



USO DE *PRIMERS* CODIFICADORES DO GENE *INO* EM GENÓTIPOS DA GERAÇÃO F1 PROVENIENTES DO CRUZAMENTO DE PINHEIRA (*ANNONA SQUAMOSA* L.) E DE ATEMOEIRA (*ANNONA CHERIMOLA* X *ANNONA SQUAMOSA*)

Anunciene Barbosa Duarte, Francielle de Matos Feitosa, Pedro Thiago Medeiros Paixão, Bruno Rafael Alves Rodrigues, Renata Aparecida Neres Faria, Silvia Nietzsche, Joseilton Faria Silva

Introdução

A fruticultura é um dos segmentos mais importantes para a agricultura brasileira, e nesse cenário destacam-se as anonáceas, em sua maioria nativa de regiões tropicais ou subtropicais com aproximadamente 130 gêneros e 2.500 espécies [1], dos quais dentre esses gêneros apenas dois recebem importância na fruticultura, Rollinia e Annona.

Apesar dos frutos de pinha e atemoia apresentarem grande aceitação no mercado consumidor, estudos relacionados ao melhoramento destas espécies no Brasil ainda tem sido praticamente inexistente. Isso se deve em virtude principalmente pela falta de estratégias e programas de melhoramento para as mesmas.

A Universidade Estadual de Montes Claros vêm desenvolvendo pesquisas para o melhoramento de anonáceas dentre as quais se tem a implantação da coleção de *Annona squamosa*, a avaliação dos acessos e hibridações intraespecíficas e interespecíficas entre acessos de pinheira e o híbrido de atemoia Gefner. Dentre esses genótipos existe um acesso de pinha sem semente com características físico-químicas do fruto semelhantes aos frutos dos acessos de pinha com semente, entretanto, este possui baixo potencial competitivo e produtivo.

Mediante o exposto objetivou-se com o presente trabalho verificar a conservação do gene *INO*, utilizando primers específicos em progênies de irmãos completos de (pinha com semente x pinha sem semente) e (atemoia Gefner x pinha sem semente) por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR).

Material e métodos

O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental e no laboratório de Biotecnologia da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES) campus Janaúba/MG. Foram avaliados 47 indivíduos obtidos por meio de polinizações artificiais, em que o genitor masculino utilizado Brazilian seedless (P1), polinizou quatro acessos femininos, no qual 3 desses acessos são pinheiras com semente, denominados pelos códigos: M1, M2 e M3 e 1 cultivar de atemoia Gefner, denominado pelo código M4 oriundos do Banco de Germoplasma da Unimontes. Procedeu-se os cruzamentos e as progênies quando produziram frutos por meio da polinização artificial foram colhidos, identificados individualmente e avaliados quanto à produção ou não de sementes; suas folhas foram coletadas e encaminhadas ao laboratório de Biotecnologia, onde se realizou a extração de DNA e demais análises moleculares.

O DNA das progênies e genitores foi extraído a partir de folhas jovens, utilizando-se o método de brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) de acordo com a metodologia de Doyle e Doyle (1990) [2]. Cerca de 0,250 g de tecido fresco foi triturado com N2 líquido e incubado a 65°C por 30 – 40 minutos em tubos eppendorf de 2 mL com 800 µL de tampão de extração (2% CTAB; 1,4M NaCl; 20mM EDTA pH 8,0; 100mM Tris-HCl pH 8,0; 2% PVP; 0,2% mercaptoetanol). Para verificação da qualidade do DNA foi utilizado um gel de agarose 0,8% corado em solução de brometo de etídeo (0,2 mg/L). A quantidade do DNA foi estimada por espectrofotometria a 260 nm. A partir de então foi realizada a diluição, padronizando todas as amostras a 10 ng de DNA/µL. As amostras foram submetidas às reações de amplificação compostas das seguintes concentrações finais: KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), MgCl₂ 2,5 mM, 2,5 mM de dNTPs, 0,4 mM de cada primer, 25 ng de DNA genômico, 1,0 unidade de Taq DNA polimerase (Phonotria) e água ultra pura para completar o volume final. As amplificações foram efetuadas em termociclador Techne, modelo TC-412. Os produtos resultantes das amplificações foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% e em tampão TBE 1X por uma hora e corados em solução de brometo de etídeo a 0,05 mg/ml por um período de 15 minutos. Os fragmentos amplificados foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados em sistema digital UVP



Life Science Software.

