGCCGAC	CCACAAAGGCTCCTCAACTT	277
166	GGGGTGACCGTGAATAAACA	TTGTCATGGTGATGCTGGTT	115
167	CCACAACACTCACTCCCTAACA	CCACCTAAAGTGAAGCCAGC	198
179	CCGGAAGTCAACGGAGATAA	GAAATCAAACGAGCATCCGT	201
187	CAGGGACTCAAAACACGACA	TATGATGATGGTGGTGGTCG	117
193	AGATGTTGCAAGTTCGCCTT	TGGAAGCAGCCTTGTATGTG	234
194	GGGGAGTGCATTTGTGAGAT	TCCAGTGGCCATTATACCTG	268
195	TCATTACCTCAAAGCACCGA	ATTTCAAGATTCTTGCCCCA	224
196	AACCGAAGATGGAGGGAAGT	ACATTCATGGCCACATCTCA	206
197	CGATCCTTCCTCCCTTTCTC	TGTGCTTGGAACTGTGCTC	204
198	AAAAAGAACAGGAGCAGGCA	AGAACCCACATGCAGAAACC	243
199	GATGGTGATGAGGAGGAGGA	CTCAGGCAGTAACCTCCCAG	219
200	GAAATCCCCATCTTCCCAT	CTTCACAGTCCGCAGCATTA	184
201	AGCTAGGGTTCCCCAGATTC	GGCCTCCAAGTACAACCAAA	276
203	CACAAAACAAAGCGCTAGAGTG	GCACAATCGAAGCAACTTCA	248
204	CTGGCTCAGCTCTGCTCATT	ATGACATAATCGTGCCCTGC	210
205	CGTTTATGGCTCTGGTGGAT	AATAGCTCCACTGCTGCCAC	124
206	TCGCCACTCTCCTTCAGTTT	TTGAGGACGCTGTTGTTGAG	274
209	GAAGCTCGCCATAATCAAA	GACGAGAGGTCCAGAAATCG	262
210	AACCTTCAACTTCCCTCTCCA	ATGCTACCCATACAGCACCC	150
213	GACGTTGTTCTCACCCTTT	CACGTTATTGTGGCGATGAC	142
214	GAGAGAGAGAGCATTTTTCGG	TCATGGCTTATGGGTAAGTGG	100
216	AAGCAGGAGCAACAACAGGT	GCCTCTTACCTGGGCACATA	158
220	GATCAAGAGCGACGGCTTAC	GAACTTCATCGATTGCGCT	124

Na genotipagem em gel de agarose, alelos que apresentam diferenças menores do que dez pares de bases, normalmente são difíceis de serem separados e analisados. Por isso, é necessário selecionar o conjunto dos marcadores com

diferenças maiores nos tamanhos dos fragmentos amplificados por alelo, para que esses iniciadores possam ser mais facilmente utilizados quando a genotipagem for realizada em géis de agarose (VIEIRA et al., 2009). A Figura 1 ilustra a amplificação, para o loco 204, testado para os genitores do programa de melhoramento de citros.

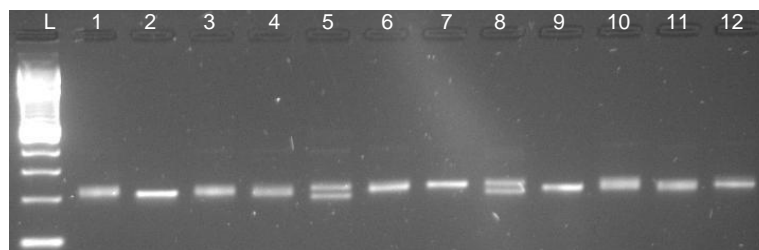


FIGURA 1: Padrão de amplificação do loco SSR-EST 204. L = Ladder 100 bp; 1. Clementina; 2. Murcott, 3. Fremont, 4. tangerina Cravo, 5. limão Cravo, 6. Sunki, 7. Trifoliata, 8. C. Swingle, 9. Pêra, 10. Thomas, 11. África do Sul e 12. Marisol.

Na segunda etapa do trabalho, foi realizada a seleção de marcadores polimórficos para os híbridos dos cruzamentos de limão Cravo x c. Swingle; Trifoliata x Sunki; tangerina Cravo x laranja Pêra; Fremont x Murcott; e Murcott x laranja Pêra. Nesta seleção foram comparados os padrões de amplificação dos parentais com seus respectivos híbridos. O número de marcadores variou de acordo com cruzamento avaliado (Tabela 3). Os padrões de polimorfismo foram visualizados tanto em géis de agarose 3%, quanto em acrilamida 8% (Figura 2).

TABELA 3: Locos polimórficos de acordo com cruzamento avaliado.

