

## DISSIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DO GÊNERO *Citrus*

Janáira Lopes dos Santos Carneiro<sup>1</sup>, Yslai Silva Peixoto<sup>1</sup>, Cláudia Fortes Ferreira<sup>2</sup>, Orlando Sampaio Passos<sup>2</sup>, Walter dos Santos Soares Filho<sup>2</sup>, Abelmon da Silva Gesteira<sup>2</sup>

<sup>1</sup>: Graduanda em Ciências Biológicas, UFRB. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, C.P. 007, 44380-000. Cruz das Almas, BA, Brasil. E-mail: [janairacarneiro@hotmail.com](mailto:janairacarneiro@hotmail.com), [yslaipeixoto@hotmail.com](mailto:yslaipeixoto@hotmail.com)

<sup>2</sup>: Pesquisador Dr. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, C.P. 007, 44380-000, Cruz das Almas, BA, Brasil. E-mail: [claudiaf@cnpmf.embrapa.br](mailto:claudiaf@cnpmf.embrapa.br), [orlando@cnpmf.embrapa.br](mailto:orlando@cnpmf.embrapa.br), [wsoares@cnpmf.embrapa.br](mailto:wsoares@cnpmf.embrapa.br), [abelmon@cnpmf.embrapa.br](mailto:abelmon@cnpmf.embrapa.br)

### Introdução

A conservação e utilização dos recursos genéticos de plantas são fatores essenciais para a manutenção e desenvolvimento da produção agrícola. Para uma melhor utilização do germoplasma conservado é necessário que se caracterize a diversidade nele existente, quer morfológicamente, quer em nível do genoma, utilizando técnicas moleculares. O Banco Ativo de Germoplasma de Citros (BAG Citros) pertencente à Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, dotado de grande variabilidade genética, possui cerca de 800 acessos, compreendendo diversas espécies e variedades de *Citrus*, além de gêneros afins, dentro dos quais estão *Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus*, *Eremocitrus* e *Severina* (Soares Filho *et al.*, 2003).

A caracterização deste BAG Citros vem sendo efetuada mediante o emprego de descritores mínimos definidos pela Embrapa-CNPMP 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 marcadores molecular terá um papel importante na caracterização da diversidade genética. Essa contribuição será possível com base na utilização de marcadores moleculares tipo ISSR, devido ao elevado grau de polimorfismo, reprodutibilidade e baixo custo. O entendimento das relações genéticas entre os acessos 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).

Neste contexto, esse trabalho teve como principal objetivo utilizar marcadores ISSR para auxiliar na caracterização de acessos do BAG Citros, a fim de determinar o nível e organização da diversidade genética na coleção.

## Material e Métodos

Foram utilizados 83 acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (com as espécies *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, *C. reticulata* Blanco, *C. Clementina*, *C. reshni* e *C. sunki*). Foram coletadas folhas jovens e sadias, embaladas em papel alumínio e armazenadas em gelo para transporte. As folhas foram lavadas em água corrente e enxaguadas em água destilada para a extração de DNA.

O DNA foi extraído utilizando o protocolo padrão para extração de DNA em tecido vegetal (Doyle & Doyle, 1990). Para quantificar o DNA, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%; e, em seguida diluído com TE para uma concentração final de 5 ng/ $\mu\text{L}^{-1}$ . Os *primers* utilizados foram propostos por Biswas, et al.(2010) e demais *primers* são de uso da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical.

Para a amplificação do DNA genômico de citros, inicialmente foi realizado teste com diferentes temperaturas de anelamento para os 21 primers. Esta temperatura variou de 48°C a 52°C. A temperatura ideal para a amplificação dos *primers* foi de 48° C. A amplificação foi conduzida de acordo com o protocolo proposto por Williams et al. (1990) e as amostras ajustadas para um volume final de 15  $\mu\text{L}$ , contendo: 4,9  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O milli-Q, 3  $\mu\text{L}$  de DNA (5ng/  $\mu\text{L}$ ), 1,5  $\mu\text{L}$  dos iniciadores ISSR (0,2  $\mu\text{M}$ ), 1,5  $\mu\text{L}$  de tampão Tris/KCl (10X), 1,5  $\mu\text{L}$  de MgCl<sub>2</sub> (2,5mM), 0,9 de dNTPs (1,5 mM) e 0,2 U da enzima *Taq Polimerase* (5U/  $\mu\text{L}$ ). 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 1minuto (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.

