

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE  
CAMPUS DE CUITÉ

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES DO TIPO  
TRAP (“TARGET REGION Amplification POLYmorphism”)  
EM HÍBRIDOS DE *Poncirus trifoliata* E *Citrus sunki***

CUITÉ - PB

2010

MPCC/BIOLIVTECA

JONATHAS DIEGO LIMA SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES DO TIPO  
TRAP (“TARGET REGION Amplification POLYmorphism”)  
EM HÍBRIDOS DE *Poncirus trifoliata* E *Citrus sunki***

Monografia apresentada ao Curso de Biologia da  
Universidade Federal de Campina Grande como  
forma de obtenção do Grau de Licenciado.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Magnólia de Araújo Campos.

CUITÉ - PB

2010



Biblioteca Setorial do CES.

Junho de 2021.

Cuité - PB

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE  
Responsabilidade Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

S237i Santos, Jonathas Diego Lima.

Identificação de marcadores moleculares do tipo TRAP (*Target region amplification polymorphism*) em híbridos de *Poncirus trifoliata* e *citrus sunki*. / Jonasthas Diego Lima Santos – Cuité: CES, 2010.

37 fl.

**Monografia (Curso de Licenciatura em Biologia) – Centro de Educação e Saúde – UFCEG, 2010.**

Orientadora: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Magnólia de Araújo Campos.

1. Biologia molecular. 2. Marcadores moleculares. 3. Citros - melhoramento. I. Título.

CDU

575

JONATHAS DIEGO LIMA SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES DO TIPO  
TRAP (“TARGET REGION Amplification POLYmorphism”)  
EM HÍBRIDOS DE *Poncirus trifoliata* E *Citrus sunki***

Monografia apresentada ao Curso de Biologia da UFCG/Campus de Sumé, para obtenção do grau de Licenciatura em Biologia.

Aprovada em \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

BANCA EXAMINADORA

  
Prof<sup>ª</sup> Dra. Magnólia de Araújo Campos (Orientadora)

  
Prof Dr. Marcus José Conceição Lopes

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Flávio Henrique Vasconcelos Medeiros

UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Aos meus pais  
Maria do Socorro (*in memoriam*) e  
Paulo Augusto  
A minha esposa  
Pelo amor e apoio

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, por me contemplar em sabedoria e inteligência e permitir saúde e capacidade de chegar a esta etapa da vida.

Ao Centro de Educação e Saúde (CES), Campus de Cuité da UFCG, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e ao Dr. Marcos Antonio Machado, pesquisador do Centro APTA de Citros Sylvio Moreira, Cordeirópolis SP, pela concessão de bolsa nível AT-NM no âmbito do projeto INCT dos Citros.

A minha orientadora, Profa. Dra. Magnólia de Araújo Campos, por sua disposição e contribuição imprescindível na realização deste trabalho e pelos ensinamentos transmitidos.

À Dra. Mariângela Cristofani, pesquisadora do Centro APTA de Citros Sylvio Moreira, pela sua colaboração efetiva e preciosa.

À EMBRAPA Algodão, através da pesquisadora Dra. Liziane Lima, por permitir a realização de parte substancial deste trabalho em suas dependências.

Aos técnicos Antônio e Fabiana do Laboratório de Biotecnologia da EMBRAPA Algodão pela boa vontade e contribuição na realização de parte deste trabalho.

Aos meus professores do CES, que foram responsáveis por minha formação acadêmica.

À técnica dos Laboratórios de Biologia do CES, Jacqueline Mendes, pelo apoio e boa vontade em todos os momentos.

Aos meus colegas de turma, pela agradável convivência e aprendizado juntos.

À minha esposa, a quem amo muito, por está sempre ao meu lado compartilhando dos mesmos sonhos com amor, carinho, atenção e palavras motivadoras quem me fazem seguir em frente.

Aos meus familiares que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste curso.

11/01/2017

## EPIGRAFE

*Ao começar uma jornada, o indivíduo nunca saberá se vai alcançar seus objetivos; nesta caminhada há possibilidades de cair, porém, a grande virtude é a coragem de se erguer e seguir em frente, nunca desistir. Entretanto, ao terminar uma caminhada não há prazer maior que se compare àquele momento. As dificuldades são esquecidas e logo após a euforia, novas metas são traçadas e o ser humano recomeça sua jornada.*

Toda boa dádiva e todo dom perfeito são lá do alto, descendo do Pai das luzes, em quem não pode existir variação ou sombra de mudança (Tiago 1.17).

