



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS

JANÁIRA LOPES DOS SANTOS CARNEIRO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS DO BANCO ATIVO DE  
GERMOPLASMA DE CITROS DA EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA.**

CRUZ DAS ALMAS  
2010

JANÁIRA LOPES DOS SANTOS CARNEIRO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS DO BANCO ATIVO DE  
GERMOPLASMA DE CITROS DA EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA**

Monografia apresentada junto ao curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, na área de concentração de Melhoramento Genético Vegetal como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel.

**COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:**

Professora Msc. Edna Lôbo Machado - Orientadora - UFRB

Pesquisador Dr. Abelmon da Silva Gesteira - Co-orientador – Embrapa (CNPMPF)

Pesquisadora Dr<sup>a</sup> Cláudia Fortes Ferreira - Co-orientadora – Embrapa (CNPMPF)

C289 Carneiro, Janáira Lopes dos Santos.

Caracterização molecular de acessos do banco ativo de germoplasma de citros da embrapa mandioca e fruticultura . / Janáira Lopes dos Santos Carneiro. \_ . Cruz das Almas - Ba, 2010.

39f.; il.

Orientador: Edna Lôbo Machado.

Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Área de Concentração: Ciências Biológicas.

1. Germoplasma. 2. Melhoramento genético. 3 Variabilidade genética - Citrus. 4. Marcadores ISSR (Inter Single Sequence Repeats). I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 631.523

JANÁIRA LOPES DOS SANTOS CARNEIRO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS DO BANCO ATIVO DE  
GERMOPLASMA DE CITROS DA EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA**

Monografia apresentada junto ao curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, na área de concentração de Melhoramento Genético Vegetal como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel.

Aprovada em 16 de dezembro de 2010.

**Banca Examinadora**



---

Edna Lôbo Machado

Professora Assistente do CCAAB



---

Dr. Ricardo Franco Cunha Moreira

Professor Adjunto da UFRB



---

Dr<sup>a</sup>. Simone Alves Silva

Professora Adjunto da UFRB

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Jaciara (in memoriam) e Edson, e ao meu companheiro Roger, que sempre estiveram ao meu lado transmitindo confiança, estímulo e amor, tanto na alegria como nas horas tristes.*

*( Chico Xavier )*

## AGRADECIMENTOS

À FAPESB pela concessão da bolsa de estudo e ao Macroprograma II/Embrapa pelo financiamento do projeto;

A Embrapa-CNPMF pela estrutura disponibilizada para a execução desse trabalho;

Aos técnicos do Laboratório de Biologia Molecular (LBM) da Embrapa pelo auxílio, ajuda e aprendizado;

A orientadora Edna L. Machado e a co-orientadora Cláudia F. Fortes pelos seus empenhos e pelo aprendizado, para o desenvolvimento desse trabalho;

Ao pesquisador e orientador Abelmon da Silva Gesteira por suas contribuições;

A meus pais, especialmente a minha mãe (*in memoriam*) que me incentivou através das minhas orações nos momentos mais difíceis nessa etapa da minha vida;

A minha família, especialmente aos meus avós pela experiência de vida que me passaram ao longo dessa trajetória;

A meu namorado, companheiro e amigo por demonstrar imenso afeto e carinho por mim, e principalmente esteve comigo no momento mais difícil e delicado da minha vida;

A Deus, principalmente, pois me deu forças para vencer todos os obstáculos e por permitir concluir mais essa etapa da minha vida.

## SUMÁRIO

### *LISTA DE FIGURAS E TABELAS*

### *LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS*

RESUMO-----	10
1 INTRODUÇÃO-----	13
2 JUSTIFICATIVA-----	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-----	16
3.1 Importância do cultivo de citros no Brasil-----	16
3.2 Origem, caracterização botânica e condições edafoclimáticas do citros-----	17
3.3 Variabilidade Genética-----	18
3.4 Uso de marcadores moleculares para estudo da variabilidade genética em vegetais-----	18
3.5 Importância do melhoramento genético na citricultura-----	20
3.6 Banco ativo de germoplasma de citros e a variabilidade genética-----	21
4 OBJETIVOS-----	22
4.1 Objetivo geral-----	22
4.2 Objetivo específico-----	22
5 METODOLOGIA-----	23
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	30
7 CONCLUSÃO-----	34
8 REFERÊNCIAS-----	35

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Tabela 01:</b> Espécies e origem dos acessos de citros do BAG pertencente ao CNPM -----	<b>23</b>
<b>Tabela 02:</b> Seqüências de iniciadores ISSR utilizados na triagem-----	<b>27</b>
<b>Tabela 03:</b> Número de marcadores totais e polimórficos por iniciador ISSR -----	<b>31</b>
<b>Figura 01.</b> Perfil eletroforético, em gel de agarose a 2%, dos fragmentos gerados através do iniciador TriAAG'3RC dos acessos do BAG-Citros. -----	<b>30</b>
<b>Figura 02.</b> Perfil eletroforético ,em gel de agarose a 2%, dos fragmentos gerados através do iniciador ISSR TriATC3'RC dos acessos do BA -Citros. -----	<b>31</b>
<b>Figura 03.</b> Perfil eletroforético ,em gel de agarose a 2%, dos fragmentos gerados através do iniciador ISSR TriTCT3'RC dos acessos do BAG-Citros. -----	<b>31</b>
<b>Figura 04:</b> Dendograma dos 83 acessos do banco de germoplasma de citros do CNPMF utilizando-se 39 bandas polimórficas provenientes de marcadores ISSR-----	<b>33</b>



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BAG – Banco Ativo de Germoplasma

CNPMF- Centro Nacional de Pesquisa Mandioca e Fruticultura

Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ISSR – *Inter Single Sequence Repeats*

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

SSR - Sequências simples repetidas

TBE - Tris-borato-EDTA

UPGMA - *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*

## RESUMO

O Banco Ativo de Germoplasma de Citros, localizado no campo experimental da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA, contém aproximadamente 800 acessos de Citrus e espécies afins, muitos com ascendência desconhecida. Assim, este trabalho objetivou a caracterização, via marcadores ISSR, de 83 acessos do banco de Germoplasma de Citros, a fim de determinar o nível de dissimilaridade genética entre os acessos da coleção. Para tanto, DNA genômico total foi extraído, quantificado e genotipado através da utilização de 9 iniciadores ISSR. Um total de 47 marcadores foi identificado, sendo 39 polimórficos (82,98%) e 8 monomórficos (17,02%). Os programas computacionais GENE e MEGA-4, foram utilizados para gerar uma matriz de dissimilaridade e dendograma, respectivamente, revelando a formação de cinco grandes grupos entre os acessos. A maior dissimilaridade observada foi entre os acessos Ilhoa de Goiânia e Oneco, oriundos das espécies *C. sinensis* e *C. reticulata*, respectivamente. No entanto, para uma caracterização mais completa desses genótipos faz-se necessária a identificação de um maior número de marcadores ISSR.

**Palavras-chaves:** *Citrus*; Variabilidade genética, Marcadores ISSR (*Inter Single Sequence Repeats*)

## ABSTRACT

The Active Germplasm Bank of Citrus, located at Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA, contains about 800 accessions of *Citrus* and related species, many from unknown ancestry. The level of genetic diversity present in this collection so far remains unknown. This study aimed to characterize, through the ISSR markers, 83 accessions from the Citrus Germplasm Bank in order to determine the level and organization of genetic diversity in the collection. In order to do so, total genomic DNA was extracted, quantified and genotyped by using 9 ISSR primers. A total of 47 markers were identified, from which 39 were polymorphic (82.98%) and monomorphic 8 (17.02%). The computer programs GENE and MEGA-4 were used to generate a dissimilarity matrix and a dendrogram, respectively, revealing the formation of five major groups among the accessions. The greatest dissimilarity was observed among accessions Ilhoa Goiânia and Oneco, provenient from the species *C. sinensis* and *C. reticulata*, respectively. However, for a more complete characterization of these genotypes it is necessary to identify a larger number of ISSR.

**Keywords:** *Citrus*; Genetic variability, ISSR (*Inter Single Sequence Repeats*) Markers.



## 1 INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira representa importante segmento econômico na pauta de produtos agrícolas, não só por seu expressivo valor de produção, como por sua importância na geração de empregos diretos e indiretos. Em nível mundial, o Brasil destaca-se como maior produtor de citros, detentor de pomares que somam uma população superior a 200 milhões de plantas, e maior produtor e exportador de suco concentrado congelado de laranja. O Nordeste, por sua vez, detém, após o Estado de São Paulo, a citricultura de maior expressão, graças à liderança nesse setor dos Estados da Bahia e Sergipe, que hoje praticamente se igualam na produção de citros (IBGE, 1995). Apesar de sua importância, a vulnerabilidade da citricultura nordestina, a exemplo da brasileira, é muito grande, pela presença quase única da combinação laranja 'Pêra' [*Citrus sinensis* (L.) Osb.] / limão 'Cravo' (*C. limonia* Osb.) na sustentação de nossos pomares, tornando urgente a diversificação de variedades. A par deste fato, verifica-se uma adaptação inadequada das variedades hoje disponíveis às nossas condições tropicais de cultivo, conforme se constata pelo período de vida útil relativamente baixo que apresentam (em torno de 12 anos), em comparação com o que se observa em outras regiões produtoras como Flórida, Califórnia, Mediterrâneo e Japão, nas quais esse período pode se prolongar por mais de 60 anos.

