

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE

CAMPUS DE CUITÉ

**GENOTIPAGEM MOLECULAR DE HÍBRIDOS DE *Poncirus trifoliata* E
Citrus sunki, POR MEIO DE MARCADORES TRAP-PCR (Target Region
Amplification Polymorphism-Polymerase Chain Reaction)**

GÉSSICA LAIZE BERTO GOMES

CUITÉ - PB

2011

GÉSSICA LAIZE BERTO GOMES

**GENOTIPAGEM MOLECULAR DE HÍBRIDOS DE *Poncirus trifoliata* E
Citrus sunki POR MEIO DE MARCADORES TRAP-PCR (Target Region
Amplification Polymorphism-Polymerase Chain Reaction)**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Campina
Grande/Campus Cuité, para obtenção do Grau de
Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof^ª.Dra. Magnólia de Araújo Campos

CUITÉ - PB

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE

Responsabilidade Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

G633g Gomes, Gessica Laize Berto.

Genotipagem molecular de híbridos de *Pancirus trifoliata* e *Citrus sunki*, por meio de marcadores TRAP – PCR (Target Region Amplification – Polymorphism- Polymerase Chain Reaction). / Gessica Laize Berto Gomes - Cuité: CES, 2011.

53 fl.

Monografia (Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2011.

Orientadora: Magnólia de Araújo Campos.

1. Genética. 2. Mapeamento genético. 3. *Phytophthora parasitica*.
I. Título.

CDU 575

GÉSSICA LAIZE BERTO GOMES

**GENOTIPAGEM MOLECULAR DE HÍBRIDOS DE *Poncirus trifoliata* E
Citrus sunki, POR MEIO DE MARCADORES TRAP-PCR (Target Region
Amplification Polymorphism-Polymerase Chain Reaction)**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Campina
Grande/Campus Cuité, para obtenção do Grau de
Licenciado em Ciências Biológicas.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Magnólia de Araújo Campos (Orientadora)

Prof^ª. Dr. Humberto Actis Zaidan

Prof^ª. Dr. Marcus José Conceição Lopes

A minha Família,
Por todo apoio e o amor recebido,
A minha prima,
Joseane Dantas de Souza (*in memoriam*),
Pelos bons e poucos momentos compartilhados nesta vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por proporcionar momentos tão importantes e inesquecíveis na minha vida e que por ela passaram pessoas que carregarei comigo pelo resto da minha vida.

Ao Centro de Educação e Saúde (CES), Campus Cuité-PB, pela oportunidade de realização deste que curso, que foi onde começou uma nova história da minha vida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e ao Dr. Marcos Antônio Machado, pesquisador do Centro APTA de Citros Sylvio Moreira, Cordeirópolis – SP, pela concessão de bolsa nível ITI A no âmbito do projeto INCT dos Citros, que foi por intermédio desse projeto que eu aprendi a importância e a responsabilidade do compromisso com a ciência.

À minha querida ilustríssima orientadora, Prof^a Dra. Magnólia de Araújo Campos, por ter confiado em mim, ter me mostrado que eu era capaz nos momentos que mais pensei que não conseguiria, agradeço pelas palavras amigas e sinceras, pelos puxões de orelha, quando mais precisava, você estava sempre ali por perto, mesmo nos momentos que não percebia. Obrigada por ter participado da minha formação, ter auxiliado no que eu sou hoje.

À Dra. Mariângela Cristofani-Yali, minha co-orientadora e pesquisadora do Centro APTA de Citros Sylvio Moreira, Cordeirópolis – SP, pelo apoio incondicional no envio de materiais do seu programa de melhoramento dos citros, nas orientações, análises e sugestões em todas as etapas deste trabalho.

À Prof^a Flávia Lins pelos seus conselhos e apoio que me deu durante essa fase da monografia.

Às técnicas de laboratório Danila Barbosa e Jacqueline Mendes, pelo apoio e ensinamentos, vocês duas contribuíram muito para os meus conhecimentos.

Aos colegas de projeto, Jonathas Diego, Gláucia Djojânia, Thyago Talles e Rayane Abreu, pela amizade, incentivo e agradável convivência.

Aos meus queridos e sinceros amigos: Larisse Bianca, Whanea Guimarães, Jordana Kaline, Max, Cristiane. Foram vocês quem estiveram comigo em todos os momentos, na alegria, na tristeza, nas loucuras e aventuras da vida. Vocês foram a minha segunda família longe de casa, foram vocês que me fizeram ver o mundo com outros olhos e me fizeram descobrir que para sermos irmãos não precisamos ser de sangue e sim de coração.

Às meninas do quarto 8 da RUF-UFCG (Residência Universitária Feminina – UFCG, *Campus Cuité*), Gilmara, Priscila e Micaela, agradeço pela paciência que vocês tiveram comigo nos momentos de estresses, nos meus momentos de chatices, e pelas longa risadas da madrugada.

À minha família, pelo suporte que me deram nessa minha trajetória por Cuité, por ter compreendido a minha ausência em alguns momentos especiais. E obrigado por tudo que vocês me proporcionaram, e que vocês são a minha base, a minha fortaleza, e a minha perseverança, sem vocês nada disso teria acontecido.

À minha tia Nicke, por disponibilizar um cantinho da sua casa e do coração.

Àquelas pessoas que contribuíram diretamente e indiretamente, com suas críticas construtivas e seus falsos elogios, por meio deles que aprendi crescer cada vez mais e mostrar que sou capaz de conseguir o que quero. Percebendo ou não, vocês também foram fonte importante para o meu crescimento.

*Nada é suficientemente bom,
então vamos fazer o que é certo,
dedicar o melhor de nossos esforços para atingir o inatingível,
desenvolver ao máximo os dons que Deus nos concedeu,
e nunca parar de aprender.*

Ludwig Van Beethoven

RESUMO

Os programas de melhoramento dos citros têm buscado alternativas para controlar problemas fitossanitários da citricultura, usando o porta-enxerto *Poncirus trifoliata* como fonte de resistência a doenças, entre estas a gomose causada pelo Oomiceto *Phytophthora parasitica*. A genotipagem de indivíduos usando marcadores baseados em DNA oferece a possibilidade de selecionar indivíduos com características de interesse com maior rapidez e eficiência. O objetivo geral deste trabalho foi realizar genotipagem molecular de uma população de híbridos F₁ de *Citrus sunki* e *Poncirus trifoliata*, por meio de marcadores TRAP-PCR (*Target Region Amplification Polymorphism-Polymerase Chain Reaction*), visando o mapeamento de QTLs ligados a resistência a gomose de *P. parasitica*. Tendo como base informações prévias sobre genes expressos em citros (do CitEST) e híbridos de fenótipos contrastantes para resistência e suscetibilidade a infecção por *P. parasitica*, foram realizadas análises de segregação para *Bulk* de DNAs do genitor resistente (*P. trifoliata*), DNA do genitor suscetível (*C. sunki*), *pool* de DNAs de híbridos resistentes e *pool* de DNAs de híbridos suscetíveis para testar 12 combinações de *primers*, sendo dois fixos *versus* seis aleatórios. Foi usada na genotipagem de 161 híbridos de *P. trifoliata* e *C. sunki*. Como resultados, a análise de *Bulk* segregante revelou que a combinação de *primers* SRG1/A6 (gene fixo SRG1 (*Senescence Related Gene1*)/Primer Arbitrário 6), gerou 02 bandas polimórficas que estão presentes em ambos, no progenitor e progênes F₁ resistentes. Esta combinação de *primer* selecionada foi usada na genotipagem de 161 híbridos, dos quais 93 apresentaram os dois marcadores. Os dois marcadores TRAP foram analisados individualmente quanto a segregação Mendeliana na proporção 1:1, pelo Teste do Qui-quadrado. Apenas um marcador TRAP foi integrado ao mapa genético de *P. trifoliata*, no grupo de ligação C4, usando o programa JoinMap v.3.0. A detecção de QTLs foi realizada utilizando o programa QTLCartographer v.1.25 e o método de mapeamento por intervalo composto (CIM), que indicaram a presença de um QTL entre 71 e 79 centiMorgans e a posição do marcador 79 centiMorgans (LOD > 1,6). Apesar do mapeamento genético de citros e a identificação de QTLs, é necessária a avaliação de novas combinações de *primers* (fixos /arbitrário) para geração de marcadores TRAP para a saturação do mapa genético com a estimativa cada vez mais acurada.

Palavras-chave: *Bulk* Segregante; Mapeamento Genético; QTL; gomose; *Phytophthora parasitica*

ABSTRACT

The citrus breeding programs have been researched alternatives to control phytosanitary problems concerning to citriculture, by using the *Poncirus trifoliata* rootstock as a disease resistant source, among these the gummosis disease, caused by the *Phytophthora parasitica* Oomycete. Genotyping of individuals using DNA-associated molecular markers provides the possibility for screening of individuals that carries interesting traits in a fast and efficient manner. The general aim of this work was to perform the molecular genotyping of a F₁ population obtained of *Citrus sunki* versus *Poncirus trifoliata* cross, by using TRAP-PCR (*Target Region Amplification Polymorphism-Polymerase Chain Reaction*) markers, focusing the mapping of QTLs associated with *P. parasitica* gummosis resistance. Based on previous information about citrus expressed genes (from CitEST) and contrasting phenotype hybrids for resistance and susceptibility to *P. parasitica* infection, we performed *bulk segregant* analyses for DNAs from resistant genitor (*P. trifoliata*), susceptible genitor (*C. sunki*), *pool* of DNAs from resistant hybrids and *pool* of DNAs from susceptible hybrids to test 12 *primers* combinations, two fixed versus six arbitrary *primers*. As results, the *bulk segregant* analyses revealed that the *SRG1/A6* (fixed *primer* for the *SRG1* (*Senescence Related Gene 1* gene)/Arbitrary *primer* number 6) *primer* combination produced 02 polymorphic fragments, that were present in both resistant genitor and F₁ hybrids. This selected *primer* combination was used for genotyping a population of 161 hybrids, and among them 93 showed the two TRAP markers. The two TRAP markers were individually analyzed for the Mendelian segregation pattern, in a 1:1 ratio, by using the Qui-Square test. Only one TRAP marker was integrated into the *P. trifoliata* genetic map, at the linkage group C4, using the JoinMap v.3.0 program. QTLs detection was performed using the QTLCartographer v.1.25 program and compost interval mapping, that indicated the presence of a QTL between 71 and 79 centiMorgans with position for the marker at 79 centiMorgans (LOD > 1,6). In relation at the citrus genetic mapping and the QTLs identification, new *primer* combinations need to be evaluated in order to generate TRAP markers to saturate the the *P. trifoliata* genetic map with a more accurate estimative.

Keywords: Bulk Segregant; Genetic Mapping; QTL; gummosis; *Phytophthora parasitica*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Ilustrações da morfologia de flores, frutos e plantas cítricas	18
FIGURA 2	Sintomas da doença gomose de <i>Phytophthora</i> spp. . em citros	20
FIGURA 3	Eletroforese em gel agarose 1,5% de produtos de TRAP-PCR da análise de Segregação em <i>Bulk</i> , usando combinações dos <i>primers</i> fixos <i>SRG1</i> (gene <i>SRG1</i>) e <i>Miraculin</i> (gene <i>Miraculina</i>) versus <i>primers</i> arbitrários TRAP (A1, A2, A3, A4, A5 e A6)	41
FIGURA 4	Gel de agarose 2% demonstrativo da amplificação de fragmentos de DNA da genotipagem dos indivíduos da população F1 usando as combinações de <i>primers</i> <i>SRG1/A6</i> , ressaltando as duas bandas polimórfica	43
FIGURA 5	Mapa de ligação de <i>Poncirus trifoliata</i> com 26 marcadores no total em um grupo de ligação, indicando o marcador TRAP deste trabalho, identificado como M76_2. Os QTLs estão destacados em vermelho	45
FIGURA 6.	Análise do grupo de ligação C4 do mapa de <i>Poncirus trifoliata</i> „Rubidoux“ indicando a presença de QTL entre 71 e 79 centiMorgans e a posição do marcador M76_2 (LOD > 1,6)	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Sequências dos “ <i>primers</i> ” fixos e arbitrários utilizados para amplificar marcadores TRAPs nos híbridos de <i>C. sunki</i> e <i>P.trifoliata</i>	31
TABELA 2	Combinações de “ <i>primers</i> ” fixos e arbitrários utilizadas para amplificar marcadores TRAPs o <i>Bulk Screening</i> de híbridos de <i>C. sunki</i> e <i>P. trifoliata</i>	31
TABELA 3	Identificação de genótipos de citros	32
TABELA 4	Identificação de marcadores TRAP em genótipos F1 de <i>C. sunki</i> e <i>P. trifoliata</i> , atribuindo-se os valores 0 (zero) e 1 (um) para ausência e presença de banda polimórfica, respectivamente	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP	Do inglês, <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
A/T	Adenina/Timina
BSA	Análise do <i>Bulk</i> Segregante
CES	Centro de Educação e Saúde
CIM	Mapeamento por Intervalo Composto
CitEST	Banco de dados de segmentos de seqüências expressas de citros
cM	centiMorgan
CTV	Vírus da tristeza dos citros
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ESTs	Do inglês, <i>Expressed Sequence Tags</i> , segmentos de seqüências expressas
G/C	Guanina/Citosina
IAC	Instituto Agrônômico de Campinas
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LOD	Logaritmo das probabilidades
ORF	Do inglês, <i>Open Reading Frame</i>
nt	Nucleotídeo
PCR	Do inglês, <i>Polimerase chain Reaction</i>
QTLs	Do inglês, <i>Quantitative Trait Locus</i>
RAPD	Do inglês, <i>Random Amplified Polymorphism DNA</i>
RFLP	Do inglês, <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SAM	Seleção assistida por marcadores
SAR	Soma dos coeficientes de recombinação adjacentes
SSR	Do inglês, <i>Simple Sequence Repeats</i>
SRG1	Do inglês, <i>Senescence Related Gene1</i>
TRAP	Do inglês, <i>Polymorphism amplification region targeted</i>
UFMG	Universidade Federal de Campina Grande

