

CONSTRUÇÃO DE MAPAS DE LIGAÇÃO GÊNICA DE TANGERINA CRAVO E LARANJA PÊRA UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES, TRAP e SNPs

PAULA C. LOPES¹; MARIÂNGELA C. YALY²; DANIELA Z. BARDELLA³; DANIEL B. A.
CASTRO⁴
Nº 12112

RESUMO

A pequena quantidade de variedades de citros utilizadas comercialmente contribui para a vulnerabilidade da cultura em relação a problemas fitossanitários, portanto há a necessidade de unir ferramentas biotecnológicas e metodologias tradicionais de melhoramento genético para que o número de variedades aumente. Foram realizados diversos experimentos, através de cruzamentos controlados, para avaliar a resistência das plantas a diversas doenças como a clorose variegada dos citros (CVC) e a tristeza (*Citrus tristeza virus* - CTV), além de verificar as características agrônomicas como época de maturação, tamanho da planta, quantidade de sementes, produtividade e qualidade dos frutos. Os 76 híbridos resultantes do cruzamento de tangerina Cravo e laranja Pêra, já foram utilizados para a construção de mapas de ligação gênica com o marcador molecular RAPD, portanto o objetivo desse trabalho é incluir os marcadores moleculares SSR (Simple Sequence Repeats), TRAPs (Target Region Amplification Polymorphism) e SNPs (single Nucleotide Polymorphism) nos mapas genéticos de laranja Pêra e tangerina Cravo. Através do presente trabalho foi possível selecionar e genotipar na população 76 marcadores TRAPs e 26 SSR. A construção dos mapas de ligação está em andamento.

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Ciências Biológicas, UFSCar/CCA, Araras-SP, paulacruzlopes@hotmail.com.

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

³ Colaborador: Graduação em Biotecnologia, UFSCar/CCA, Araras-SP.

⁴ Colaborador: Graduação em Biotecnologia, UFSCar/CCA, Araras-SP.

ABSTRACT

The small amount of citrus varieties used commercially contributes to the vulnerability of culture in relation to phytosanitary problems, so there is the need to combine biotechnological tools and traditional methods of genetic improvement to increase the number of varieties. Several experiments were conducted by means of controlled crosses to evaluate plant resistance to various diseases such as citrus variegated chlorosis (CVC) and Tristeza (*Citrus tristeza virus* - CTV), and check the agronomic characteristics such as period of ripening, plant size, number of seeds, productivity and fruit quality. The 76 hybrids of Cravo mandarin and Pera sweet orange, have been used to construct genetic linkage maps with RAPD molecular marker, so the aim of this study was to include molecular markers SSR (Simple Sequence Repeats), TRAPs (Target region Amplification Polymorphism) and SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) in the genetic maps of Cravo mandarin and Pera sweet orange. With the present work, it was possible to select and genotype in the population 76 TRAPs and 26 SSR markers. The construction of linkage maps is in progress.

INTRODUÇÃO

A citricultura é uma das atividades econômicas mais importantes do Brasil, porém a cultura de citros é bastante afetada por diversos problemas fitossanitários, devido ao pequeno número de variedades utilizadas comercialmente. Um número maior de variedades / genótipos com o potencial para cultivo comercial tem sido um dos principais objetivos dos programas de melhoramento genético de citros.

Ferramentas biotecnológicas como a utilização de marcadores moleculares e auxiliam na obtenção de mapas de ligação gênica, possibilitando a avaliação de várias fontes de resistência a fatores bióticos e abióticos da planta.

Marcadores codominantes como os Microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats) são de extrema importância para a construção de mapas, pois permitem a distinção de genótipos heterozigotos e homozigotos (CRISTOFANI et al., 2010).

Os TRAPs possuem dois pares de *primers*, os fixos e os arbitrários. Os *primers* fixos são desenhados a partir de uma sequência alvo, os *primers* arbitrários são sequências ricas em AT ou GC. Através da utilização deste marcador pesquisadores tem buscado genótipos com características de interesse agrônomo.

A utilização desses marcadores nos mapas de ligação gênica de tangerina Cravo (*Citrus reticulata*) e laranja Pera (*Citrus sinensis*) possibilitará ampliar o número

de marcadores moleculares em mapas existentes e trabalhos futuros envolvendo mapeamento de regiões genômicas de interesse, como a resistência a clorose variegada dos citros (CVC), uma vez que, a tangerina Cravo é resistente à doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e extração do DNA total

Foram coletadas folhas de 76 híbridos e de seus genitores (Figura 1). Essas folhas passaram por um processo de limpeza, posteriormente, a extração total do DNA foi realizada de acordo com a metodologia de Murray e Thompson (1980), com adaptações introduzidas por Machado et al. (1996). A quantificação do DNA extraído foi realizada através de sua comparação com DNA padrão de concentração conhecida.

