

FINGERPRINT MOLECULAR EM GENÓTIPOS DE CITROS UTILIZANDO MARCADORES MICROSATELITES NÃO-ANCORADOS

CLAUDIA FORTES FERREIRA¹; WALTER SANTOS SOARES FILHO²; AMANDA GABRIELLY SANTANA SILVA³; TAÍS ARAÚJO SANTOS⁴; DOMINGO HAROLDO RUDOLFO CONRADO REINHARDT⁵

INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de citros e contribui com cerca de 15% da produção global (FAO, 2017). Diante da importância da citricultura, principalmente no cenário econômico, diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de explorar o potencial máximo da cultura e minimizar os desafios enfrentados pela cadeia de produção citrícola nacional (PIMENTEL et al., 2014).

O conhecimento da base genética de porta-enxertos e híbridos de grande valor comercial é de suma importância para a conservação, caracterização e uso de recursos genéticos no melhoramento de plantas. Dessa forma, diversos métodos de análise molecular têm sido utilizados em estudos de variabilidade genética em plantas, em especial na fruticultura (REIS et al., 2015).

Dentre os diversos tipos de marcadores moleculares utilizados para o estudo de diversidade genética, destaca-se os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), ou também denominados de marcadores microssatélites não-ancorados (BORNET & BRANCHARD, 2001), que tem sido amplamente utilizados para relevar o polimorfismo molecular em diversas espécies de plantas devido a sua ampla distribuição no genoma. Esse tipo de marcador é muito importante para estudos de caracterização genética e *fingerprint* molecular devido à sua alta taxa de discriminação, especialmente entre indivíduos proximamente relacionados (WHITE et al., 2018), como muita das vezes é o caso de acessos em bancos germoplasma.

As comparações de *fingerprints* moleculares entre espécies, híbridos ou variedades em estudos de recursos genéticos de plantas, tem como finalidade principal fornecer um perfil eletroforético molecular, que pode, se necessário, ser utilizado para assegurar os direitos dos melhoristas em caso de contestação de idoneidade, principalmente em culturas que se propagam vegetativamente (TORRE et al., 2006). Da mesma forma, a verificação da identidade das plantas pode favorecer estudos de adoção e distribuição geográfica de variedades lançadas pelos programas de melhoramento.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver perfis moleculares de 15 PEs de citros para obtenção do *fingerprint* por meio de análises moleculares.

1. Embrapa Mandioca e Fruticultura. E-mail: claudia.ferreira@embrapa.br
2. Embrapa Mandioca e Fruticultura. E-mail: walter.soares@embrapa.br
3. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. E-mail: manda.gaby@hotmail.com
4. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. E-mail: tai.19@hotmail.com
5. Embrapa Mandioca e Fruticultura. E-mail: domingo.reinhardt@embrapa.br

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas folhas jovens de 15 porta-enxertos de citros, a citar: HTR-051, HTR-053, HTR-206, HTR-208, TSKFL x CTSW – 004, TSKC x CTSW – 028, TSKC x CTSW – 041, TSKC x (LCR x TR) – 017, TSKC x (LCR x TR) – 059, TSKC x TRFD – 003, TSKC x TRFD – 006, TSKC x TRFD – 007, TSKC x CTQT1439 – 014, LCR x TR – 001, LCR x CTSW – 009. Os PEs foram coletados no BAG-citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizada no município de Cruz das Almas, Bahia. As amostras foram armazenadas em freezer (-20°C) até o momento da extração.

A extração do DNA total foi realizada pelo método Doyle & Doyle, (1990) com modificações. Depois de extraído, a concentração do DNA foi estimada através de eletroforese em gel de agarose a 1%. Após essa etapa, a amostra de DNA foi ajustada para 10 ng/μL, para posteriores ampliações utilizando primers ISSR.

Os primers ISSR foram selecionados conforme testes preliminares de ajuste de temperatura de anelamento e amplificação realizados no Laboratório de biologia molecular da Embrapa. Com base nesses testes, foi possível selecionar 40 primers a serem amplificados. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% e as imagens capturadas para genotipagem.

A genotipagem seguiu o padrão de ausência (0) e presença de bandas (1) e posteriormente os dados foram submetidos a dois softwares: GENES (CRUZ et al. 2016) – comando “*fingerprint*” e o software R-Program (R-Core Development Team, 2014) - pacotes “*vegan*” e “*poppr*”. O uso de ambas metodologias permitiu não somente a identificação dos principais primers a serem utilizados no *fingerprint*, mas também as principais marcas responsáveis pela diferenciação entre os indivíduos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os acessos do BAG-Citros da Embrapa em campo e em casa de vegetação encontram-se na Figura 1 (A e B).



Figura 1(A e B): A: Acessos de genótipos de citros pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura. A: Acessos em campo e B: Acessos mantidos em casa de vegetação. Créditos das fotos: Dr. Orlando Sampaio Passos.

Dos 40 primers utilizados, 18 amplificaram com sucesso e um total de 109 fragmentos foram obtidos. Dos 109, 38 locos foram monomórficos e 71 locos polimórficos. Esses últimos foram então utilizados na análise molecular.

Pela análise de exclusão do GENES, foram detectadas 5 marcas mais polimórficas, sendo 3 dessas marcas geradas pelo mesmo primer, ISSR40 (TriGTG3'YC) (Figura 1C), seguido do TriGTG, e TriCAG3'YC.