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XII
1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 Os Citros	18
2.2 A Importância da citricultura no Brasil	19
2.3 A gomose dos citros causada por <i>Phytophthora</i> spp	19
2.4 Melhoramento Genético de Citros	21
2.5 Genotipagem e Marcadores Moleculares	23
2.5.1 Marcadores TRAP-PCR (<i>Target Region Amplification Polymorphism-Polymerase Chain Reaction</i>)	24
2.6 A estratégia da Análise de Segregação em <i>Bulk</i> (<i>Bulk Segregant Analysis</i> , BSA)	25
2.7 Mapeamento Genético	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Análise de <i>Bulk Segregant Screening</i> usando TRAP-PCR	30
3.2 Condições da TRAP-PCR (“ <i>Target Region Amplification Polymorphism - Polymerase Chain Reaction</i> ”)	32
3.3 Análise de tipagem de híbridos F1 de <i>P. trifoliata</i> e <i>C. sunki</i>	32
3.4 Eletroforese de produtos de TRAP-PCR	38
3.5 Identificação de marcadores TRAP	39

3.6 Mapeamento e detecção de QTLs (<i>Quantitative Trait Loci</i>) ligados a resistência dos citros a gomose	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
4.1 Identificação de marcadores associados à resistência dos citros a gomose por <i>Bulk</i> segregante	41
4.2. Genotipagem da população F1 usando marcadores moleculares TRAP-PCR	43
4.3 Identificação de QTLs associados a resistência dos citros a gomose de <i>Phytophthora parasítica</i>	44
CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS	48

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o maior produtor e exportador mundial de citros, com cerca de 27,9% da produção de laranjas e 59% da produção global de suco concentrado congelado de laranjas (JÚNIOR, 2008). Tendo a maior parte da produção concentrada na região de São Paulo, o nordeste assume 9% da produção brasileira, com a Paraíba sendo considerada a maior produtora de tangerinas. Entretanto, a citricultura brasileira vem sofrendo desafios ambientais e patogênicos com mais de 35 doenças que limitam a produção e comprometem a biossegurança alimentar. Dentre principais os agentes causadores de doenças, podemos destacar a *Phytophthora* spp., o agente causador da gomose. A espécie *P. nicotianae* (Breda de Haan) (Tucker) var. *parasitica* é predominante na citricultura brasileira e está associada a perdas significativas na produção. A ação do patógeno leva à morte do tecido interno e do lenho, e formação de goma parda nos frutos, nas raízes, no tronco, causando perdas em todas as fases do desenvolvimento da planta.

Os citros raramente são cultivados como pé-franco, devido a susceptibilidade a estresses ambientais e patogênicos, tendo o seu meio usual da propagação pelo método da enxertia, que utiliza a combinação de copa e porta-enxerto. Por *P. parasitica* ser patógeno de solo, uma das estratégias de controle da gomose é a resistência do porta-enxerto. Atualmente, mais de 85% do cultivo citrícola nacional utiliza o limão „Cravo“ como porta-enxerto, devido ao seu bom desempenho e, provavelmente, sua resistência à seca e a CTV (vírus da tristeza dos citros) (CRISTOFANI *et al.*, 2005; JUNIOR, 2008). Porém, esta realidade se torna preocupante uma vez que a utilização de um único porta-enxerto no cultivo deixa a citricultura vulnerável ao surgimento de novas moléstias, causando danos econômicos severos. O programa de melhoramento genético de citros visa diversificar variedades de porta-enxertos, por busca de genótipos resistentes que sejam superiores ao limão “Cravo”.

A tangerina “Sunki” começou a ser utilizada como porta-enxerto por volta de 1985, devido a sua tolerância ao declínio, CTV, Xiloporese, a solos salinos e a seca, e induz ainda boa formação de copa (FARIA, 2007; JUNIOR, 2008; MARENGO, 2009). O porta-enxerto *P. trifoliata* (L.) Rafinesque cv. Rubidoux, espécie única do gênero *Poncirus*, é resistente a *Phytophthora* spp., nematóides, CTV e à xiloporose. Este porta-enxerto induz melhor qualidade do fruto (FARIA, 2007; MARENGO, 2009).

Visando obter genótipos de porta-enxertos resistentes as principais doenças e adaptados a diversas condições ambientais, o programa de melhoramento dos citros do Centro

de Citricultura IAC, Cordeirópolis SP, gerou inúmeros híbridos de cruzamentos entre *Citrus sunki* e *Poncirus trifoliata*. Entretanto, as plantas cítricas apresentam características que são difíceis de selecionar pelo melhoramento convencionais, incluindo heterogeneidade genética, poliembrião, longo período pré-produtivo, incompatibilidade e alta heterozigosidade (CRISTOFANI *et al.*, 2000, e MARENGO, 2009). Neste sentido, o uso de marcadores moleculares vem contribuindo para o programa melhoramento genético dos citros, possibilitando a seleção precoce de genótipos resistentes e que apresentam características agrônomicas desejáveis.

Uma vez que o DNA (ácido desoxirribonucleico) é a molécula que guarda a informação genética dos indivíduos, as quais são responsáveis pelas características herdáveis, a associação da genética clássica com a biologia molecular levou a criação de marcadores moleculares relacionados a análises de DNA. A base para estas técnicas está no fato de que o DNA de indivíduos da mesma espécie, até mesmo entre irmãos ou entre pais e filhos, possuem pequenas variações chamadas de Polimorfismos. Os polimorfismos são a base para as variações fenotípicas entre os indivíduos aparentados. Nestas características fenotípicas estão incluídos caracteres quantitativos importantes como resistência a doenças e produtividade, por exemplo. Por essa razão, técnicas moleculares vêm contribuindo para selecionar indivíduos com características de interesse utilizando as marcas de DNA (genótipo). Entretanto, um grande desafio é identificar entre os diversos polimorfismos aqueles que controlam a característica desejada (NJOKA; OKWANY; GITHUI, 2010).

A era pós-sequenciamento contribuiu para a nova geração de técnicas moleculares, as quais utilizam ferramentas de bioinformática e *Expressed Sequence Tags* (ESTs) para gerar marcadores polimórficos ao redor de genes alvos, a exemplo do TRAP-PCR (*Target Region Amplification Polymorphism-Polymerase Chain Reaction*), desenvolvido pelos pesquisadores HU e VICK (2003). A técnica TRAP-PCR se destaca por ser um marcador dominante de alta resolução e reprodutibilidade, que permite a amplificação de região alvo de polimorfismo, a partir de duas combinações de *primers*, sendo um arbitrário e o outro fixo/específico. Esse marcador facilita o desenvolvimento de mapas densos que são eficazes para localização de características quantitativas (QTL) (FARIA, 2007; LIMA, 2009; MARENGO, 2009).

Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi realizar genotipagem molecular de uma população de híbridos F1 de *Citrus sunki* e *Poncirus trifoliata*, por meio de marcadores TRAP-PCR (*Target Region Amplification Polymorphism-Polymerase Chain Reaction*), visando o mapeamento de QTIs ligados a resistência a gomose de *P. parasitica*. Tendo como

base informações de genes expressos em citros (CitEST) e a classificação prévia de alguns híbridos, como resistentes e suscetíveis, mediante inoculação com *P. parasitica*, a estratégia usada para alcançar este objetivo envolveu: (a) Seleção de combinações de *primers* com marca polimórfica de interesse por meio de análise de segregação em *Bulk* baseada em TRAP-PCR; (b) Realização da genotipagem de população F₁ de *P. trifoliata* e *C. sunki*, por meio de reações TRAP-PCR, com a combinação de *primers* selecionados no *Bulk* e DNAs de todos os genótipos da população; (c) Identificação visual de marcadores moleculares TRAP associados aos genótipos resistentes, por meio da presença e ausência de bandas polimórficas em gel de agarose; e (d) Introdução de marcadores TRAP associados à resistência a gomose no mapa genético de *P. trifoliata*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Citros

O termo citros abrange espécies do gênero *Citrus* e gêneros afins, *Poncirus* e *Fortunela*, conhecidos comercialmente pelos seus frutos, incluindo as laranjas (*Citrus sinensis*), tangerinas (*Citrus reticulata*, *C. deliciosa* e *C. sunki*), limões (*Citrus limonia*), limas ácidas como o Tahiti (*Citrus latifolia*) e o Galego (*Citrus aurantiifolia*), e doces como a lima da Pérsia (*Citrus limettioides*), pomelo (*Citrus paradisi*), cidra (*Citrus medica*), laranja-azedada (*Citrus aurantium*) e toranjas (*Citrus grandis*) (Figura 1) (CEAGESP, 2011).

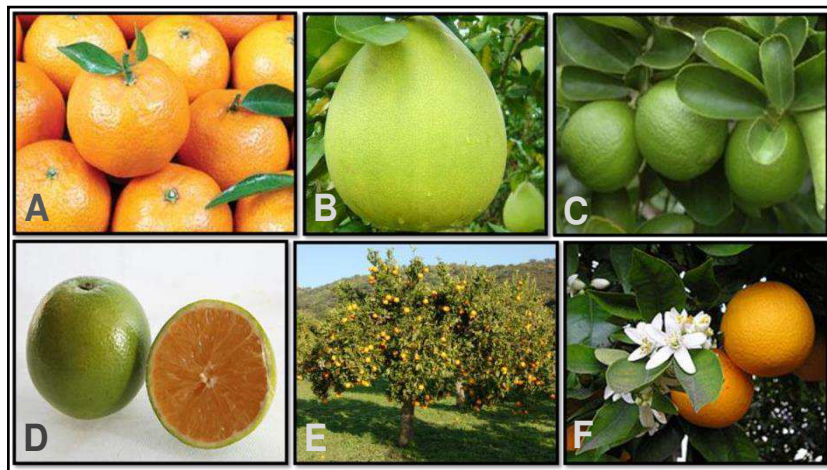


Figura 1. Ilustrações da morfologia de flores, frutos e plantas cítricas. A. Laranjas. B. Pomelo. C. Limão “Cravo”. D. Detalhe interno de laranja sem sementes. E. Planta de citros com frutos. F. Detalhe da floração de laranjeira.

Originárias de regiões tropicais e subtropicais do sul e sudeste Asiático (FARIA, 2007; JUNIOR, 2008; MARENGO, 2009; SOUZA, 2010), as plantas cítricas são caracterizadas pelo porte médio (arbustivo) com presença de flores brancas aromáticas e fruto tipo hesperídeo (Figura 1). SWINGLE (1943) classificou as espécies cítricas entre seis gêneros que compunham o grupo subtribal “árvores de citros verdadeiros” (“true citrus fruit trees”), subtribo Citrinae, tribo Citrae, subfamília Aurantioideae da família Rutaceae (SWINGLE; REECE, 1967). Essas plantas são predominantemente diplóides, com número básico de cromossomos $X=9$, sendo $2n=2x=18$, reproduzem-se sexuadamente, por meio de autopolinização e fecundação cruzada, e por meio de apomixia nucelar adventícia (MACHADO *et al.*, 2005).

2.2 A importância da citricultura no Brasil

Os citros ganharam destaque no agronegócio brasileiro a partir da década de 20, devido à crise do café e da cana de açúcar. Atualmente o Brasil é considerado o maior produtor e exportador mundial de citros, responsável por 53% produção do suco de laranja concentrado, correspondendo a 80% do mercado internacional (OLIVEIRA, 2011), com total de 608,6 mil hectares de plantações cítricas, gerando mais de 500 mil empregos diretos e indiretos no país. Mais de 300 municípios no Brasil cultivam citros, com uma produção média nacional de 19.707.602 toneladas, sendo o estado de São Paulo responsável por 78,1% desta produção (IBGE, 2011), considerado o berço citrícola. Quanto a produção de laranjas nordeste, o estado da Bahia assume liderança com 986,2 mil toneladas (SILVA *et al.*, 2011). A Paraíba ocupa a 8º posição no *ranking* contribuindo com 21 mil toneladas, com produção predominante na região do Planalto da Borborema, onde 60 municípios exercem a prática citrícola. O município paraibano de Matinhas ganha destaque como maior produtor de tangerinas no nordeste, com 6.800 toneladas em 850 ha de área plantada e colhida, com valor de produção de R\$ 2.040 mil reais (SILVA *et al.*, 2011).