O gênero *Citrus* representa o ponto mais alto de um longo período evolutivo, cujo início remonta a mais de 20 milhões de anos, na Austrália, quando esta ainda estava conectada com a Ásia e Nova Guiné, antes da separação dos continentes (Swingle, 1967). Sua origem é atribuída ao Sudoeste da Ásia, particularmente ao oeste da Índia, apresentando relações filogenéticas que se estendem pelas Índias Orientais, Austrália, Centro da China, Japão e África.

Os citros podem ser propagados por sementes, estaquia e enxertia, sendo este último o mais utilizado por apresentar algumas vantagens em relação à propagação por sementes, entre as quais uniformidade das mudas, precocidade no início de produção e aumento na produtividade. A propagação dos citros por enxertia é um método misto, que envolve a propagação sexuada do porta-enxerto e assexuada da copa. A interação enxerto/porta-enxerto, embora provoque pequenas

alterações no clone, atende às necessidades da cultura, dando à planta vigor, adaptação, resistência e ganhos comerciais. Os pomares comerciais de citros são, portanto, formados por mudas obtidas por enxertia, porém isso tornou os cultivos vulneráveis a enfermidades típicas de plantas enxertadas, como exocorte, xiloporose e declínio dos citros (Castro & Kersten, 1996).

A variabilidade genética existente em *Citrus* e gêneros afins é bastante ampla, capaz de permitir a criação de porta-enxertos adaptados às mais diversas condições ambientais. Apesar das hibridações entre espécies de *Citrus* e entre este e gêneros afins serem em muitas circunstâncias passíveis de realização, deve-se atentar para a ocorrência de barreiras reprodutivas que dificultam ou mesmo impedem determinados cruzamentos (Hoyt, 1988 e 1992; FAO/PNUMA, 1991; Giacometti, 1991). Neste sentido, é importante considerar que em virtude das mudanças climáticas globais, sobretudo pelo aumento do efeito estufa, há uma expectativa de que as deficiências hídricas tornem-se mais acentuadas ao longo do tempo e limitem a produção mundial de citros. No Brasil este cenário é encontrado no nordeste e tem se expandido para outras regiões do país significativamente. Esta situação será futuramente muito mais agravada na luz do reconhecimento das mudanças climáticas globais que poderão resultar em efeitos adversos na agricultura e segurança alimentar; sobretudo, em países em desenvolvimento (Rosenzweig e Parry, 1994).

O Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Citros pertencente à Embrapa Mandioca e Fruticultura, situado em região tropical, procura dar ênfase a espécies e variedades adaptáveis a ambientes nela prevalentes, principalmente relacionados ao Norte e Nordeste brasileiros. Contando atualmente com 800 acessos, conservados sob condições de campo, na razão de três a 12 plantas por acesso, o BAG-Citros reúne diversas espécies, compreendendo: *Citrus* spp., *Poncirus trifoliata*, *Fortunella* spp., *Microcitrus* spp., *Eremocitrus glauca*, *Severinia buxifolia*, *Atalantia monophylla*, *Merrillia caloxylon*, *Feroniella oblata*, *Feronia limonia*, *Micromelum tephrocarpa*, *Triphasia trifolia*.

De acordo com Cervera *et al.* (1996), as técnicas de marcadores moleculares têm facilitado e potencializado a análise genética de plantas e vêm tornando-se uma ferramenta extremamente útil no melhoramento genético de várias espécies. Os

marcadores moleculares têm sido utilizados com o objetivo de avaliar relações genéticas entre cultivares, espécies e híbridos intra e interespecíficos, além de serem usados na construção de mapas genéticos (Ferreira & Gratapaglia, 1998). Um dos marcadores amplamente utilizado na caracterização genética de banco de germoplasma é o do tipo ISSR (*“Inter Single Sequence Repeats”*). Esses marcadores são dominantes, semiarbitrários, amplificados via PCR na presença de um oligonucleotídeo complementar a uma região microssatélite, representando assim um grande avanço pela possibilidade de identificar em nível molecular os genótipos dos indivíduos analisados, permitindo a estimativa de parâmetros genéticos para o estudo de diversidade genética. Sendo assim, este trabalho objetivou a caracterização de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Citros, pertencente ao Centro Nacional de Pesquisa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), através de marcadores ISSR a fim de, determinar o nível e a organização da diversidade genética na coleção.

## **2 JUSTIFICATIVA**

A citricultura brasileira é um dos setores mais competitivos do agronegócio global, ocupando o Brasil a posição de maior produtor mundial de citros. É notória que a citricultura brasileira destaca-se por ser centro de diversidade de *Citrus*, com enorme variação genética que tende a ganhar ainda mais valor quando devidamente organizada, classificada, documentada e disponível para acesso sempre que houver demanda, seja ela para pesquisa ou aplicações tecnológicas. Por isso, a ampla caracterização, em termos morfológico, agronômicos e moleculares do banco ativo de germoplasma de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF) faz-se necessária garantindo dessa forma, a integridade dos recursos genéticos e a manutenção da variabilidade genética. Assim, a utilização de marcadores ISSR é vantajosa, uma vez que, são marcadores moleculares que não requerem informações prévias de seqüências de DNA da espécie-alvo, produzem fragmentos com grande reprodutibilidade, quando comparados a outros marcadores com base em PCR não-específico como RAPD, por exemplo, e requerem pouca infra-estrutura em termos de equipamento e de laboratório para execução dos experimentos.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Importância do cultivo de citros no Brasil

A Citricultura lidera a produção mundial de frutas em volume, no qual, encontra-se disseminada por todo território nacional. Segundo o IBGE (2008) esta cultura apresenta grande importância econômica e social para vários estados brasileiros, com destaque para São Paulo com 80,4% da produção nacional. Outros estados como Bahia, Sergipe, Minas Gerais, Rio Grande do sul e Rio de Janeiro também participam do percentual de citros produzidos (FNP, 2001).

A indústria citrícola é uma das principais atividades do agronegócio brasileiro, sendo o suco concentrado congelado sua principal “commodity” para exportação. O Brasil lidera as exportações mundiais de suco concentrado de laranja e de sua produção, com participação acima de 70% e de 29% do mercado internacional, respectivamente. Internamente, valores expressivos também são alcançados, visto que a laranja representa 49% de toda a produção de frutas do país (Neves & Lopes, 2005). Tal relevância econômica confere ao país o título de maior produtor mundial de citros e maior produtor e exportador de suco concentrado congelado de laranja (Cerqueira *et al.*, 2004).

Os Pomares brasileiros somam cerca de 270 milhões de plantas, distribuídas por todo o país, em área superior a 900 mil ha (Anuário *et al.*, 2008). No Nordeste a citricultura se concentra na Grande Unidade de Paisagem de Tabuleiros Costeiros, onde são registradas precipitações pluviométricas anuais de 1.000 mm a 1.200 mm, distribuídas em 8 a 10 meses, com dois a seis meses de deficiência hídrica, sendo o uso de irrigação praticamente nulo (Cerqueira *et al.*, 2004). A Região Nordeste responde por 9% da produção nacional, constituindo-se na segunda maior região produtora do país, com mais de 110.000 hectares cultivados e mais de 1,5 milhões de toneladas. A citricultura nordestina tem grande potencial para implementar seu crescimento sobretudo em função da ausência de doenças e pragas de grande importância que se encontram distribuídas no Sudeste, maior centro produtor. No que diz respeito ao incremento e geração de empregos, percebe-se que devido à instalação de muitas casas de embalagens (packing-houses) e aumento da



exportação do limão tahiti para o Mercado Europeu, muitos empregos diretos e indiretos tem sido oferecidos, na ordem de 100 mil; há que se considerar, no entanto, a importância da citricultura para a economia de regiões carentes como o Nordeste.

### 3.2 Origem, caracterização botânica e condições edafoclimáticas do citros

O gênero *Citrus* pertence à família *Rutaceae*, subfamília *Aurantioideae*, tribo *Citreae*, subtribo *Citrinae*. Esta compreende outros gêneros: *Severinia*, *Pleiospermium*, *Burkillanthus*, *Limnocitrus* e *Hesperetusa*, que são mais primitivos, *Citropsis* e *Atalantia*, gêneros mais evoluídos que os anteriores, e *Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus*, *Eremocitrus* e *Clymenia*. Estes últimos, em conjunto com *Citrus*, compõem o grupo das verdadeiras frutas cítricas, por possuírem frutos semelhantes à laranja ou ao limão (Swingle, 1967).

