

1 **IDENTIDADE GENÉTICA DE HÍBRIDOS TRIFOLIADOS DE CITROS POR MEIO DE**
2 **MARCADORES MICROSSATÉLITES**

3 **(Dalma Brito¹; Ana Cláudia Oliveira¹; Iane Queiroz¹; Claudia Fortes Ferreira², Carlos Alberto**
4 **ledo²)**

5 **INTRODUÇÃO** setor citrícola brasileiro, é considerado líder mundial e destaca-se por promover o
6 crescimento sócio-econômico e gerar empregos diretos e indiretos na área rural (LOPES, et al. 2011). A
7 maioria das espécies de citros e gêneros próximos, possuem alta capacidade de intercruzamento com
8 produção de híbridos férteis (CARVALHO et al., 2003). A dificuldade em distinguir e identificar as
9 relações de parentesco dos genótipos, torna de grande importância conhecer a origem e identidade dos
10 materiais genéticos, não somente pelo aspecto da correta identificação, mas também para a sua
11 utilização em futuras etapas do melhoramento, bem como para a sua adequada multiplicação e
12 distribuição das sementes para repasse aos produtores (BORÉM & CAIXETA, 2009).

13 O Programa de Melhoramento Genético de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura (PMG
14 C), vem obtendo e disponibilizando materiais genéticos híbridos oriundos de diversos cruzamentos.

15 No entanto, para confirmar a identidade genética e procedência destes híbridos, faz-se
16 necessário, o uso de marcadores moleculares. De acordo com Borém e Caixeta (2009) os mesmos são
17 ferramentas úteis para auxiliar os melhoristas em estudos que visam conhecer a identidade genética de
18 genótipos, pois são capazes de detectar polimorfismos no genoma de espécies vegetais. Em vista disso
19 , o presente trabalho objetivou uso de marcadores SSR para identificação de possíveis parentais dos
20 principais híbridos gerados recentemente pelo PMGC.

21 **MATERIAL E MÉTODOS**

22 Foram utilizados 15 acessos do BAG – Citrus da Embrapa Mandioca e Fruticultura. O DNA foi
23 extraído segundo protocolo de Murray e Tompson (1980), quantificado em gel de 1%.

24 As reações de amplificação foram feitas para volume final de 25µl contendo: tampão 1X [KCl
25 50mM, Tris-HCl 10mM (pH 8,3)], 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP),
26 0,4µM de cada *primer*, 30ng de DNA genômico e uma unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen).

27 Para as reações de PCR, utilizou-se o programa em termociclador com um ciclo de desnaturação
28 a 94°C por 3min; 35 ciclos a 94°C por 30s, 52°C e 72°C por 30s e 45s respectivamente; e uma extensão
29 final de 5 minutos a 72°C.

¹Graduandas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, dalmabsantos@gmail.com; aina-cob2@hotmail.com; q.iane@hotmail.com;

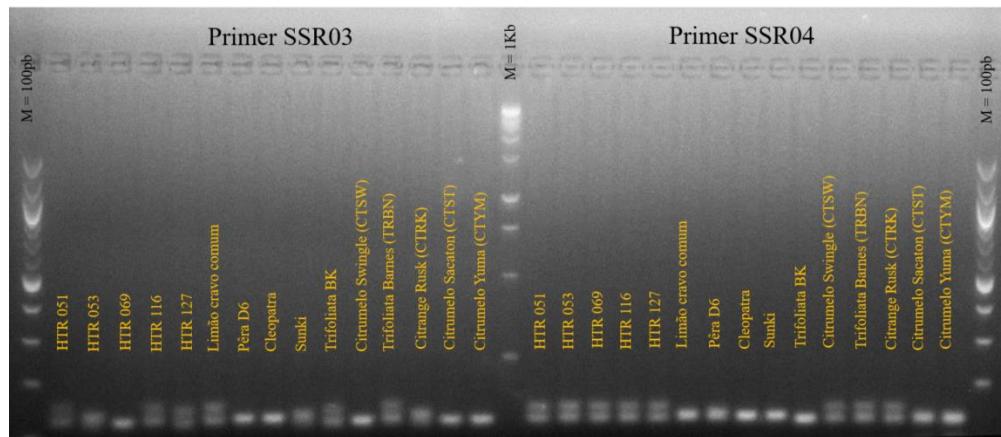
²Pesquisador , EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, ledo@cnpmf.embrapa.br, claudia.ferreira@embrapa.br.

