

MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS AOS ALELOS *alc* (*alcobaça*), *nor* (*non-ripening*), *hp* (*high pigment*) E *og^c* (*old gold crimson*) EM TOMATEIRO

Flávio Rodrigo Gandolfi Benites¹; Luciano Vilela Paiva²; Cláudia Teixeira Guimarães³; Wilson Roberto Maluf⁴; Marcos Ventura Faria⁵.

Palavras-chave: marcadores-moleculares, RAPD e tomateiro.

INTRODUÇÃO

A produção de tomate para consumo *in natura* no Brasil sofreu grandes transformações tecnológicas nesta última década. Entre as transformações ocorridas a utilização de sementes híbridas de cultivares que produzem frutos do tipo longa-vida foi, sem dúvida, uma das mais importantes.

A utilização de mutantes de amadurecimento pelos melhoristas visa aumentar a firmeza e a conservação pós-colheita dos frutos do tomateiro. Os alelos mutantes que atuam de forma marcante sobre a conservação pós-colheita dos frutos são: *rin* (*ripening inhibitor*), *nor* (*non ripening*), *alc* (*alcobaça*). Há também os alelos *hp* (*high pigment*) e *og^c* (*old gold crimson*), que aumentam a produção de carotenóides nos frutos.

Hoje em dia o melhoramento conta com ferramentas que podem auxiliá-lo no momento da selecionar pequenas diferenças entre os materiais. Entre essas ferramentas estão os marcadores moleculares, podendo destacar-se os marcadores RAPD, AFLP e SSR.

Em tomate, os alelos *alc*, *nor*, *rin*, *hp* e *og^c* são de fácil identificação devido a seus efeitos pleiotrópicos que se expressam em características morfológicas. Entretanto, o uso de marcadores moleculares associados a tais alelos assume grande importância quando se objetiva a piramidação desses alelos em um mesmo genótipo, uma vez que a identificação e a seleção morfológica torna-se bastante dificultada devido ao efeito desses alelos em conjunto.

A chance de selecionar fenotipicamente um indivíduo que contenha os quatro alelos em homozigose é de 1 em 256. Com a utilização de marcadores moleculares diretamente associados com tais alelos pode-se obter esse genótipo desejado com mais facilidade e rapidez viabilizando o uso desses alelos piramidados em um mesmo genótipo.

-
1. Eng. Agr., Mestrando- Genética e Melhoramento de Plantas, UFLA-Dep. Biologia
 2. Eng. Agr., Dr., Prof. UFLA-Dep. Química;
 3. Eng. Agr., Dra., Pesq. EMBRAPA Milho e Sorgo;
 4. Eng. Agr., Ph.D., Prof. UFLA-Dep. Fitotecnia;
 5. Eng. Agr., Doutorando- Genética e Melhoramento de Plantas, UFLA-Dep. Biologia.

Recentemente foram clonados os alelos mutantes *rin* (Vrebalov et al., 2002), *nor* (Vrebalov et al., dados não publicados) e *og^c* (Ronen et al., 2000). As seqüências dos cDNA desses alelos não estão disponíveis nos bancos de dados públicos de seqüências (NCBI e GenBank), dificultando a sua utilização como ferramenta de auxílio ao melhoramento. Uma vez disponíveis as seqüências dos alelos sequenciados, elas poderão serem usadas para a construção de *primers* específicos para cada alelo auxiliando na seleção de indivíduos que contenham o alelo de interesse.

Yen (1997) trabalhando com o alelo *hp*, testou 300 *primers* RAPD e apenas cinco foram polimorficos entre os materiais avaliados. Dos cinco *primers* polimórficos, três estavam ligados ao alelo *hp* mutante. Os fragmentos amplificados gerados por estes três *primers* RAPD (OPB-7, OPD-1 e OPM-10), foram clonados e sequenciados. Posteriormente foram transformados em sondas RFLP que hibridaram no cromossomo 2, flanquiando o alelo *hp* mutante. As três sondas oriundas dos marcadores RAPD, foram chamadas de RAPDhp-7, RAPDhp-10 e RAPDhp-11 que estavam posicionadas a 1,6, 4,6 e 14,6 cM respectivamente do alelo *hp* Yen (1997).

O presente trabalho teve como objetivo encontrar marcadores moleculares associados aos alelos *alc*, *nor*, *hp* e *og^c*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Centro Nacional de Pesquisa em Milho e Sorgo - EMBRAPA Milho e Sorgo- Sete Lagoas-MG no Núcleo de Biologia Aplicada, durante o ano de 2002. Foram utilizadas 5 linhagens quase isogênicas derivada da cultivar Flora-Dade, proveniente do programa de melhoramento genético do tomateiro do professor Dr. Wilson Roberto Maluf, na Universidade Federal de Lavras. Os indivíduos avaliados foram: Flora-Dade (*alc⁺ alc⁺ nor⁺ nor⁺ rin⁺ rin⁺ hp⁺ hp⁺ og^{c+} og^{c+}*), TOM-559 (*alc alc nor⁺ nor⁺ rin⁺ rin⁺ hp⁺ hp⁺ og^{c+} og^{c+}*), TOM-595 (*alc⁺ alc⁺ nor⁺ nor⁺ rin⁺ rin⁺ hp hp og^{c+} og^{c+}*), TOM-596 (*alc⁺ alc⁺ nor⁺ nor⁺ rin⁺ rin⁺ hp⁺ hp⁺ og^c og^c*) e TOM-613 (*alc⁺ alc⁺ nor nor rin⁺ rin⁺ hp⁺ hp⁺ og^{c+} og^{c+}*).