Os citros procedem originariamente das zonas tropicais úmidas do sudeste da Ásia, porém a produção comercial em grande escala encontra-se nas zonas subtropicais sob irrigação. Além de serem produzidos para o consumo como fruta fresca e suco, os citros são cultivados também para a produção de óleo e ácido cítrico (Doorenbos e Kassam, 1979).

O clima exerce grande influência sobre a vigor e longevidade das plantas cítricas, qualidade e quantidade de frutos. Os citros desenvolvem-se melhor em regiões de clima mais ameno, desde que os solos sejam adequados e o regime pluvial atinja cerca de 1.200 mm anuais, bem distribuído durante o ano. Em condições climáticas ideais são capazes de elevada transpiração, que fica limitada em ambientes desfavoráveis, devido ao fechamento dos estômatos.

Os elementos climáticos exercem influência sobre os citros, destacando-se dentre esses a temperatura que, além de ter efeito acentuado sobre a qualidade do fruto, foi o fator que determinou a distribuição geográfica das plantas cítricas na grande faixa de 40° ao norte e sul do equador. Em geral, as plantas cítricas desenvolvem-se em regiões de clima subtropical, quando as baixas temperaturas do inverno induzem a dormência e um período de diferenciação floral, seguido de um intenso florescimento da primavera. A duração do florescimento é fortemente

dependente da temperatura. Sob condições de clima mais quente as flores se abrem dentro de poucos dias, resultando em uma concentração do florescimento, queda e pegamento de frutos. Entretanto, sob condições de temperatura amenas o período pode se estender, obtendo-se um florescimento difuso (Spiegel-Roy e Goldschmidt, 1996; Coelho *et al.*, 2004).

O fator de maior influência, em condições tropicais, parece ser o estresse hídrico. Segundo Pires *et al.* (1993), o florescimento é influenciado naturalmente pela sucessiva ocorrência de período de chuva e seca. Neste sentido, é importante considerar que em virtude das mudanças climáticas globais, sobretudo pelo aumento do efeito estufa, há uma expectativa de que as deficiências hídricas tornem-se mais acentuadas ao longo do tempo e limitem a produção mundial.

### **3.3 Variabilidade Genética**

A variabilidade genética é a base para o melhoramento. O conhecimento da diversidade genética entre germoplasmas, elite e adaptados, pode melhorar a eficiência na identificação de combinações parentais que gerem populações segregantes com máxima variabilidade genética para a seleção. Caracteres fenotípicos, tradicionalmente usados para estimar a diversidade genética, são de importância limitada, uma vez que são geralmente influenciados pelo ambiente e estágio de desenvolvimento da planta, e porque, em algumas espécies, adequado nível de polimorfismo fenotípico não está disponível (Tatineni *et al.*, 1996).

Por sua vez, marcadores de DNA são independentes das condições ambientais e possuem alto nível de polimorfismo, além de muito abundantes e com herança mendeliana, possibilitando uma descrição mais detalhada da estrutura genética de populações (Williams *et al.*, 1990).

### **3.4 Marcadores moleculares para estudo da variabilidade genética em vegetais.**

A diversidade genética em plantas pode ser estimada de várias maneiras. O mais simples indicador de variabilidade genética é a própria variabilidade morfológica. As características morfológicas, porém, podem ser influenciadas pelo

ambiente, apresentando variação contínua e grande plasticidade. Portanto, faz-se necessário a utilização de características não influenciáveis pelo ambiente. As modernas técnicas de biologia molecular permitem a observação de polimorfismo diretamente na sequência gênica de organismos. Os marcadores moleculares abrem novas perspectivas para pesquisas em conservação de espécies e têm sido amplamente utilizados no monitoramento da variabilidade genética (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Zucchi, 2002). Podem diferir com respeito a características importantes como, abundância genômica, nível de polimorfismo detectado e informação genética (Pinto, 2001) e ainda distinguir, em alguns casos, homozigotos e heterozigotos (Hodgkin *et al.*, 2001).

Os primeiros marcadores moleculares foram desenvolvidos no início dos anos 60 com a introdução da técnica de eletroforese de isoenzimas. Esta técnica detecta de forma indireta polimorfismo em sequências de DNA e se baseia na detecção de polimorfismo na carga elétrica de proteínas com função enzimática, gerado por mutações na sequência gênica. Outra técnica, surgida posteriormente, baseia-se na ação de enzimas de restrição às quais reconhecem uma sequência de DNA e clivam a molécula nesses sítios específicos. Mutações, deleções, ou inserções nos sítios de clivagem são detectados como polimorfismos no tamanho do fragmento de DNA após a digestão com uma enzima de restrição. Esse marcador chamado de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) surgiu da década de 70 e se tornou uma ferramenta importante para várias áreas da biologia. Porém por ser muito laboriosa essa técnica não tem sido muito utilizada em trabalhos de genética de população (Zucchi, 2002). Com o desenvolvimento da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) na década de 80, surgiram diversas técnicas que permitem detectar o polimorfismo diretamente em moléculas de DNA (Cavallari, 2004). Dentre os diversos marcadores moleculares disponíveis atualmente, destacam-se em estudos de diversidade de plantas as sequências simples repetidas (SSR) e repetições entre sequências simples (ISSR).

Os genomas eucariotos são densamente povoados por sequências simples repetidas, as quais consistem em um a seis nucleotídeos repetidos em *tandem*, sendo denominadas Microsatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeats* – Sequências simples repetidas). As seqüências de DNA que flanqueiam os microsatélites são

geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo seleção de *primers* específicos que amplificam, via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos. Os produtos de amplificação são observados em gel de poliacrilamida ou em gel de agarose de alta resolução (Borém & Caixeta, 2006). O ISSR (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Reddy *et al.*, 2002) é um método baseado em microssatélite, que não necessita o conhecimento prévio do genoma, desenho do *primer* clonado. Enquanto os SSR são baseados na amplificação da região repetida usando dois *primers* loco-específicos, em ISSR, um único *primer* composto por uma seqüência do microssatélite usualmente de 16-25bp de comprimento é utilizado para amplificar principalmente as seqüências Inter-SSR de diferentes tamanhos. *Primers* de ISSR têm sido usados para caracterização e manutenção de germoplasma de cacau (Charters & Wilkinson, 2000), para distinguir entre várias cultivares de crisântemo (Wolff *et al.*, 1995), e também para distinguir plantas derivadas de micrósporos daquelas oriundas de tecidos somáticos em cultura de anteras em linho no estágio de plântulas (Chen *et al.*, 1998).

### **3.5 Importância do melhoramento genético na citricultura**

O gênero *Citrus* possui uma ampla diversidade genética, porém a base genética das espécies economicamente importantes é estreita. Isso torna a citricultura bastante suscetível a: (i) diversos fatores bióticos, a exemplo da gomose de *Phytophthora*, da virose “tristeza dos citros” e o “greening”; doenças estas que acarretaram inúmeros prejuízos à produção nacional; e (ii) a diversos fatores abióticos, especialmente o déficit hídrico.

Conforme Nogueira *et al.* (2001), genótipos que apresentam diversidade na resposta ao estresse hídrico constituem excelentes materiais para serem utilizados em programas de melhoramento genético. Com base nesse contexto, vários caracteres fisiológicos podem ser empregados na avaliação das respostas das espécies vegetais ao estresse hídrico, destacando-se entre eles o potencial hídrico foliar, a condutância estomática e a transpiração. Logo, encontrar variedades que sejam tolerantes à seca é fundamental para manutenção e melhoria da cadeia produtiva.

A conservação e utilização dos recursos genéticos de plantas são fatores essenciais para a manutenção e desenvolvimento da produção agrícola. A necessidade de se conservar essa diversidade tem sua base na demanda agrícola e, portanto no melhoramento vegetal. Para uma melhor utilização do germoplasma conservado é necessário que se caracterize a diversidade nele existente, quer morfológicamente, via descrição de caracteres morfológicos, quer em nível do genoma, utilizando técnicas moleculares.

### **3.6 Banco ativo de germoplasma de citros e a variabilidade genética.**

O Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Citros pertencente à Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, procura dar ênfase a espécies e variedades adaptáveis a ambiente nela prevalecentes, principalmente relacionados ao Norte e Nordeste brasileiros (Soares Filho *et al.*, 2003).

A caracterização deste BAG vem sendo efetuada mediante o emprego de descritores mínimos definidos pela Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical e pelo *International Plant Genetic Resources Institute-IPGRI*, além do uso de técnicas citogenéticas, baseadas em bandeamento cromossômico (Soares Filho *et al.*, 1999). Neste sentido, o uso de técnicas de genética molecular terá um papel importante na conservação e caracterização da diversidade genética desta coleção. Essa contribuição será possível com base na utilização de marcadores moleculares tipo ISSR, que representa um grande avanço pela possibilidade de identificar em nível molecular os genótipos ou a genética dos indivíduos analisados, permitindo a estimativa de parâmetros genéticos para o estudo de diversidade genética. O polimorfismo molecular difere da análise fenotípica por que a fenotípica avaliará a divergência para determinados caracteres pré-estabelecidos, enquanto a molecular considera todo genoma do indivíduo avaliado. A tecnologia molecular tem permitido a identificação de similaridade no DNA de gêneros separados há milhares de anos por evolução e cujo fenótipo mascara sua herança genética comum (Jauhar, 1996; Phillips e Vasil, 2001; Sobral, 1996).

