



**CONSTRUÇÃO DE MAPAS DE LIGAÇÃO GÊNICA DE TORANJA E TANGERINA
CRAVO UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES E
TRAP**

DANIELA Z. BARDELLA¹; MARIÂNGELA CRISTOFANI-YALY²; PAULA C. LOPES³;
DANIEL B. A. CASTRO⁴;

Nº 12121

RESUMO

A citricultura é uma das mais importantes atividades econômicas no Brasil. Um número maior de variedades/genótipos, com potencial para o cultivo comercial, tem sido um dos principais objetivos dos programas de melhoramento genético. Em citros, pouco mais de 20 mapas genéticos foram desenvolvidos nos últimos anos, porém tem sido bastante difícil correlacionar e integrar os grupos de ligação identificados. A incorporação de novos marcadores em um programa de melhoramento genético deverá facilitar a identificação de variedades e híbridos e construção de mapas genéticos. O objetivo deste trabalho foi auxiliar na construção de mapas de ligação em uma população híbrida de toranja com tangerina Cravo. Foram analisados 198 marcadores moleculares microssatélites de bibliotecas genômicas e EST e 15 combinações de TRAP. Dentre os 213 pares de *primers* (198 SSR e 15 TRAP) analisados, 40 (25 SSR e 14 TRAP) deles apresentaram polimorfismo na população de híbridos.

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Bacharelado em Biotecnologia, CCA/UFSCar, Araras-SP, danibardella@gmail.com.

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

³ Colaboradores: Graduanda em Biologia, CCA/UFSCar, Araras-SP.

⁴ Colaboradores: Graduando em Bacharelado em Biotecnologia, CCA/UFSCar, Araras-SP.



ABSTRACT

The citriculture is one of the most important economic activities in Brazil. To increase the number of variety/genotype, with commercial potential, has been one of the main goals of genetic breeding programs. In citrus, a little more than 20 genetic maps were developed, however it has been difficult to correlate and to integrate the identified linkages. The incorporation of new molecular markers in a genetic breeding programs may facilitate varieties and hybrids identification and linkage maps construction. The goal of this study was to improve the construction of linkage maps using a population of hybrids of Chinese pummelo and Cravo mandarin. From all 213 (198 SSR and 15 TRAP) tested primers, 40 (25 SSR and 14 TRAP) showed polymorphism in the hybrids population.

INTRODUÇÃO

A citricultura é uma das mais importantes atividades econômicas no Brasil. Não obstante a importância econômica e social que representa a citricultura para o país, um número maior de variedades/genótipos com potencial para o cultivo comercial, tanto para a indústria quanto para o consumo *in natura*, tem sido um dos principais objetivos dos programas de melhoramento genético.

Embora os desafios na obtenção de progênie em cruzamentos dentro de gênero *Citrus* e entre gêneros próximos sejam consideráveis, existem varias fontes de resistência a fatores bióticos e abióticos que podem ser potencializadas na obtenção de indivíduos com características agrônômicas e industriais desejáveis.

Tendo em vista a importância de se obter variabilidade como forma de superar problemas, uma das metas do programa de melhoramento do Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC tem sido a obtenção de híbridos de porta-enxertos e copas, que visam ampliar o conhecimento sobre a herança da resistência ou suscetibilidade assim como o número de variedades utilizadas na citricultura (MACHADO et al., 2005).

Em citros, pouco mais de 20 mapas genéticos foram desenvolvidos nos últimos anos por diferentes grupos de pesquisa no mundo, porém tem sido bastante difícil correlacionar e integrar os grupos de ligação identificados nesses mapas devido ao pequeno número de marcadores em comum (OSMAN et al. 2010). A incorporação de novos marcadores em um programa de melhoramento genético resultará não apenas em aumento significativo do nível de saturação dos mapas de ligação já existentes, mas também deverá facilitar a identificação de variedades e híbridos, além de auxiliar



na localização e clonagem de genes potencialmente associados com características de importância econômica tais como resistência a doenças, produtividade, resistência à seca, etc.

O principal objetivo do presente trabalho foi selecionar e genotipar marcadores microssatélites ou SSR e TRAP desenvolvidos a partir dos dados do CitEST (Citrus ESTs) na população de toranja Chinesa vs tangerina Cravo visando à construção de mapas genéticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal: foi utilizada a população de 77 híbridos originados pelo cruzamento controlado de toranja Chinesa (*Citrus grandis*) x tangerina Cravo (*Citrus reticulata*) com seus genitores para seleção e genotipagem de marcadores microssatélites (SSR - Simple Sequence Repeats) e TRAP (Targuet Region Amplification Polymorphism).