## RESUMO

A citricultura brasileira enfrenta sérios problemas e perdas devido ao grande número de doenças causadas por patógenos. Considerando-se que a resistência genética é um importante componente de estratégias integradas para controlar doenças em plantas, por ser eficiente, baixo custo para o produtor, benéfica ao homem e ao meio ambiente, programas de melhoramento dos citros buscam aumentar a produtividade pelo uso de estratégias genéticas de controle de doenças. Durante o desenvolvimento de novas variedades, melhoristas têm incorporado a seleção assistida por marcadores, na detecção de genes que estejam associados com a resistência a doença. Um novo e eficiente sistema de marcadores moleculares, o TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*), baseado em PCR, usa ferramentas de bioinformática e informações de banco de dados de ESTs para gerar marcadores polimórficos ao redor de possíveis seqüências de genes candidatos. Neste sentido, o maior banco de dados de genoma expresso dos citros do mundo, o CitEST, gerado no Brasil, representa uma poderosa ferramenta para auxiliar o programa de melhoramento dos citros, uma vez que possui genes expressos de todas as espécies consideradas citros (11 espécies) sob genótipos e condições contrastantes, tais como resistente *versus* suscetível, induzido *versus* não induzido por patógenos. Neste contexto, este trabalho descreve a identificação de marcadores TRAPs amplificados por primers fixos, desenhados a partir de genes associados com a resistência a CTV (vírus da tristeza dos citros), usando DNAs de indivíduos da progênie F1 do cruzamento de *Poncirus trifoliata* com Tangerina Sunki (*Citrus sunki*), parentais resistente e suscetível a doenças, respectivamente. De um total de 8 combinações de “primers” arbitrário/fixos testadas, 2 combinações apresentaram polimorfismo, gerando um total de 4 marcas e um número médio de marcadores por par de “primer” no valor de 2. O teste de Qui-quadrado, aplicado individualmente aos marcadores TRAPs, revelou que 100% dos marcadores identificados segregam na proporção Mendeliana 1:1. Portanto, estes marcadores poderão ser introduzidos no mapa de ligação de *P. trifoliata*. Os marcadores obtidos poderão ainda ser usados na genotipagem de todos os indivíduos da referida população F1.

**Palavras chaves:** Citros; PCR, CitEST; marcadores moleculares; melhoramento dos citros

## ABSTRACT

The Brazilian citrus industry faces serious problems and losses due to the large number of diseases caused by pathogens. Considering that the genetic resistance is an important component of integrated strategies to control plant diseases, because it is efficient, low cost to the producer, beneficial to man and the environment, the citrus breeding programs seek to increase productivity by using genetic strategies for disease control. Durante o desenvolvimento de novas variedades, melhoristas têm incorporado a seleção assistida por marcadores, na detecção de genes que estejam associados com a resistência a doença. A new and efficient system of molecular markers, TRAP (Target Region Amplification Polymorphism) based on PCR, using bioinformatics tools and information database of ESTs to generate polymorphic markers around the possible sequences of candidate genes. In this sense, the largest database of expressed genome of citrus in the world, CitEST generated in Brazil, represents a powerful tool to help the citrus breeding program, since it has all the genes expressed in citrus species considered (11 species) and genotypes under contrasting conditions, such as resistant versus susceptible induced versus not induced by pathogens. In this context, this paper describes the identification of markers amplified by primers TRAPS fixed, designed from genes associated with resistance to CTV (citrus tristeza virus), using DNA from individuals of the F1 progeny from the crossing of *Poncirus trifoliata* with Sunki (*Citrus sunki*), parental susceptible and resistant to disease, respectively. Of a total of 08 combinations of primers arbitrário / fixed tested 02 combinations showed polymorphism, generating a total of 04 marks and an average number of markers per pair of primer on the value of 2. The Chi-square applied to individual markers traps, revealed that 100% of the identified markers segregate in Mendelian 1:1 ratio. Therefore, these markers may be placed on the linkage map of *P. trifoliata*. These markers may also be used in the genotyping of all individuals of that population F1.

