

IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES TRAPs ASSOCIADOS COM  
FLORESCIMENTO PRECOCE EM LARANJA DOCE

SALETE **ROCHA**<sup>1</sup>; RODRIGO ROCHA **LATADO**<sup>2</sup>

Nº 11146

**RESUMO**

No programa de Melhoramento Genético de Citros por meio de cruzamentos controlados foram obtidas duas populações de plantas híbridas resultantes de cruzamentos entre a laranjeira Tobias (Pai), que apresenta florescimento precoce, e a laranjeira Pêra-de-Abril (mãe). Após dois anos de cultivo das plantas, algumas plantas híbridas apresentaram florescimento precoce, tal como o progenitor masculino. O objetivo do presente estudo foi usar a técnica de BSA associada com marcadores moleculares TRAPs para tentar identificar alguma marca (banda) associada a característica florescimento precoce em plantas híbridas intraespecíficas de laranjeira doce, visando futura localização do gene responsável pela característica. Foram confeccionados três bulks sendo os dois primeiros formados pela mistura física de DNAs de 10 plantas que florescia precocemente (Bulks F1 e F2) e o terceiro bulk, formado pela mistura de DNAs de 10 plantas que não florescia. Dentre os 144 pares de primers testados apenas três apresentaram polimorfismos entre os bulks F e o NF. Posteriormente quando os “bulk” foram abertos observou-se que apenas alguns indivíduos, que pertenciam aos dois bulks (F ou NF), apresentavam a banda adicional. Assim, pôde-se concluir que as bandas adicionais presentes no bulk NF não estavam totalmente correlacionadas com as características florescimento precoce ou florescimento tardio.

**ABSTRACT**

Two populations of hybrid plants resulting from crosses between sweet orange Tobias (male), which has early flowering, and sweet orange Pêra-de-Abril (female) were obtained in Citrus Breeding Program through controlled crosses. Some two years old hybrids showed earlier flowering, as the male parent. The purpose of this study was to use the technique of TRAPs molecular markers associated with BSA (Bulk Segregant analysis) and try to identify some marks (band) that are

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

<sup>2</sup> Orientador: Rodrigo Rocha Latado- Pesquisador, CCSM/ IAC, Cordeirópolis-SP.

associated with early flowering trait in intraspecific hybrid plant, seeking future location of the gene responsible for this trait. Three bulks were made, the first two being formed by the physical mixture of DNA from 10 plants that flowered early (F1 and F2 bulks) and third bulk, formed by mixing DNA from 10 plants that never flowered (NF). Among the 144 primer pairs tested only three showed polymorphisms between the bulks F's and NF. Later, when we analyse individual plants with the same pair of primers it was observed that only a few individuals, belonging to the both bulks (F or NF), had the additional band. Thus, we concluded that the additional bands present in bulk NF were not fully correlated with the characteristics of early flowering or late flowering.

## INTRODUÇÃO

Os citros são plantas perenes e de ciclo vegetativo longo, isto é, levam muitos anos para iniciarem a produção, o que torna o melhoramento genético para essas espécies um processo longo e trabalhoso.

Apesar do melhoramento genético via hibridação controlada ser uma das principais formas de se obter variabilidade, nos citros existe duas grandes barreiras biológicas que dificultam os cruzamentos, a ocorrência de poliembrião nas sementes e o longo período juvenil de plantas provenientes de sementes (FROST & SOOST, 1968). A maioria dos citros apresenta estas características e as laranjeiras doces [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], não são diferentes.

A juvenilidade representa o período de tempo desde a semeadura até o início da fase reprodutiva das plantas propagadas via sementes. Devido a esta longa juvenilidade, nos primeiros anos de cultivo, as plantas originadas de sementes geralmente são bastante vigorosas, com espinhos e folhagem abundantes e não produzem flores e nem frutos durante vários anos. Desta forma, tem-se um tempo muito longo desde a realização dos cruzamentos até a seleção das melhores plantas da progênie ou das plantas que apresentam características de interesse. Provavelmente por isto, não há relatos na literatura de programas contínuos de melhoramento de laranjas doces, no Brasil e em outros países.

No programa de Melhoramento Genético de Citros do Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC por meio de cruzamentos controlados, no ano de 2006 foram obtidas duas populações de plantas híbridas resultantes de cruzamentos entre a laranjeira Tobias (Pai), que apresenta florescimento precoce, e a laranjeira Pêra-de-Abril (mãe), variedade com sementes monoembriônicas. Após dois anos de cultivo das plantas,

algumas plantas híbridas apresentaram florescimento precoce, tal como o progenitor masculino.