Apesar disso, a citricultura brasileira vem sofrendo desafios ambientais e fitopatogênicos, com mais de 35 doenças que limita a produção e compromete a biossegurança alimentar. Dentre estas estão incluídas, mancha preta, causada pelo fungo *Guignardia citricarpa*; cancro cítrico, por bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*; clorose variegada, causada por *Xylella fastidiosa*; vírus da tristeza de citros, causada pelo vetor do pulgão *Toxoptera citricidus*, *Huanglongbing*, causada por bactéria *Candidatus Liberibacter*, e a gomose de *Phytophthora* spp.. A maioria dessas doenças causadas por esses patógenos já foram ou são responsáveis por grandes perdas econômicas para o país.

2.3 A gomose dos citros causada por *Phytophthora* spp.

O gênero *Phytophthora*, pertencente ao reino Stramenopila, ao filo Oomicota, à classe Oomicetes e à ordem Pythiales (SASSERON, 2008), compreende mais de 90 espécies, 11 delas são consideradas causadoras de doenças em citros. No Brasil foram relatadas apenas duas espécies causadoras de gomose na citricultura, *P. citrophthora* e *P. nicotianae* (FEICHTENBERGER, 1989). A *P. citrophthora* (R.E. Smith. & E.H. Smith.) Leonian., ataca principalmente as raízes e a parte aérea da planta, essa espécie adaptada em regiões

mediterrâneas, que tem características de clima frio (SIVIERO, 2001). A espécie *P. nicotianae* (Breda de Haan) (Tucker) var. *parasitica* ocorre frequentemente em regiões quentes e subtropicais, é mais predominante nos pomares brasileiros, e se manifesta geralmente no cólo da planta. Os sintomas causados por *Phytophthora* spp. incluem: escorrimento de goma do tronco (origem do nome gomose), rachadura na casca e podridão do tronco, que pode também expandir para as raízes, podendo provocar a morte da planta por estrangulamento, devido ao ataque do floema ou câmbio, dificultando ou interrompendo o fluxo da seiva (Figura 2) (SILVA *et al.*, 2008). As perdas na produção podem ocorrer em todas as fases da produção de citros, desde o viveiro, passando pelo pomar e até em pós-colheita.



Figura 2 - Sintomas da doença gomose de *Phytophthora* spp. em citros. **A.** Desfolhamento da copa no lado das lesões, no tronco ou raízes. **B.** Exsudação de goma na base do tronco da planta, limão verdadeiro; **C.** Podridão de raízes em limão „Cravo“; **D.** Podridão parda em laranja.

Os métodos utilizados para controlar a gomose sejam físicos, por via fumigação, ou a vapor, químicos, por aplicação de produtos sintéticos como metalaxyl e fosetyl-Al, ou biológicos, usando rizobactérias *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp. (SIVIERO, 2001), possuem a limitação devido à falta de dados sobre a variação temporal e espacial do grau de infestação do patógeno, sobre a contaminação do ambiente e a resposta do patógeno em relação ao tratamento adotado (SHEA; BROADBENT, 1983). Tendo como uma estratégia superior o uso de porta-enxerto resistente a *P. parasitica*, por se tratar de um patógeno de solo.

A gomose ocorre no Brasil a mais de 100 anos, entretanto só adquiriu importância após o aparecimento do vírus da tristeza de citrus (CTV), ocorrido na década de 40. Nessa época, as plantas cítricas estavam enxertadas sobre *C. aurantium* L. (laranja „Azeda“), resistente a *Phytophthora* spp., quando o CTV eliminou mais de 90% dos pomares cítricos paulistas (BOAVA *et al.*; 2003). Após a devastação “total” dos pomares de citros, várias espécies foram testadas como porta-enxerto resistente a CTV, dentre elas *C. limonia* Osbeck (limão cravo). Hoje, mais de 85% das plantas cítricas são cultivadas utilizando o limão cravo

como porta-enxerto, devido a sua resistência a CTV, tolerância a seca, e por apresentar resistência mediana a *P. parasitica*.

A existência de apenas um porta-enxerto conduzindo a maior parte da cultura dos citros é preocupante, porque torna a citricultura brasileira vulnerável às novas moléstias devastadoras, a exemplo do que aconteceu com CTV.

2.4 Melhoramento Genético dos Citros

Os citros são cultivados por enxertia, método que une tecidos de duas espécies da mesma família, os quais tendem a interagir de forma harmoniosa e eficiente para obter uma planta com mais resistência, maior produtividade, menor porte, elevada qualidade e quantidade do fruto diferenciado, mais precoce e, principalmente, na adaptação da planta às condições edafoclimáticas desfavoráveis (JUNIOR, 2008). Portanto, um dos maiores desafios do melhoramento genético dos citros é unir características agrônômicas de interesse e compatibilidade entre as espécies usadas na enxertia. Além disso, o melhoramento genético clássico dos citros torna-se limitado, devido à existência de variabilidade genética da família Rutaceae (CRISTOFANI *et al.*, 1999; MOURÃO, 1996).

As características agrônômicas de interesse incluem: resistência a doenças/pragas e a condições ambientais adversas, biossegurança alimentar, melhor qualidade dos frutos e produção precoce. Algumas espécies do gênero *Citrus* apresentam uma boa compatibilidade genética com outros gêneros da família *Rutaceae*, o *Poncirus* e *Fortunella*. O exemplo típico dessa compatibilidade são os híbridos de gêneros *Citrus* com *P. trifoliata*. Por essa razão, *C. sunki* tem sido utilizado como importante genitor feminino no melhoramento de citros, devido a seu baixo grau de poliembrionia e sua alta compatibilidade na hibridação, enquanto que *P. trifoliata* tem sido utilizado como genitor masculino.

A tangerina Sunki (*C. sunki*) começou a ser utilizada como porta-enxerto por volta de 1985, devido a sua tolerância ao declínio, CTV, Xiloporose, a solos salinos e a seca, e induz ainda boa formação de copa, porém, tem suscetibilidade a gomose (FARIA, 2007; JUNIOR, 2008; MARENCO, 2009). O porta-enxerto *P. trifoliata*, espécie única do gênero *Poncirus*, é resistente a *Phytophthora* spp., nematóides (*Tylenchulus semipenetrans* e *Pratylenchulus coffeae*), vírus da tristeza dos citros e à xiloporose. Este porta-enxerto induz melhor qualidade do fruto, porém é intolerante ao declínio, exocorte e a seca (FARIA, 2007; MARENCO, 2009).

Segundo Siviero (2001), em um programa melhoramento genético vegetal clássico que visa a incorporação de genes de resistência a doenças é de fundamental importância o conhecimento do tipo de herança dos fatores genéticos envolvidos na relação planta-patógeno. O estudo do modo de herança genética somente é possível por meio de hibridação entre genitores contrastantes para a característica em estudo e análise da segregação para o caráter nas progênes das gerações F_1 , F_2 ... F_n . O número de indivíduos e gerações a serem avaliados depende do objetivo do trabalho de melhoramento e da natureza da herança da resistência envolvida pelo caráter (qualitativa ou quantitativa). O processo de seleção de novos indivíduos pode se tornar trabalhoso, caro e lento se a base genética da interação patógeno-hospedeiro for desconhecida.

De modo geral, o melhoramento tradicional depende principalmente do fenótipo que está sendo avaliado em vários ambientes, a seleção e a recombinação são baseadas somente nos dados resultantes mais informações de genealogia (*pedigree*), quando disponíveis. A seleção assistida por marcadores (SAM) usa marcadores moleculares no desequilíbrio de ligação com QTL (*Quantitative Trait Loci*; *Loci* de Características Quantitativas). Por outro lado, a Seleção Genômica é uma nova estratégia para o melhoramento de características quantitativas em populações de melhoramento de plantas grandes, que usa marcadores moleculares para o genoma completo (marcadores de alta densidade e elevada genotipagem). A predição genômica combina dados de marcadores com fenótipo e dados de pedigree (quando disponíveis), na tentativa de aumentar a acurácia da predição de valores genotípicos e de melhoramento.

Para entender melhor a interação dos citros com seus patógenos, pragas e respostas a estresses ambientais, foi realizado no Brasil o sequenciamento em larga escala de genes expressos (ESTs) de citros induzidas por diversas situações de estresses bióticos e abióticos, dentro de um projeto intitulado “Melhoramento genético, genoma funcional e comparativo dos citros”. As seqüências foram depositadas no banco de dados CitEST (Citrus EST; Centro APTA de Citros Sylvio Moreira/<http://biotecnologia.centrodecitricultura.br>), o qual representa o maior banco de informações genéticas dos citros do mundo (CRISTOFANI-YALI *et al.*, 2007).

Além de enriquecer o melhoramento dos citros com informações gênicas, este banco oferece as facilidades para estudos de transcriptômica e proteômica e ainda disponibiliza as seqüências expressas para o desenvolvimento de marcadores moleculares ligados a QTLs.

Estes marcadores de interesse estão sendo introduzidos em mapas genéticos de *Poncirus* e *Sunki*, permitindo identificar, mapear, quantificar o efeito dos QTLs e sua estabilidade.

2.5 Genotipagem e Marcadores Moleculares

O DNA (ácido desoxirribonucleico) é a molécula que guarda a informação genética dos indivíduos, as quais são responsáveis pelas características herdáveis. As condições ambientais também podem determinar características, porém estas não são herdáveis. A Genotipagem é o processo de determinação de genes (genótipo) de um indivíduo pelo exame de seu DNA, usando ensaios biológicos e comparando com outras sequências de outros indivíduos ou com uma sequência referência. Dessa forma, a genotipagem revela os alelos que o indivíduo herdou de seus genitores. Tradicionalmente, genotipagem é o uso de sequências de DNA para definir populações biológicas pelo uso de ferramentas moleculares.

A base para estas técnicas está no fato de que o DNA de indivíduos da mesma espécie, até mesmo entre irmãos ou entre pais e filhos, possuem pequenas variações chamadas de Polimorfismos. Os polimorfismos são a base para as variações fenotípicas entre os indivíduos aparentados. Nestas características fenotípicas estão incluídos caracteres quantitativos importantes como resistência a doenças e produtividade, por exemplo. Por essa razão, técnicas moleculares vêm contribuindo para selecionar indivíduos com características de interesse utilizando as marcas de DNA (genótipo). Entretanto, um grande desafio é identificar entre os diversos polimorfismos aqueles que controlam a característica desejada.

Os métodos de tipagem molecular analisam uma parte ou a totalidade do genoma, pelo que são conhecidos por métodos de Genotipagem. Estes métodos baseiam-se no polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição gerados a partir do genoma de diversos organismos em comparação. Atualmente, os métodos de genotipagem incluem a identificação de polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), a detecção de polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP), a detecção de polimorfismos amplificados ao acaso (RAPD) em DNA genômico, a detecção de polimorfismo de um único nucleotídeo (SNPs), a reação em cadeia da polimerase (PCR), o sequenciamento de DNA, as sondas de oligonucleotídeos específicos de alelos (ASO) e a hibridização de microarranjos de DNA.

Os marcadores moleculares são tecnologias de biologia molecular, uma subárea da genética, que podem ser usados para a exploração genética, caracterização, previsão e

diferenciação de indivíduos estudados em nível de DNA em curto espaço de tempo. O desenvolvimento de marcadores de DNA é importante para a seleção e melhoramento de variedades, e ainda oferecem a vantagem de não serem influenciados pelo ambiente. No melhoramento genético de plantas, o uso de marcadores moleculares têm sido de grande importância, pois contribuem para a seleção precoce de genótipos resistentes de interesse agrônomico, bem como estão sendo cada vez mais úteis para construção do mapa genético de citros e gêneros afins.

Os marcadores moleculares podem ser classificados quanto ao seu comportamento, podendo ser (i) marcadores co-dominantes, que possibilita identificação de alelos homocigotos e heterocigotos, ou (ii) marcadores dominantes, são incapaz de discriminar os alelos heterocigotos do homocigoto.

Os primeiros marcadores foram desenvolvidos baseados em caracteres morfológicos e citológicos. A partir da década de 60, foram desenvolvidos os marcadores bioquímicos, as isoenzimas, embasados em variações alélicas, o número de polimorfismo detectado por este marcador era considerado baixo, o que impossibilitava visão ampla do genoma. Mas os marcadores bioquímicos foram de suma importância para solucionar dificuldades obtidas pelos marcadores morfológicos, por as isoenzimas compreender diversas formas moleculares de uma mesma enzima, com funções metabólicas específicas, e representação de grupos especializados de proteínas (BRAMMER, 2000).