**Palavras chaves:** Citrus; PCR, CitEST; molecular markers; citrus breeding

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Morfologia de plantas cítricas .....	18
FIGURA 2	Eletroforese em gel de agarose 2% de fragmentos amplificados por TRAP-PCR usando a combinação de primers PA1/R5. P1, Trifoliata; P2, Sunki. Híbridos, 1-10, respectivamente: (1) 1.2/ 1.3; (2) 2.4/ 2.1; (3) 4.4/ 4.3; (4) 5.3/ 5.2; (5) 14.1/ 14.3/ 14.4; (6) 17.2/ 17.1; (7) 19.3/ 19.2; (8) 20.1; (9) 23.3/ 23.4; (10) 24.3/ 24.4 .....	29
FIGURA 3	Eletroforese em gel de agarose 2% de fragmentos amplificados por TRAP-PCR usando a combinação de primers PA1/PR3. P1, Trifoliata; P2, Sunki. Híbridos, 1-10, respectivamente: (1) 1.2/ 1.3; (2) 2.4/ 2.1; (3) 4.4/ 4.3; (4) 5.3/ 5.2; (5) 14.1/ 14.3/ 14.4; (6) 17.2/ 17.1; (7) 19.3/ 19.2; (8) 20.1; (9) 23.3/ 23.4; (10) 24.3/ 24.4 .....	29
FIGURA 4	Eletroforese em gel de agarose 2% de fragmentos amplificados por TRAP-PCR usando as combinações de “primers” PA1/F5 (A), PA1/F7 (B) e PA1/R4 (C). P1, Trifoliata; P2, Sunki. Híbridos, 1-10, respectivamente: (1) 1.2/ 1.3; (2) 2.4/ 2.1; (3) 4.4/ 4.3; (4) 5.3/ 5.2; (5) 14.1/ 14.3/ 14.4; (6) 17.2/ 17.1; (7) 19.3/ 19.2; (8) 20.1; (9) 23.3/ 23.4; (10) 24.3/ 24.4 .....	30

INSTITUTO FEDERAL DE RORAIMA  
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS  
 LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Identificação dos genótipos de parentais e híbridos de <i>Poncirus trifoliata</i> e <i>Citrus sunki</i> utilizados nas reações de TRAP-PCR .....	25
TABELA 2	Seqüências dos “primers” fixos e arbitrários utilizados para amplificar marcadores TRAPs nos híbridos de <i>C. sunki</i> e <i>P. trifoliata</i> .	26
TABELA 3	Combinações de “primers” fixos e arbitrários utilizadas para amplificar marcadores TRAPs nos híbridos de <i>C. sunki</i> e <i>P. trifoliata</i> .	26
TABELA 4	Características dos Marcadores TRAPs selecionados no presente trabalho usando 10 híbridos F <sub>1</sub> de <i>C. sunki</i> x <i>P. trifoliata</i> .....	28
TABELA 5	Seqüência dos marcadores polimórficos com base na sua presença (valor 1) ou ausência (valor 0) .....	31
TABELA 6	Segregação dos Marcadores TRAPs em 10 indivíduos da progênie F <sub>1</sub> e teste de homogeneidade para segregação esperada 1:1 .....	31



**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

CitEST	Banco de dados de segmentos de seqüências expressas de citros
ESTs	Do inglês, <i>Expressed Sequence Tags</i> , segmentos de seqüências expressas
TRAP	Do inglês, Polymorfism amplification region targeted
PCR	Do inglês, Polimerase chain Reaction
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
CDSA	Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido
CES	Centro de Educação e Saúde
UFMG	Universidade Federal de Campina Grande
EMBRAPA Algodão	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro do Algodão

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE TABELAS .....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	x
1 INTRODUÇÃO .....	14
Objetivo Geral .....	15
Objetivos Específicos .....	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	17
2.1 Os Citros .....	17
2.2 Importância dos Citros .....	18
2.3 Melhoramento genético dos citros visando resistência a patógenos .....	19
2.4 Seleção de híbridos de interesse por marcadores .....	21
2.5 Marcadores TRAPs ( <i>Targed Region Amplification Polymorphisms</i> ) .....	22
3 METODOLOGIA .....	24
3.1 Identificação dos genótipos vegetais .....	24
3.2. Descrição dos primers usados .....	25
3.3 TRAP-PCR: Polimorfismo de amplificação de região alvo (TRAP) por meio de Reações em cadeia da polimerase (PCR) .....	26
3.4 Eletroforese dos produtos de TRAP-PCR .....	27
3.5 Análise dos Dados .....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	28
4.1 Identificação de marcadores moleculares do tipo TRAP em híbridos de <i>Poncirus</i>	