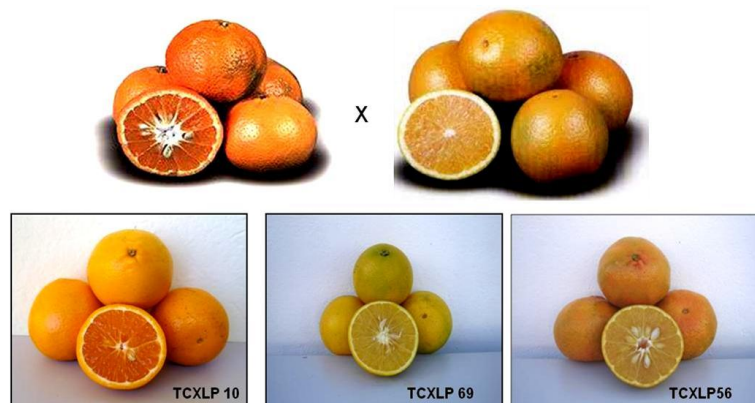


FIGURA 1. Tangerina Cravo vs laranja Pêra e amostras de híbridos da progênie .

Marcadores TRAP (Target Region Amplification Polymorphism)

Nas atividades com marcadores TRAP, foram utilizados quatro *primers* fixos e seis arbitrários. Os primers fixos foram desenhados a partir dos genes diferencialmente expressos detectados nos trabalhos com hibridação *in silico* a partir da identificação da sequência no CitEST (Citros 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). O programa Primer3 (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>) foi utilizado para desenhar os primers.

As reações de amplificação foram conduzidas a um volume final de 25 µL com os seguintes componentes: 2 µL (50 ng) da amostra de DNA, 2,5 µL do 10 × tampão

de reação, 2,5 µL de 25 mM MgCl₂, 1 µL de 5 mM dNTPs, 1 µL dos *primers* arbitrários e 1 µL dos *primers* fixos e 0,2 µL de Taq DNA polimerase. A PCR foi conduzida em termocicladores Veriti™ Dx 96-Well Thermal Cycler (Life technologies/Applied Biosystems) 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, 72°C por 1 min e um passo de extensão a 72°C por 7 min.

Após as amplificações das amostras foi realizada a eletroforese dos produtos amplificados em gel de Agarose 2% com brometo de etídio, explicitando assim, possíveis polimorfismos nos genes. Os locos polimórficos foram avaliados quanto aos tipos de segregação e ao número locos por combinações de pares de *primers*.

Marcadores Microssatélites

SSR. Polimorfismo de *loci* SSR foi acessado a partir da seleção de 30 pares de *primers* desenhados por Palmieri *et al.* (2007) tendo por base as sequências de microssatélites obtidas do banco de dados do genoma de citros (CitEST). As reações de amplificação foram preparadas em um volume final de 13 µL e constituídas de H₂O milliQ, Tampão 10X [(NH₄)₂SO₄ - MgCl₂], MgCl₂ 1,5 mM (Fermentas©); dNTPs - 2,0 mM (Fermentas©); 0,1 mM de cada *primer*, Taq DNA polimerase (1,5 U) (Fermentas©) e de 2 µL de solução de DNA (100 ng). A amplificação foi conduzida em termocicladores Veriti™ Dx 96-Well Thermal Cycler (Life technologies/Applied Biosystems) 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.

Após a realização das amplificações das amostras, foi preparado um gel de Agarose 3% junto ao brometo de etídio, para a verificação de alelos homozigotos ou/ heterozigotos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Loci TRAP e SSR. A seleção de polimorfismo em *loci* TRAP (Figura 2A) e SSR (Figura 2B) foi realizada primeiramente nos dois genitores e seis híbridos tomados aleatoriamente na população-mapa. Os *primers* polimórficos foram empregados na genotipagem de todos os genótipos da população-mapa.

Dentre os 24 pares de combinações de *primers* TRAP avaliados, 20 foram selecionados (Tabela 1), e resultaram na geração de 76 marcadores, variando de duas a seis marcas, com uma média de 3,8 marcadores/par de *primer*.