Extração do DNA total:

O DNA foi extraído a partir de folhas frescas utilizando o método CTAB de Murray e Thompson (1980), com adaptações introduzidas por Machado et al. (1996). A quantificação do DNA foi realizada utilizando NanoDrop, posteriormente, o DNA foi padronizado na concentração de 50 ng μL^{-1} .

Marcadores microssatélites (SSR – *Simple Sequence Repeats*):

Neste trabalho, 198 dos 400 marcadores desenvolvidos a partir das bibliotecas genômicas e de EST (Expressed Sequence Tags) foram validados e utilizados com os indivíduos da população de híbridos, sendo 116 EST Genômicos e 82 EST. A validação preliminar foi realizada utilizando-se amostra dos genitores e de seis híbridos.

As reações de amplificação foram preparadas com um volume final de 13 μL contendo 100 ng de DNA, 1,3 μL de tampão de reação, 1,7 μL de solução de MgCl_2 , 0,2 mM de cada dNTP, 0,1 μM de cada *primer* e 1,5 U de Taq polimerase. A amplificação foi conduzida em termocicladores MJ Research Thermocycler (em placas de 96 poços) programado para 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 65-56 °C por 30 s e 72 °C por 5 s. A temperatura de anelamento se inicia a 65 °C, decrescendo de 0,3 °C a cada ciclo seguido por três ciclos de anelamento a 56 °C.

Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose 3% preparado com tampão TAE (0,04 M Tris-acetato, 1 mM de EDTA) e corado com



brometo de etídio ($0,5 \text{ ng mL}^{-1}$). Como marcador molecular, foi utilizado *ladder* DNA de 1kb *Plus*. O perfil de bandas foi visualizado sobre luz ultravioleta.

Marcadores TRAP (target Region Amplification Polymorphism):

Primers fixos: Dez *primers* fixos foram desenhados utilizando o programa Primer3 a partir dos genes diferencialmente expressos detectados nos trabalhos com hibridização *in silico* a partir da identificação da seqüência no CitEST (Citrus EST) de plantas infectadas ou não com o *Citrus tristeza virus* (CTV), gomose de *Phytophthora* e *Xylella fastidiosa* (CRISTOFANI et al., 2007; CAMPOS et al., 2007).

Os *primers* arbitrários foram desenhados de acordo com Li e Quiros (2001). As combinações de *primers* testados foram utilizadas em toda a população de híbridos junto com os genitores para posterior construção do mapa genético.

As reações de amplificação para TRAP foram conduzidas como as de microssatélites, sendo preparadas com um volume final de 13 μL contendo 100 ng de DNA, 1,3 μL de tampão de reação, 1,7 μL de solução de MgCl_2 , 0,2 mM de cada dNTP, 0,1 μM de cada *primer* e 1,5 U de Taq polimerase. A amplificação foi conduzida em termocicladores MJ Research Thermocycler (em placas de 96 poços) programados com temperatura de desnaturação do DNA a 94°C por 2 min. Seguido de 5 ciclos a 94°C por 45s, 35°C por 45s e 72°C por 1min, com 35 ciclos subseqüentes a 94°C por 45s, 50°C por 45s, 72°C por um min e um passo de extensão a 72°C por 7 min.

Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose 2% com brometo de etídio ($0,5 \text{ ng mL}^{-1}$). A corrida eletroforética foi realizada com tampão TAE 1x e as fotos foram realizadas em aparelho de foto documentação sobre luz UV. Como marcador molecular, foi utilizado *ladder* DNA de 1kb *Plus*, como anteriormente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra o número de alelos e o tamanho dos *amplicons* dos *primers* SSR genômicos que apresentaram polimorfismo. Dos 116 *primers* testados, 45 foram polimórficos entre os genitores e desses, 14 segregaram na população de híbridos.