Atualmente, um grande número de marcadores baseados em DNA genômico está disponível, os quais foram desenvolvidos baseados na reação em cadeia de polimerase, a PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Esta técnica engloba facilidade e a rapidez versátil para diversos estudos genética-molecular, por permitir ampliações de seqüências específicas de DNA e, ainda, o desenvolvimento de vários marcadores por meio de variações na PCR.

2.5.1 Marcadores TRAP-PCR (Target Region Amplification Polymorphism-Polymerase Chain Reaction)

Dentre as inúmeras técnicas moleculares atuais que oferecem uma oportunidade de prever características de uma cultivar e gerar sistemas de marcadores específicos para o genoma, visando identificar e estudar cultivares, a escolha do marcador é dependente do gene de interesse.

O TRAP foi desenvolvido por Hu e Vick (2003) e tem como base a PCR, marcador. É um marcador do tipo dominante, que tem o objetivo de amplificar regiões alvo de polimorfismo. A amplificação de regiões alvo se dá pelo emprego de combinações de dois *primers* com aproximadamente 18 nucleotídeos, denominados de fixo e arbitrário. Os *primers* fixos são desenhados a partir de regiões alvos de seqüências conhecidas, de acordo com a característica de interesse. Os *primers* arbitrários foram desenhados por Li e Quiros (2001) tendo como base os princípios de: 1) nucleotídeos seletivos, 3-4 nt na região 3''terminal; 2) uma sequencia central (*core*), 4-6 nt com regiões ricas em AT ou GC; e 3) a sequencia que satisfaz a região 5''terminal, anelando nas demais regiões consideradas putativas (FARIA, 2007; MARENGO, 2008; SOUZA, 2010).

O marcador TRAP é considerado uma técnica rápida, altamente reproduzível. Hu e Vick (2003) ressaltaram que esta técnica é útil para genotipagem de coleções de germoplasmas com característica de interesse agrônômico desejáveis. Essa técnica visa regiões alvo de genes de interesse agrônômico e representa uma excelente alternativa para estudos em plantas perenes, como de citros, as quais apresentam longo ciclo de produção, que dificulta o desenvolvimento de mapa genético.

De modo geral, a genotipagem de indivíduos envolve três etapas, que são: o isolamento do DNA genômico do indivíduo, o uso de uma técnica adequada e eficiente (predominantemente aquelas baseadas em PCR), e um método para determinar o genótipo (eletroforese em géis de agarose ou poliacrilamida). Na maioria dos casos, as marcas moleculares ou marcadores moleculares gerados por essas técnicas são visualizadas como bandas polimórficas. Quando existe o interesse em realizar o mapeamento genético, os dados obtidos em bandas polimórficas são organizados em planilhas e analisados para a segregação mendeliana esperada e para a frequência de recombinação gênica, usando programas computacionais apropriados.

2.6 A estratégia da Análise de Segregação em *Bulk* (*Bulk Segregant Analysis*, BSA)

Muitas vezes inúmeras reações de amplificações são realizadas na tentativa de encontrar combinações de *primers* capazes de gerar bandas polimórficas na população que está sendo estudada. Então, a estratégia de análise de segregação em *bulk* (grupo) representa uma poderosa ferramenta que pode ser utilizada quando a população segregante em estudo possui genitores contrastantes para a característica alvo (exemplo, resistente e suscetível) e

possui alguns híbridos individuais dessa população previamente fenotipados para a característica alvo (resistência e suscetibilidade) (QUARRIE *et al.*, 1999).

O BSA baseia-se no fenótipo e no princípio da detecção de polimorfismos (marcadores) em regiões ou genes de interesse (responsáveis pelo fenótipo). Isto porque, após segregação ao acaso, espera-se que as sequencias ou polimorfismos diretamente responsáveis pela característica, ou intimamente ligados a ela, estejam presentes nos segregantes associados ao genitor de interesse (positivos) e ausentes em todos os segregantes negativos (MICHELMORE; PARAN; KESSELY, 1991).

Em BSA, dois genitores (ditos resistentes e suscetíveis), apresentando alto grau de polimorfismos molecular e contrastantes para a característica alvo, são cruzados e os indivíduos da progênie são fenotipados para resistência e suscetibilidade. Normalmente, o DNA isolado de 10 plantas em cada grupo é misturado para constituir os *bulks* resistente e suscetível. O genitor resistente, o suscetível, o *bulk* resistente e o *bulk* suscetível são analisados para produzir polimorfismo usando marcadores moleculares. Um marcador que apresenta polimorfismo entre genitor e *bulk* é considerado ligado à característica alvo, e então ele é usado para mapeamento da característica. Conceitualmente, a constituição genética dos dois *bulks* é similar, mas não para a região genômica que está associada com a característica alvo. Portanto, ela serve para o propósito de linhagem isogênica em princípio (MICHELMORE *et al.*, 1991).

Tem sido observado muitos experimentos em que 10 plantas são amostradas em cada grupo para constituir o *bulk*, a probabilidade do marcador polimórfico não estar ligado a característica alvo é extremamente baixa. Assim, normalmente 10 plantas são usadas para constituir os *bulks*. Entretanto, este número pode variar dependendo do tipo de população que está sendo mapeada. Embora a estratégia tenha sido projetada para linhagens isogênicas, na ausência destas, o BSA oferece uma alternativa bem sucedida para mapeamento gênico.

2.7 Mapeamento Genético

Mapa genético ou mapa de ligação é uma representação gráfica das distâncias entre genes e de suas posições relativas em um cromossomo. Essa distância é calculada a partir da frequência de *quiasmas* entre dois genes ligados, que é proporcional a distância física entre ambos (SOUZA, 2010). A distância é representada pela unidade centiMorgan (morganídeo). Quanto maior for a taxa de recombinação gênica, maior será a distância entre os genes, menor

a possibilidade de não haver *crossing over* e vice-versa. Ou seja, quanto maior a distância entre os marcadores no cromossomo, maior será percentual de permuta entre os genes, ou seja, a ocorrência *crossing over* será visível.

O mapeamento genético envolve a combinação de critérios como: a escolha da população apropriada (denominada de população de mapeamento), o tipo e o comportamento do marcador e a ser utilizado na seleção da população contrastante em relação à característica de interesse e a segregação mendeliana. É necessário que o marcador seja polimórfico, com maior número de locos detectado dentro do acesso de características de dominância (TANKSLEY, 1993; MALIEPAARD; JANSSEN; OOIJEN, 1997; JOSHI; RANJEKAR; GUPTA, 1999). Os genitores escolhidos para gerar a população de mapeamento devem ser contrastantes (até mesmo quanto à expressão fenotípica para caracteres de interesse), visto que o número de marcas no mapa representa o número de caracteres contrastantes nos genitores.

Esta população de mapeamento é confeccionada de modo que se espera a ocorrência de um padrão de segregação mendeliana típico para os marcadores analisados, ou seja, de segregação esperada conhecida (1:1, 3:1, 1:2:1 ou 1:1:1:1) definida pelo tipo de cruzamento (F_1 , F_2 , retrocruzamento etc.), pois é necessário que os locos estejam em equilíbrio de ligação. Em alguns casos, pode ocorrer distorção de segregação, em que a segregação gamética não ocorre como previsto por Mendel, como é o caso de populações oriundas de cruzamentos interespecíficos. De acordo com Ferreira (2006), a presença de marcadores com distorção de segregação pode ser um inconveniente, devido à construção de mapas de ligação genética ser realizada a partir de frequências de recombinação entre locos em populações experimentais ou populações naturais com *pedigrees* conhecidos.

Uma vez que são utilizadas centenas de marcadores na análise de segregação, a construção de mapas de ligação é computadorizada. Atualmente existem vários programas computacionais disponíveis para auxílio de construção de mapas genéticos com base no método da máxima verossimilhança, tais como: Linkage 1 (SUITER; WENDEL; CASE, 1983), Mapmaker (LANDER; BOTSTEIN, 1989), GMendel (LIU; KNAPP, 1992), Joinmap (STAM, 1993). Estes programas usam os dados obtidos das populações segregantes para estimar a frequência de recombinação que são então usadas para determinar o arranjo linear dos marcadores genéticos.

Na simulação dos grupos de ligação, durante o mapeamento, são realizadas as seguintes análises: 1) Verificação da segregação ou distorção da segregação Mendeliana em lócus

individuais, usando o teste do Qui-quadrado; 2) Estimativa da porcentagem de recombinação entre pares de marcadores moleculares, usando o princípio da verossimilhança; 3) Determinação de grupos de ligação, onde as marcas moleculares são agrupadas, considerando valores referenciais de LOD (logaritmo das probabilidades) mínimo e porcentagem de recombinação máxima para que duas marcas sejam consideradas ligadas; e 4) Organização linear (ordem) das marcas no grupo de ligação é feita pela soma dos coeficientes de recombinação adjacentes (SAR), onde a ordem correta entre os locos seja aquela que possibilite o mínimo valor de SAR (FERREIRA, 2006).

Atualmente, a utilização do mapa tornou-se comum, devido advento do uso de marcadores moleculares, que permitiu existência de mapa genético para maioria de espécies de cultivares de plantas que desperta interesse no setor agrícola e econômico. Estes mapas representam ferramentas essenciais para aplicações práticas no melhoramento genético de plantas, tais como mapeamento de QTLs, seleção assistida e clonagem de genes. A identificação e localização de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) é uma das aplicações mais importantes. A maior parte das características agrônômicas de citros é caracterizada controle de vários genes, assumindo herança poligênica ou quantitativa. O mapeamento de QTLs é desenvolvido a partir da base do mapa de ligação e a característica fenotípica (BOAVA, 2004). Sendo necessário que o marcador esteja fundamentado no desequilíbrio de ligação na população segregante, para que seja permitida a associação entre o marcador e o QTL. Uma vez identificada associação significativa entre o marcador e a expressão do caractere pode evidenciar a presença de um QTL próximo fisicamente ao marcador (LAPERUTA, 2011).

As metodologias de mapeamento de QTLs estão associadas entre o marcador-QTL e os fenótipos são: análises de marcas simples „*single marker analysis*“, que baseia-se na comparação entre as médias das classes genotípicas dos marcadores, usando os testes: t, regressão linear simples, análise de variância e razão de verossimilhança (LYNCH; WALSH, 1998, LIU, 1998); mapeamento por intervalo usando o método da máxima verossimilhança utilizada para análise marcadores adjacentes, flanqueando num possível QTL (LANDER; BOTSTEIN, 1989); e o mapeamento por intervalo composto, proposto por Jansen, (1992, 1996) e Zeng (1994), que consiste num refinamento do mapeamento por intervalo que evita a identificação de QTLs „fantasmas“ conjugando o método da máxima verossimilhança com regressões lineares múltiplas.

Em resumo, a detecção de QTLs depende do número de QTLs, amplitude do seu efeito, herdabilidade da característica, interações entre os genes, o tamanho e o tipo da população

segregante, frequência de recombinação entre o QTL e o marcador e saturação do mapa (TANKSLEY, 1993).

A configuração do cruzamento não necessita ser planejada “*a priori*”, como no cruzamento teste clássico, mas pode ser inferida “*a posteriori*”, após a análise de segregação dos marcadores na progênie (FARIA, 2007, MARENGO, 2009). No caso de um parental ser heterozigoto para um marcador dominante e o outro parental apresentar formas alélicas indetectáveis, a progênie F₁ segrega na proporção 1:1 para ausência e presença de marcas de DNA detectado (GRATTAPAGLIA; SEDEROFF, 1994).

No Mapeamento genético realizado em espécies perenes de alta heterozigose, como dos citros, se utiliza a estratégia *pseudo testcross* (GRATTAPAGLIA; SEDEROFF, 1994), devido à dificuldade da progênie F₁ obter gerações avançadas. A geração F₁ obtida do cruzamento de duas espécies altamente heterozigotas refletirá uma F₂ ou retrocruzamento nos modelos clássicos de culturas anuais (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

Os primeiros mapas de ligação de citros foram desenvolvidos com base nos marcadores isoenzimáticos e RFLP utilizando famílias de retrocruzamento intergenérico de *Citrus* e *P. trifoliata*, de tangerina com pomelo e uma família F₂ intergenérica de *Citrus* e *Poncirus* (FARIA, 2007). Com o advento do marcador RAPD foi possível avançar a extensão genética do mapeamento do grupo de ligação. Utilizando o “*pseudo testcross*” Cristofani *et al.* (1999) relatam o uso da estratégia na construção do mapa de ligação genética de *P. trifoliata* a resistência ao vírus da tristeza dos citros (CTV), usando o RAPD. Olivera *et al.* (2004b), com uso do marcador molecular RAPD elaborou o mapa genético de ligação de laranja Pêra e tangerina Cravo, visando herança a resistência à CTV, cancro cítrico e leporose. Além desses, estudos de mapeamento dos citros foram realizados para os caracteres dormência, juvenilidade e vigor (ROOSE *et al.*, 1992), peso da planta e acidez do fruto (GMITTER *et al.*, 1996).