Cruzamento	Locos (SSRs-ESTs)
L. Cravo x C. Swingle	159, 179, 194, 197, 199, 200, 203, 206, 207, 209, 213, 220
Trifoliata x Sunki	159, 194, 195, 197, 198, 199, 200, 203, 204, 206, 207, 213, 220
Tang. Cravo x Pêra	166, 167, 187, 194, 195, 198, 203, 204, 206, 207, 209, 213, 214, 220
Fremont x Murcott	199, 204, 209, 210
Murcott x Pêra	166, 167, 194, 198, 199, 203, 204, 206, 209, 210, 213

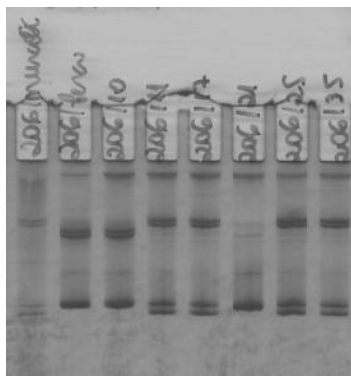


FIGURA 2 – Amplificação do loco SSR-EST 206, para o cruzamento dos parentais Murcott x Pêra e seus respectivos híbridos (10, 11, 17, 21, 25 e 35).

Na terceira etapa do trabalho foi feito *screening* de 14 acessos de tangerinas com 19 locos SSRs (140, 142, 149, 159, 162, 166, 167, 179, 187, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201 e 203), considerados polimórficos entre parentais e híbridos nas etapas anteriores. Desta seleção foram identificados 16 locos polimórficos (142, 149, 159, 162, 167, 179, 187, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201 e 203), conforme ilustrado na Figura 3.

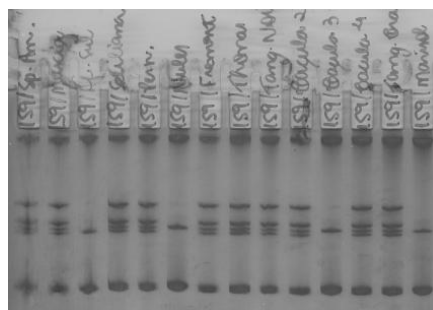


FIGURA 3: Padrão de amplificação para o loco SSR-EST 159, para os acessos de tangerinas: Span Americana, Muscia, África do Sul, Sicília Pernambucana, Nules, Fremont, Thomas, Tang. Nova, Caçula 2, Caçula 3, Caçula 4, Cravo, e Marisol.

CONCLUSÕES

A síntese de marcadores microssatélites a partir do banco CitESTs foi bem sucedida, resultando em 29 locos microssatélites informativos de 105 sequências expressas. Este trabalho resultou em um novo número de marcadores disponíveis para saturação de mapas genéticos e variabilidade, já iniciado pelo grupo de melhoramento do CCSM. Os resultados confirmam o potencial de marcadores SSR-ESTs em estudos de diversidade genética, permitindo a comparação genética intra e

interespecífica, e auxiliando os programas de melhoramento. Porém, até momento não foram encontrados marcadores acesso-específico para utilização em programas de registro de cultivares.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIT, pela bolsa concedida.

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

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. D.; DUBNICK, M.; KERLAVAGE, A.R.; MORENO, R.; KELLEY, J. M.; UTTERBACK, T. R.; NAGLE, J. W.; FIELDS, C. & VENTER, J. C. Sequence identification of 2,375 human brain genes. **Nature**, v.355, p.632–634, 1992.
- HUANG, G.M.; NG, W.; FARKAS, J.; HE, L.; LIANG, H.A.; GORDON, D.; YU, J. & HOOD, L. Prostate cancer expression profiling by cDNA sequencing analysis. **Genomics**, v.59, p.178-186, 1999.
- JAUHAR, PREM P. Genome Analysis: A Prologue. Page1-9 in Prem P. Jauhar, editor. *Methods of Genome Analysis in Plants*. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL. PHILLIPS, R.L.; VASIL, I.K. (Eds.;2001) *DNA-Based Markers in Plants Series: Advances in Cellular and Molecular Biology of Plants*, v. 6 2nd ed., 532 p, 1996.
- 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.
- PALMIERI, D. A.; NOVELLI, V. M.; BASTIANEL, M.; CRISTOFANI-YALY, M.; ASTÚA-MONGE, G.; CARLOS, E. F.; OLIVEIRA, A. C. & MACHADO, M. A. Frequency and distribution of microsatellites from ESTs of citrus. *Genetics and Molecular Biology* 30(3): 1009-1018, 2007.
- SOARES FILHO, W.S.; CUNHA SOBRINHO, A.P.; PASSOS, O.S.; MOITINHO, E.D.B. Maravilha: uma nova seleção de tangerina 'Sunki'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, n.2, p.268-271, 2003.
- VIEIRA, E.S.N.; SCHUSTER, I.; SILVA, R.B.; OLIVEIRA, M.A.R. Variabilidade genética em cultivares de soja determinada com marcadores microssatélites em gel de agarose. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.44, n.11, p.1460-1466, 2009.