30 Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose 3% e corados com brometo de
31 etídeo e visualizado sob luz UV. O tamanho dos fragmentos foi determinado com marcador de peso
32 molecular de 100pb (Invitrogen) e 1Kb (Invitrogen).

33 A matriz de disimilaridade genética entre os genótipos foi calculadas com base no índice de
34 Nei lico-dominantes, utilizando-se o programa Power Marker (LIU & MUSE, 2005). A matriz de
35 dissimilaridade genética foi utilizada para a construção do dendograma, utilizando-se o método de
36 agrupamento UPGMA, por meio do software MEGA – 4 (TAMURA et al. 2007).

38 RESULTADOS E DISCUSSÃO

39 Dos 30 primers SSR testados nos 15 genótipos deste estudo, nove apresentaram bom padrão de
40 amplificação (Figura 2), a citar: SSR 3, SSR 4, SSR 5, SSR 10, SSR 12, SSR 16, SSR 17, SSR 18 e SSR
41 25. Esses primers foram eficientes na identificação dos parentais dos híbridos (HTRs) trifoliados.
42 Cristofani et al. (2001) ao identificar híbridos de citros oriundos de cruzamentos controlados, utilizou
43 três pares de primers SSR e quatro RAPD, e observou a eficiência dos primers SSR na identificação dos
44 híbridos, em relação aos primers RAPD, evidenciando que a metodologia empregada é adequada para
45 este tipo de análise.



46
47 **Figura 2.** Gel de agarose 3%, ilustrando o padrão de amplificação dos primers SSR 3 e 4. 1-15: acessos/híbridos avaliados.
48

49 De acordo com a matriz de dissimilaridade genética entre os acessos, foi possível identificar os
50 genótipos híbridos que apresentaram menor distância genética em relação aos seus possíveis parentais
51 (Figura1).

Figura 1. Matriz de dissimilaridade genética entre os genótipos híbridos trifoliados (HTRs) e os seus prováveis parentais, gerada pelo programa Power Marker. Os genótipos mais relacionados apresentam a mesma coloração, neste caso, cada híbrido foi comparado isoladamente com os genótipos parentais.

	Cleopatra	CTRK	CTST	CTSW	CTYM	L. C. C.	Pera D6	Sunki	TRBK	TRBN
Cleopatra	0,00	0,61	0,63	0,61	0,50	0,44	0,61	0,33	0,67	0,72
CTRK	0,61	0,00	0,44	0,33	0,33	0,61	0,78	0,72	0,72	0,50
CTST	0,63	0,44	0,00	0,25	0,25	0,75	0,69	0,81	0,56	0,44
CTSW	0,61	0,33	0,25	0,00	0,22	0,67	0,56	0,83	0,44	0,56
CTYM	0,50	0,33	0,25	0,22	0,00	0,56	0,67	0,72	0,61	0,56
HTR051	0,72	0,61	0,50	0,44	0,67	0,56	0,56	0,72	0,50	0,22
HTR053	0,78	0,50	0,56	0,39	0,61	0,67	0,44	0,61	0,44	0,33
HTR069	0,83	0,56	0,69	0,44	0,67	0,72	0,33	0,72	0,50	0,44
HTR116	0,61	0,50	0,50	0,44	0,67	0,44	0,56	0,61	0,50	0,22
HTR127	0,72	0,50	0,38	0,22	0,44	0,61	0,50	0,67	0,28	0,39
L.C.C.	0,44	0,61	0,75	0,67	0,56	0,00	0,61	0,50	0,61	0,56
Pera D6	0,61	0,78	0,69	0,56	0,67	0,61	0,00	0,61	0,33	0,56
Sunki	0,33	0,72	0,81	0,83	0,72	0,50	0,61	0,00	0,44	0,72
TRBK	0,67	0,72	0,56	0,44	0,61	0,61	0,33	0,44	0,00	0,61
TRBN	0,72	0,50	0,44	0,56	0,56	0,56	0,56	0,72	0,61	0,00