Ainda nos citros, Siviero (2001) identificou quatro QTLs associados à resistência a gomose de *Phytophthora* dos citros, sendo três localizados em grupos de ligação I, II e V no mapa de *Poncirus trifoliata* „Rubidoux“ e um QTL no grupo de ligação II no mapa de *Citrus sunki*, ambos desenvolvidos por Cristofani *et al.* (1999). E nessa mesma população detectados QTLs associados à produção de frutos e sementes (SIVIERO *et al.*, 2002).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Parte das atividades foi realizada no Laboratório de Biotecnologia do Centro APTA de Citros Sylvio Moreira, Cordeirópolis SP e no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Educação e Saúde - UFCG, Cuité PB.

3.1 Análise de *Bulk Segregant Screening* baseada em TRAP-PCR

Reações de TRAP-PCR foram preparadas conforme item 3.2 utilizando como amostras DNA de *P. trifoliata* (genitor resistente a *P. parasitica*), DNA de *C. sunki* (genitor suscetível) e *pool* de 04 DNAs de híbridos caracterizados fenotipicamente como resistentes e *pool* de 04 DNAs de híbridos caracterizados fenotipicamente como suscetíveis a *P. parasitica* por SIVIERO *et al.*, 2006. Para amplificar estes DNAs foram utilizados “*primers*” cedidos pela Dra. Mariângela Cristofani-Yali do Centro APTA de Citros Sylvio Moreira. Os *bulks* contrastantes foram obtidos pela mistura de igual quantidade de cada um dos DNAs de indivíduos fenotipados para a característica estudada.

Os *primers* fixos foram desenhados dentro de regiões codificadoras (ORF) dos genes alvo *Miraculina* e *SRG1* (*Senescence Related Gene 1*), usando as informações disponíveis no banco de dados CitEST (<http://biotecnologia.centrodecitricultura.br>). Estes genes foram escolhidos com base na demonstração de serem diferencialmente expressos em folhas de *P. trifoliata* infectadas com CTV (*Citrus Tristeza Virus*) (CRISTOFANI-YALI *et al.*, 2007) e por codificarem proteínas relacionadas com a defesa da planta. Os *primers* arbitrários foram sintetizados de acordo com Li e Quiros (2001). As sequências dos *primers* usados estão descritas na Tabela 01.

TABELA 1. Sequências dos “*primers*” fixos e arbitrários utilizados para amplificar marcadores TRAPs nos híbridos de *C. sunki* e *P. trifoliata*.

<i>Primers</i>	Identificação dos <i>Primers</i>	Sequência de nucleotídeos
<i>Primers</i> Fixos (PF)	<i>SRG1</i> ¹ – <i>Foward</i>	5''GGCACCGCACTCACCATC 3''
	<i>Miraculin</i> ¹ - <i>Foward</i>	5''GTGGCGAATTTTGACTGT 3''
<i>Primers</i> Arbitrários ²	PA1 - <i>Reverse</i>	5'' GACTGCGTACGAATTAAT 3''
	PA2 - <i>Reverse</i>	5'' GACTGCGTACGAATTTGC 3''
	PA3 - <i>Reverse</i>	5'' GACTGCGTACGAATTGAC 3''
	PA4 - <i>Reverse</i>	5'' GACTGCGTACGAATTTGA 3''
	PA5 - <i>Reverse</i>	5'' GACTGCGTACGAATTAAC 3
	PA6 - <i>Reverse</i>	5'' GACTGCGTACGAATTGCA 3''

¹ORF (*Open Reading Frame*), sequência expressa de genes induzidos pelo vírus da tristeza dos citros (CRISTOFANNI et al., 2007). ²De acordo com Li e Quiros (2001).

Para cada uma das quatro amostras de DNA, reações TRAP-PCR foram realizadas com 12 combinações de *primers*, sendo dois fixos *versus* seis aleatórios (Tabela 02).

Tabela 2- Combinações de “*primers*” fixos e arbitrários utilizadas para amplificar marcadores TRAPs o *Bulk Screening* de híbridos de *C. sunki* e *P. trifoliata*.

<i>Primers</i> <i>Arbitrários</i>	<i>Primers</i> Fixos	
	<i>SRG1</i>	<i>Miraculin</i>
PA1	PA1/ <i>SRG1</i>	PA1/ <i>Miraculin</i>
PA2	PA2/ <i>SRG1</i>	PA2/ <i>Miraculin</i>
PA3	PA3/ <i>SRG1</i>	PA3/ <i>Miraculin</i>
PA4	PA4/ <i>SRG1</i>	PA4/ <i>Miraculin</i>
PA5	PA5/ <i>SRG1</i>	PA5/ <i>Miraculin</i>
PA6	PA6/ <i>SRG1</i>	PA6/ <i>Miraculin</i>

3.2 Condições da TRAP-PCR (“Target Region Amplification Polymorphism -Polimerase-Chain Reaction”)

As reações de amplificação TRAP-PCR foram conduzidas a um volume final de 15µL contendo os seguintes componentes: 50-80 ng da amostra de DNA de genitores ou híbridos extraídos conforme MARENGO (2009), 1X do tampão (NH₄)₂SO₄, da Taq (750 mM Tris-HCl, pH 8.8, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% (v/v) Tween 20) (Fermentas Lab Science), 25 mM de MgCl₂, 0,4mM de cada dNTP (Amersham Pharmacia), 0,533µL de cada “*primer*” da combinação arbitrário/fixo e 1,5 U de Taq DNA polimerase recombinante (Fermentas Lab Science). As reações foram realizadas em Termociclador (Amplitherm), sob as seguintes condições térmicas: 35 ciclos de 94°C por 45 s de desnaturação, 35°C por 45 s para anelamento dos *primers*, e 72°C por 1 min de extensão, seguido de uma extensão final a 72°C por 5 min.

3.3 Análise de tipagem de híbridos F₁ de *P. trifoliata* e *C. sunki*

Os genótipos empregados no experimento fazem parte de uma progênie F₁ de 161 indivíduos do programa de melhoramento dos citros do Centro APTA Sylvio Moreira, obtidos por meio de cruzamentos entre os genitores *Citrus sunki* Hort. Ex Tan. e *Poncirus trifoliata* Raf. Cv. *Rubidoux*, genitores suscetível e resistente a gomose, respectivamente. Os DNAs das plantas foram cedidos pela Dra. Mariângela Cristofani-Yali do referido Centro, sendo que para a maioria as amostras foram replicadas provenientes de diferentes datas de procedimentos de extração. Na genotipagem de híbridos dessa população, as reações de TRAP-PCR foram preparadas conforme item 3.2 utilizando os DNAs dos genitores e dos híbridos, com suas repetições (TABELA 3), e uma combinação de *primers* selecionada por meio do *Bulk Segregant*, a qual produziu banda polimórfica associada ao parental resistente *Poncirus*. Um total de 260 reações foi realizado.

TABELA 3. Identificação de genótipos de citros.

Identificação das amostras	Identificação dos Genitores	Identificação dos Híbridos	Repetições dos Híbridos
Parental 1	<i>Poncirus trifoliata</i>		T ₂
Parental 1			¹ T ₅
Parental 1			¹² T _{8a}
Parental 2			S ₁

Parental 2	<i>Citrus sunki</i>		¹ S ₃
Parental 2			¹² S _{8a}
1		1	1.2 1.3
2		2	2.4 2.1
3		4	4.4 4.3
4		5	5.3 5.2
5		14	14.1 14.3 14.4
6		17	17.2 17.1
7		19	19.3
8		20	20.1
9		24	24.4
10		26	26.3 26.4
11		29	29.3 29.4
12		31	31.3 31.4
13		35	35.3 35.4
14		37	37.2 37.3
15		42	42.2 42.3
16		49	49.3 49.4
17		54	54.3 54.4
18		68	68.3 68.4
19		70	70.3 70.4
20		73	73.2 73.3
21		78 78	78.3 78.4
22		90	90.1
23		101	101.3 101.4
24		102	102.3 102.4
25		103	103.1
26		105	105.2

			105.3
27		106	106.3 106.4
28		107	107.1 107.2
29		108	108.2 108.3
30		109	109.1
31		110	110.2 110.4
32		111	111.1 111.2
33		113	113.4
34		114	114.2 114.3
35		116	116.2
36		117	117.3
37		118	118.4
38		119	1119* 119.4
39		121	121.2
40		123	123.3
41		124	124.3 124.4
42		125	125.2 125.3
43		126	126.3 126.4
44		128	128.3 128.4
45		129	129.3 129.4
46		130	130.2 130.3
47		131	131.2 131.3
48		132	132.4
49		133	133.1
50		134	134.4
51		135	135.3 135.4
52		136	136.3 136.4
53		137	137.2 137.3
54		140	140.2 140.3
55		141	141.3
			141.4

56		142	142.2 142.3
57		143	143.3 143.4
58		144	144.3 144.4
59		145	145.2 145.1
60		146	146.3 146.4
61		147	147.2 147.3
62		148	148.2 148.3
63		149	149.3 149.4
64		150	150.3 150.4
65		151	151.4
66		152	152.1 152.3
67		154	154.2 154.1
68		155	155.1 155.2
69		66	66.4
70		61	61.1
71		56	56.3 56.2 56.1
72		61	61.2
73		62	62.2
74		299	299.2
75		293	293.1
76		279	279.4 279.3 279.2 279.1
77		217	217.3 217.2 217.1
78		191	191.4 191.3 191.2 191.1
79		190	190.3 190.2 190.1
80		189	189.4

81		293	293.1
82		279	279.4 279.3 279.2 279.1
83		176	176.4 176.3 176.2 176.1
84		173	173.4 173.3 173.2 173.1
85		172	172.4 172.3 172.2 172.1
86		166	166* 166.3 166.2 166.1
87		165	165.4 165.2 165.1
88		163	163.3 163.2 163.1
87		161	161.4 161.3 161.2 161.1
88		160	160.4 160.3 160.2
88		160	160.1
89		155	155.4 155.3
90		1.1	1.1 1.4
91		4	4.1
92		2	2.3
93		4	4.2
94		5	5.1
95		14	14.2
96		17	17.4 17.3
97		19	19.4
98		23	23.1 23.2

99		24	24.1 24.2
100		26	26.2
101		29	29.2 29.1
102		31	31.2
103		35	35.2
104		37	37.1
105		42	42.1
106		49	49.1 49.2
107		54	54.2
108		68	68.2
109		70	70.2
110		73	73.1
111		102	102.2
112		105	105.4
113		107	107.3
114		101	101.1
115		154	154.3
116		151	151.3
117		149	149.1
118		145	145.3
119		121	121.1
120		114	114.4
121		110	110.3
122		101	101.2
123		105	105.1
124		106	106.1 106.2
125		108	108.1
126		110	110.1
127		113	113.1 113.2
128		114	114.1
129		117	117.1 117.2
130		118	118.1 118.2
131		119	119.1 119.2
132		126.1	126.1
133		123	123.1 123.2
134		126.2	126.2
135		124	124.1 124.2
136		125.1	125.1
137		128	128.1

			128.2
138		129	129.1 129.2
139		130.1	130.1
140		131.1	131.1
141		136.2	136.2
142		146.2	146.2
143		137	137.1
144		132	132.3
145		134	134.2
146		135	135.2
147		140	140.1
148		141	141.2
149		147	147.1
150		148	148.1
151		151	151.2 151.1
152		66.3	66.1 66.3 66.2
153		146	146.1
154		144	144.2
155		143	143.2
156		150	150.2
157		152	152.2
158		142	142.4
159		150	150.1
160		142	142.1
161		149	149.2

3.4 Eletroforese de produtos de TRAP-PCR

Os produtos das reações TRAP-PCR foram separados por eletroforese em tampão TAE 1X (0,04 M de Tris-acetato e 1 mM de EDTA 500 mM pH 8,0), utilizando géis de agarose a 2%, contendo 5 µL de Brometo de etídio. A migração dos fragmentos amplificados foi realizada sob voltagem constante de 120 V, durante 1h:30min. A cada reação de 15 µL foi adicionado 1X de tampão de carregamento (0,25% de azul de bromofenol + 40% de sacarose) e aplicados em uma canaleta do gel.

3.5 Identificação de marcadores TRAP

Marcadores TRAP foram identificados como bandas polimórficas, amplificadas por TRAP-PCR a partir dos DNAs do parental e híbridos resistentes e ausentes na amplificação dos DNAs do parental e híbridos suscetíveis, e reveladas no gel sob luz ultravioleta. À presença da banda polimórfica no parental resistente (ausente no suscetível) que segrega nos híbridos, foi atribuído a nota 1 (um), enquanto que a ausência foi atribuído a nota 0 (zero). Os dados foram preenchidos em tabela no Programa Excel e analisados pelo Teste do Qui-quadrado (STELL; TORRIE, 1980). O teste *qui*-quadrado [χ^2 ($p \leq 0,05$, GL=1)] foi utilizado para testar a hipótese de segregação Mendeliana 1:1 esperada para cada um dos marcadores TRAP. Mesmo os marcadores que apresentaram distorção na segregação mendeliana 1:1 estatisticamente foram confrontados com os dados fenotípicos determinados por SIVIERO *et al.* (2006), visando sua introdução no Mapa genético de *P. trifoliata*.

