

XVIII

CIC

XI ENPOS
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:
por uma ciência do devir



SCREENING DE PRIMERS RAPD PARA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA TANGERINEIRA CV. MONTENAGRINA (*Citrus deliciosa* Ten.)

FONSECA, Cíntia Protzen¹; DEGENHARDT, Juliana²; OLIVEIRA, Roberto Pedroso de;³ COSTA, Raquel Rosa da⁴

¹Pós-graduação em Gestão Ambiental em Municípios – Universidade Federal do Rio Grande (FURG)-
cint_fonck@hotmail.com

² Pesquisadora Embrapa Florestas, Colombo, PR- juliana@cnpf.embrapa.br

³ Pesquisador Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS- rpedroso@cpact.embrapa.br

⁴ Mestranda em Biotecnologia da UFPel, Pelotas, RS- raq-pg@hotmail.com

INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de frutas cítricas, tendo produzido em torno de 19% da produção mundial em 2005 (FAO, 2006). Dentre os citros, a cultura das tangerineiras apresenta pequena diversidade, sendo quatro as principais variedades cultivadas no Brasil: tangerineira 'Poncã', tangoreiro 'Murcott' e de menor relevância a 'Mexerica do Rio' e tangerineira 'Cravo', sendo produzidas em São Paulo, o principal estado produtor (PIO, 2003).

A 'Montenegrina' (*C. deliciosa* Ten.) é a principal variedade de tangerineira cultivada no Rio Grande do Sul, correspondendo a aproximadamente 30% da área plantada (GRUPEX, 2005). A origem dessa cultivar ainda não foi determinada, mas se acredita que tenha surgido, na década de 1930, a partir de um *seedling* da cultivar Caí, no município de Montenegro, RS (RODRIGUES & DORNELLES, 1999).

Desde que começou a ser cultivada comercialmente, outras variedades surgiram a partir da "Montenegrina", selecionadas pelos produtores locais. No entanto, a caracterização dessas novas variedades não foi realizada até o momento, para determinar a distância genética entre elas e a cultivar Montenegrina.

Em citros, marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados em um grande número de espécies para fins de caracterização de germoplasma, estudos taxonômicos e filogenéticos, mapeamento e identificação de mutantes, entre outros (CAI *et al.*, 1994; LURO *et al.*, 1995; MACHADO *et al.* 1996; BASTIANEL *et al.*, 1998; COLETTA FILHO *et al.*, 1998; BASTIANEL *et al.* 2001) e os marcadores RAPD vêm demonstrando ser muito eficientes para essas espécies (OLIVEIRA *et al.* 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2003, CRISTOFANI *et al.*, 2001).

OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo realizar um *screening* de *primers* RAPD com base em tangerineiras oriundas de pomares comerciais de Montenegro (RS), para serem utilizados futuramente para caracterizar molecularmente a variedade Montenegrina e avaliar a distância genética entre ela e novas variedades selecionadas naquele município.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de DNA foram isoladas a partir de folhas jovens de cinco genótipos de tangerineiras, provenientes de pomares comerciais localizados no município de Montenegro, RS. Foram coletadas amostras da variedade Montenegrina, da planta “Montenegrina Mãe”, de onde a variedade teria se originado, além das variedades conhecidas pelo produtor como “Montenegrina graúda”, “Montenegrina rugosa”, Montenegrina Ost e “Montenegrina Rainha”.

O DNA total foi extraído utilizando o kit Quiagen (Alemanha). A quantificação e a qualificação do DNA genômico foram efetuadas em gel de agarose (1,5%).

Foram testados 57 primers de RAPD. As reações de amplificação em cadeia (PCR) foram preparadas em um volume de 13µL, contendo: 1,3 µL de tampão 10x (Invitrogen); 10µL de dNTPs (Invitrogen); 3,0 µL de cada primer (Invitrogen); 1,5 unidades da enzima *Taq* polimerase (Invitrogen) e 2µL de DNA genômico. A reação de amplificação em cadeia foi conduzida em termociclador (Robocycler Cyler Stratagene) em 40 ciclos de 1 minuto a 92°C, 1 minuto a 35°C e 2 minutos a 72°C, acrescidos de 5 minutos a 72°C ao final do último ciclo, segundo protocolo descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998). Os padrões de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo e fotografados no sistema Vilber Lourmat.

