

XVI CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFPA
22 a 26 de outubro de 2007

AVALIAÇÃO DA SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE VARIEDADES DE
LARANJAS [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] E MUTANTES DA 'FOLHA MURCHA'
POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES RAPD

HUMBERTO HENRIQUE DE CARVALHO¹; LUCIANO VILELA PAIVA²;
CLAUDIA TEIXEIRA GUIMARÃES³; EMANUELLE FERREIRA MELO⁴;
ELIZÂNGELA ALMEIDA ROCHA⁵; MAURÍCIO DE SOUZA⁶.

RESUMO

A variedade 'Folha Murcha' se destaca em pomares de laranjas-doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], onde alguns indivíduos apresentam folhas normais (não murchas). Com o objetivo de analisar a possível origem genética desse mutante, foi realizado um estudo de diversidade genética envolvendo seus parentais e outras cultivares de laranja utilizando marcadores RAPD. A partir de 17 primers foram obtidos 28 marcadores polimórficos, número suficiente para a diferenciação dos genótipos analisados, uma vez que a partir de 17 fragmentos foi determinada correlação de 0,9771, pela análise de todos os marcadores. O agrupamento pelo método UPGMA representou adequadamente a matriz de distância, com uma correlação cofenética (r_c) de 0,96. Apesar do baixo nível de polimorfismo detectado pela técnica em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (1,6 polimorfismo/primer), 9 variedades de laranja foram diferenciadas, não havendo diferenças genéticas entre a variedade 'folha murcha' e os mutantes de folha normal. Adicionalmente, a variedade 'Folha Murcha' e seus mutantes apresentaram maiores índices de similaridade genética com as cultivares 'Valência Tardia' e 'Natal', sendo bons candidatos para maiores investigações sobre a origem da cultivar 'Folha Murcha'.

Palavras-chave: 'Folha Murcha', Marcadores RAPD, Similaridade Genética.

ABSTRACT

The variety 'Folha Murcha' is detected in sweet orange orchards [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], where some individuals present normal leaves (not witherings). With the objective to analyze the possible genetic origin of this mutant, it was carried through a study of genetic diversity involving its parental and others to cultivate of orange using RAPD markers. From 17 primers 28 polymorphic markers had been gotten, enough number for the differentiation of the analyzed genotypes, a time that from 17 fragments was determined a correlation of 0,9771, for the analysis of all the markers. The grouping will be method UPGMA represented adequately the distance matrix, with a cofenetic correlation (r_c) of 0,96. Although the low level of polymorphism detected for the technique in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (1,6 to polymorphism/primer), 9 varieties of orange had been differentiated, having genetic differences between the variety 'Folha Murcha' and the mutants normal leaf. Additionally, the variety 'Folha Murcha' and its mutants had presented greater indices of genetic similarity with them

¹ Mestrando em Agronomia/Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras - MG, humberto.henriquec@yahoo.com.br

² Doutor, Professor Associado do Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras - MG, luciano@ufla.br

³ Doutor, Pesquisador, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, claudia@cnpmc.embrapa.br

⁴ Mestrando em Agronomia/Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras - MG, emanuellemelo@yahoo.com.br

⁵ Mestranda em Agronomia/Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras - MG, almeida.elizangela@gmail.com

⁶ Doutor, Professor Aposentado, Universidade Federal de Lavras - MG, mauricio@ufla.br

XVI CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFPA
22 a 26 de outubro de 2007

to cultivate 'Valência Tardia' and 'Natal', being good candidates for bigger inquiries on the origin of cultivating 'Folha Murcha'.

Key words: 'Folha Murcha', RAPD Markers, Genetic Similarity.

INTRODUÇÃO

Dentre as cultivares de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, a laranjeira 'Folha Murcha' é uma variedade com frutos de ótima qualidade, cuja maturação se dá nos meses de janeiro a março, período considerado de entressafra. Essa laranjeira tem sua origem de difícil estabelecimento, caracterizada por apresentar folhas enroladas e de maturação tipicamente tardia. Alguns autores a consideram uma variação espontânea da Pêra, Valência ou Seleta (Junior et al., 2005). Em um pomar particular na cidade de Lavras MG, foram observados que alguns indivíduos apresentando 'Folha Murcha', obtidos a partir de um mesmo indivíduo por meio da limpeza clonal por microenxertia *in vitro* (Paiva, 1993) apresentavam galhos maiores com folhas normais (não murchas).