O produto da amplificação foi submetido à eletroforese horizontal em gel de agarose 2%, com 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, exposto à luz ultra-violeta e fotografados com um sistema Kodak® de fotodocumentação.

A matriz de distância genética e o coeficiente de correlação cofenética considerando os dados dos marcadores ISSR foram obtidos utilizando-se o coeficiente de dissimilaridade de Jaccard e o programa GENES (Cruz, 2003); sendo que os dados foram computados como ausência (0) e presença (1). O índice de Jaccard é formulado da seguinte maneira:

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

A = mesma banda para ambos os indivíduos;

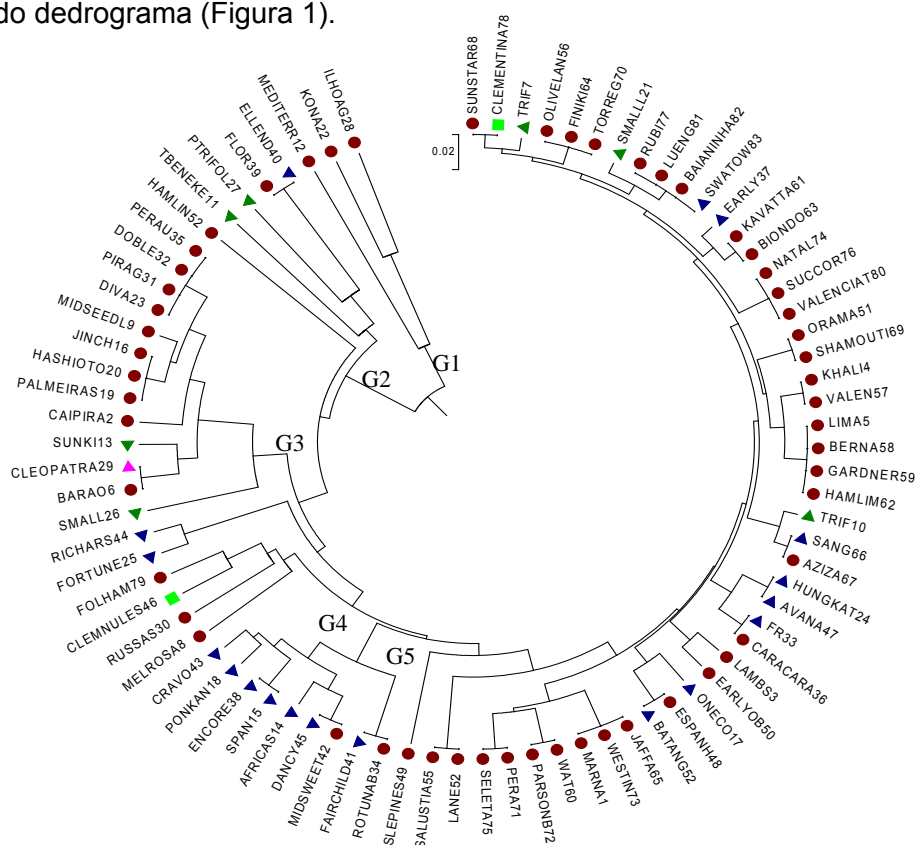
B = presença da banda no indivíduo 1 e ausência no indivíduo 2;

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) e o programa MEGA-4 (Tamura *et al.* 2007).