TABELA 1: *Primers* SSR genômicos analisados

Combinações de Primers SSR Genômicos	Número de Alelos	Tamanho dos Amplicons (pb)
GEN 08	3	75-125
GEN 09	3	240-300
GEN 10	3	260-300
GEN 15	3	50-75
GEN 87	4	40-50
GEN 93	2	160-175
GEN 95	4	75-130
GEN 107	4	60-70
GEN 108	2	45-55
GEN 120	2	50-100
GEN 130	4	70-140
GEN 148	3	75-85
GEN 152	3	150-210
GEN 171	4	80-100

Já os SSR - EST, dos 82 testados, 68 mostraram polimorfismo entre os genitores, sendo que 11 segregaram na população. Na Tabela 2, é possível identificar o par de *primer* polimórfico, o número de alelos que ele possui e o tamanho dos *amplicons*.

TABELA 2: *Primers* SSR - EST analisados

Combinações de Primers SSR – EST	Número de Alelos	Tamanho dos Amplicons (pb)
EST 01	4	200-250
EST 03	3	50-70
EST 14	4	150-190
EST 15	3	190-230
EST 18	3	200-240
EST 26	3	300-350
EST 34	3	650-750
EST 43	3	530-540
EST 52	3	530-600
EST 54	3	490-550
EST 92	3	700-750

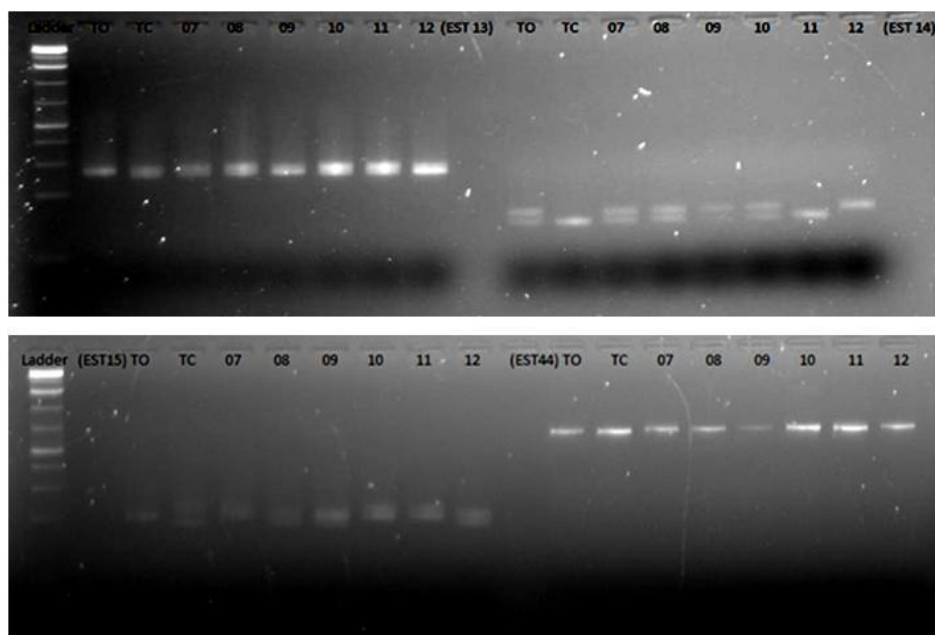


FIGURA 1: Gel de agarose com *primers* microssatélite. Validação dos de *primers* SSR EST 13, 14, 15 e 44, apresentando polimorfismo e segregação na progênie nos SSR ESTs 14 e 15. Nos géis, identificam-se: o *ladder* 1kb *Plus* e, para cada *primer*, os genitores e amostras de seis híbridos.

Para os TRAPs, das 60 combinações, 15 foram avaliadas. Como era de se esperar, estes marcadores apresentaram uma taxa de polimorfismo elevada, tendo 14, dentre os 15 trabalhados, apresentado um ou mais *loci* polimórficos. A Tabela 3 mostra as 14 combinações que apresentaram polimorfismo, o número de *loci* polimórficos de cada um deles, o tipo de segregação e o tamanho dos *amplicons*.

