

SCREENING DE *primers* SSR PARA POPULAÇÃO SEGREGANTE DE PORTA-ENXERTOS DE *Prunus persica*

MACHADO-NOGUEIRA, Luciana Rodrigues; BENEMANN, Daiane de Pinho; ARGE, Luis Willian Pacheco; BIANCHI, Valmor João

Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Departamento de Botânica, Instituto de Biologia
Universidade Federal de Pelotas

1 INTRODUÇÃO

Os marcadores moleculares SSR (*Simple Sequence Repeat*) têm sido amplamente utilizados em estudos de caracterização genética dentro do gênero *Prunus*, pois estão disponíveis em grande número, são altamente polimórficos, seletivamente neutros e não sofrem influência do meio ambiente, sendo considerados altamente confiáveis e reprodutíveis. O surgimento destes marcadores tornou possível a construção de mapas genéticos, que servem de base para o isolamento e introgressão de genes de interesse, visando a criação de novas cultivares com as características desejáveis, como resistência a pragas e doenças (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Uma vez mapeados, os marcadores associados a esses genes podem ser utilizados para seleção indireta, conhecida como Seleção Assistida por Marcadores, o que torna mais rápido e eficiente o melhoramento tradicional (MORETZSOHN et al., 2005).

Para iniciar a construção de um mapa genético é importante a realização da seleção de *primers* que gerem boa amplificação e mostrem polimorfismo dentro da população analisada, esta seleção inicial é conhecida como *Screening de primers*, uma etapa extremamente importante em qualquer estudo de marcadores moleculares.

O objetivo deste trabalho foi selecionar *primers* que gerem polimorfismo para locos microssatélites em uma população segregante de porta-enxertos 'Capdebosq X Flordaguard'.

2 METODOLOGIA

O *Screening* foi realizado para os parentais Capdebosq, Flordaguard, um Híbrido F1, obtido pelo cruzamento dos parentais e 3 indivíduos F2 (F21, F22, e F23) obtidos por autofecundação de F1. Utilizou-se 23 *primers* para locos microssatélites escolhidos a partir da análise de mapas moleculares já existentes na literatura, cobrindo distâncias aproximadas em 20 cM do gene de resistência a fitonematóides (Tabela 1). O DNA foi extraído a partir de 150 mg de folhas frescas usando o método descrito por Doyle & Doyle (1991). Após, o DNA foi quantificado em gel de agarose 0,8%, usando como padrão o DNA de Fago *Lambda* digerido com *Hind* III, diluído e ajustado para a concentração de 10 ng μL^{-1} . No PCR foi utilizado 20 ng de DNA genômico de cada amostra; 2,5 μL de 10x PCR Buffer; 1,7 mM de MgCl_2 ; 0,5 μM de cada *primer*; 0,2 mM de dNTP; 0,8U de Taq polimerase (Invitrogen) e água Milli-Q para um volume final de 25 μL . As reações foram realizadas em aparelho Termociclador, BIO-RAD modelo ICYCLER, a PCR ocorreu com as seguintes etapas: 1 ciclo de 95°C por 3 min, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 54-60°C por 45s, 72°C por 1min, 1 ciclo de 72°C por 10 min e 4°C por 5 min. A eletroforese foi feita em gel de poliácridamida 6%, utilizando TBE 1X como tampão de corrida, por 2 horas a 65 V. A ordem da aplicação das amostras foi a seguinte: Flordaguard, F1, Capdebosq, F21, F22, F23 sendo esta mesma combinação repetida para todos os *primers* testados, (Figura 1). O gel foi corado com Nitrato de Prata conforme o protocolo de Bassam et al. (1991).

Tabela 1 - Relação dos *primers* para locos microssatélites utilizados no *Screening*, Amplificação e presença de bandas polimórficas