3.6 Mapeamento e Detecção de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) ligados a resistência dos citros a gomose

O mapa de ligação utilizado neste trabalho foi previamente construído para estes mesmos genitores, *C. sunki* e *P. trifoliata* por Cristofani *et al.* (1999). Usando este mapa, os marcadores TRAP foram analisados para QTLs (*loci* de características quantitativas) envolvidos na resistência a gomose de *Phytophthora*, considerando os dados fenotípicos estabelecidos por Siviero *et al.* (2006), confrontando-se dados de marcadores com os dados fenotípicos.

A integração de marcadores TRAPs ao mapa de ligação foi realizada utilizando o programa JoinMap v 3.0 (VAN OOIJEN; VOORRIPS, 2001). Este programa permite análise conjunta de marcadores que segregam nas proporções 1:1, 3:1, 1:2:1 e 1:1:1:1 e estabelece o mapa genético constituído de grupos de ligação de um conjunto de marcadores ligados geneticamente com frequências de recombinação conhecidas. Os critérios usados para estabelecer os grupos de ligação foram $Lod\ score \geq 4$ e a fração de recombinação $\theta = 40$. As frequências de recombinação, estimadas em análises multiponto foram convertidas em distância genética (centiMorgans) através da função de mapeamento Kosambi (KOSAMBI, 1944).

Os QTLs foram mapeados pelo método de mapeamento por intervalo composto (MIC) proposto por Zeng (1994) utilizando o Programa QTLCartographer v.1.25 (BASTEN; WEIR; ZENG, 2000). O MIC utiliza as análises de máxima verossimilhança e regressão linear múltipla aplicada aos marcadores e aos dados fenotípicos para testar a hipótese de que um intervalo entre duas marcas adjacentes contém um QTL afetando a característica, ou seja, se está associada ao caráter em estudo (resistência a gomose), e para testar o efeito de QTLs segregando fora do intervalo avaliado. Assim, sob condições padrões, o MIC foi utilizado em análises de intervalo de 1cM entre marcadores e uma janela de 10cM para possíveis QTLs, com intervalo de significância de $p \leq 0,05$. Em seguida, o Programa gerou uma curva para cada intervalo do mapa, analisado em valores de LOD.

O logaritmo das probabilidades (LOD) é um valor limite determinado pelo teste de hipótese em que se baseia a determinação da presença do QTL no intervalo entre dois marcadores. O LOD crítico de cada QTL foi calculado usando-se o teste de permutação randômica com 1000 repetições (CHURCHILL; DODGE, 1994). Em seguida, o programa gerou gráficos de saída com os dados de distância em cM e valores de LOD ou „*threshold*“ (quando se usa a regressão linear). Normalmente, uma linha de corte reta é traçada, indicando a presença de QTL acima dela, e a posição do QTL no grupo ou mapa analisado é indicada por uma linha ondulada.

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 Identificação de marcadores associados à resistência dos citros a gomose por segregação em grupo

A seleção de 12 combinações de *primers* com *bulk* de DNAs de uma progênie F₁ do cruzamento entre *Poncirus trifoliata* e *Citrus sunki*, levou a identificação de uma combinação de *primers* (SRG1/A6) com marcador TRAP associado à resistência de *P. trifoliata* ao oomiceto *Phytophthora parasitica* (Figura 3). O uso do *primer* fixo SRG1, desenhado dentro do gene SRG1, associado ao *primer* arbitrário 6 (LI; QUEIROS, 2001) revelou um fragmento polimórfico entre os dois *bulks* contrastantes de 04 indivíduos em cada, em que uma marca polimórfica foi amplificada nos genomas do parental resistente (*P. trifoliata*) e no *pool* de híbridos previamente fenotipados como resistentes (SIVIERO *et al.*, 2006). Esta marca está ausente nos genomas do parental suscetível (*C. sunki*) e no *pool* de híbridos classificados como suscetíveis.

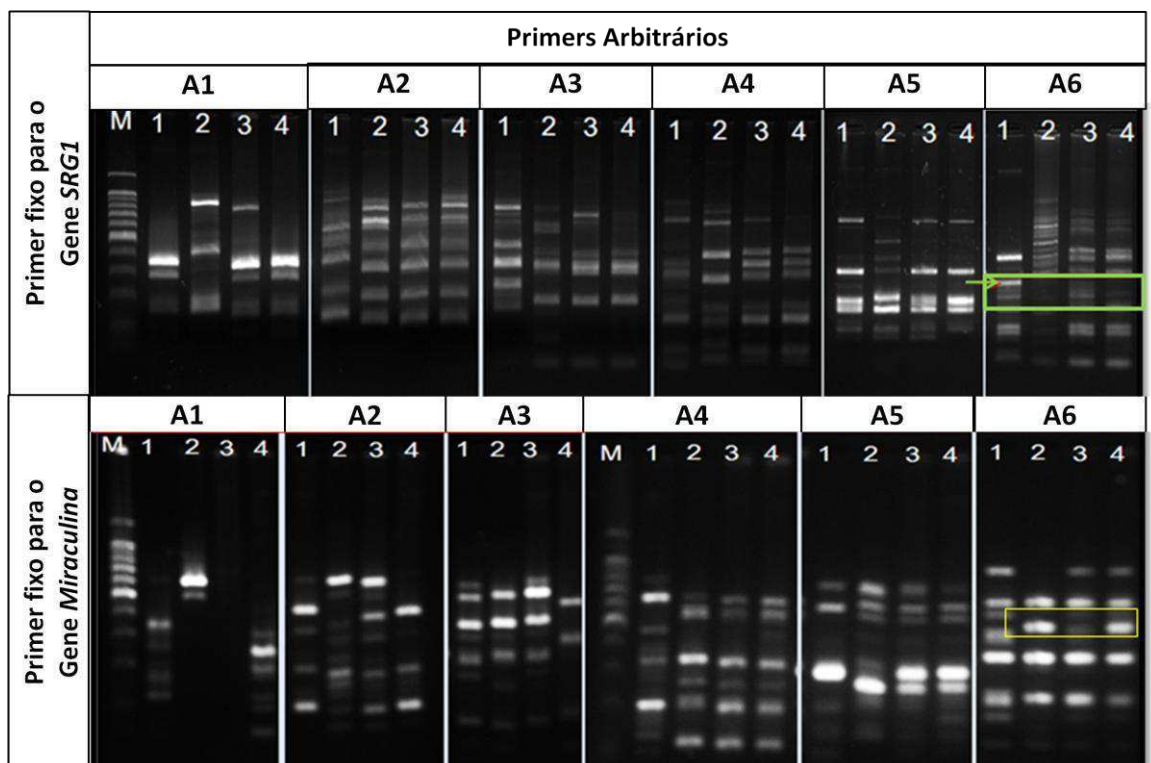


Figura 3. Eletroforese em gel agarose 1,5% de produtos de TRAP-PCR da análise de Segregação em *Bulk*, usando combinações dos *primers* fixos SRG1 (gene SRG1) e Miraculina (gene Miraculina) versus *primers* arbitrários TRAP (A1, A2, A3, A4, A5 e A6). Amostras de DNA: (1) parental resistente (*P. trifoliata*); (2) parental suscetível (*C. sunki*); (3) pool de híbridos resistentes (70, 73, 142, 150); (4) pool de híbridos suscetíveis (19, 47, 105, 148). M: marcador molecular 100 pb Ladder (Axygen).

Além dessa, uma segunda combinação de *primers* (*Miraculin/A6*) foi identificada com um marcador TRAP associado ao genitor suscetível *C. sunki*, que segrega nas progênes fenotipadas como suscetíveis, a qual está ausente em *P. trifoliata* e nas progênes fenotipadas como resistentes. A análise de segregação em *bulk* de DNAs das progênes usando o TRAP-PCR resultou ainda em 4 combinações de *primers* (*SRG1/A1*, *SRG1/A3*, *SRG1/A6*, *Miraculin/A5*) que apresentaram marcas polimórficas nos genitores resistentes, mas que não houve segregação nos híbridos, 2 combinações de *primers* (*SRG1/A5*, *Miraculin/A6*) com polimorfismo de banda no parental suscetível, mas não houve segregação, e 6 combinações de *primers* (*SRG1/A2*, *SRG1/A4*, *Miraculin/A1*, *Miraculin/A2*, *Miraculin/A3*, *Miraculin/A4*) não apresentaram polimorfismo de banda.

A estratégia de segregação em *bulk* proposta por MILCHEMORE *et al.* (1991) consiste na seleção de genótipos contrastantes, reduzindo o tempo, os custos e o trabalho massante de ter que realizar reações com todos os indivíduos da população com cada uma das combinações de *primers* desejadas, para se determinar que em apenas uma delas seria produzido marcador significativo. Associados com uso de marcadores moleculares TRAP-PCR, os *bulks* de DNAs permitiram avaliar um grande número de indivíduos da população em curto prazo, reduzindo o número de amostras autuadas e consequentemente preservando caracteres (alelos) mais frequentes de cada população, por meio do acesso do polimorfismo genético que muitas vezes difere da análise fenotípica.

A associação de *bulks* com marcadores moleculares TRAP levou a identificação de polimorfismo dentro do gene *SRG1*, associando este gene a respostas de defesa de *P. trifoliata* a *P. parasitica* e estabelecendo um padrão molecular entre os híbridos resistentes com o parental resistente. A expressão desse gene *SRG1* em folhas de *P. trifoliata* foi correlacionada com resposta de defesa ao vírus da tristeza dos citros (CRISTOFANI-YALI *et al.*, 2007) e a sequência expressa usada para desenhar o *primer* fixo foi obtida do banco de dados CitEST (<http://biotecnologia.centrodecitricultura.br>) e apresenta homologia com genes relacionados a defesa do grupo PR-10. Uma vez que a resistência de *P. trifoliata* a *P. parasitica* é quantitativa, esta marca presente no *bulk* deve representar um QTL associado à resposta a gomose.

Diferentemente do marcador associado à resistência de *P. trifoliata*, o marcador TRAP identificado no genoma *C. sunki* produziu polimorfismos dentro do gene *Miraculina*. A expressão desse gene *miraculina* em folhas de *P. trifoliata* também foi correlacionada com resposta de defesa ao vírus da tristeza dos citros (CRISTOFANI-YALI *et al.*, 2007). Este

gene codifica uma proteína vegetal que apresenta uma propriedade capaz de modificar o sabor amargo para doce, a qual pode ser de interesse para o melhoramento dos citros visando o sabor dos frutos. Este tipo de glicoproteína é encontrado de forma mais eficiente em frutos de milagre (*Richadella dulcifica*), um arbusto originário da África Ocidental (BACHCHU *et al.*, 2011). Uma vez que este gene foi associado ao caracter suscetibilidade em *C. Sunki*, é preciso estudar a função dele na resposta de suscetibilidade a *P. Parasitica*, a qual pode estar relacionada a proteína alvo do patógeno.

4.2. Genotipagem da população F1 usando marcadores moleculares TRAP-PCR

Um total de 161 indivíduos da população F₁ obtida do cruzamento entre *P. trifoliata* e *C. sunki* foi genotipado usando a combinação de *primers* polimórfica selecionada por meio do *bulk* segregante. Entretanto, a banda polimórfica foi mais bem separada em gel de agarose 2%, produzindo dois fragmentos polimórficos dentro gene *SRG1*, denominados de M76.1 e M76.2 (Figura 4).