A técnica de “bulk Segregant Analysis” (BSA), envolve a comparação de duas misturas “pools” de amostras de DNA dos indivíduos que apresentam o mesmo fenótipo para determinada característica, provenientes de uma população segregante originária de um único cruzamento. Dentro de cada “bulk”, os indivíduos são identificados para características ou gene de interesse, mas são arbitrários para todos os outros genes. Dois “pools” contrastantes para uma característica (por exemplo: resistência ou suscetibilidade a uma doença particular) são analisados para identificar marcadores que os distinguem. Marcadores que são polimórficos entre os “pools” são relacionados ao loco que determina a característica usada para construir os conjuntos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Uma nova classe de marcadores moleculares dominantes são os TRAPs - *Target region amplification polymorphism* (HU & VICK, 2003). Estes marcadores são baseados em PCR e possibilitam encontrar polimorfismos de DNA, próximos de regiões-alvo utilizando dois *primers*, 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.

O objetivo do presente estudo foi usar a técnica de BSA associada com marcadores moleculares TRAPs para tentar identificar alguma marca (banda) associada a característica florescimento precoce em plantas híbridas intraespecíficas de laranja doce, visando futura localização do gene responsável pela característica.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material vegetal**

Neste estudo foram utilizadas trinta plantas, todas elas híbridas e irmãs, pertencentes a uma população de plantas híbridas obtidas por cruzamento entre as laranjeiras Tobias (Pai) e Pêra-de-Abril (mãe). Dentre estas trinta plantas, 20 floresceram precocemente dois anos após a semedaura das sementes, e as 10 restantes, não apresentaram esta característica.

### Confecção dos ““bulk”s”

O DNA genômico foi extraído de folhas frescas de cada planta individualmente utilizando-se a metodologia descrita por MACHADO et al. (1996). Na fase final da extração, os DNA foram ressuspensos e quantificados, realizando depois, a diluição dos mesmos para a concentração de 100ng/μL cada.

Foram formados três “bulks”, dois compostos pela mistura de DNA’s de 10 plantas cada que apresentaram florescimento precoce (“bulk” F1 e F2) e o terceiro “bulk”, formado por 10 plantas que não floresceram precocemente (“bulk” NF).

Para análise dos três “bulks” foram usados os marcadores moleculares TRAPs. As reações de amplificação do DNA 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 reação de 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 desnaturante 6,0%) conforme recomendações do fabricante.

No total foram testadas 144 combinações de pares de *primers* de marcadores moleculares TRAPs, sendo cada par formado por um primer fixos e um, arbitrário.

Os *primers* fixos foram desenhados a partir dos genes diferencialmente expressos detectados nos trabalhos com hibridização *in silico* a partir da identificação da sequência no CitEST (Cristofani-Yali et al., 2007) e citados a seguir:

01F-5'-TCCCCGAGGCACAGCATC-3';	01R-5'TCGGGGAGTAGCATCAA-3';
02F-5'-ACAGGGCCAAAGGTAAAC-3';	02R-5'-AGCGCGTCCTGGTGATGC-3';
03F-5'-CAATCGTGGCTGTCTGA-3';	03R-5'-ATATACCCAGCCAATGT-3';
04F-5'-AATGGGGGTTTCGGTTTGT-3';	04R-5'-GATCATCATGGGGGTTAC-3';
05F-5'-ACGCGTCCGCCACTCTCA-3';	05R-5'-CCTTTCCCGGTGATACAG-3';
06F-5'-TGGCAGCATCGTCAACT-3';	06R-5'-GGAGACGGCGGGCTTAGA-3';

07F-5'-GGCACCGCACTCACCATC-3'; 07R-5'-TGCTCTGGTTTCGGACAA-3';  
08F-5'-GTGGCGAATTTTGAAGTGT-3'; 08R-5'-CGCGCCCATAGTGAGAG-3';  
09F-5'-GGGCGGTGATCCTGAGAA-3'; 09R-5'-CGCATCCTCGCCGTATTG-3';  
10F-5'-CAGTTTCTTGTTGCTACG-3'; 10R-5'-TGGGGAAACTCACAGGTA-3';  
F1- 5'-GCCCCGTGCTGCCTGATGATT-3' F2-5'-ACAGGGCCAAAGGTAAACACA-3'  
R1-5'- TAATCGACATAAAAGGTCCTC-3' R2-5'- CCTTTGGCCCTGTAGATGGTC-3'

O *primers* arbitrários foram confeccionados de acordo com o citado por Li & Quiros (2001): P1-5'-GACTGCGTACGAATTAAT-3';

P2-5'-GACTGCGTACGAATTTGC-3'; P3-5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3';  
P4-5'-GACTGCGTACGAATTTGA-3' ;P5-5'-GACTGCGTACGAATTAAC-3';  
P6-5'-GACTGCGTACGAATTGCA-3'.

Para cada combinação de *primers* testada foram utilizados os DNA's dos três "bulk"s (F1, F2 e NF) lado a lado, em busca de alguma banda polimórfica que discriminasse o "bulk" NF em relação aos dois "bulks" F1 e F2.