Um total de 4 pares de primers foram testados (LMINO 01/02, LMINO 03/04, LMINO05/06 e LMINO 07/08), sendo que estes foram confeccionados segundo sequências disponibilizadas por Lora et al., 2011. A análise foi por visualização direta no gel, detectando a presença ou ausência da banda correspondente de cada par de primer utilizado com auxílio de marcadores de peso molecular de 1 kb.

Resultados e Discussão

Todos os indivíduos avaliados em campo produziram frutos com sementes. Esses resultados sugerem para a hipótese de a presença de sementes ser governada por um gene com interação de dominância completa. Estes resultados corroboram com os encontrados por Lora *et al.* (2011) [3], onde a progênie F1 resultante do cruzamento entre um tipo selvagem de cherimóia com o mutante sem semente produziu 78 plantas e todas apresentaram sementes, bem como geraram produtos de amplificação quando amplificadas com os *primers* específicos para o gene *INO*.

O modelo de cruzamento incluindo genitor feminino pirênico e masculino apirênico é considerado de baixa eficiência porque não se pode esperar que mais de 25% da progênie seja portadora de apirenia [4]. Isso ocorreria caso os genitores fossem heterozigotos para o gene em estudo, entretanto não é possível confirmar no presente trabalho que os pais envolvidos sejam homozigotos, pois além dos acessos da geração F1 não segregarem, os *primers* não conseguem detectar essa diferença, devido serem dominantes, ou seja, não diferencia os indivíduos homozigotos dos heterozigotos. Dessa forma, como não houve segregação, são necessários trabalhos complementares como autofecundações dos pais e a avaliação de populações F2 e retrocruzamento de cada cruzamento, ou até mesmo a utilização de *primers* codominante capazes de detectar essa característica. A verificação se os genitores são puros é importante pelo fato de se conhecer a herança do caráter estudado, se este é controlado por um gene dominante ou recessivo, ou se tem dois ou mais genes envolvidos nessa característica, pois sendo os genitores puros, torna-se mais fácil a comprovação dos resultados.

Os quatro pares de *primers* foram testados inicialmente nos acessos de pinha com sementes (M1, M2 e M3), pinha sem semente (P1) e na cultivar de atemoia Gefner (M4), entretanto somente dois pares, entre eles o LMINO 03/04 (Figura 1) e LMINO 05/06 geraram produtos de amplificação de peso molecular correspondente aos encontrados por Lora *et al.* (2011) [3], sendo que, a pinha sem semente *Brazilian seedless* não amplificou tais marcas para nenhum dos *primers*. No mutante 'Thai seedless' que não produz frutos com sementes a amplificação desse gene não foi observada, dessa forma pode-se sugerir que este acesso de pinha sem semente da coleção de anonáceas da Unimontes proveniente de um germoplasma em Janaúba, possui também uma interrupção do gene *INO*, o que poderia explicar a provável causa da ausência de sementes nos seus frutos.

A não amplificação dos *primers* LMINO 01/02 e LMINO 07/08 pode ser devido as condições de amplificação testadas, dessa forma, para otimizar as amplificações e obter as bandas específicas é necessário mais testes e assim aumentar a precisão da análise da presença do gene *INO*.

Na população F1 de todas as progênies os *primers* LMINO 03/04 (Figura 2) e LMINO 05/06 amplificaram em todos os acessos, demonstrando que a partir dos cruzamentos realizados, o gene *INO* ainda permanece na geração F1.

O fato de todos os acessos apresentarem a banda sugere que a interrupção do gene *INO* no acesso de pinha sem semente, pode ser causado por um alelo recessivo, visto que não houve segregação da marca do gene em nenhum dos acessos das populações F1. Quando for possível confirmar que a ausência de sementes é devido à interrupção do gene *INO*, esses *primers* poderão ser utilizados no processo de seleção assistida por marcadores moleculares nas gerações subsequentes e nos ciclos de retrocruzamentos com a cultivar Gefner.