A análise das relações genéticas nas espécies de plantas cultivadas é um componente importante dos programas de melhoramento, pois fornece informação

sobre a diversidade genética e, conseqüentemente, uma base de amostragem de variedades, linhagens, cultivares, acessos ou populações envolvidas nesse processo (Mohammadi e Prasanna, 2003). Além disso, o entendimento das relações genéticas entre linhagens tem um papel importante no planejamento de cruzamentos, na classificação de grupos heteróticos e na identificação de plantas para a proteção de variedades (Hallauer e Miranda, 1988).

Diversos marcadores moleculares (ISSR, RAPD, AFLP e SSR) têm sido utilizados para avaliar as relações filogenéticas entre acessos e analisar o nível de diversidade genética em Citros (Barkley *et al.* 2006; Bretó *et al.* 2001; Gulsen e Roose, 2001). Esses estudos demonstram que os marcadores moleculares são ferramentas poderosas para elucidar a diversidade genética, determinar o grau de parentesco, revelar as relações filogenéticas entre Citros e espécies afins.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Este trabalho teve como objetivo caracterizar a diversidade genética existente entre 83 acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Citros, pertencente ao Centro Nacional de Pesquisa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), utilizando marcadores ISSR.

### **4.2 Objetivos específicos**

I Genotipar, através de iniciadores ISSR, 83 acessos do Banco de Germoplasma de Citros;

II Identificar marcadores polimórficos ISSR em Citros a fim de determinar o nível e organização da diversidade genética na coleção;

## 5. METODOLOGIA

O Estudo foi realizado com as espécies *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, *C. reticulata* Blanco e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf do Banco Ativo de Germoplasma de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura em que foram utilizados 83 acessos. A escolha dos acessos para análise foi de acordo com as espécies que apresentam maior número de acessos. A classificação desses acessos quanto a espécie pertencente, nome popular, procedência e origem encontra-se na Tabela 01. Para tanto, coletou-se, na coleção de Germoplasma de Citros da Embrapa - Cruz das Almas, folhas jovens e saudáveis. As folhas foram cortadas, embaladas em papel alumínio e armazenadas em gelo para transporte. No laboratório de Biologia Molecular da Embrapa, as folhas foram lavadas em água corrente e enxaguadas em água destilada para a extração do DNA.

**Tabela 01:** Espécies e origem dos acessos de citros do BAG pertencente ao CNPMF

Espécie /variedade	Porta-enxerto	Quantidade	Localização	Procedência	Origem
<b><i>Citrus sinensis</i>, laranjas doces</b>					
Aziza	Limoeiro Volkameriano	2	BAG II	UC Riverside	Marrocos
Baianinha IAC 79	Limoeiro Cravo	2	BAG III	CCSM	Brasil
Berna	Limoeiro Volkameriano	2	BAG II	UC Riverside	Espanha
Biondo	Limoeiro Volkameriano	2	BAG II	UC Riverside	EUA
Caipira DAC	Limoeiro Cravo	2	BAG III	CCSM	Brasil
Diva	Limoeiro Cravo	3	BAG I	CCSM	Brasil
Early Oblong	Limoeiro Volkameriano	2	BAG II	UC Riverside	EUA
Españole Sans Péppin	Tangerineira Cleópatra	2	BAG IV	UC Riverside	Espanha
Finiki	Limoeiro Volkameriano	2	BAG II	UC Riverside	Turquia
Flor	Citrangeira Troyer	3	BAG I	Mucugê	Brasil
Folha Murcha	Limoeiro Cravo	3	BAG I	CCSM	Brasil
Gardner	Tangerineira Cleópatra	2	BAG II	UC Riverside	EUA
Hamlin CNPMF 04	Tangerineira Cleópatra	2	BAG II	CNPMF	Brasil
Hamlin CNPMF 20	Limoeiro Volkameriano	2	BAG II	CNPMF	Brasil
Hashimoto Iniasel 328	Limoeiro Volkameriano	5	BAG I	IVIA	Japão
Havard Blood	Limoeiro Volkameriano	2	BAG II	UC Riverside	Nova Zelândia
Ilhoa de Goiania	Pé-franco	3	BAG I	CPFT	Brasil

Imperial	Tangerineira Cleópatra	2	BAG II	UESB	Brasil
Isle of Pines	Limoeiro Volkameriano	2	BAG II	UC Riverside	Cuba
Jaffa	Limoeiro Volkameriano	2	BAG II	UC Riverside	Palestina
Jin Chen (Sincorá)	Limoeiro Cravo	3	BAG I	China	China
Kavatta Blood	Limoeiro Volkameriano	2	BAG II	UC Riverside	Suriname
Kcay Sekeri Sweet Orange	Limoeiro Volkameriano	3	BAG I	UC Riverside	Índia
Khalily White	Limoeiro Volkameriano	2	BAG II	UC Riverside	Egito
Kona	Limoeiro Volkameriano	2	BAG II	UC Riverside	Hawai
Lamb Summer	Limoeiro Cravo	2	BAG III	UC Riverside	EUA
Lane Late	Limoeiro Volkameriano	2	BAG II	UC Riverside	Austrália
Lima	Pé-franco	3	BAG I	CCSM	Brasil
Lue Gin Gong	Limoeiro Cravo	2	BAG III	CCSM	EUA
Marrs Navel	Limoeiro Cravo	2	BAG III	UC Riverside	EUA
Mediterranean	Limoeiro Cravo	2	BAG IV	UC Riverside	Açores
Melrosa	Limoeiro Cravo	3	BAG I	Paraíba	Brasil
Midknigh Valencia Orange	Limoeiro Volkameriano	3	BAG I	UC Riverside	África do Sul
Midsweet	Limoeiro Volkameriano	2	BAG II	UFlorida	E.U.A.
Natal CNPMF 112	Limoeiro Volkameriano	6	BAG I	CNPMF	Brasil
Olivelands	Limoeiro Volkameriano	2	BAG II	UC Riverside	EUA
Orama	Limoeiro Volkameriano	2	BAG II	UC Riverside	EUA
Palmeiras	Limoeiro Cravo	3	BAG I	Sapeaçu	Brasil
Parson Brown	Limoeiro Cravo	2	BAG III	UFlorida	EUA
Pêra CNPMF D.6	Limoeiro Volkameriano	3	BAG I	CNPMF	Brasil
Pineapple	Tangerineira Cleópatra	2	BAG II	UC Riverside	EUA
Salustiana	Tangerineira Cleópatra	2	BAG II	UC Riverside	Espanha
Rubi	Limoeiro Cravo	2	BAG III	UC Riverside	Mediterrâneo
Seleta Amarela	Limoeiro Cravo	2	BAG III	CCSM	Brasil
Shamouti	Citrumelo Swingle	3	BAG I	UC Riverside	Israel
Succory Acidless	Limoeiro Cravo	2	BAG III	UC Riverside	EUA
Sunstar	Tangerineira Cleópatra	2	BAG II	UC Riverside	EUA
Torregrosa	Limoeiro Volkameriano	2	BAG II	UC Riverside	Marrocos
Valência CNPMF 27	Limoeiro Volkameriano	2	BAG II	CNPMF	Brasil
Valência Trepadeira	Tangerineira Cleópatra	2	BAG II	CCSM	Brasil
Watumpka	Limoeiro Volkameriano	2	BAG II	UC Riverside	EUA
Westin	Limoeiro Cravo	2	BAG III	CCSM	Brasil
<b>C. reticulata</b>					
Africa Do Sul	Limoeiro Cravo	2	BAG IV	CCSM	África do Sul
Avana	Limoeiro Volkameriano	3	BAG I	UC Riverside	Itália
Batangas	Citrumelo Swingle	2	BAG II	CCSM	Filipinas