Loco	Seqüência 5'-3'	Referência	Amplificação	Polimorfismo
UDP96013	F ATTCTTCACTACACGTGCACG R CCCAGACATACTGTGGCTT	Testolin et al. (2000)	sim	sim
UDP98411	F AAG CCA TCC ACT CAG CAC TC R CCA AAA ACC AAA ACC AAA GG	Testolin et al. (2000)	sim	sim
UDP98025	F GGG AGG TTA CTA TGC CAT GAAG R CGC AGA CAT GTA GTA GGA CCT C	Testolin et al. (2000)	sim	sim
UDP98407	F AGC GGC AGG CTA AAT ATC AA R AAT CGC CGA TCA AAG CAA C	Testolin et al. (2000)	sim	não
UDP97403	F CTG GCT TAC AAC TCG CAA GC R CGT CGA CCA ACT GAG ACT CA	Testolin et al. (2000)	sim	sim
BPPCT004	F CTG AGT GAT CCA TTT GCA GG R AGG GCA TCT AGA CCT CAT TGT T	Dirlewanger et al. (2002)	sim	sim
BPPCT002	F TCG ACA GCT TGA TCT TGA CC R CAA TGC CTA CGG AGA TAA AAG AC	Dirlewanger et al. (2002)	sim	sim
BPPCT008	F ATG GTG TGT ATG GAC ATG ATG A R CCT CAA CCT AAG ACA CCT TCA CT	Dirlewanger et al. (2002)	sim	sim
BPPCT019	F TGA TAC CAC CAT CCA ATC TAG C R TTG CTG GGA CAT GGT CAG	Dirlewanger et al. (2002)	sim	sim
BPPCT024	F GAG GAA TGT GCC TCT TCT GG R CTC CCG TAC GCG TTT ACC	Dirlewanger et al. (2002)	sim	sim
BPPCT025	F TCC TGC GTA GAA GAA GGT AGC R CGA CAT AAA GTC CAA ATG GC	Dirlewanger et al. (2002)	sim	sim
BPPCT034	F CTA CCT GAA ATA AGC AGA GCC AT R CAA TGG AGA ATG GGG TGC	Dirlewanger et al. (2002)	sim	sim
BPPCT030	F AAT TGT ACT TGC CAA TGC TAT GA R CTG CCT TCT GCT CAC AC C	Dirlewanger et al. (2002)	sim	sim
CPSCT007a	F GTG GCC GGA CGA GAG AAC R CGA TCG AAT GAA GCT CAG TG	Mnejja et al. (2004)	sim	não
CPSCT021	F GCC ACT TCG GCT AAA AGA GA R TCC ATA TCT CCT CCT GCT TGA	Mnejja et al. (2004)	sim	não
CPSCT034	F AGG TGG ACA ATA GCC GTC AT R TTT CCA GAC CCT GAG AAA GC	Mnejja et al. (2004)	sim	sim
CPPCT024	F TTC TCC CAA AAA CCA AAA CC R TCA TTG GCT GCT AAG TGT CCT	Aranzana et al. (2002)	sim	não
CPDCT044	F ACA TGC CGG GTA ATT AGC AA R AAA ATG CAC GTT TCG TCT CC	Mnejja et al. (2004)	sim	sim
PACITA27	F GAT CCC TCA ACT GAA TCT CTC R CGT CAC AAC AAT AGA TGC GAA GG	Yasushi (2005)	não	não
MA007a	F GTG CAT CGT TAG GAA CTG CC R GCC CCT GAG ATA CAA CTG CA	Yamamoto et. al (2002)	sim	sim
MA024	F AAC CCA ATC CAA TAT CAA CC R GGG GGA TCT CTC AAC TCA A	Yamamoto et. al (2002)	não	não
pchgms1	F GGG TAA ATA TGC CCA TTG TGCAATC R GGA TCA TTG AAC	Lu et. al (1999)	não	não
pcega34	F GAA CAT GTG GTG TGC TGG TT R TCC ACT AGG AGG TGC AAA TG	Lu et. al (1999)	não	não

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A partir dos 23 locos SSR testados, pode ser observado boa amplificação para 19 deles, o que representa 82,6% do total, e destes, aproximadamente 79% dos locos foram polimórficos. Os resultados encontrados neste trabalho estão acima da média obtida por Aranzana et al. (2002), onde 69% dos SSRs testados revelaram polimorfismo. Os melhores resultados foram obtidos na amplificação dos locos: UDP97403, BPPCT008, UDP98411, BPPCT002, BPPCT025, BPPCT034, CPDCT044, CPSCT034 e UDP98025, revelando bandas polimórficas entre 200 e 300 pares de bases. Já os locos UDP98407, CPSCT007a, CPSCT021 e CPPCT024 embora tenham amplificado, apresentaram apenas bandas monomórficas, não possibilitando a diferenciação entre os genótipos testados, a exemplo do loco UDP984079 (Figura 1), apesar disso, estes locos monórficos podem ser utilizados para a caracterização entre outras variedades de *Prunus spp.* Para os marcadores que apresentaram polimorfismo, será repetida a amplificação, desta vez, para todos os indivíduos F2, juntamente com seus parentais, com o objetivo de verificar a segregação genética entre eles, para posteriormente construção do mapa genético da população segregante 'Capdebosq X Flordaguard'.