Conclusão/Conclusões/Considerações finais

O gene *INO* está conservado nas progênies (pinha com semente x pinha sem semente) e (atemoia Gefner x pinha sem semente) verificado por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR).

Agradecimentos

Os autores agradem a FAPEMIG e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Referências

- [1] SAUQUET, H. J. A. *et al.* Phylogenetic analysis of Magnoliales and Tisticaceae based on multiple data sets: implications for character evolution. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 142, p. 125-186, 2003.
- [2] DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1990.



- [3] LORA, J. *et al.* Seedless fruit and the disruption of conserved genetic pathway in angiosperm ovule development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 13, p. 5461-5465, 2011.
- [4] RAMMING, D. W. The use of embryo culture in fruit breeding. **Hortscience**, v. 25, n. 2, p. 393-398, 1990.

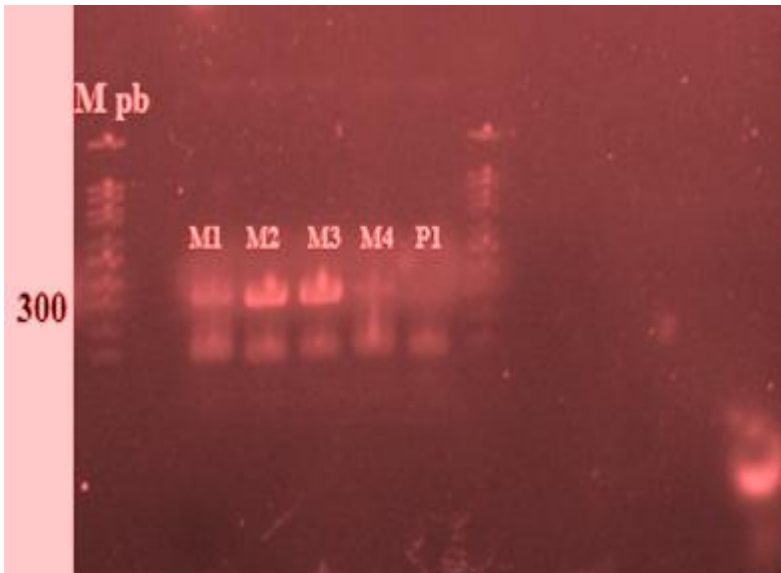


Figura 1: Produto da amplificação de acessos de pinha com semente M1, M2, M3, atemóia M4 e *Brazilian seedless* P1 com os *primers* LMINO 03/LMINO 04, com produto de amplificação de peso molecular de aproximadamente 350 pb em gel de agarose 1,2% em tampão TBE 1X.

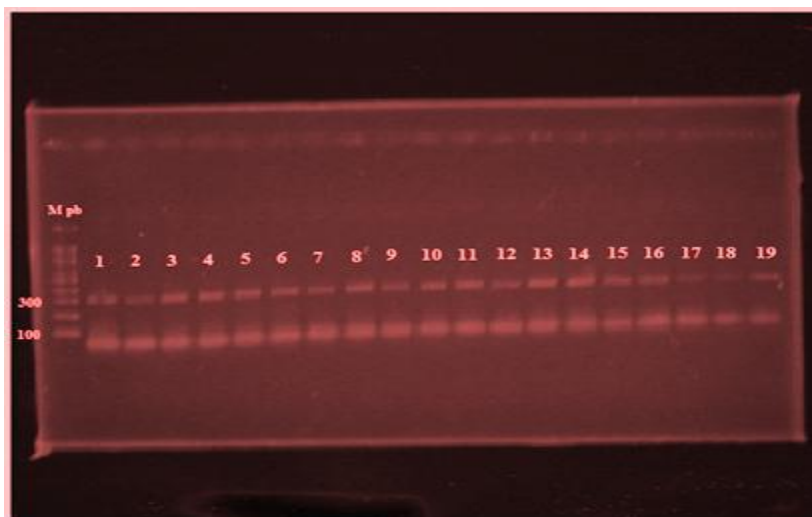


Figura 3: Produto da amplificação da geração F1 dos indivíduos 1 ao 19 com os *primers* LMINO 03/LMINO 04, com produto de amplificação de peso molecular de aproximadamente 350 pb em gel de agarose 1,2% em tampão TBE 1X.