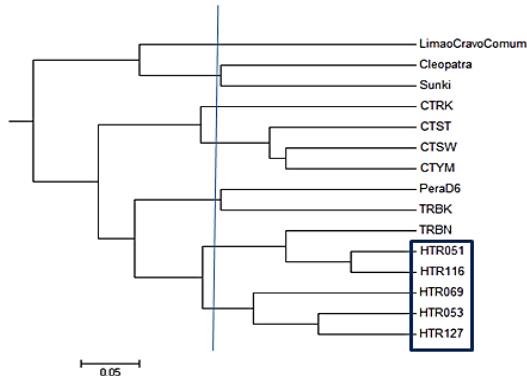
Os híbridos trifoliados HTR 051, HTR 116 apresentam distância genética de 0,44 e o HTR 053 de 0,39 em relação ao genótipo Citrumelo Swingle (CTSW) e de 0,22 (HTR 051 e 116) e 0,33 (HTR 053) em relação ao genótipo Trifoliata Barnes (TRBN), sendo estes genótipos seus prováveis parentais.

Nesta análise inicial, os híbridos trifoliados HTR 069 e HTR 127 também foram considerados geneticamente relacionados com o Citrumelo Swingle, apresentando distâncias genéticas de 0,44 e 0,22 respectivamente. Porém, o segundo parental difere entre os dois híbridos. O HTR 069 é geneticamente próximo ao genótipo da laranja ‘Pêra D6’ e o HTR 127 mais relacionado ao genótipo Trifoliata Benecke (TRBK). A tabela 2, mostra os híbridos e os seus prováveis parentais, com base na matriz de dissimilaridade genética utilizando 9 marcadores SSR.

Tabela 2. Híbridos trifoliados e seus possíveis parentais com base nos marcadores SSR.

Híbrido	Parental 1	Parental 2
HTR 051	CTSW	TRBN
HTR 053	CTSW	TRBN
HTR 069	CTSW	PÊRA D6
HTR 116	CTSW	TRBN
HTR 127	CTSW	TRBK

O dendograma gerado (Figura 3) separou os acessos em 4 grupos distintos, agrupando os HTRs em um único grupo. Entretanto, em se tratando do estudo de identificação de possíveis parentais, a matriz de distância genética é bastante útil nessa análise, pois nos permite comparar cada híbrido isoladamente com os seus prováveis parentais tendo como base a distância genética e seus padrões eletroforéticos.



76
77 **Figura 3.** Dendograma obtido para 15 indivíduos de citros baseado em 9 marcadores SSR, usando o método de agrupamento
78 genético UPGMA e o programa POWERMARKER (Liu e Muse, 2005).

80 CONCLUSÃO

81 Os primers SSR (*Simple Sequence Repeats*) utilizados foram efetivos em detectar variações no
82 genoma de espécies cítricas, permitindo identificar relações genéticas entre indivíduos interespecíficos.
83

84 REFERÊNCIAS

- 85 1. BORÉM, A. & CAIXETA, E. T.; **Marcadores Moleculares**. 2^a. Ed. UFV. 532p. Viçosa, 2009.
- 86 2. CARVALHO, R. de; **Variabilidade Cromossômica e Relação entre Espécies e Cultivres de**
87 **Citrus L.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco. Recife
88 – PE, 2003.
- 89 3. CRISTOFANI, M.; NOVELLI, V. M.; *et al.* Identificação de híbridos de cruzamentos
90 interespécíficos em citros utilizando marcadores RAPD e SSR. **Citrus Research & Technology**.
91 Cordeirópolis – SP, v.22, n.1, p 231-241, 2001.
- 92 4. LIU, K.; MUSE, S.V. POWERMARKER: Integrated analysis environment for genetic marker data
93 – **Bioinformatics**, v.9, p. 2128-2129, 2005.
- 94 5. LOPES, J. M. S.; DÉO, T. F. G. et al. Importância econômica do Citros no Brasil. **Revista**
95 **Científica de Agronomia** (Periódico Semestral). Garça-SP, Ano X, n. 20, Dezembro, 2011.
- 96 6. MURRAY, M.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high-molecular weight plant DNA.
97 **Nucleic acid research**, v. 8, p. 4321-4325, 1980.
- 98 7. TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics
99 Analysis (MEGA) Software Version 4. **Molecular Biology and Evolution** 24:1596-1599, 2007.