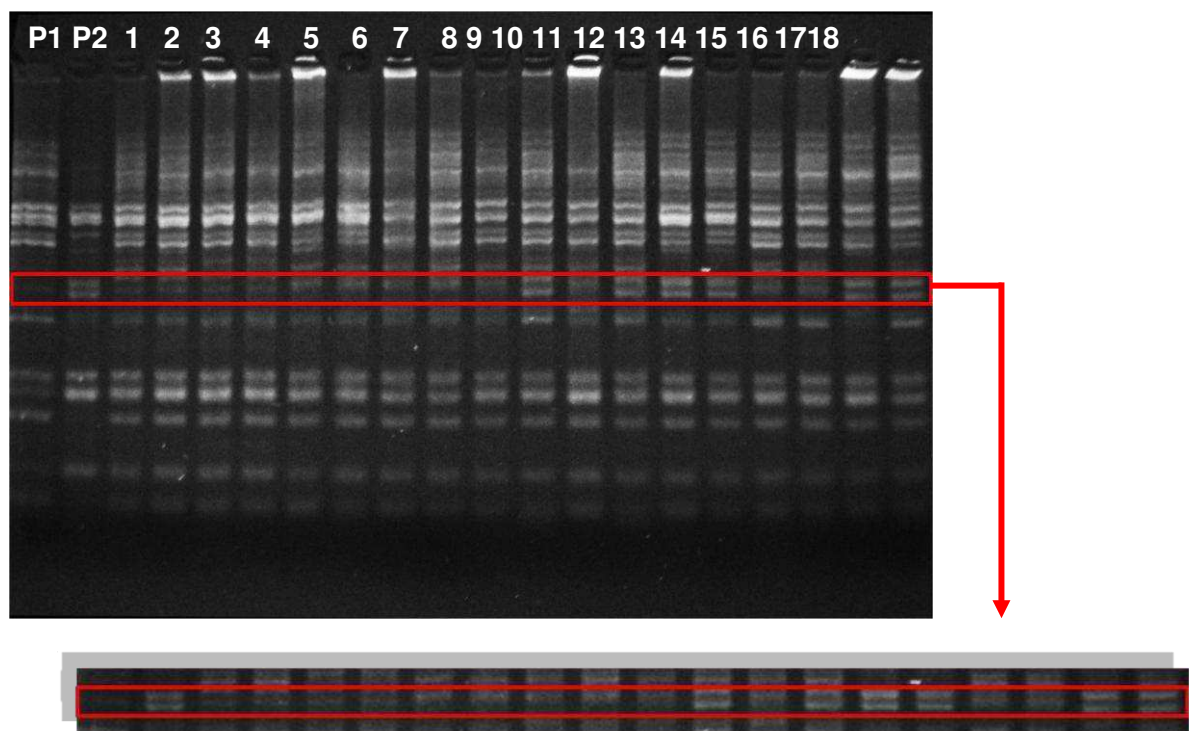


Figura 4. Gel de agarose 2% demonstrativo da amplificação de fragmentos de DNA da genotipagem dos indivíduos da população F₁ usando as combinações de *primers* *SRG1/A6*, ressaltando as duas bandas polimórficas. P1: *P. trifoliata*; P2: *C. sunki*; 1 – 20: híbridos.

Dos 161 indivíduos genotipados, 93 híbridos apresentaram os dois marcadores M76.1 e M76.2, representando 58% dos indivíduos, 13 híbridos apresentaram o marcador M76.1, 36

híbridos apresentaram o marcador M76.2, 12 híbridos não apresentaram nenhum dos dois marcadores, e 7 híbridos não amplificaram, deve ter acontecido devido às diferenças de concentrações e a pureza dos DNAs. Os resultados da genotipagem observados nos géis de agarose foram organizados em planilha eletrônica Microsoft Excel 2007, atribuindo-se o valor 1 para a presença de marca polimórfica e 0 para ausência de marca polimórfica (Tabela 4).

Tabela 4. Identificação de marcadores TRAP em genótipos F1 de *C. sunki* e *P. trifoliata*, atribuindo-se os valores 0 (zero) e 1 (um) para ausência e presença de banda polimórfica, respectivamente.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U
1 Amostras	S	T	1.2	1.3	2.4	2.1	4.4	4.3	5.3	5.2	14.1	14.3	14.4	17.2	17.1	19.3	20.1	26.3	26.4	29.3	
2 M76.1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	
3 M76.2	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
4																					
5 Amostras	29.4	31.3	31.4	35.3	35.4	37.2	37.3	42.2	42.3	49.3	49.4	54.3	54.4	68.3	68.4	70.3	70.4	73.2	73.3	78.3	
6 M76.1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	=	0	0	0	0	1	1	1	1	1	
7 M76.2	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	=	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
8																					
9 Amostras	78.4	90.1	101.3	101.4	102.3	102.4	103.1	105.2	105.3	106.3	106.4	107.1	107.2	108.2	108.3	109.1	110.2	110.4	111.1	111.2	
10 M76.1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	
11 M76.2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	
12																					
13 Amostras	1113.4	114.2	114.3	116.2	117.3	118.4	119	119.4	121.2	123.3	124.3	124.4	125.2	125.3	126.3	126.4	128.3	128.4	129.3	129.4	
14 M76.1	0	1	1	0	0	=	=	1	1	=	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
15 M76.2	1	1	1	0	0	=	=	0	0	=	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
16																					
17 Amostras	130.2	130.3	131.2	131.3	132.4	133.1	134.4	135.3	135.4	136.3	136.4	137.2	137.3	140.2	140.3	141.3	141.4	142.2	142.3	143.3	
18 M76.1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
19 M76.2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
20																					
21 Amostras	143.4	144.3	144.4	145.2	145.1	146.3	146.4	147.2	147.3	148.2	148.3	149.3	149.4	150.3	150.4	151.4	152.1	152.3	154.2	154.1	
22 M76.1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	
23 M76.2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
24																					
25 Amostras	155.1																				
26 M76.1	0																				
27 M76.2	0																				

4.3 Identificação de QTIs associados a resistência dos citros a gomose de *Phytophthora parasítica*

Dos 2 marcadores TRAP usados na genotipagem da progênie F₁ em estudo, apenas o marcador M76.2 foi integrado ao mapa genético de *P. trifoliata*, por apresentar os padrões de segregação mendeliana e caracteres fenotípicos esperados. Usando o programa JoinMap v 3.0 (VAN OOIJEN; VOORRIPS, 2001), o mapa de ligação foi construído para o marcador M76.2 juntamente com vários outros marcadores associados a resistência de *P. trifoliata* a gomose, analisados no Laboratório de Biotecnologia do Centro APTA de Citros Sylvio Moreira, em Cordeirópolis, os quais foram agrupados no grupo de ligação C4 (Figura 5).

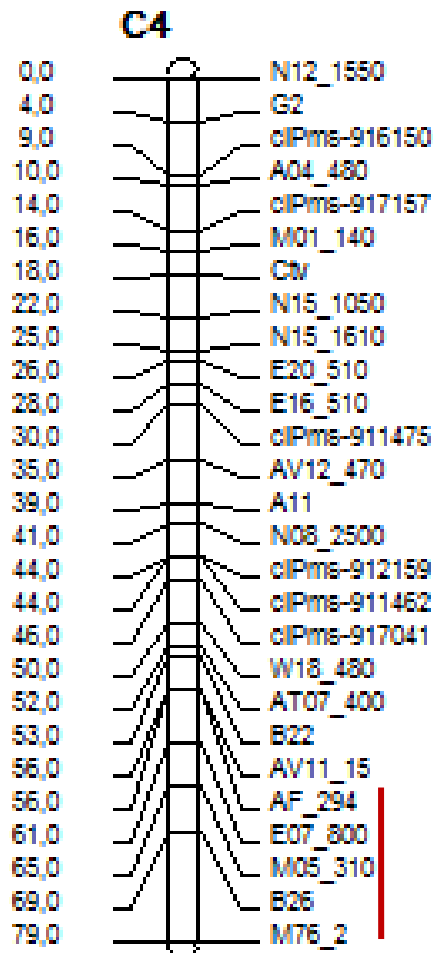


Figura 5. Mapa de ligação de *Poncirus trifoliata* com 26 marcadores no total em um grupo de ligação, indicando o marcador TRAP deste trabalho, identificado como M76_2. Os QTLs estão destacados em vermelho.

A detecção de QTLs ligado a gene *SRGI* e associado à resistência a gomose dos citros, realizada com o auxílio do programa QTLCartographer, foi identificada pela presença do pico do LOD entre 71 e 79 centimorgans e a posição do marcador M76_2 no grupo de ligação, em 79 cM no intervalo de 8 cM em LOD > 1,6 (Figura 6). Na coordenada vertical está a escala de valores do LOD para o grupo de ligação analisado. E na coordenada horizontal está a representação do grupo de ligação „cromossomo“ e as distâncias dos marcadores em centimorgans. A Linha horizontal indica o valor do „LOD score“ limite de significância estatístico do grupo de ligação. A região a cima do limite „LOD score“ é considerado QTL, este ligado a um marcador. Na ordenada está disposta a escala dos valores do LOD para cada grupo de ligação analisado.

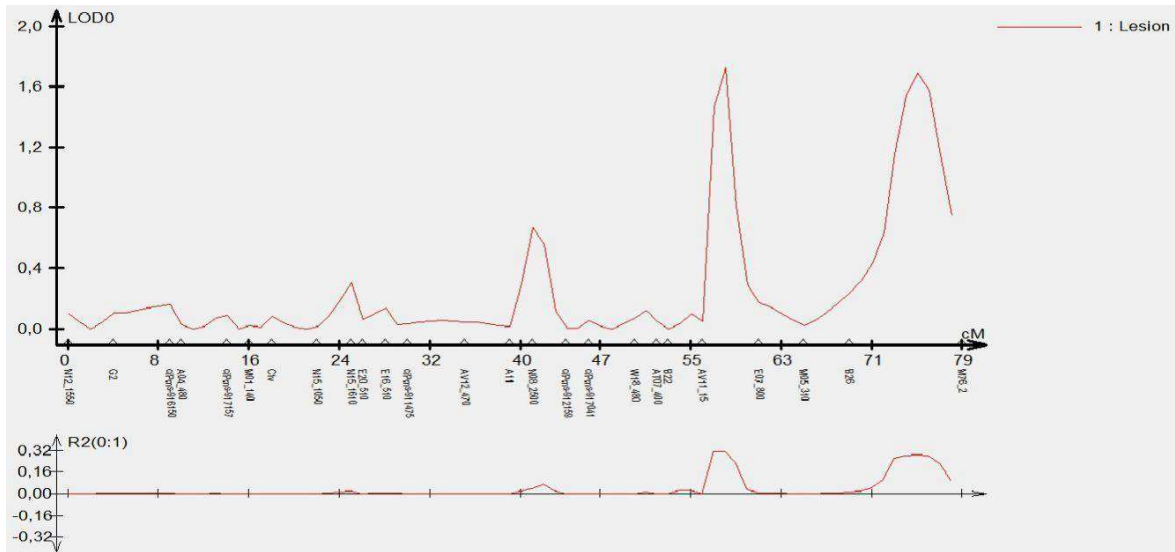


Figura 6. Análise do grupo de ligação C4 do mapa de *Poncirus trifoliata* „Rubidouxx“ indicando a presença de QTL entre 71 e 79 centiMorgans e a posição do marcador M76_2 (LOD > 1,6).

Siviero (2001) também detectou 4 QTLs associados a resistência a *Phytophthora parasitica*, sendo 3 QTLs localizados nos grupos de ligação de *P trifoliata*, I, II, V, sendo responsáveis por 14, 60 e 18% da variação fenotípica, respectivamente. O mapeamento QTLs tem sido uma ferramenta importante no melhoramento genético, que possibilitará detectar regiões do genoma responsável pela expressão de caracteres de importância agrônômica desejáveis. A introdução deste marcador ao mapa genético de *Poncirus trifoliata* vem contribuir para a saturação de informações associadas a resistência dessa espécie a doenças, bem como para a elucidação de genes e da posição dos mesmos nos cromossomos. Estes resultados terão impacto positivo no programa de melhoramento genético dos citros.

CONCLUSÕES

- A estratégia de análise de segregação em *bulk* foi eficiente para identificar marcadores polimórficos na população contrastante para resistência e suscetibilidade.
- Marcadores TRAP são eficientes para genotipagem de populações de citros e para identificação de QTL ligado ao gene *SRGI* associado à resistência a gomose.
- Contribuindo para controlar o caráter resistência a gomose em *P. trifoliata* está um QTL localizado no grupo de ligação C4.
- Apesar do mapeamento genético de citros e a identificação de QTLs, é necessária a avaliação de novas combinações de *primers* (fixos/arbitrário) para geração de marcadores TRAP para a saturação do mapa genético com a estimativa cada vez mais acurada.