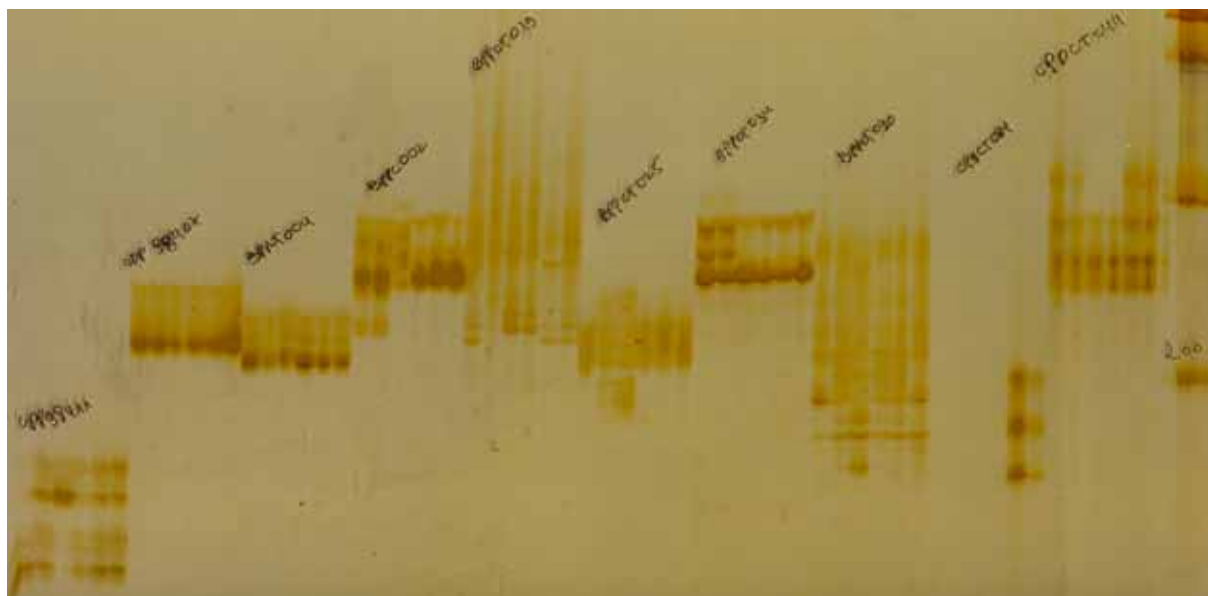


Figura 1 – *Screening de primers* em gel de poliacrilamida 6% mostrando o perfil eletroforético de 5 indivíduos de uma população segregante 'Capdebosq X Flordaguard', para 10 locos microssatélites: UDP98411, UDP98407, BPPCT004, BPPCT002, BPPCT019, BPPCT025, BPPCT034, BPPCT030, CPPCT024 e CPDCT044.

4 CONCLUSÕES

Os marcadores SSR foram capazes de detectar polimorfismo entre as amostras, revelando bandas nítidas e uniformes entre as cultivares estudadas. Dentre os 23 marcadores testados, UDP97403, BPPCT008, UDP98411, BPPCT002, BPPCT025, BPPCT034, CPDCT044, CPSCT034 e UDP98025 apresentaram polimorfismo e são indicados para avaliação de cultivares de *Prunus*, podendo ser utilizados para estudos de similaridade genética, transferabilidade, bem como em estudos de mapeamento genético.

5 REFERÊNCIAS

- ARANZANA, M.J.; GARCIA-MAS, J.; CARBÓ, J.; ARÚS, P., Development and variability analysis of microsatellite markers in peach. **Plant Breeding**, Berlin, v. 121, 87–92. 2002.
- BASSAM, B.J.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P.M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Anal Biochemistry**, v. 196, p. 80-83, 1991.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Gaithersburg, v. 1, p.13-15, 1991.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA- CENARGEN, 1998. 220 p.
- LU, Z. X.; SOSSEY-ALAOUI, G. L.; REIGHARD, G. L.; BAIRD, W. V.; ABBOTT, A. G. Development and characterization of a codominant marker linked to root-knot nematode resistance, and its application to peach rootstock breeding. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.99, p.115-122, 1999.
- MORETZSOHN, M.C.; LEOI, L.; PROITE, K.; GUIMARÃES, P.M.; LEAL-BERTIOLI, S.C.M.; GIMENES, M.A.; MARTINS, W.S.; VALLS, J.F.M.; GRATTAPAGLIA, D.; BERTIOLI, D.J. A microsatellite-based, gene-rich linkage map for the AA genome of *Arachis* (Fabaceae). **Theoretical and Applied Genetics**, v.111, p.1060-1071, 2005.
- MNEJJA, M. GARCIA-MAS, J. HOWARD, W. BADENES, ML. ARÚS, P., Simple-sequence repeat (SSR) markers of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) are highly polymorphic and transferable to peach and almond. **Molecular Ecology Notes**. v. 4, no. 2, 163-166. 2004.
- TESTOLIN, R.; MARRAZZO, T.; CIPRIANI, G.; QUARTA, R.; VERDE, I.; DETTORI, M.T.; PANCALDI, M.; SANSAVINI, S. Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. **Genome**, Ottawa, v.43, p.512-520, 2000.
- YAMAMOTO, T.; HAYASHI, T. New root-knot nematode resistance genes and their TS markers in peach. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 96, p. 81-90, 2002.
- YASUSHI, Rin. **Análise da diversidade genética de ameixeira usando marcadores de DNA**. 2005. Tese (Doutorado em tecnologia avançada em ciências agrárias) – Universidade de Tsukuba, Japão, 2005.