<i>trifoliata</i> e <i>Citrus sunki</i> .....	28
5 CONCLUSÕES .....	34
6 REFERÊNCIAS .....	35

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se como maior produtor e exportador de suco concentrado no mercado mundial, sendo esta a maior ‘commodity’ agrícola brasileira, com produção concentrada no Estado de São Paulo, onde se encontram cerca de 85% da produção de laranjas (19,8 milhões t; 700 mil ha), limão Tahiti e tangerinas, como a Ponkan e o tangor Murcott (1,5 milhão t). Dados do IBGE (2002) confirmam que a Paraíba com uma área colhida de 1.028 hectares de tangerina, foi o maior produtor do Nordeste. Já, em 2003, com 1.049 hectares, foi responsável por 1,5% da produção de tangerina e o maior produtor do Nordeste (IBGE, 2003). Em 2004, com uma área colhida de 1.122 hectares, lidera o ranking como maior produtor de tangerina do Nordeste (IBGE, 2004).

Com o conhecimento das qualidades nutricionais, a demanda para o suco cítrico tem crescido. No mercado interno, além do consumo da fruta, destaca-se a demanda de laranjas, tangerinas e limões para o preparo de suco fresco. Para o Tahiti e o Galego, junto com o uso culinário dá-se também o consumo misturado à cachaça no preparo da “caipirinha”. Entretanto, a produção de citros *in natura* para o mercado interno e externo, tem se destacado pela crescente necessidade da melhoria da qualidade dos frutos, particularmente pela minimização de efeitos negativos causados por doenças e pragas, os quais geram elevadas perdas no viveiro, no campo e na indústria.

Os citros sofrem com mais diversos tipos de doenças, por exemplo, Clorose Variegada dos Citros (CVC), Morte súbita dos Citrus (MSC), Tristeza dos Citros, Mosca negra dos Citros, Gomose, entre outras que precisam ser combatidas. Em virtude do uso de agroquímicos encarecerem o produto comercializado e causarem danos ao meio ambiente e ao homem, a sociedade busca por alternativas que sejam sustentáveis e amigáveis ao ambiente e ao ser humano. Neste sentido, o uso de plantas de citros com resistência genética a doenças representa a estratégia mais atrativa para o agronegócio dos citros. Entretanto, a obtenção de genótipos elites dos citros que combinem resistência a várias doenças com produtividade elevada é extremamente complexa, por meio do melhoramento tradicional, em que não se consegue transferir apenas genes com a característica de interesse, e devido a várias razões que incluem: a planta citros comercializada é composta por duas espécies, uma porta-enxerto e outra copa, e o melhoramento está voltado para a planta porta-enxerto; não existir dentro do gênero citros espécies com resistência genética a várias doenças dos citros, precisando obtê-las de gêneros relacionados, a exemplo do gênero *Poncirus*; a identificação de híbridos

zigóticos, uma vez que a maioria das plântulas germinadas é de origem nucelar; e, entre outras dificuldades, como a demora para identificação de indivíduos com características superiores.

Os marcadores moleculares têm sido uma ferramenta importante adotada para auxiliar o melhoramento tradicional no processo monitorando dos alelos de resistência, bem como no auxílio do entendimento das relações alélicas entre as fontes de resistência (FHER, 1987). Por exemplo, marcadores intimamente ligados aos alelos de resistência apresentam grande facilidade e precisão na seleção de indivíduos resistentes, podendo viabilizar projetos que, por meio de procedimentos clássicos, não seria possível. Em citros, com o uso de marcadores moleculares, os estudos visando o mapeamento de diferentes alelos associados à resistência a doenças aumentaram consideravelmente nos últimos anos (KELLY e MIKLAS, 1998, CRISTOFANI et al., 1999; CRISTOFANI et al., 2000; SIVIERO et al., 2002).