Já a análise baseada no acúmulo de bandas pelo programa R (Development Core Team, 2016) com uso dos pacotes *vegan* e *poppr* (Figura 2), revelou que sete locos já seriam suficientes para gerar o *fingerprint* desse conjunto de genótipos ao considerar o arquivo original de dados da planilha de genotipagem, sendo os primers mais importantes o ISSR9 (DiCA5'T), ISSR54 (TriATG3'RC) e ISSR26 (DiGT5'CR).

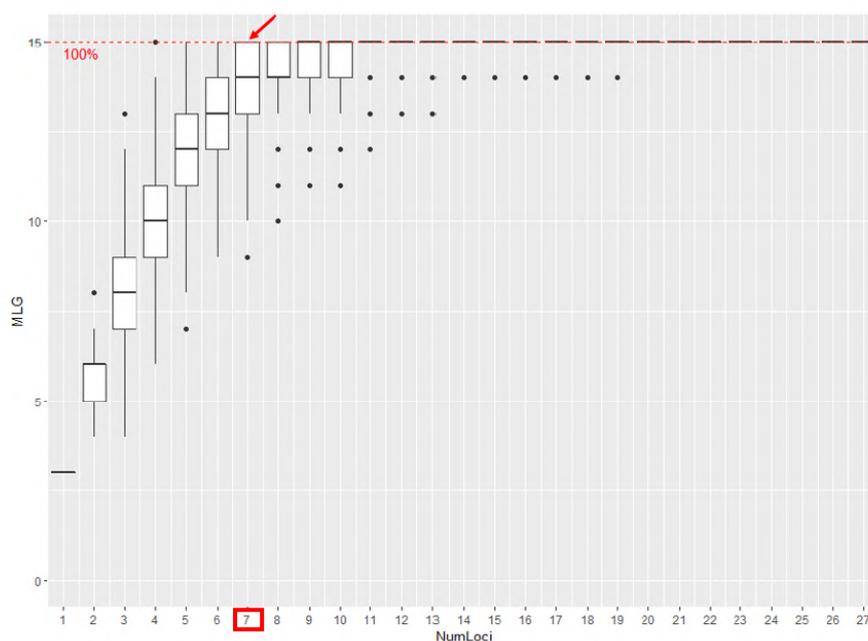


Figura 2 - Análise por acúmulo de bandas gerada com auxílio dos pacotes *vegan* e *poppr* no software “R”. Entre os primers que foram eficazes em gerar a identidade molecular dos indivíduos, destacam-se: ISSR 9 (TriGTG3'YC), ISSR54 (TriGTG), e ISSR26 (TriCAG3'YC). A seta vermelha indica o número mínimo de bandas necessárias para diferenciar o conjunto de genótipos (1-15), que no caso, foi sete (100%).

O perfil eletroforético do primer ISSR 40 e ISSR 9 para os 15 PEs em estudo, encontra-se na Figura 3 (A e B).

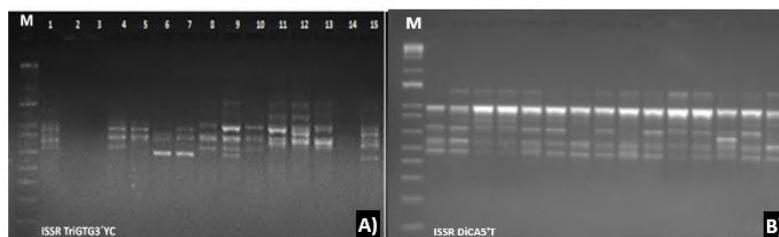


Figura 3 (A e B): Perfil eletroforético dos 15 genótipos de PEs de citros: (A): ISSR40 TriGTG3'YC (mais polimórfico). M = marcador molecular 1 kb (Invitrogen). 1-15: genótipos de PEs de citros. (B) ISSR 9 (DiCA5'T). M = marcador molecular 1 kb (Invitrogen). 1-15: genótipos de citros.

CONCLUSÕES

As análises realizadas permitiram a elaboração de um *fingerprint* molecular entre os 15 genótipos, além de determinar os primers que foram mais eficazes no presente estudo. Esse estudo preliminar é importante para garantir a identidade genética dos PEs de citros, não somente por fornecer seus perfis moleculares, mas também por fornecer informações de forma a assegurar os direitos dos melhoristas caso haja contestação de idoneidade dos materiais.

REFERÊNCIAS

- BORNET, B & BRANCHARD. Nonanchored Inter Simple Repeat (ISSR) markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**, p. 209–215, 2001.
- CRUZ, C.D. **Programa GENES**: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2016. 442 p.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v.12, n.1, p.13-15, 1990.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Citrus fruit - fresh and processed statistical bulletin 2016**, 77 p. 2017.
- PIMENTEL, U. V.; MARTINS, A. B. G.; BARBOSA, J. C.; CAVALLARI, L. L. Nutrição do porta-enxerto 'Flying Dragon'. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 36, n. 2, p.495-502, 2014.
- R development Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2016.
- REIS, R. V. et al. Genetic dissimilarity and selection of putative mutants of Terra Maranhão plantain cultivar using the Ward-MLM strategy. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 15339-15348, 2015.
- TORRE, M.C.P. Construction of a molecular identification profile of new varieties of *Nierembergia linariaefolia* by anchored microsatellites. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, n.3., p. 240-252, 2006.
- WHITE, L. A. S., SILVA, A. V. C., ALVARES-CARVALHO, S. V., SILVA-MANN, R., ARRIGONI-BLANK, M. F., SOUZA, E. M. S., ... & BLANK, A. F. Genetic diversity of a native population of *Myrcia ovata* (Myrtaceae) using ISSR molecular markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 17, n.3, p. 1-11, 2018.