Segundo Donadio et al. (1995) a variedade 'Folha Murcha' é uma espécie tipicamente brasileira, pois não há citações de tipos semelhantes na literatura mundial. Assim torna-se de fundamental importância a compreensão da origem de tal variedade, pois sendo de maturação tardia (Paiva, 1993), torna-se uma ótima opção ao citricultor. Assim, o estudo da diversidade genética por meio de marcadores moleculares envolvendo outras cultivares de laranja pode contribuir para aumentar o conhecimento sobre a variedade em questão. O objetivo deste trabalho foi o estudo da diversidade genética entre variedades de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck relacionados aos mutantes da 'Folha Murcha', além de ramos mutantes (folha normal) e de folha murcha de dois indivíduos da cultivar 'Folha Murcha' utilizando marcadores RAPD.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados dois indivíduos da variedade 'Folha Murcha' que apresentavam galhos mutantes (folhas normais), incluindo os galhos com folhas murchas e com folhas normais e um indivíduo sem galhos mutantes. Foram avaliadas as cultivares Valência Tardia, Pêra-rio, Bahia, Bahia Microenxertada, Natal e três variedades de Seleta. O DNA foi extraído (Wadt, 1997) e as reações de RAPD foram realizadas utilizando um programa de 35 ciclos, com desnaturação inicial a 95°C por 60 segundos, seguido por desnaturação a 94°C por 10 segundos, anelamento a 36°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v).

Foi montada uma matriz representando a presença (1) e ausência (0) de bandas fortes, a partir da qual foi gerada uma matriz de similaridade genética calculada pelo índice de

XVI CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA
22 a 26 de outubro de 2007

Jaccard (Anderberg, 1973). A representação gráfica das similaridades genéticas foi realizada pelo método de agrupamento UPGMA-Unweighted Pair-Group Method, Arithmetic Average (Sneath & Sokal, 1973) utilizando o software NTSYS-pc 2.1 (Rohlf, 2000), que analisou-se também a consistência do agrupamento por meio da correlação cofenética, denominado teste Z de Mantel (Manly, 1997). O número ótimo de marcadores foi calculado por meio de simulações com 10.000 reamostragens utilizando números crescentes de marcadores por meio do programa GENES (Cruz, 2001). O número ideal de bandas polimórficas foi considerado quando o valor de estresse assumiu valor menor que 0,05 Kruskal (1964).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 98 *primers* RAPD inicialmente testados, 17 amplificaram pelo menos um produto com padrão adequado e polimórfico, sendo, utilizados nas análises subseqüentes. Foram obtidos 28 (16%) fragmentos polimórficos e 122 (84%) monomórficos entre os indivíduos avaliados, esse valor é baixo em relação às Análises de Genótipos de *Citrus* spp. com 12 *primers*, feitas por Bastianel et al. (2001), encontrando 64 bandas polimórficas. O número ótimo de marcadores polimórficos pela reamostragem dos dados foi 17 fragmentos (Figura 1). Com esse número, a soma dos quadrados dos desvios em relação à análise feita com todos os marcadores e o valor de estresse foram menores que 0,05 e a correlação entre os dados foi de 0,9771, sugerindo alta consistência entre as matrizes segundo Kruskal (1964).

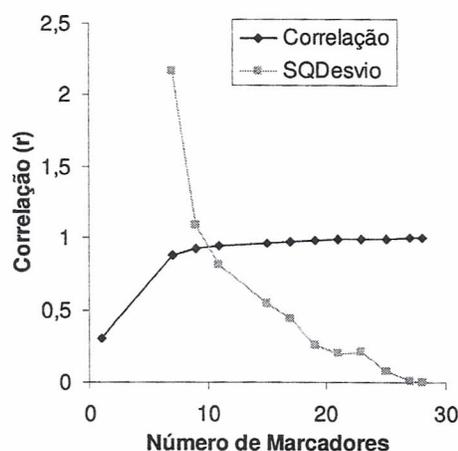


Figura 1: Valores de correlação, estresse e SQD utilizando a estratégia de reamostragem para números crescentes de marcadores RAPD polimórficos, comparados com a matriz gerada pelo número total de marcadores, entre as cultivares de *Citrus sinensis* (L) Osbeck.

XVI CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFPA
22 a 26 de outubro de 2007

No dendrograma obtido por meio da análise de agrupamento UPGMA (Figura 2), não houve diferenciação entre os indivíduos da cultivar 'Folha Murcha' nem entre os galhos apresentando folha murcha e folha mutante, sugerindo que esse fenótipo pode ser alguma alteração fisiológica, ou mesmo genética, mas que não foi detectada pela estratégia empregada. Os indivíduos 'Seleta' também se encontram em um mesmo ramo do dendrograma com similaridade em torno de 0,50, confirmando que mesmo dentro de uma cultivar existe uma certa variabilidade genética. Dentre as cultivares de laranja avaliadas no presente trabalho, a 'Valência Tardia' e 'Natal' mais se aproximaram dos indivíduos que representaram a cultivar 'Folha Murcha'. Essas cultivares podem ser indicadas para trabalhos futuros com objetivo de identificar a origem da cultivar 'Folha Murcha'. O dendrograma representou com elevada confiabilidade a matriz de similaridade genética, uma vez que a correlação cofenética (r_c) foi de 0,96.