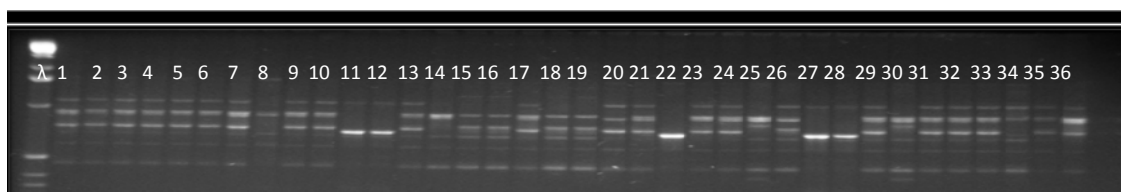
### Resultados e Discussão

Foram testados 21 iniciadores dos quais até o momento 9 foram utilizados para análise da diversidade genética de 83 acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Citros. Os *primers* utilizados amplificaram de 4 a 7 bandas, totalizando 47 bandas. Destas 8 bandas foram monomórficas e 39 bandas foram polimórficas, as quais utilizou-se para a construção do dendrograma (Figura 1).



**Figura 1.** Dendrograma dos 83 acessos do banco de germoplasma de citros do CNPMF utilizando-se 39 bandas polimórficas provenientes de marcadores ISSR. A matriz de distância foi gerada pelo programa GENES e o dendrograma construído pelo método de agrupamento do UPGMA utilizando-se o programa MEGA-4.

O padrão de bandejamento gerado pelo *primer* 844 está apresentado na figura 2



**Figura 2.** Perfil eletroforetico dos acessos do BAG-Citros. Amplificação do *primer* 844 em Agarose 2%.  $\lambda$  - Marcador de peso molecular 1 Kb, 1 - 36 acessos do BAG-Citros. Cruz das Almas, 2010.

O coeficiente de correlação cofenética, ou seja, a correlação entre a matriz de distância e a matriz de agrupamento, foi de 0.89, demonstrando boa correlação entre os dados moleculares e o agrupamento.

A princípio, 5 grupos maiores foram formados (G1, G2, G3, G4, G5) e a distância média entre os acessos foi de 0.10 (Figura 1). Essa distância demonstra uma base genética muito estreita entre os acessos avaliados. A maior distância foi de 0.51 entre os acessos Ilhoa Goiânia e Oneco, oriundos das espécies *C. sinensis* e *C. reticulata*, respectivamente.

Embora o número de bandas polimórficas avaliadas nesse estudo foi apenas de 39, as mesmas foram capazes de separar, como pode ser visto no G4, alguns dos acessos de *C. reticulata* (Figura 1). Fica claro que o número de bandas utilizados nessa análise preliminar não foi o suficiente para separar os acessos de acordo com suas respectivas espécies, sendo um número maior de bandas necessário para uma análise mais conclusiva.

### **Conclusões**

Por meio dos marcadores ISSR, é possível avaliar a dissimilaridade genética entre os acessos de citros; um número maior de bandas é necessário para a obtenção de resultados mais consistentes.

### **Agradecimentos**

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

### **Referências Bibliográficas**

BISWAS, M. K; XU. Q; DENG. X ; Utility of RAPD, ISSR, IRAP and REMAP of the genetic analysis of citrus spp. *Scientia Horticulturae*. Vol. 124, Issue 2, Pages 254-261,15 March 2010.

CRUZ, C.D.; Programa Genes, Versão Windows (2003.0.0). UFV, Viçosa, 2003.

DOYLE, J.J; DOYLE, J.L.; Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12, n. 1, p. 13-15, 1990.

HALLAUER, A.R.; MIRANDA, J. B.; Quantitative genetics in maize breeding. 2.ed., Ames: Iowa State University Press, 1988.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R.; Numerical Taxonomy. San Francisco: Freeman, 1973. p. 573.

SOARES FILHO, W.S.; CUNHA SOBRINHO, A.P.; PASSOS, O.S.; MOITINHO, E.D.B. Maravilha: uma nova seleção de tangerina 'Sunki'. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 268-271, 2003.

SOARES FILHO, W.S.; MORAIS, L.S.; CUNHA SOBRINHO, A.P.; DIAMANTINO, M.S.A.S.; PASSOS, O.S.; Santa Cruz: uma nova seleção de limão Cravo. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 21, n. 2, p. 222-225, 1999.

TAMURA K.; DUDLEY J.; NEI M.; KUMAR S.; MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, v. 24, n.8, p.1596-1599, maio 2007.