Os géis obtidos após a corrida das reações de PCR foram avaliados quanto à qualidade das bandas obtidas e a presença de bandas polimórficas e monomórficas. Os tamanhos dos fragmentos foram estimados por comparação com o marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A época de coleta de folhas para a extração de DNA não foi a ideal. As plantas apresentavam poucas folhas jovens e, conseqüentemente, a quantidade de DNA extraída nas amostras foi baixa.

A maioria dos *primers* testados apresentou padrão de amplificação ruim ou não amplificaram. Os *primers* OPA5, OPAB5, OPAB17, OPN7, OPX3, OPX12, OPX16 e OPY15, embora não tenham apresentado padrão claro de bandas, a visualização foi possível, mas, porém a qualidade não permitiu a interpretação dos resultados. Já os *primers* OPF13, OPI1, OPX1, OPX4, OPX6 e OPY16 embora tenham amplificado, apresentaram apenas bandas monomórficas, não possibilitando a diferenciação entre os genótipos testados, mas podendo ser utilizados para a caracterização entre outras variedades de tangerineiras (Tabela 1).

O *primer* OPA11 apresentou padrão diferente de bandas entre as variedades Montenegrina, “Montenegrina graúda” e “Montenegrina Rainha”, com duas bandas polimórficas. As amostras de “Montenegrina rugosa” e “Montenegrina mãe” não apareceram no gel, provavelmente devido à quantidade insuficiente de DNA (Figura1). Em estudo realizado com a espécie tangerina ‘Cravo’ (*C. reticulata* Blanco) e laranja ‘Pera’ (*C. sinensis* (L.) Osbeck), Oliveira et al.; 2004, utilizaram o *primer* OPA 11, obtendo 7 fragmentos amplificados com 1 fragmento polimórfico. O *primer* OPA13 também apresentou padrão diferente entre as variedades “Montenegrina Rainha” e “Montenegrina graúda”, com a segunda apresentando uma banda de 830 bp a mais. Já o *primer* OPA3 apresentou fragmentos amplificados que variam de 1700 pb a 1280pb pb, somente a amostra Montenegrina não apareceu no gel.

O *primer* OPF13 possibilitou a amplificação de fragmentos com padrão de segregação heterozigoto para o citrumeleiro ‘Swingle’ e limoeiro ‘Cravo’ (FARIA et al. 2007).

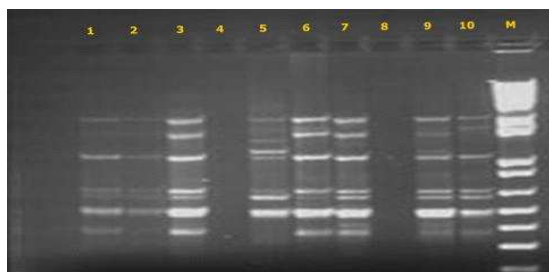
Dentre os 57 *primers* testados, três apresentaram polimorfismo entre as amostras, com variação de um ou dois fragmentos. O baixo polimorfismo pode ser devido à pequena distância genética entre os genótipos, sugerindo um grau de parentesco entre eles. Os fragmentos amplificados variaram entre 470 pb e 1.570 pb.

Novas amostras de DNA deverão ser isoladas e testadas em novas condições de reação bem como os *primers* OPA11, OPA13 e OPI3, bem como com os *primers* OPA3, OPA4, OPA5, OPA10, OPAB1, OPAB5, OPF13, OPN7, OPX3, OPX12, OPX16 e OPY15 a fim de determinar a distância genética entre as variedades selecionadas em Montenegro, RS.

Tabela 1 - Relação dos *primers* utilizados que apresentaram boa qualidade no gel de agarose. Número de bandas avaliadas por gel e presença de bandas polimórficas. Avaliação da variedade de tangerineira "Montenegrina" e variedades oriundas desta.

Primer	Sequência 5' – 3'	Número de bandas avaliadas	Presença de bandas polimórficas
OPA11	CAATCGCCGT	8	Sim
OPA13	CAGCACCCAC	5	Sim
OPI1	ACCTGGACAC	3	Não
OPI3	CAGAAGCCCA	3	Sim
OPF13	GGCTGCAGAA	5	Não
OPX1	CTGGGCACGA	6	Não
OPX4	CCGCTACCGA	9	Não
OPX6	ACGCCAGAGG	5	Não
OPY16	GGCCAATGT	2	Não

Figura 1 - Gel agarose (1.5%) obtido após amplificação com o primer OPA11. 1-Montenegrina, 2-Montenegrina Ost, 3-Montenegrina Rainha, 4-Montenegrina Ost, 5-Montenegrina Ost, 6-Montenegrina Graúda, 7- Montenegrina Graúda, 8- Montenegrina Ost, 9- Montenegrina Rainha, 9- Montenegrina Mãe, M- Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).