Caçula 3	Tangerineira Cleópatra	2	BAG II	EEC B	Brasil
Cravo	Citrumelo Swingle	2	BAG IV	CCSM	Portugal
Dancy	Tangerineira Cleópatra	2	BAG IV	UC Riverside	EUA
Early	Limoeiro Volkameriano	3	BAG I	UC Riverside	EUA
Ellendale	Limoeiro Volkameriano	3	BAG I	UC Riverside	Austrália
Encore	Limoeiro Volkameriano	3	BAG I	UC Riverside	EUA
F.R.	Limoeiro Volkameriano	3	BAG I	UC Riverside	EUA
Fairchild	Limoeiro Volkameriano	2	BAG II	UC Riverside	EUA
Fortune Iniasel 80	Limoeiro Cravo Sta. Cruz	3	BAG I	IVIA	Espanha
Hung Kat	Limoeiro Volkameriano	3	BAG I	UC Riverside	EUA
Israel	Tangerineira Cleópatra	2	BAG II	CCSM	Brasil
Oneco	Tangerina Cleópatra	2	BAG IV	CCSM	Índia
Ponkan	Limoeiro Cravo	3	BAG I	CCSM	Índia
Richards Especial	Tangerineira Cleópatra	2	BAG II	UC Riverside	Austrália
Sangüínea	Limoeiro Volkameriano	3	BAG I	CCSM	Brasil
Span	Limoeiro Cravo	2	BAG IV	CCSM	Brasil
Swatow	Limoeiro Volkameriano	2	BAG II	CCSM	Índia
<b>C. clementina</b>					
Clementina Comum	Limoeiro Volkameriano	2	BAG II	CCSM	Brasil
Clementina de Nules	Limoeiro Cravo	2	BAG IV	CPACT	Brasil
<b>C. reshni</b>					
Cleópatra	Limoeiro Cravo	3	BAG I	CCSM	Índia
<b>C. sunki</b>					
Sunki	Tangerineira Cleópatra	2	BAG IV	CCSM	China
<b><i>Poncirus trifoliata</i></b>					
Trifoliata Barnes	Citrumelo Swingle	2	BAG IV	UC Riverside	EUA
Trifoliata Beneke	Citrumelo Swingle	2	BAG IV	UC Riverside	EUA
Trifoliata Diplóide	Citrumelo Swingle	2	BAG IV	UC Riverside	EUA
SMALL LEAF A					
SMALL LEAF C					
WEBBER					
FAWCETT					
P. trifoliata USDA					

i- Extração de DNA genômico para fins de genotipagem.

O DNA foi extraído de folhas jovens utilizando o protocolo padrão para extração de DNA em tecido vegetal MINI-PREP (Doyle & Doyle, 1990, com modificações) (Anexo I). Para tanto, pesou-se 300 mg de tecido foliar de cada genótipo. As amostras foram maceradas em almofariz na presença de nitrogênio líquido sendo, em seguida transferidas para microtubos de 2mL congelados. Após, adicionou-se 700 µL da solução tampão de extração (CTAB a 2,0%, NaCl a 1,4 M, Tris HCl a 0,1M pH 8,0, EDTA a 20mM, 2-mercaptoetanol 0,4%, PVP (Polivinilpirrolidona) 1,0% e água purificada) aos macerados. As amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C e homogeneizada em intervalos 15 minutos, suavemente, por inversão. Em seguida, retirou-se o material do banho – maria e adicionou-se ao sobrenadante 700 µL de clorofórmio:álcool Isoamílico (24:1), homogeneizado suavemente e centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi coletado e transferido para novos microtubos de 2mL e novamente, adicionou-se 700 µL de clorofórmio: álcool Isoamílico (24:1) e centrifugados por 10 minutos a 10.000 rpm; Após esse processo, o sobrenadante foi recuperado e transferido para novos tubos microtubos 2 mL, onde foi adicionado 450 µL de álcool Isopropílico (gelado) aproximadamente, 2/3 do volume coletado, foi homogeneizado suavemente, incubado a (-20°C) por 20 minutos. Após , retirado do *freezer* o material foi centrifugado por 10 minutos a 12.000 rpm e, em seguida o DNA isolado foi ressuspensão em 600 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) e adicionado 200 µL de acetato de amônio a 7,5 M. Os tubo fechados foram misturados suavemente por inversão para homogeneizar a solução, posteriormente incubados no gelo por 15 minutos. Realizou-se uma nova centrifugação por 15 minutos a 12.000 rpm; o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 2 mL, a este adicionou-se 800 µL de etanol absoluto em que foi misturado suavemente por inversão e incubado por 1 hora a -20°C, houve uma nova centrifugação por 10 minutos a 12.000 rpm. O precipitado foi lavado com etanol 70% gelado (v/v) (500 µL) e centrifugado novamente nas mesmas condições anteriores por 3 minutos, em seguida o precipitado foi posto para secar a temperatura ambiente por 20 minutos e ressuspensão em 100 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) + 1

$\mu\text{L}$  de RNase (10 mg/ml) e incubado a 37°C por 1 hora. O DNA foi armazenado no freezer a -20° C.

#### ii- Quantificação e ajuste da concentração do DNA genômico

Após a extração do material genético, foi realizada a diluição do DNA com o uso de TE gelado. Em seguida, foi feita a verificação da qualidade e quantidade do DNA através de eletroforese em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídeo, imerso em tampão TBE 1X, com uma voltagem igual a 60 W por 1 hora. As amostras foram visualizadas através do sistema de fotodocumentação. A quantificação do DNA foi realizada por comparação com o DNA Fago lambda de concentração conhecida. Após quantificação, as amostras tiveram a sua concentração ajustada para 5ng/ $\mu\text{L}$  por diluição em tampão TE e verificada, novamente, por eletroforese em gel de agarose a 1% sob as condições especificadas acima.

A eletroforese em gel permite a resolução de ácidos nucleicos, e possui um importante papel analítico, e às vezes um “pape” preparativo. A matriz de separação usada é normalmente agarose. Os ácidos nucleicos migram com base nas diferenças de peso molecular e estrutura tridimensional (conformação espacial). De modo geral, todos os ácidos nucleicos possuem aproximadamente uma densidade de carga por base, e a conformação de molécula em geral é semelhante. Portanto, a dificuldade de penetração no gel é proporcional ao peso molecular obtido por cada amostra.

#### iii- Triagem dos *Primers*

Visando a genotipagem dos 83 acessos citados, realizou-se uma seleção prévia de iniciadores ISSR. Os iniciadores ISSR utilizados foram publicados por Biswas *et al.* (2010). As sequências desses *primers* estão presentes na Tabela 2. O objetivo dessa triagem foi à seleção de iniciadores capazes de gerar amplificação das amostras e que se mostrassem promissores na detecção de polimorfismo sendo então, empregados nas análises.

**Tabela 02:** Sequências de iniciadores ISSR utilizados na triagem

Identificação de Primers ISSR	Sequência de Nucleotídeos (5'- 3')	Fonte
809	AGAGAGAGAGAGAGAGG	Biswas <i>et al.</i> (2010)
810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	Biswas <i>et al.</i> (2010)
814	CTCTCTCTCTCTCTCTA	Biswas <i>et al.</i> (2010)
844	CTCTCTCTCTCTCTCTAGC	Biswas <i>et al.</i> (2010)
861	ACCACCACCACCACCACC	Biswas <i>et al.</i> (2010)
ISSR-1	BDB TCCTCCTCCTCCTCC	Biswas <i>et al.</i> (2010)
TriATC3' <b>R</b> C	ATCATCATCATCATC <b>R</b> C	Biswas <i>et al.</i> (2010)
TriCAA3' <b>R</b> C	CAACAACAACAACA <b>R</b> C	Biswas <i>et. al.</i> (2010)
TriTCA3' <b>R</b> C	TCATCATCATCATC <b>R</b> C	Biswas <i>et. al.</i> (2010)
TriTCT3' <b>R</b> C	TCTTCTTCTTCTTCT <b>R</b> C	Biswas <i>et. al.</i> (2010)
TriGTG3' <b>R</b> C	GTGGTGGTGGTGGT <b>R</b> C	Biswas <i>et. al.</i> (2010)
TriTGT	TGTTGTTGTTGTTGT	Biswas <i>et. al.</i> (2010)
TriTGT3' <b>Y</b> C	TGTTGTTGTTGTTGT <b>Y</b> C	Biswas <i>et. al.</i> (2010)
TriAAC3' <b>R</b> C	AACAACAACAACA <b>R</b> C	Biswas <i>et. al.</i> (2010)
TriAAG3' <b>R</b> C	AAGAAGAAGAAGA <b>R</b> C	Biswas <i>et. al.</i> (2010)
TriATG3' <b>R</b> C	ATGATGATGATGAT <b>R</b> C	Biswas <i>et. al.</i> (2010)
TriAGA3' <b>R</b> C	AGAAGAAGAAGA <b>R</b> C	Biswas <i>et. al.</i> (2010)
TriTAG3' <b>R</b> C	TAGTAGTAGTAG <b>R</b> C	Biswas <i>et. al.</i> (2010)
TriTTC3' <b>R</b> C	TTCTTCTTCTTCTT <b>R</b> C	Biswas <i>et. al.</i> (2010)
TriTTG3' <b>R</b> C	TTGTTGTTGTTGTT <b>R</b> C	Biswas <i>et. al.</i> (2010)
TriTCC3' <b>R</b> C	TCCTCCTCCTCCT <b>R</b> C	Biswas <i>et. al.</i> (2010)

\***R** = (A, G); \***Y** = (C,T)

#### iv- Amplificação de regiões genômicas de *citrus* através de iniciadores ISSR

A fim de otimizar a amplificação do DNA genômico de *Citrus* através de ISSR foram realizados teste com diferentes temperaturas de anelamento para os 21 iniciadores supra citados. As temperaturas testadas variaram entre 48°C a 52°C sendo, a temperatura de 48°C a que favoreceu uma melhor amplificação das

amostras. A reação de amplificação foi conduzida de acordo com o protocolo proposto por Williams *et al.* (1990). Para tanto, cada reação foi ajustada para um volume final de 15 µL, contendo: 4,9 µL de H<sub>2</sub>O milli-Q, 3 µL de DNA (5ng/ µL), 1,5 µL dos iniciadores ISSR (0,2 µM), 1,5 µL de tampão Tris/KCl (10X), 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (2,5mM), 0,9 de dNTPs (1,5 mM) e 0,2 U da enzima *Taq Polimerase* (5U/ µL). As amplificações foram realizadas em termocicladores utilizando o programa com os seguintes ciclos: um ciclo inicial de 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de: 94°C por 1 minuto (desnaturação do DNA genômico), 48°C por 45 segundos (anelamento dos iniciadores), 72 °C por 1 minuto (extensão da fita de DNA) e um ciclo final de extensão pela polimerase de 72°C por 7 minutos finalizando assim, a amplificação do material genético.