REFERÊNCIAS

- ALWALA, S.; SUAN, A.; ARRO, J.A.; VEREMIS, J.C.; KIMBENG, C.A. Target region amplification polymorphism (TRAP) for assessing genetic diversity in sugarcane germplasm collections. **Crop Science**, v.46, p. 448-455, 2006.
- BACHCHU, M. A.; JIN, S. B.; PARK, J-W.; BOO, K-H.; SUN, H-J.; KIM, Y-W.; LEE, H-Y.; RIU, K-Z; KIM, J-H. Functional expression of miraculin, a taste-modifying protein, in transgenic miyagawa wase satsuma mandarin (*Citrus unshiu* marc.). **J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.** p. 24-29. 2011.
- BASTEN, C.J.; WEIR, B.S.; ZENG, Z.B. *QTL Cartographer*. A reference manual and tutorial for QTL mapping. Version 1.14, Raleigh:Department of Statistics, North Caroline State University, p. 139. 2000.
- BOAVA, L. P. **Estabilidade de QTLs ligados à resistência dos citros a gomose, causada por *Phytophthora parasítica***. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP, 2004.
- BOAVA, L. P.; SIVIERO, A.; MASUDA, Y.; FURTADO, E. L.; MACHADO, M. A. Resistência de citrandarins e citranges a *phytophthora parasítica*. **Laranja**, Cordeirópolis, v.24, n.1, p.135-144, 2003
- BRAMMER, S.P. Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal. Documentos online, **Embrapa**, 2000.
- CARNEIRO, M.S.; VIEIRA, M.L.C. Mapas genéticos em plantas. **Bragantia**, v.61, p.89-100, 2002.
- CARVALHO, M.L.T. **Reação de porta-enxertos híbridos de citros à infecção de tronco e raízes por *Phytophthora parasítica***.(Doutorado). Universidade Estadual de Campinas. SP, 2000.
- CERVERA, M.T., GUSMÃO, J., STEENACKERS, M., PELEMAN, J., STORME, V., VANDEN BROECK, A., VAN MONTAGU, M., BOERJAN, W. Identification of AFLP molecular markers for resistance against *Melampsora larici-populina* in *Populus*. **Theor. Appl. Genet.**, v.93, p.733-7. 1996.
- CHURCHILL, G.A.; DODGE, R.W. Empirical threshold values for quantitative values for quantitative trait mapping. **Genetics**, v.138, p.963-971, 1994.
- CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A.; GRATTAPAGLIA, D. Genetic linkage maps of *Citrus sunki* Hort. Ex. Tan. And *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. and mapping of Citrus tristeza virus resistance. **Euphytica**, Wageningen, v.109, p.25-32, 1999.
- CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A.; NOVELLI, V.M; SOUZA, A.A.; TARGON, M.L.P.N. Construction of linkage maps of *Poncirus trifoliata* and *Citrus sunki* based on microsatellite markers. **Proceedings. Acireale: International Society of Citriculture**, v.1, p.175-178, 2000.

- CRISTOFANI, M.; NOVELLI, V. M.; PERIN, M. S.; OLIVEIRA, A. C.; OLIVEIRA, R. P.; BASTIANEL, M.; MACHADO, M. A. Programa de melhoramento de citros por hibridação controlada no centro apta citros “Sylvio Moreira”/IAC em 1997–2005. **Laranja**, Cordeirópolis, v.26, n.1, p.121-134, 2005.
- CRISTOFANI-YALI, M.; BERGER, I J.; TARGON, M. L. P. N.; Takita, M. A.; DORTA, S. O.; ASTÚA, J.F.; SOUZA, A. A.; CAMARGO, R. L.; REIS, M. S.; MACHADO, M. A. Differential expression of genes identified from *Poncirus trifoliata* tissue inoculated with CTV through EST analysis and in silico hybridization. **Genetics and Molecular Biology**. p. 972-97, 2007.
- DENG, Z., HUANG, S.Y., XIAO, S., GMITTER, C.M. Development and characterization of SCAR markers linked to the citrus tristeza virus resistance gene from *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. **Genome**, v.40, p.697-704, 1997.
- FARIA, L. M. **Mapeamento genético e detecção de qtls em um cruzamento de limão „cravo“ e citrumelo „swingle“**. Dissertação (Mestrado), Instituto Agrônomo, Campinas, SP, 2007.
- FEICHTENBERGER, E. Doenças induzidas por fungos do gênero *Phytophthora* em citros e seu controle. **Laranja**, Cordeirópolis, v.10, n.2, p.359-378. 1989.
- FERREIRA, A. Mapeamento genético utilizando marcadores moleculares com distorção de segregação gamética e genotípica. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa: UFV, p. 132 2006.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, p. 220. 1996.
- GMITTER Jr. F.G.; XIA, S.Y.; HUANG, S.; HU, X.L.; GARNSEY, S.M. A localized linkage map of the citrus tristeza virus resistance gene region. **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, p.688-695, 1996.
- GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, v.137, p.170-177, 1994.
- HU, J.; OCHOA, O.E.; TRUCO, M.J.; VICK, B.A. Application of the TRAP technique to lettuce (*Lactuca sativa* L.) genotyping. **Euphytica**, v.144, p.225–235, 2005.
- HU, J.; SEILER, G.J, JAN, C.C.; VICK, B.A. Assessing genetic variability among sixteen perennial *Helianthus* species using PCR-based TRAP markers. **Proceedings. 25th Sunflower Research Workshop**, p.16-17, 2003.
- HU, J.; VICK, B.A. Target Region Amplification Polymorphism: A Novel Marker Technique for Plant Genotyping. **Plant Molecular Biology**, v.21, p.289-294, 2003.
- HUTCHISON, D.J. Rootstocks development screening and selection for disease tolerance and horticultural characteristics. **Fruit Var. J.**, v.39, p.21-5, 1985.

- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201110.pdf. Acesso em: 14 de novembro de 2011.
- JANSEN, R.C. A general mixture model for mapping quantitative trait loci by using molecular markers. **Theoretical Applied Genetics**, v.85, p.252-260. 1992.
- JANSEN, R.C. A general monte Carlo method for mapping multiple quantitative trait loci. **Genetics**, v.192, p.305- 311, 1996.
- JOSHI, S.P.; RANJEKAR, P.K.; GUPTA, V.S. Molecular markers in plant genome analysis. **Current Science**, v.77, n.2, p.230-240, 1999.
- JUNIOR, A.S. **Obtenção de plantas autotetraplóides de variedades de porta-enxertos de citros**. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, SP, 2008.
- LANDER, E. S; BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, Austin, v.121, p. 185 – 199, 1989
- LAPERUTA, L. D. C. **Estudo de uma população segregante (F₁) de maracujá-doce: enriquecimento do mapa de ligação e mapeamento QTL para produção e qualidade de frutos**. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, SP, 2011.
- LAVILLE, E. Reflexions sur la nature des relations hôte-parasite dans le couple agrumes-*Phytophthora* spp. **Fruits**, v.30, n.1, p.19-22, 1975.
- LI, G.; QUIROS, C.F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. **Theoretical Applied Genetics**, v.103, p.455-461, 2001.
- LIMA, B. M. **Mapeamento de locos de resistência quantitativa a *Puccinia psidii* Winter em uma progênie de irmãos completo de eucalipto**. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2009.
- LING, P., DUNCAM, L.W., DENG, Z., DUNN, D., HU, X., HUANG, S., GMITTER, F.G. Inheritance of citrus nematode resistance and its linkage with molecular markers. **Theor. Appl. Genet.**, v.100, p.1010-7, 2000.
- LIU, B.H. **Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis**. Boca Raton: CRC Press, p. 611. 1998.
- LIU, D.H.; KNAPP, S.J. **Gmendel 2.0: a software for gene mapping**. Oregon State University, 1992.
- LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative**. Sunderland: Sinauer, p. 980. 1998
- MACHADO, M.A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A.M.; OLIVEIRA, A.C. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: MATTOS Jr. D.; NEGRI, J.D; PIO, R.M; POMPEU Jr. J. (eds). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, 2005.

MALIEPAARD, C.; JANSEN, J.; OOIJEN, J.W.V. Linkage analysis in a full-sib family of an outbreeding plant species : overview and consequences for applications. **Genetics Research Cambridge**, v.70, p.237-250, 1997.

MARENGO, S. **mapeamento genético de tangerina Sunki e *Poncirus trifoliata* para resistência ao *huanglongbing* (greening) dos citros**. Dissertação (Mestrado), Instituto Agrônômico, Campinas, SP, 2009.

MESTRE, P.F., ASINS, M.J., PIA, J.A., CARBONELL, E.A., NAVARRO, L. Molecular markers flanking citrus tristeza virus resistance gene from *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.. **Theor. Appl.Genet.**, v.94, p.458-64, 1997.

MICHELMORE, R.W., PARAN, I., KESSELY, R.V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregation populations. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.88, p.988-92, 1991.

MIKLAS, P.N.; HU, J.; GRUNWALD, N.J.; LARSEN, K.M. Potential application of TRAP (Targeted Region Amplified Polymorphism) markers for mapping and tagging disease resistance traits in common bean. **Crop Science**, v.46, p. 910- 916, 2006.

MOURÃO, F.A.A. Produção de Híbridos somático em Citros”. Revista: **Laranja**, Cordeirópolis, v.17, n.1, p.179-197, 1996.

NJOKA, F.M.; OKWANY, Z.A.; GITHUI, E.K.. Molecular genotyping of selected soybean (*Glycine max* L.) genotypes grown in different regions of East Africa. **African Journal of Plant Science** v. 4, p. 128-134. May 2010.

Normas de Classificação de Citros de Mesa. São Paulo, SP. **CEAGESP**, Agosto 2011.

OLIVEIRA, R.P.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A. Genetic linkage maps of „Pera“ sweet orange and „Cravo“ mandarin with RAPD markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.2, p.159-165, 2004.

QUARRIE, S.A.; LAZIC –JANCIC, V.; KOVAC EVIC, D.; STEED, A.; PEKIC, S. Bulk segregant analysis with molecular markers and its use for improving drought resistance in maize. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, n. 337, p. 1299–1306. August 1999.

RITTER, E.; GEBHARDT, C.; SALAMINI, F. Estimation of recombination frequencies and construction of RFL linkage maps in plants from crosses between heterozygous parents. **Genetics**, Bethesda, v. 125, p.645-654, 1990.

ROOSE, M.L.; JARRELL, D.C.; KUPPER, R.S. Genetic mapping in a *Citrus x Poncirus* F2 population. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, v.7, p.210-213. 1992.

SASSERON, G.R. **Desenvolvimento e validação de diagnóstico molecular de fungos patogênicos a citros**. Dissertação (Mestrado), Instituto Agrônômico, Campinas, SP, 2008.

SHEA, S.R., BROADBENT, P. Developments in cultural and biological control of *Phytophthora* diseases. In.: ERWIN, D.C. (Coord.). **Phytophthora, its biology, taxonomy, ecology and pathology**. St. Paul: American Phytopathological Society, p.335-50. 1983.

SILVA, K. S.; REBOUÇAS, T. N. H.; BOMFIM, M. P.; SILVA, D. S.; ABEL José, R. S.; BENETT, C. G. S. Atividade antagônica *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. ao fungo *Phytophthora citrophthora*. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 749-754, out./dez. 2008.

SILVA, L. C. **Estratégias de condução de população segregantes no melhoramento genético do feijoeiro**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, MG, 2009.

SILVA, R.A, AGRA, A.C, ALEIXO, D.L, NOBREGA, V. R., DANTAS, E. A. Situação econômica e produtiva da cultura dos citros no estado da Paraíba. **Revista Verde**, Mossoró, RN. v.6, n.3, p. 39 - 48 julho/setembro de 2011.

SIVIERO, A. **Avaliação de métodos de inoculação de *Phytophthora parasitica* e mapeamento de QTLs de resistência em híbridos de *Citrus sunki* vs. *Poncirus trifoliata* à gomose**. Tese (Doutorado), Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, 2001.

SIVIERO, A.; CRISTOFANI, M.; BOAVA, L.P.; MACHADO, M.A. Mapeamento de QTLs associados a produção de frutos e semente em híbridos de *Citrus sunki* vs. *Poncirus trifoliata*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, p.741-743, 2002.

SIVIERO, A.; CRISTOFANI, M. FURTADO, E.L.; GARCIA, A.A.F.; COELHO, A.S.G.; MACHADO, M.A. Identification of QTLs associated with citrus resistance to *Phytophthora gummosis*. **Journal of Applied Genetics**, v.47, n.1, p.23-38, 2006.

SOUZA, L. B. **Mapeamento genético de híbridos intraespecíficos de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], obtidos por cruzamentos controlados**. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, SP, 2010.

STAM, P. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: Joinmap. **The Plant Journal**, v.5, p.739-744, 1993.

STELL, R.G.D; TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics. A biometrical approach**. 2 ed. McGraw-Hill Book Co., New York, 1980.

SUITER, K.A.; WENDEL, J.F.; CASE, J.S. Linkage-1: a PASCAL computer program for the detection and analysis of genetic linkage. **The Journal of Heredity**, v.74, n.3, p.203-204, 1983.

SWINGLE, W.T. The botany of Citrus and its relatives in the orange subfamily. In: WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (eds.). **The citrus industry**. Berkeley and Los Angeles: University of California Press, v.1, p.128-474, 1943.

SWINGLE, W.T.; REECE, P.C. The botany of citrus and its wild relatives. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (eds.). **The citrus industry**. Berkeley and Los Angeles: University of California, v.1, p.190-430, 1967.

TANKSLEY, S.D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics**, v.27, p.205- 233, 1993.

VAN OOIJEN J.W.; VOORRIPS, R.E. JoinMap version 3.0: software for the calculation of genetic linkage maps (software). Wageningen. **Plant Research International**, p.51, 2001.

WILLIAMS, J.G.K., M.K. HANAFEY, J.A. RAFALSKI, S.V. TINGEY. Genetic analysis using random amplified DNA markers. In: R. WU, R. (Ed.) **Methods in enzymology, recombinant DNA**. San Diego:Academic Press, p.218-28. 1993.

ZENG, Z.B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, v.136, p.1457-68, 1994.

ZENG, Z-B. Theoretical basis of separation of multiple linked gene defects on mapping quantitative trait loci. **Proceedings of the National Academy Scienc**, Washington, v. 90, p10972 -1976. 2003.