CONCLUSÕES

Marcadores RAPD foram capazes de detectar polimorfismo entre as amostras, mesmo com a provável pequena distância genética entre elas, podendo, portanto, ser utilizados para estudos de similaridade genética entre tangerineiras.

Dentre os 57 *primers* testados, os *primers* OPA11, OPA13, OPF13, OPI1, OPI3, OPX1, OPX4, OPX6 e OPY16 apresentaram os melhores padrões de bandas em gel de agarose, sendo indicados para a avaliação de cultivares de tangerineira.

Embora não sejam definitivos, os resultados sugerem similaridade genética entre as variedades.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASTIANEL, M.; SCHWARZ, S.F.; COLETTA-Filho, H.D.; LIN, L.L.; MACHADO, M.; KOLLER, O.C. Identification of zygotic and nucellar tangerine seedlings (Citrus spp.) using RAPD. **Genetics and Molecular Biology**, v.21, p.123-127, 1998.

BASTIANEL, M.; DORNELLES, A.L.C.; MACHADO, M.A.; WICKERT, E.; MARASCHIN, S.F.; COLETTA FILHO, H.D.; SHCAFER, G. Caracterização de genótipos de *Citrus* spp. através de marcadores RAPD. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n.5, p. 763-768, 2001

CAI, Q.; GUY, C.L.; MOORE, G.A. Extension of the linkage map in Citrus using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of cold-acclimation-responsive loci. **Theoretical and Applied Genetics**, v.89, p.606-614, 1994.

COLLETA FILHO, H.D.; MACHADO, M.A.; TARGONI, M.L.; *et al.* Analysis of the genetic diversity among mandarins (*Citrus spp.*) using RAPD markers. **Euphytica**, Berlin, n. 102, p. 133-139, 1998.

CRISTOFANI, M.; NOVELLI, V.M.; OLIVEIRA, A.C.; OTAVIANO, A.R.; SOUZA, A.A.; MACHADO, M.A. Identificação de híbridos de cruzamentos interespecíficos em citros utilizando marcadores RAPD e SSR. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 22, n.1, p. 231-241, 2001.

FAO QUARTERLY BULLETIN OF STATISTICS. Rome, v. 12, 1999. 152p.

FARIA L. M.; MACHADO M. A.; Mapeamento genético e detecção de QTLs em um cruzamento de limão “cravo” e citrumelo “swingle” Campinas, SP, 2007.

FERREIRA, M E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. Ed. Brasília: CENARGEN, 1996. 220p

GRUPEX. **O cultivo dos citros no Rio Grande do Sul: referências tecnológicas**. Porto Alegre: FEPAGRO, 2005, 141p.

LURO, F.; BOVÉ, J.M.; OLLITRAULT, P. DNA amplified fingerprinting, a useful tool for determination of genetic origin and diversity analysis in *Citrus*. **Hortscience**, Alexandria, v. 30, n. 5, p. 1063-1067; 1995.

MACHADO M.A.; COLETTA-Filho, H.D.; TARGON, M.L.N.; POMPEU Jr. J. (1996). Genetic relationship of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. **Euphytica**, v.92, p.321-326, 1996.

OLIVEIRA, R. P.; RADMANN, E. B.; AUGUSTIN, E. Genetic characterization of new varieties and hybrids of citrus table fruit through isoenzymes. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 3, n. 1, p. 77-82, 2003.

OLIVEIRA, R.P.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A. Genetic linkage maps of ‘Pêra’ sweet orange and ‘Cravo’ mandarin with RAPD markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.2, p.159-165, 2004.

OLIVEIRA, R.P.; CRISTOFANI, M.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; MACHADO, M. A. **Diversidade genética entre híbridos de tangerina 'Cravo' e laranja 'Pêra'**. *Pesq. agropec. bras.* [online]. 2002, vol.37, n.4, pp. 479-484. ISSN 0100-204X.

PIO R.M. A qualidade e as exigências do mercado de tangerinas. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Cruz das Almas, v. 25 n.3, 2003.

RODRIGUES, L.R.; DORNELLES, A.L.C. Origem e caracterização horticultural da tangerineira "Montenegrina". **Laranja**. Cordeirópolis, vol. 20, n.1, p.167-185, 1999.