#### V- Revelação dos produtos amplificados

O produto da amplificação foi submetido à eletroforese horizontal em gel de agarose 2% em tampão TBE (Tris-borato-EDTA) 0,5X por 4 horas. Ao final do processo o gel foi submetido à coloração com brometo de etídio e, em seguida foram colocados sob luz ultra-violeta para visualização dos fragmentos e a captura da imagem com o auxílio do sistema Kodak® de fotodocumentação.

#### - Análise da Diversidade Genética

Por se tratar de um marcador dominante, os dados foram computados como ausência (0) e presença (1) de bandas. A partir dos dados obtidos, através dos marcadores ISSR, gerou-se uma matriz de distância genética e o coeficiente de correlação cofenética pelo coeficiente de dissimilaridade de Jaccard e o programa GENES (Cruz, 2001); sendo que O índice de Jaccard é formulado da seguinte maneira:

$$I_{AB} = A / (A + B + C) \text{ onde:}$$

A = mesma banda para ambos os indivíduos;

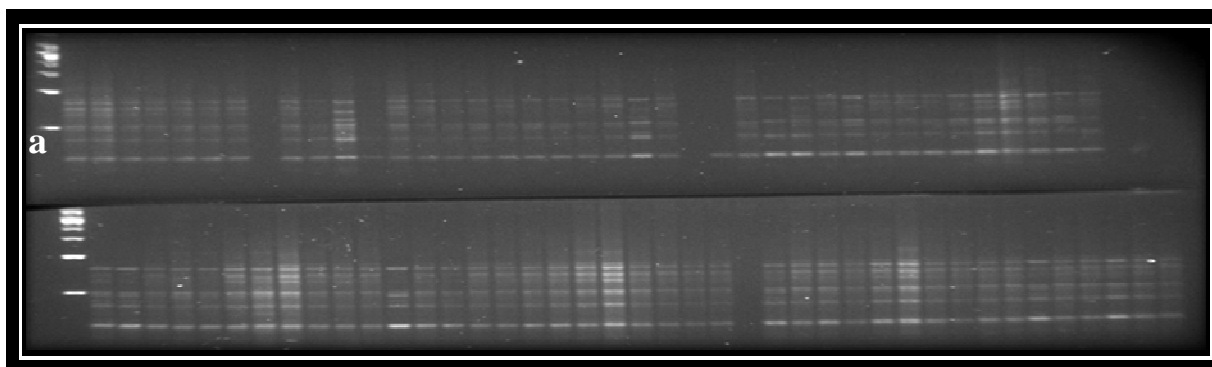
B = presença da banda no indivíduo 1 e ausência no indivíduo 2;

C = ausência da banda no indivíduo 1 e presença no indivíduo 2.

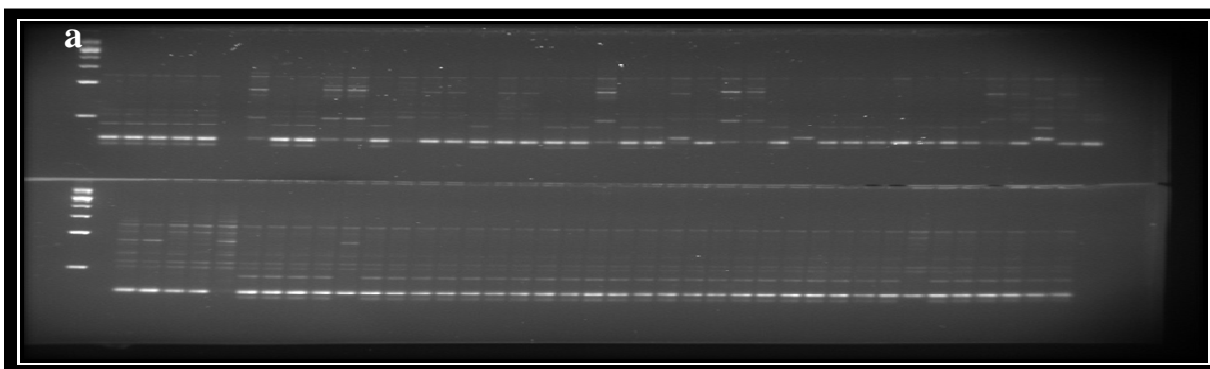
O dendrograma foi construído utilizando-se o *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean* (UPGMA) (Sneath & Sokal, 1973) pelo programa MEGA-4 (Tamura *et al.* 2007).

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

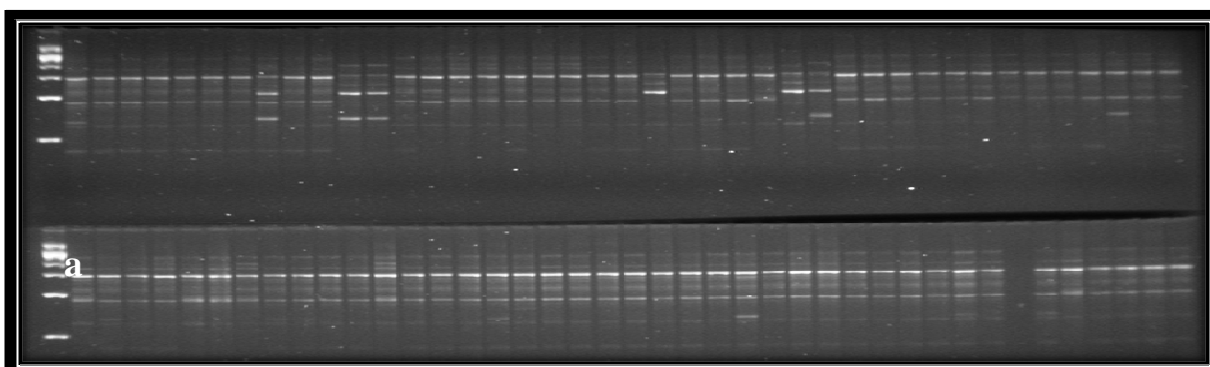
De um total de 21 iniciadores ISSR testados, 9 apresentaram foram eficientes na amplificação das amostras. Estes iniciadores foram selecionados e utilizados na genotipagem dos 83 acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Citros (Figura 1, 2 e 3). Souza *et al.*, (2008) realizou uma triagem entre 26 iniciadores ISSR para fins de análise da diversidade genética em *Zabrotes subfasciatus* e selecionou apenas 15 iniciadores. Os quinze iniciadores selecionados foram os que obtiveram fragmentos de alta intensidade quando avaliados em gel de agarose.



**Figura 1.** Perfil eletroforético em gel de agarose a 2%, dos fragmentos gerados através do iniciador **TriAAG'3RC** dos acessos do BAG-Citros. Em (a) Marcador de peso molecular 1 Kb, Cruz das Almas, 2010.



**Figura 02.** Perfil eletroforético em gel de agarose a 2%, dos fragmentos gerados através do iniciador ISSR TriATC3'RC dos acessos do BAG-Citros. Cruz das Almas, 2010. Em (a) Marcador de peso molecular 1 Kb, Cruz das Almas, 2010.



**Figura 03.** Perfil eletroforético em gel de agarose a 2%, dos fragmentos gerados através do iniciador ISSR TriTCT3'RC dos acessos do BAG-Citros. Cruz das Almas, 2010. Em (a) Marcador de peso molecular 1 Kb, Cruz das Almas, 2010.

Os nove iniciadores utilizados na caracterização molecular dos acessos amplificaram um total de 47 marcadores sendo de 4 a 7 por iniciador com média de 5,2 por iniciador (Tabela 3). Dos 47 marcadores identificados 8 foram monomórficos (17,02%) e 39 polimórficos (82,98%). Apenas os marcadores polimórficos foram computados e utilizados nas análises. Val et al., (2009), estudando a diversidade genética em germoplasma de *Lippia Alba*, através de 9 iniciadores ISSR obteve um total de 52 marcadores, sendo 41 (78,85%) polimórficos.