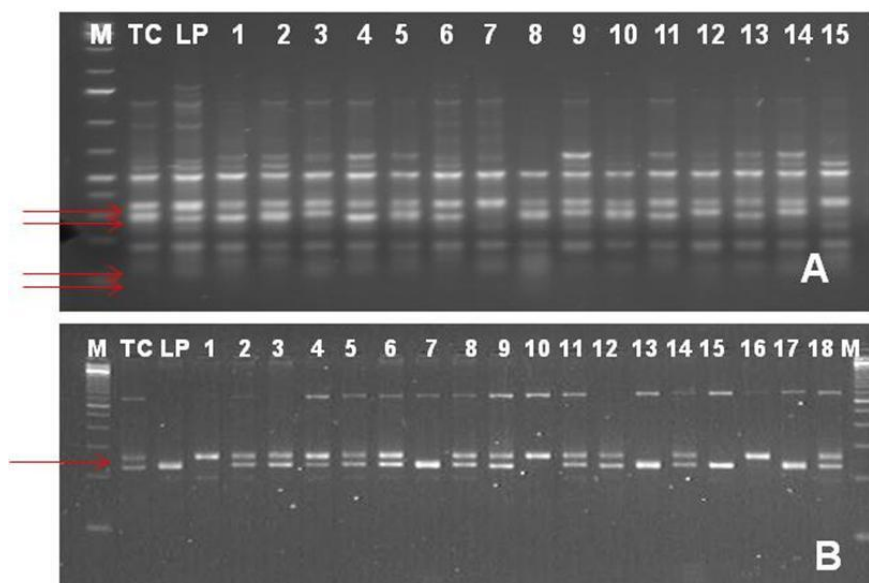


Figura 2. (A) Gel de agarose 2% com brometo de etídio, apontando locos polimórficos do marcador molecular TRAP, obtido pela combinação dos primers 03F e 02A. M = marcador de peso molecular (Ladder 1Kb plus), TC = tangerina Cravo, LP = laranja Pêra, de 1 a 15 = híbridos de laranja Pêra e tangerina Cravo. (B) Gel de agarose 3% com Brometo de etídio, apontando loco polimórfico do marcador molecular SSR 40.

Entre os primers testados foram avaliados o número de locos polimórficos e o tipo de segregação desses alelos (Tabela 1).

TABELA 1. Categorias funcionais de cada gene alvo, o número de alelos polimórficos obtidos a partir de 20 combinações de *primers* fixos e arbitrários e o tipo de segregação desses alelos.

Categoria Funcional	Gene Alvo	<i>Primers</i>		Nº de locos polimórficos	Tipo de segregação
		Fixos	Arbitrários		
Metabolismo	Síntese de ACC	01	01	04	1:1 e 3:1
			02	03	1:1 e 3:1
			03	03	1:1 e 3:1
			04	03	1:1 e 3:1
			05	03	3:1
			06	02	3:1
Metabolismo	Ácido cafeico-O-metiltransferase	02	01	05	1:1 e 3:1
			02	03	1:1 e 3:1
			03	05	1:1 e 3:1
			05	05	3:1
			06	03	1:1 e 3:1
Metabolismo	Sacarose Sintase	03	01	04	1:1 e 3:1
			02	05	1:1 e 3:1
			03	04	1:1 e 3:1
			04	06	1:1 e 3:1
			05	03	1:1 e 3:1
			06	06	1:1 e 3:1
Energia	Ribulose 1,5-Bifosfato Carboxilase	04	01	04	1:1 e 3:1
			02	03	1:1
			03	02	1:1

Em relação aos marcadores microssatélites (Figura 2B) dos 30 pares de *primers* 26 foram selecionados com base no polimorfismo entre os genitores e a segregação na progênie, totalizando 26 SSRs genômicos e derivados de seqüências expressas (EST-SSRs). A genotipagem dos marcadores SSR na progênie e a construção dos mapas de ligação estão em andamento.

CONCLUSÃO

Através do presente trabalho foi possível ampliar o número de marcadores moleculares para a construção de mapas de ligação gênica de tangerina Cravo e laranja Pêra e possibilitará o mapeamento de genes de resistência e/ou de interesse agrônomo.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBITI, pela bolsa concedida.

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

REFERÊNCIAS

- CAMPOS MA, ROSA DD, TEIXEIRA JEC, TARGON MLPN, SOUZA AA, PAIVA LV, STACH-MACHADO DR, MACHADO MA (2007) **PR gene families of citrus: an overall from their tissue specific-biotic and abiotic inducible expression profiles based on ESTs approach**. Genetics and Molecular Biology, v.30, p.972-979.
- CRISTOFANI-YALY M, BERGER IJ, TARGON MLPN, TAKITA MA, DORTA SO, FREITAS-ASTUA J, SOUZA AA, BOSCARIOL-CAMARGO RL, REIS MS, MACHADO MA (2007) **Differential expression of genes identified from *Poncirus trifoliata* tissue inoculated with CTV through EST analysis and *in silico* hybridization**. Genetics and Molecular Biology, v.30, p. 917-930.
- CRISTOFANI-YALY M, NOVELLI VM, BASTIANEL M, MACHADO MA (2010) **Transferability and Level of Heterozygosity of Microsatellite Markers in Citrus Species** Plant Mol Biol Rep. DOI 10.1007/s11105-010-0241-x.
- LI G, QUIROS CF (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 MA, COLETTA-FILHO HD, TARGON MLN, POMPEU JR J (1996) **Genetic relationship of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers**. Euphytica, v.92, p.321-326.
- MURRAY MG, THOMPSON WF (1980) **Rapid isolation of high molecular weight plant DNA**. Nucleic Acids Research 8: 4321-25.
- PALMIERI, D.A.; NOVELLI, V.M.; BASTIANEL, M.; CRISTOFANI-YALY, M.; ASTÚA-MONGE, G.; CARLOS, E.F.; OLIVEIRA, A.C. & MACHADO, M.A. 2007. Frequency and distribution of microsatellites from ESTs of *citrus*. **Genetics and Molecular Biology**, Rib. Preto/SP, v.30, p.1009-1018.