Aquelas combinações de pares de primers que demonstraram haver polimorfismo entre o "bulk" NF e os "bulks" F1 e F2 foram utilizados em novas reações de PCR mas usando os DNAs das plantas isoladamente para confirmar a correlação entre a característica fenotípica (florecimento precoce) e a marca molecular.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 144 combinações de pares de primers de marcadores moleculares TRAPs amplificaram os DNA's dos bulks de forma adequada resultando no número de bandas variando entre 7 e 12 por gel, sendo que cada banda representava um *locus*.

Estas são as principais características dos marcadores moleculares TRAPs, é um marcador dominante que avalia polimorfismos de DNA próximos de regiões-alvo (regiões codificantes) utilizando dois *primers* de 18 a 20 nucleotídeos (um fixo e um aleatório), produzir perfis moleculares com 7 a 10 *loci* por corrida, com fragmentos de DNA contendo aproximadamente 50-900 pb (HU; VICK, 2003).

Das 144 combinações de pares de primers testadas, apenas três revelaram algum polimorfismo no perfil molecular do "bulk" NF (plantas que não florescem precocemente) em relação aos dois "bulks" F (plantas que florescem precocemente).

Os pares de primers 01F-P4, 05F-P5 e 04R-P3 amplificaram perfis moleculares dos três bulks em que foi possível identificar uma banda polimórfica no bulk NF que não havia nos dois bulks F (F1 e F2) (Figura 1).

No entanto, no experimento seguinte em que se realizou a amplificação dos DNAs das plantas individualmente com os mesmos pares de primers (01F-P4, 05F-P5 e 04R-P3) não foi encontrado o padrão esperado, ou seja, a amplificação da banda adicional em todas as plantas que não floresceram precocemente e a não amplificação nas plantas do bulk de florescimento precoce. Em alguns casos, as bandas apareciam em algumas plantas dos dois tratamentos (Figura 2).

Diante destes resultados, pôde-se concluir que as bandas adicionais presentes no bulk NF não estavam totalmente correlacionadas com as características florescimento precoce ou florescimento tardio.

Futuramente serão repetidos estes experimentos com uso da técnica de BSA e marcadores moleculares TRAPs mas com o uso de primers fixos que amplificam regiões gênicas associadas com a via biossintética de indução de florescimento.

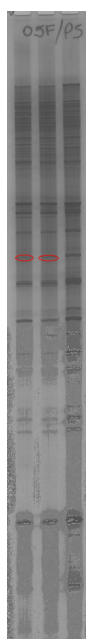


Figura 1. Gel de acrilamida contendo produtos de PCR amplificados das amostras de DNA dos bulks F1, F2 e NF, com o par de primers 05F-P5.

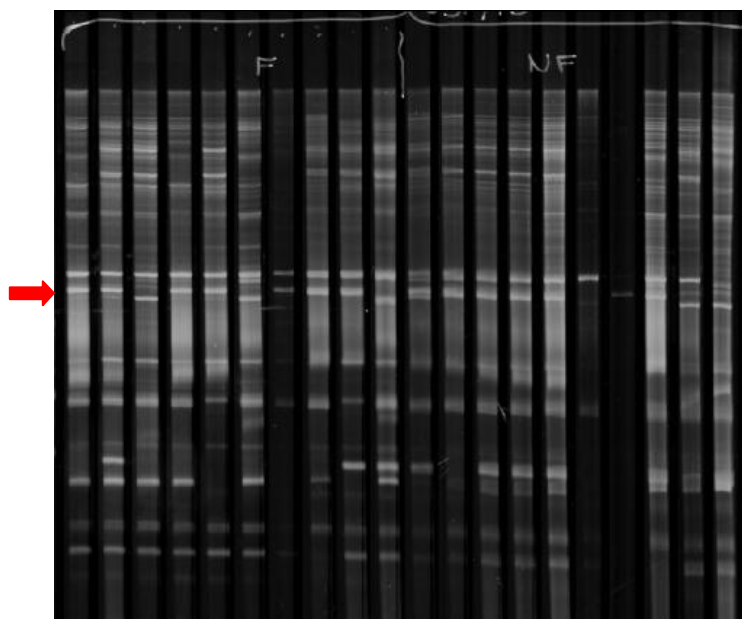


Figura 2. Perfil molecular das plantas pertencentes aos dois “bulks” (F1 e NF), utilizando o par de primers 05F-P5.

## CONCLUSÃO

A combinação de marcadores moleculares TRAPs com a técnica de BSA é aplicável na identificação de marcas associadas a genes de interesse. Contudo, com os primers TRAPs utilizados no presente projeto não foi possível encontrar fragmentos amplificados que estivessem totalmente correlacionadas com as características florescimento precoce ou florescimento tardio em híbridos de laranja doce.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – INCT, pela bolsa concedida.

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

## REFERÊNCIAS

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.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p.220. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).

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.

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.

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.

MICHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by "bulk"ed segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.88, p.9828-9832, 1991.