**Tabela 03:** Número de marcadores totais e polimórficos por iniciador ISSR

Iniciadores ISSR	Nº. total de marcadores	Nº. de marcadores polimórficos
814	03	02
844	06	04
TriATC3'RC	07	06
TriCAA3'RC	05	05
TriTCT3'RC	07	06
TriAAG3'RC	07	06
TriTCA3'RC	04	02
TriTTG3'RC	04	03
TriTTC3'RC	07	05

O coeficiente de correlação cofenética, ou seja, a correlação entre a matriz de distância e a matriz de agrupamento, que foi de 0.89. Esse valor de 0.89 demonstra uma boa correlação entre os dados moleculares e o agrupamento.

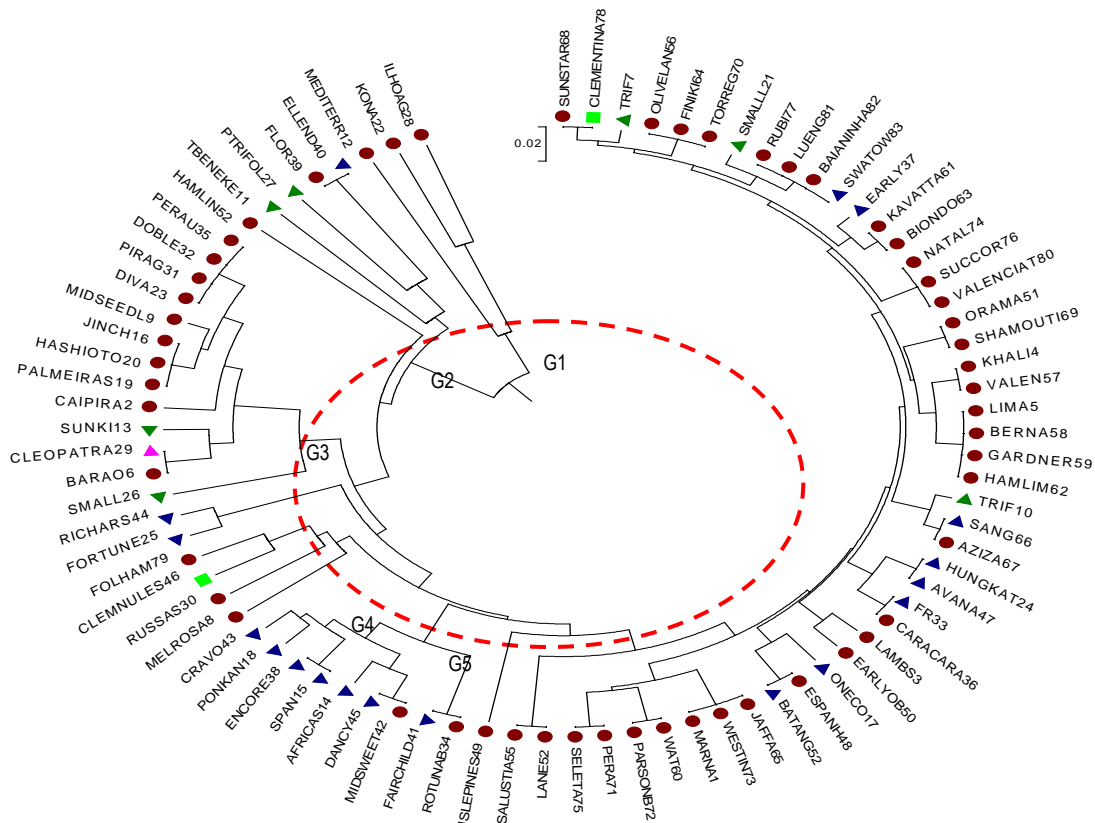
Através da análise do dendograma (Figura 4) pode-se observar a formação de 5 grupos maiores (G1, G2, G3, G4, G5). A distância média entre os acessos foi de 0.10 (Figura 4). Essa distância demonstra uma base genética muito estreita entre os acessos avaliados. Embora o gênero *Citrus* possua uma ampla diversidade genética, porém a base genética das espécies economicamente importantes é estreita o que torna a citricultura bastante suscetível a diversos fatores bióticos, a exemplo da gomose de *Phytophthora*, da virose “tristeza dos citros” e o “greening”; doenças estas que acarretaram inúmeros prejuízos à produção nacional; e a diversos fatores abióticos, especialmente o déficit hídrico.

A maior distância foi de 0.51 entre os acessos Ilhoa de Goiânia e Oneco, oriundos das espécies *C. sinensis* e *C. reticulata*, respectivamente.

Embora o número de marcadores polimórficos avaliados nesse estudo tenha sido de apenas 39, os mesmos foram capazes de separar, como pode ser visto no dendograma, a princípio, por espécie. Também, pode ser observado no G4 (Figura 4), que alguns dos acessos de *C. reticulata* foram separados. No entanto, é evidente que o número de marcadores identificados são insuficientes para separar os acessos de acordo com suas respectivas espécies e regiões de origem (Tabela 2).



Sendo assim, faz-se necessária a aplicação de um maior número de iniciadores ISSR para identificação de mais loci polimórficos.



**Figura 4.** Dendrograma obtido pelo método de agrupamento do UPGMA, a partir da dissimilaridade genética entre 83 acessos do banco de germoplasma de citros do CNPMF através de marcadores ISSR. ● *Citrus sinensis*; ▲ *Citrus sunki*; ▲ *Reticulata*; ■ *Citrus clementina*; ▲ *Citrus reshni*

## 7 CONCLUSÃO

- Marcadores ISSRs mostraram-se eficientes na caracterização molecular de *Citrus*;
- Os resultados gerados apresentam grande utilidade ao melhoramento genético do BAG-citros do CNPMF, pois permitem maior compreensão sobre a genética dos citros e fornecem subsídios para a seleção de genitores para futuras hibridizações;
- A Detecção de um maior número de marcadores ISSR polimórficos, através da genotipagem dos acessos com iniciadores ISSRs, faz-se necessária para confirmação dos resultados obtidos ou para formação de novos grupos.

## REFERÊNCIAS

- ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA 2008. **Brazilian Fruit Yearbook**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz,. 136p. 2006.
- BRETÓ MP, RUIZ C, PINA JA, ASINS MJ. The diversification of *Citrus clementina* Hort. Ex Tan., a vegetatively propagated crop species. **Mol Phy and Evol** 21:285–293; 2001.
- CASTRO, A.M.; KERSTEN, E. Influência do anelamento e estiolamento de ramos na propagação da laranjeira Valência (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) através de estacas. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v..53, n..2/3, p.199-203, 1996.
- CERQUEIRA, E. C.; CASTRO NETO, Manoel Teixeira de ; PEIXOTO, Clovis Pereira; SOARES FILHO, Walter dos Santos ; LEDO, Carlos Alberto da Silva ; OLIVEIRA, Jutair Garcia de . Resposta de porta-enxertos de citros ao déficit hídrico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v. 26, p. 515-519, 2004.
- CERVERA, M.T.; GUSMÃO, J.; STEENACKERS, M.; VANGYSEL, A.;VANMONTAGU, M.; BOERJAN, W. Application of AFLPTM–based molecular markers to breeding of *Populus* spp. **Plant Growth Regulation**, Dordrechtm, v.20,n.1, p.47-52, 1996.
- CHEN, Y.; HAUSNER, G.; KENASCHUK, E.; PROCUNIER, D.; DRIBNENKI, P. PENNER, G.. Identification of microspore-derived plants in anther culture of flax (*Linum usitatissimum* L.) using molecular markers. **Plant Cell Reports** 18: 44-48. 1998.
- CRUZ, C. D. Programa Genes: versão Windows; **Aplicativo computacional em genetic e estatística**. Viçosa-UFV, 648p. 2001.
- DOORENBOS, J.; KASSAM, A.H. **Yiels response to water**. Rome: FAO, 1979. 306p. (FAO: Irrigation and Drainage Paper, 33).
- FAO/PNUMA (Santiago, Chile). **Conservación in situ de recursos genéticos**. Santiago, Chile: Oficina Regional de la FAO para America Latina y el Caribe,1991;
- FERREIRA. M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA – CENARGEN, 1998. 220p. GURGEL, J.T.A. Poliembrionia e embriogenia adventícia em *Citrus*, *Mangifera* e *Eugenia*. *Dusenía*, Curitiba, v.6, p.443-450, 1952.
- FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Agrianual 2002: **Anuário de agricultura brasileira**. São Paulo. p. 281-309: Citros, 2001.
- GIACOMETTI, D.C. **Taxonomia das espécies cultivadas de citros baseada em filogenética**. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A.A. (eds.). *Citricultura Brasileira*. 2. ed. Campinas, SP: Fundação Cargill, v.1, p.99-115. 1991;

GULSEN O, ROOSE ML (2001a) Lemons: Diversity and relationships with selected *Citrus* genotypes as measured with nuclear genome markers. **J Amer Soc Hort Sci** V.126, p. 309-327, 2001.

GUPTA, M., CHYI, Y – S., ROMERO-SEVERSON, J., OWEM, J.L Amplification of DNA from evolutionarily diverse using singer primers of simple-sequence repeats. **Teor. Appe. Gen.**, V.89, p.998-1006, 1994.

