

Caracterização molecular de acessos do banco ativo de germoplasma de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura

Janáira Lopes dos Santos Carneiro¹; Cláudia Fortes Ferreira²; Walter Soares Filho²; Orlando Sampaio Passos², Abelmon da Silva Gesteira²

¹Graduanda em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia; ²Pesquisador Embrapa Mandioca e Fruticultura

INTRODUÇÃO

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. Sendo assim, o Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Citros pertencente à Embrapa Mandioca e Fruticultura, procura dar ênfase a espécies e variedades adaptáveis à ambientes nela prevaletentes, principalmente relacionados ao Norte e Nordeste brasileiros (Soares Filho et al., 2003).

Neste sentido, uso de técnicas de genética molecular tem um papel importante na conservação e caracterização da diversidade genética do BAG Citros. Neste sentido, a utilização de marcadores moleculares tipo SSR (*Simple Sequence Repeats*) representa 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. (Jauhar, 1996). Este trabalho teve como principal objetivo caracterizar, via marcadores microssatélites, 90 acessos do BAG Citros, a fim de determinar o nível e organização da diversidade genética na coleção, bem como também elucidar a relações filogenéticas entre os acessos.

METODOLOGIA

Estudo realizado com as espécies *Citrus sinensis*, *C. reticulata* e *Poncirus trifoliata* do BAG Citros em que foram utilizados trinta acessos de cada espécie, totalizando 90 acessos. O DNA foi extraído de folhas jovens utilizando o protocolo Doyle & Doyle (1990). As sequências desses *primers* foram obtidos da literatura (Barkley et al., 2006, Kijas et al., 1997, Luro et al., 2008) e os demais do Instituto

Agrônomo de Campinas (IAC). Os *primers* mais polimórficos foram utilizados para análise de diversidade genética. Cada reação de amplificação constou de um volume final de 15 µL, contendo 30 ng de DNA genômico, 10 mM Tris-HCl; 1,5 mM MgCl₂; 100 mM de cada dNTPs; 0,2 µM de cada *primer* e 1U de *Taq polymerase*. Os fragmentos amplificados foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida 6 %, em seguida foram corados com carbonato de prata, conforme protocolo descrito por Creste *et al.* (2001). Foi realizado o estudo das frequências alélicas dos *primers* amplificados.

RESULTADOS

De um total de 15 pares de *primers* utilizados, no estudo de caracterização molecular, 5 amplificaram locos polimórficos. O número de alelos detectados entre os marcadores foi 23 alelos com média de 5,75 alelos por loco. Barkley *et al.*, (2006) encontram uma média de 13,6 alelos por locos numa população de 370 acessos e 24 pares de *primers* polimórficos. Os cinco pares de *primers* mais polimórficos, com maior número de alelos, utilizados no estudo de Barkley *et al.*, 2006, também foram utilizados neste estudo. Entretanto, apenas o *primer* TAA15 amplificou utilizando as mesmas condições empregadas no trabalho de Barkley e colaboradores. As maiores frequências alélicas foram de 0,67 para o alelo 1 no loco SSR817 e de 0,6071 para o alelo 2 do loco SSR338.

O valor de PIC calculado para estimar a informatividade de cada *primer* variou de 0,37 a 0,66 com média de 0,49. Uma possível razão para o baixo polimorfismo, em comparação ao estudo de Barkley *et al.* (2006), encontrado nos 90 acessos é o número de *primers* utilizados como também o número de espécies. A heterozigose observada foi calculada para cada marcador individual como uma medida da diversidade marcador. A heterozigose observada para cada loco variou de 0,47 a 0,70 com média 0,57.

CONCLUSÃO

Os resultados mostram o potencial de marcadores SSR em estudos de diversidade genética entre espécie e entre indivíduos da mesma espécie. A utilização de marcadores microssatélites permite a comparação das distâncias genéticas entre as espécies entre indivíduos da mesma espécie, podendo ser uma

ferramenta auxiliar nos programas de melhoramento, como também na classificação do BAG-Citros.

REFERÊNCIAS

BARKLEY, N.A.; ROOSE, M.L.; KRUEGER, R.R.; FEDERICI, C.T. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). **Theoretical and Applied Genetics**, v.112, p.1519-1531, 2006.

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

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. 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, 1996.

KIJAS J.M., THOMAS M.R., FOWLER J.C., ROOSE M.L. Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of *Citrus*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.94, p.701-706, 1997.

LURO, F.; LAIGRET, F.; BOVE. J. M.; OLLITRAULT, P. DNA amplified fingerprinting, a useful tool for determination of genetic origin and diversity analysis in Citrus. **Hort Sci**, v.30, p.1063-1067,1995.

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**, v.25, n.2, p.268-271, 2003.

Palavras-chave: *citrus*; variabilidade genética, marcadores microssatélites.