Os resultados apresentados no presente trabalho são consistentes, em decorrência de não haver interferência do ambiente, o que é comum em dados fenotípicos, e dos marcadores RAPD geralmente proporcionarem uma ampla cobertura do genoma (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

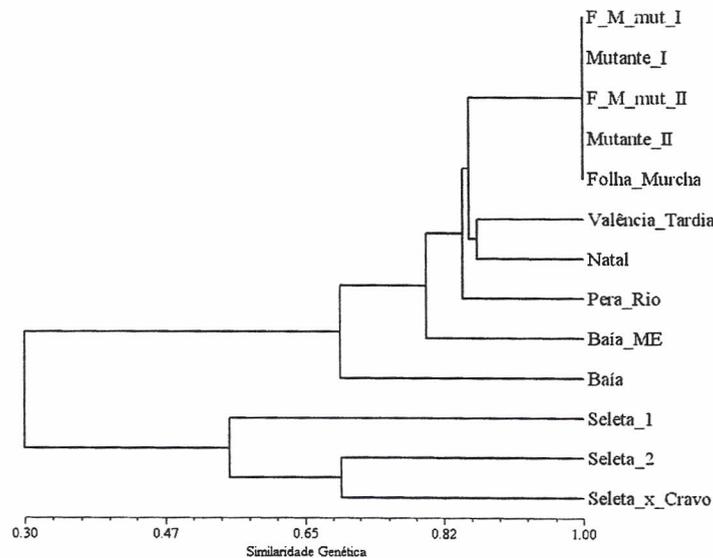


Figura 2: Análise de agrupamento dos 13 genótipos de *Citrus sinensis* (L) Osbeck calculada pelo método UPGMA, com base no coeficiente de similaridade de Jaccard.

XVI CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA
22 a 26 de outubro de 2007

CONCLUSÕES

O polimorfismo gerado pela técnica de RAPD possibilitou a diferenciação entre as variedades de *Citrus sinensis* (L) Osbeck estudadas, utilizando 28 marcadores polimórficos, mesmo sendo verificado um baixo índice de polimorfismo. Considera-se de acordo com a figura 2 que porcentagens maiores de similaridades são verificadas entre os indivíduos 'Folha Murcha', 'Valência Tardia' e 'Natal', sendo bons candidatos para maiores investigações sobre a origem da cultivar 'Folha Murcha'.

Informações sobre *Citrus sinensis* (L) Osbeck são de extrema importância para a citricultura, principalmente a variedade 'Folha Murcha' pois há poucos relatos sobre a mesma. Os estudos realizados neste trabalho visaram apenas à prévia distinção de laranjeiras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERBERG, M. R. *Cluster analysis for applications*. New York: Academic press, 1973.

BASTIANEL, M; DORNELLES, A. L. C.; MACHADO, M. A.; WICKERT E.; MARASCHIN, S.de F.; FILHO, H. D. C.; SCHAFER G. Caracterização de genótipos de *Citrus* spp através de marcadores RAPD. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n.5,p.763-768, 2001.

CRUZ, C.D. *Programa GENES – versão Windows*. Editora UFV. Viçosa, MG. 642 p. 2001.

DONADIO, L.C.; FIGUEIREDO, J.O.; PIO, R.M. Variedades cítricas brasileiras. Jaboticabal : FUNEP, 1995. 228p

FERREIRA, M.E.; GRATAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas. 3. ed. Brasília: EMBRAPA – CERNAGEN, 1998. 220p.

JUNIOR, D. M.; NEGRI, J. D. P, R. M.; JUNIOR, J. P. Citros. Centro APTA Citros Sylvio Moreira, Campinas, Instituto Agrônômico e Fundag, 2005. 929p.

KRUSKAL, J. B. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a no metric hypothesis. **Psychometrika**, Williamsburg, v. 29, n. 1, p. 1-27, 1964.

MANLY, B. F. J. Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in biology. London: Chapman & Hall, 1997. 281 p.

MANTEL, N. 1967. *The detection of disease clustering and a generalized regression approach*. *Cancer Res* 27:209–20.

PAIVA, L.V.; CARVALHO, S.A. de; SOUZA, M. de. Limpeza clonal da laranjeira "seleta folha murcha" através da microenxertia in vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.28, p.1341-1344, 1993.

ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**: New York: Exeter Software, 2000. 38 p. (Version 2. 1).

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. *Numerical Taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. W. H. Freeman, San Francisco, 1973.

XVI CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA
22 a 26 de outubro de 2007

WADT, L. H. O.; Avaliação de divergência em coqueiro (*Cocus nucifera* L.) usando marcadores RAPD em amostras de plantas individuais ou compostas. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 1997.