HALLAUER, A.R., AND J.B.MIRANDA. **Quantitative genetics in maize breeding**. 2nd edition, Iowa State University Press, Ames, IA, 1988.

HOYT, D. V, Variations in sunspot structure and climate. **Clim. Charge**. V.2, p. 79-92, 1988.

IBGE (Rio de Janeiro). **Levantamento sistemático da produção agrícola: Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil**. Rio de Janeiro, RJ. 66p, 1995.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 29. nov. 2009.

JAUHAR, PREM P.. Genome Analysis: A Prologue. Page1-9 *in* Prem P. Jauhar, editor. **Methods of Genome Analysis in Plants**. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL. 1996.

LITT, M. HAUGE, X. SHARMA, V. Shadows bands seen when typing polymorphic dinucleotide repeats:some causes and cures. **Biotechniques**, V.15, p.280-284, 1993;

LIU K, GOODMAN M, MUSE S, SMITH JS, BUCKLER E, DOEBLEY J Genetic structure and diversity among Maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites. **Genetics** V.165, p.2117–2128, 2003.

LIU, B., WENDEL, J.F. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system en cotton. **Molecular Ecology Notes**, v.1, p.2005-2008, 2001;

PHILLIPS, R.L.; VASIL, I.K. (Eds.;2001) **DNA-Based Markers in Plants Series: Advances in Cellular and Molecular Biology of Plants**, V. 6 2nd ed., 532 p.

PIRES, R; ROJAS, E. Effects of drought stress and urea sprays on production of flower and vegetative buds of Tahiti lime. **Fruits**, Paris, v.54, p. 177-182, 1993.

MICHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.88, p.9828-9832, 1991.

MOHAMMADI, S. A.; PRASANNA, B. M. Analysis of Genetic Diversity in Crop Plants—Salient Statistical Tools and Considerations REVIEW & INTERPRETATION. **Crop Sci.** P. 431235–1248, 2003.

NEVES, M.F.; LOPES F.F. **O comportamento do consumidor de laranja *in natura* e suco.** In: NEVES, M.F.; LOPES F.F. (eds). Estratégias para a laranja no Brasil. Editora Atlas, p.170-185, 2005;

NOGUEIRA, R. J. M. C.; MORAES, J. A. P. V.; BURITY, H. A. Alterações na resistência à difusão de vapor das folhas e relações hídricas em aceroleira submetidas a déficit de água. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.13, n.1, p.75-87, 2001.

OLIVEIRA, J. R. P. ; SOARES FILHO, W. dos S. ; NASCIMENTO, A. S. do ; COSTA, D. da C. . **Banco ativo de germoplasma de acerola.** In: **Workshop para curadores de bancos de germoplasma de espécies frutíferas**, 1999, Brasília, DF.. Recursos genéticos de espécies frutíferas no Brasil. Brasília, DF. : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia,. p. 65-71; 1999.

ROSENZWEIG, C; PARRY, M.L. Potential impact of climate change on world food supply. **Nature.** 367:133-138;1994.

SOARES FILHO, W. dos S.; VILARINHOS, A.D.; ALVES, A.A.C.; *et al.* Programa de Melhoramento Genético de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura: obtenção de híbridos, Webb DM, Knapp SJ (1990) DNA extraction from a previously recalcitrant plant genus. **Plant Mol Bio** V.8, p.180–185, 2003.

SOUZA G.A., CARVALHO, M. R. *et al*; Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus* **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v.43, n.7, p.843-849, 2008.

SPIEGEL-ROY, P.; GOLDSCHMIDT, E. E. Reproductive physiology: flowering and fruiting. In:\_\_\_\_\_ **Biology of citrus.** Cambridge: Cambridge University Press, 1996. p. 70-125.

SWINGLE, W.T.; REECE, P.C. **The botany of citrus and its wild relatives.** In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (eds.). The citrus industry. Berkeley and Los Angeles: University of California, v.1, p.190-430, 1967.

TATINENI, V.; CANTRELL, R. G.; DAVIS, D. D. Genetic diversity in elite cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPDs. **Crop Science, Madison**, v. 36, p. 186-192, 1996.

VAL, T. M; CAVALLARI, M. M; ZUCCHI, M. I; BLANK, A. F; MONTEIRO, M.; PINHEIRO, J.B. **Diversidade genética em germoplasma de *Lippia alba* utilizando marcadores ISSR.** Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética 30 de agosto a 02 de setembro de 2009 Centro de Convenções do Hotel Monte Real Resort ,

Águas de Lindóia ;SP, Brasil. Disponível em [www.sbg.org.br](http://www.sbg.org.br) - ISBN 978-85-89109-06-2 < Acessado em 20 de novembro de 2010>

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TIGEY, S., V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WOLF, A. D & LISTON, A. (1998). **Contributions of PCR-based methods to plant systematic II D.E. Soltes**, P. S. Soltes and J. J. Doyle. pp 43-86. Boston. Kluwer

WOLFF, K.; ZIETKIEWICZ, E.; HOFSTRA, H.. Identification of chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprint patterns. **Theor Appl Genet** V.91, p. 439-447, 1995.

ZIETKIEWICZ, E. RAFALSKI, A; LABUDA, D.Genome frigerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomic** V.20, p. 176-183, 1994.

ZUCCHI, R.A. Espécies de *Anastrepha*, sinonímias, plantas hospedeiras e parasitóides,. In A. Malavasi & Zucchi, R.A. (eds.), Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil; conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto, **Holos**, p.41-48, 327p. 2000.

## Anexo I

### PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA EM TECIDO VEGETAL (MINI-PREP)

(Doyle & Doyle, 1990, com modificações)

### SOLUÇÃO TAMPÃO DE EXTRAÇÃO

SOLUÇÕES/REAGENTES/CONC. FINAL		V. FINAL 10 mL
CTAB a 10%	2,0 %	2,0 mL
NaCl a 5 M	1,4 M	2,8 mL
Tris HCl a 1M pH 8,0	0,1 M	1,0 mL
EDTA a 0,5 M	20 mM	400 µL
2-mercaptoetanol	0,4 %	40 µL
PVP (Polivinilpirrolidona)	1,0 %	0,1 g
H <sub>2</sub> O de milli-Q		3,76 mL

- 1- Coletar as amostras de folhas de plantas, de preferência jovens e saudáveis, evitando áreas atacadas por pragas e doenças. De modo geral devem-se lavar as folhas em água corrente, usando sempre que necessário detergente. Enxaguar com água destilada e secar com papel toalha.
  - 2- Macerar 300 mg do tecido vegetal em almofariz na presença de nitrogênio líquido ou diretamente no tubo usando um micro-pistilo.
  - 3- Transferir a amostra para tubo de eppendorf de 2 mL e adicionar 700 µL da solução tampão de extração a 65°C. Homogeneizar suavemente pôr inversão, durante 5 minutos.
  - 4- Incubar os tubos em banho-maria a 65°C por 45 minutos, e homogeneizar a cada 15 minutos.
  - 5- Retirar do banho-maria.
  - 6- Adicionar 700 µL de clorofórmio: álcool Isoamílico (24:1), e homogeneizar suavemente
  - 7- Centrifugar por 10 minutos a 10.000 rpm.
  - 8- Coletar o sobrenadante e transferir para novos tubos.
  - 9- Adicionar 700 µL de clorofórmio: álcool Isoamílico (24:1), e homogeneizar suavemente.
  - 10- Centrifugar por 10 minutos a 10.000 rpm.
- 11-Coletar o sobrenadante e transferir para novos tubos.

- 12- Adicionar 450  $\mu\text{L}$  de álcool Isopropílico (gelado). Tem que ser equivalente a aproximadamente 2/3 do volume coletado. Homogeneizar suavemente, incubar a (-20°C) por 20 minutos.
- 13- Centrifugar por 10 minutos a 12.000 rpm.
- 14- Ressuspender o DNA isolado em 600  $\mu\text{L}$  de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) e adicionar 200  $\mu\text{L}$  de acetato de amônio a 7,5 M.
- 15- Fechar o tubo e misturar suavemente por inversão para homogeneizar a solução. Incubar no gelo por 15 minutos.
- 16- Centrifugar por 15 minutos a 12.000 rpm. Transferir o sobrenadante para um novo tubo.
- 17- Adicionar 800  $\mu\text{L}$  de ETANOL ABSOLUTO ao sobrenadante e misture suavemente por inversão. Incube por 1 hora a -20°C.
- 18- Centrifugar por 10 minutos a 12.000 rpm.
- 19- Lavar o precipitado com etanol 70% gelado (v/v) (500  $\mu\text{L}$ ) e centrifugar novamente nas mesmas condições anteriores por 3 minutos.
- 20- Secar o precipitado e dissolver em 100  $\mu\text{L}$  de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) + 1  $\mu\text{L}$  de RNase (10 mg/ml).
- 21- Colocar na estufa à 37°C durante 1 hora.
- 22- Guardar o DNA no -20°C (armazenamento).