Por volta de 50 dias após a semeadura foi realizada a extração do DNA genômico dos folíolos de tomateiro, conforme metodologia descrita por Saghai-Marrof et al. (1984). As reações de amplificação de RAPD foram realizadas em volume final de 25 µl. Cada reação foi composta de 2,5 µl de tampão PCR 10X, 1µl dNTPs, 1µl primer, 1 unidade taq polimerase, 1 µl de MgCl₂ 50mM, 30ng DNA genômico e 16,3 µl água.

Após o preparo, as reações foram submetidas ao termociclador GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystem, Palo Alto, CA, USA), programado com ciclos de 94 °C a 4 min. para a fase de desnaturação das fitas de DNA, 40 ciclos de amplificação a 94 °C por 1 min., 35 °C por 1min 72 °C por 2 min. e 72 °C por 5 min. na fase de extensão.

Ao final das reações, os produtos amplificados foram separados mediante uma corrida eletroforética a 100V em gel de agarose 1,2%. Após a eletroforese, o gel foi incubado em solução de brometo de etídio (10%) durante 30 minutos. O perfil eletroforético foi visualizado sob luz ultravioleta e as imagens captadas pelo sistema de fotodocumentação "Eagle Eye" (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram testados 119 *primers* RAPD incluindo os *primers* utilizados por Yen, (1997) que amplificaram o alelo mutante *hp*. Foram testados todos os *primers* dos kits OPA, OPB, OPC, OPD, OPN, OPE-1 a OPE-16 e ainda os OPK-18, OPL-9 e OPM-10. Foram gerados um total de 304 bandas monomórficas e nenhuma banda polimórfica entre os 5 indivíduos. Em média foram gerados 2,55 bandas por *primers*. O número de bandas monomórficas variaram entre os *primers* entre 1 a 8 bandas. Dos 119 *primers* testados 27 (22,7%) não amplificaram nenhum fragmento.

Os *primers* testados por Yen (1997) que estavam ligados a 1,6 cM, 4,6 cM e 14,6 cM não amplificaram a região ligada ao alelo *hp* no material avaliado. Esse fato pode estar relacionado com a baixa reprodutibilidade da técnica do RAPD entre diferentes laboratórios, uma vez que os *primers* utilizados são curtos e de sequência aleatória, requerendo uma baixa temperatura de anelamento durante os ciclos de PCR. Tal fato, reduz a especificidade de amplificação, fazendo que com o anelamento dos *primers* ocorra em outras regiões do genoma. A hipótese mais provável e que deve ser considerada, é que o *background* genético dos materiais utilizados neste experimento é diferente do utilizado por Yen (1997). Devido a esse fato, não existiria nos materiais testados neste trabalho as regiões que estavam ligadas ao alelo *hp* e com isso os *primers* utilizados por Yen (1997) não diferenciaram os materiais normais do mutante *hp* no *background* Flora-Dade.

Os *primers* utilizados também não conseguiram diferenciar os alelos *nor*, *alc* e *og^c* que estavam presente nos outros materiais. Como o RAPD é um marcador que se anela em posições aleatórias no genoma e as linhagens avaliadas eram quase isogênicas, seria realmente esperado uma elevada proporção de bandas monomórficas, e aquelas que fossem polimórficas teriam uma maior probabilidade de estarem ligadas aos genes de interesse em cada material. A efetiva ligação com os alelos seria comprovada posteriormente em populações maiores de mapeamento.

Nota-se a necessidade de se testar novos *primers* para encontrar as sutis diferenças entre os materiais estudados, pois a grande vantagem da utilização do RAPD está no fato de que caso seja encontrado uma marca que esteja ligada ao alelo de interesse, essa marca possa

ser cortada do gel para ser sequenciada, transformando-se em uma sonda para o alelo de interesse.

CONCLUSÃO

Entre os *primers* testados não foi encontrado marcador molecular RAPD que diferenciasse as linhas quase isogênicas que continham os alelos *alc*, *nor*, *hp* e *og^c* no *background* Flora-Dade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

RONEN, G.; CARMEL-GOREL, L.; ZAMIR, D.; HIRSCHBERG, J. A alternative to beta carotene formation in plant chromoplast discovered by map-based cloning of Beta and old-gold color mutations in tomato. **PNAS**, Jerusalem v. 27, n. 20, p. 11102- 11107, sep. 2000.

SAGHAI-MAROOF, M.A., K.A. SOLIMAN, R.A. JORGENSEN & R.W. ALLARD, 1984. ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. **Proc Natl Acad Sci USA** 81: 8014-8018.

VREBALOV, J.; RUEZINSKY, D.; PADMANABHAN, V.; WHITE, R.; MEDRANO, D.; DRAKE, R.; SCHUCH, W.; GIOVANNONI, J. A MADS-Box necessary for fruit ripening at the tomato ripening- inhibitor (Rin) Locus. **Science**, USA, v. 296, p. 343-346, 2002.

YEN, H.C. **Genetic and Physiological characterization of the ripening related never rip (NR) high pigment (HP) mutants of tomato**. 1996. 148p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – University of Illinois, Illinois.