Contribuindo com o melhoramento clássico, cientistas têm direcionado esforços, atualmente, para estudos genético-genômicos que visem elucidar os mecanismos moleculares relacionados com a troca de sinais entre plantas e seus patógenos e as novas técnicas de biologia molecular associadas à bioinformática levaram ao sequenciamento em larga escala de genes envolvidos na interação planta-patógeno. Em virtude da importância sócio-econômica da citricultura para o país, em 2007 foi concluído o projeto Genoma Funcional e Comparativo dos citros (Projeto Milênio dos Citros/CNPq), a partir do qual foi gerado o maior banco de dados genômicos sobre os citros do mundo, o CitEST. Informações genéticas valiosas foram, portanto, geradas e estão disponíveis no CitEST, as quais podem ser utilizadas para estudos de genética direta e reversa, validação de dados para completar os mapas genéticos e auxiliar programas de melhoramento tradicional visando resistência a doenças, por meio da genotipagem de indivíduos das progênies e identificação de marcadores para genes específicos relacionados com a resistência.

Neste sentido, uma nova técnica rápida e eficiente, baseada em PCR, foi desenvolvida visando aumentar a probabilidade de se estabelecer correlações entre fenótipo e genótipo denominada TRAP (*Target Region Associated Polymorphism*), a qual utiliza ferramentas de bioinformática e base de dados de *Expressed Sequence Tags* (ESTs) para gerar marcadores polimórficos ao redor de seqüências de genes candidatos (HU e VICK, 2003). Marcadores TRAPs têm sido usados com sucesso na genotipagem e mapeamento dos citros (MARENCO et al., 2009).

Visando auxiliar o programa de melhoramento dos citros do Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC, Cordeirópolis SP, o objetivo principal deste trabalho foi identificar marcadores polimórficos em indivíduos da progênie F1 de *Poncirus trifoliata* (resistente) x

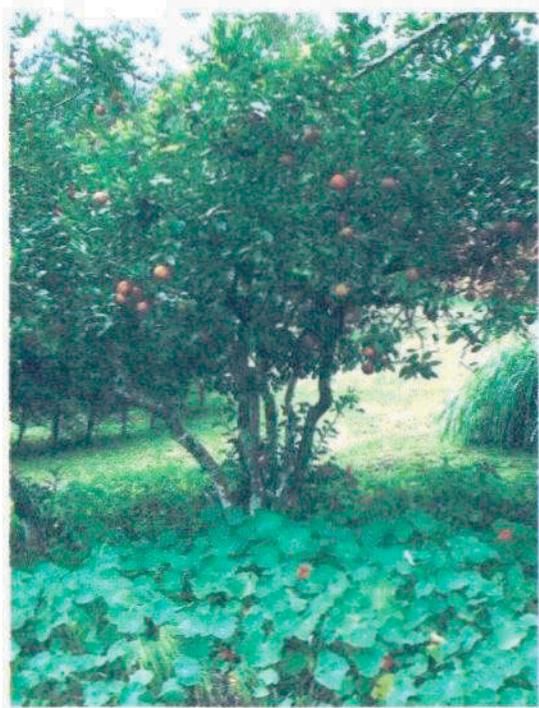
*Citros sunki* (suscetível), por meio da técnica TRAP-PCR. A estratégia usada para alcançar este objetivo envolveu *a)* A realização de reações de amplificação do tipo TRAP-PCR, usando DNAs de indivíduos da progênie F1 do cruzamento entre *Poncirus trifoliata* x *Citros sunki*, e combinações de primers aleatórios e primers fixos para genes de interesse; *b)* A separação de fragmentos de DNA amplificados por eletroforese em gel de agarose; *c)* A visualização de amplicons marcados com marcador intercalante de DNA sob luz ultravioleta e fotodocumentar; *d)* A análise dos fragmentos amplificados, visando identificar bandas polimórficas, por meio de comparação visual entre amostras de parentais e híbridos; e por fim *e)* A análise dos marcadores TRAPs quanto à segregação mendeliana por meio do teste do Qui-quadrado.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Os Citros

O termo citros refere-se a um grande grupo de plantas que compreende não somente o gênero *Citrus*, mas também os gêneros afins *Fortunella* e *Poncirus* ou híbridos da família Rutaceae. A importância dos citros vem da diversidade de seus frutos saborosos comercializados e abrangem laranjas (*Citrus sinensis*), tangerinas (*Citrus reticulata* e *Citrus deliciosa*), limões (*Citrus limon*), 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*). Originários principalmente das regiões subtropicais e tropicais do sul e sudeste da Ásia, incluindo áreas da Austrália e África, chegaram ao Brasil trazidos pelos portugueses, no século XVI.