TABELA 3: Combinações de TRAP analisadas

Combinação de Primers – TRAP	Número de <i>loci</i> polimórficos	Peso molecular (pb) e tipo de segregação
P1F1	2	100 (1:1); 290 (3:1)
P1F2	6	75 (1:1); 100 (1:1); 350 (3:1); 500 (3:1); 1000 (1:1); 1480 (1:1)
P1F3	2	310 (1:1), 400 (1:1)
P1F4	3	200 (3:1); 280 (1:1); 320 (1:1)
P1F5	1	200 (3:1)
P1F6	1	600 (1:1)
P1F8	1	710 (1:1)
P1F9	4	310 (1:1); 495 (1:1); 1300 (1:1); 1400 (1:1)
P1F10	2	410 (1:1); 480 (1:1)
P2F3	1	700 (1:1)
P2F4	2	1150 (1:1); 1500 (1:1)
P2F5	2	700 (3:1); 1200 (1:1)
P2F6	2	220 (1:1); 500 (1:1)
P2F7	1	410 (1:1)

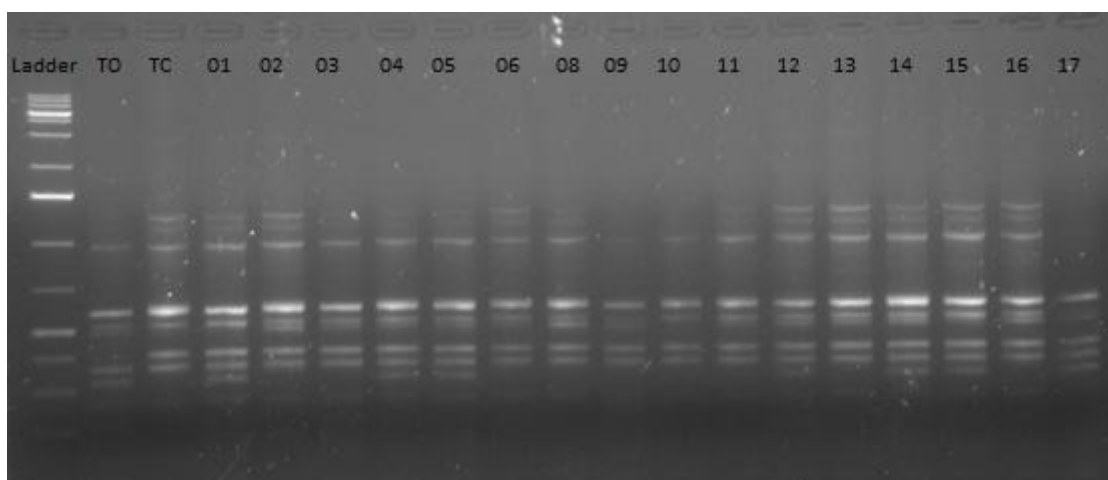


FIGURA 2: Exemplo de polimorfismo apresentado pelo par de *primer* TRAP P1F9. Na foto, foi utilizado marcador de peso molecular *ladder* 1 kb plus. As amostras são os genitores (toranja China - TO e tangerina Cravo - TC) e 16 híbridos provenientes do cruzamento entre eles.

A construção dos mapas de ligação de toranja e tangerina Cravo está em andamento.



CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos neste trabalho dos 198 primers microssatélites, apenas 25 apresentaram polimorfismo em suas amplificações. Nos TRAPs, como era de se esperar, a taxa de polimorfismo encontrada foi maior. Das 15 combinações trabalhadas, 14 foram polimórficas entre os genitores e segregaram na população.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.

Ao Instituto Agrônomo – Centro APTA Citros Sylvio Moreira, pela oportunidade de estágio.

REFERÊNCIAS

- CAMPOS, M. A., et al. (2007). PR gene families oh citrus: an overall from their tissue specific-biotic and abiotic inducible expression profiles bases on ESTs approach. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, p.972-979.
- CRISTOFANI-YALY, M., et al. (2007). Differential expression of genes identified from *Poncirus trifoliata* tissue inoculated with CTV throught EST analysis and *in silico* hybridization. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, p. 917-930.
- LI G., QUIROS, C. F., (2001). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. **Theor Appl Genet** 103: 455-461.
- MACHADO, M. A., COLETTA-FILHO, H. D., TARGON, M. L. N., POMPEU, JR. J., (1996). Genet Relationship of Mediterranean Mandarins (*Citrus deliciosa* tenore) using RAPD markers. **Euphytica**, v.92, p. 321-326.
- MURRAY, M. G., THOMPSON, W. F., (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**. 8: 4321-25.
- OSMAN, G., AYDIN, U., IHSAN, C., UBEYIT, S., ERCAN, C., (2010). A new citrus linkage map based on SRAP, SSR, ISSR, POGP, RGA and RAPD market. **Euphytica**, v. 173, p. 2265-277, DOI: 10.1007/s10681-010-0146-7.