

Fingerprint molecular de porta-enxertos de citros via marcadores IRAP

Luiz Carlos de Souza Junior¹, Andresa Priscila de Souza Ramos², Walter dos Santos Soares Filho³ e Claudia Fortes Ferreira⁴

¹Estudante de bacharelado em Biologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, estagiário da Embrapa Mandioca e Fruticultura, bolsista da FAPESB, Cruz das Almas, BA; ²Engenheira Agrônoma, Doutora em Agronomia (Ciência do Solo), analista da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA; ³Engenheiro Agrônomo, Doutor em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA; ⁴Engenheira Agrônoma, Doutora em Produção Vegetal, pesquisadora da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.

Introdução

A citricultura é uma das cadeias que mais movimenta o agronegócio de frutas no Brasil. No entanto, está sujeita a vários fatores limitantes, como o déficit hídrico, alto custo de manutenção, além da estreita base genética dos porta-enxertos (PEs) disponíveis. Desse modo, torna-se importante a busca por ampliar a diversidade de variedades de porta-enxertos dos pomares brasileiros, que tem se sustentado em sua maioria, no uso do PE limoeiro cravo. A fim de resolver essa problemática, a Embrapa Mandioca e Fruticultura vem desenvolvendo híbridos de porta-enxerto com diversas características de importância econômica, como alta produtividade e consistentes com as exigências do agronegócio citrícola. Através do surgimento dessas novas variedades, torna-se necessário a obtenção da identidade molecular desses genótipos. Portanto, o Programa de Melhoramento Genético de Citros (PMGC), vem implementando, por meio do uso de fingerprints moleculares, a garantia da identidade genética desses materiais. Os *fingerprints* moleculares oferecem perfis eletroforéticos formados a partir de bandas polimórficas oriundas de marcadores de DNA, que além de apresentar o perfil genético dos PEs, também podem ser utilizados para assegurar os direitos dos melhoristas em casos de contestação de idoneidade dos PEs sendo lançados.

Objetivo

O objetivo do presente trabalho foi estabelecer as principais combinações de primers IRAP (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*) que melhor discriminem os PEs (porta-enxertos) de citros de importância desenvolvidos pelo (Programa de Melhoramento Genético de Citros) da Embrapa em nível molecular.

Material e Métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular (Núcleo de Biologia Avançada-NBA) da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Foram coletadas folhas jovens de cada um dos 12 porta-enxertos (PEs) selecionados para este trabalho e o DNA dos mesmos extraído de acordo com a metodologia de CTAB descrito por Doyle e Doyle (1987), com modificações. Foram testadas 11 combinações de marcadores IRAP. As amplificações foram conduzidas em termociclador, com o seguinte programa de amplificação: uma etapa inicial de 94 °C por 3 min., seguida de 35 ciclos de 94 °C por 30s, temperatura de anelamento x° (variando com a combinação dos primers) por 60s, 72 °C por 45s, com extensão final de 72 °C por 5 min. Após a amplificação, foi realizada a corrida eletroforética utilizando gel de agarose 2%. Em seguida, o mesmo foi fotodocumentado e utilizado para a geração de uma matriz binária com a presença (1) e ausência de bandas (0). As análises dos dados foram realizadas utilizando os softwares R (pacotes *vegan* e *poppr*) (R Development Core Team, 2016) e o software Genes (CRUZ, 2006).

Resultados

124 bandas, ou fragmentos, foram gerados a partir da combinação de 11 primers IRAP. Com base no software GENES, 14 marcas em 124, foram selecionadas para identificar os 12 PEs, com as principais marcas oriundas das combinações, Sukkula + Nikita (M21, M22), 3'LTR + LTR6149 (M37, M48), CO795 + CO945 (M56, M57, M61), CO795 + Stowaway (M66, M67, M70, M72), 9900 + CO699 (M78, M82) e 5'LTR + 3'LTR (M90). Já o software "R", pacotes *vegan* e *poppr*, identificou que as primeiras 13-14 bandas da combinação IRAP 5'LTR + Nikita (M1 a M13 ou M14), já podem ser consideradas suficientes para se obter um perfil eletroforético polimórfico entre os 12 PEs. Esses resultados serão importantes para, além de assegurar os direitos dos viveiristas/melhoristas, também agregar informações desses PEs junto ao MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento).

Conclusão

Conclui-se que, as combinações de primers IRAPs utilizadas no presente estudo foram capazes de discriminar os porta-enxertos estudados e seus respectivos fingerprints moleculares.

Significado e impacto do trabalho

Agregar informações moleculares via marcadores de DNA aos principais PEs e assegurar os direitos de viveiristas/melhoristas em casos de contestação de idoneidade dos materiais gerados pela Embrapa CNPMF junto ao MAPA e aos produtores, contribuindo para os avanços biotecnológicos na cultura.