Diversas características contribuem para sua importância econômica, tais árvores de porte médio, atingem em média quatro metros de altura; copa é densa, de formato normalmente arredondado, o que contribui para seu cultivo em grande quantidade em um espaço menor (Figura 1). As folhas são aromáticas, assim como as flores, pequenas e brancas muito procuradas pelas abelhas melíferas e matéria-prima da água de flor de laranjeira. Os frutos são saborosos, ricos em vitamina C; possuem ainda vitaminas A e complexo B, além de sais minerais, principalmente cálcio, potássio, sódio, fósforo e ferro.



**Figura 1.** Morfologia de plantas cítricas.

## **2.2 A importância dos citros**

A citricultura brasileira apresenta números expressivos que traduzem a grande importância econômica e social que a atividade tem para a economia do país. Alguns desses números são mostrados concisamente: a área plantada está ao redor de 1 milhão de hectares, com pomares que somam uma população superior a 200 milhões de plantas e a produção de frutas supera 19 milhões de toneladas, a maior no mundo há alguns anos. O país é o maior produtor e exportador de suco concentrado congelado de laranja cujo valor das exportações, juntamente com as de outros derivados. O setor citrícola brasileiro somente no Estado de São Paulo gera mais de 500 mil empregos diretos e indiretos (IBGE, 2004).

O Nordeste, por sua vez, detém, após o Estado de São Paulo, a citricultura de maior expressão, respondendo por 9% da produção nacional, com mais de 110.000 hectares cultivados e mais de 1,5 milhões de toneladas, graças à liderança nesse setor dos Estados da Bahia e Sergipe, segundo e terceiro produtores nacionais, respectivamente, responsáveis juntos por 90% de toda área plantada com igual produção (IBGE, 1995). A citricultura nordestina tem grande potencial para programar seu crescimento, sobretudo em função da ausência de doenças e pragas de grande importância que se encontram distribuída no Sudeste, maior centro produtor. No que diz respeito ao incremento e geração de empregos, percebe-se

que devido à instalação de muitas casas de embalagens (packing-houses) e aumento da exportação do citros para o Mercado Europeu, muitos empregos diretos e indiretos têm sido oferecidos, na ordem de 100 mil (IBGE, 2002).

Dados do IBGE (2002) confirmam que a Paraíba com uma área colhida de 1.028 hectares de tangerina, se posiciona como o maior produtor do Nordeste. Já, em 2003, com 1.049 hectares, foi responsável por 1,5% da produção de tangerina e o maior produtor do Nordeste (IBGE, 2003). Em 2004, com uma área colhida de 1.122 hectares, lidera o *ranking* como maior produtor de tangerina do Nordeste (IBGE, 2004).

No entanto, alguns problemas têm atingido o setor, como os crescentes danos causados por pragas e doenças. Os danos causados são irreversíveis e afetam diretamente a quantidade e qualidade das frutas cítricas, podendo chegar até a improdutividade e erradicação das plantas. Uma alternativa racional frente ao usual controle químico dessas doenças ou de seus vetores é a obtenção de genótipos com maior resistência a esses principais patógenos. Sendo assim, os programas de melhoramento genético e seleção dos citros focam a obtenção de novas variedades de porta-enxertos e de copa com maior tolerância ou resistência a doenças e pragas, e mais adaptadas a condições abióticas adversas (CRISTOFANI et al., 1999).

### 2.3 Melhoramento genético dos citros visando resistência a patógenos

Os programas de melhoramento genético de citros focam, principalmente, a obtenção de novos porta-enxertos e variedades de copas resistentes às doenças, pragas e mais adaptados a condições abióticas adversas (MARENGO, 2006). Neste caso, é analisado geneticamente os híbridos (F1) descendentes resultantes do cruzamento dos Parentais (*Poncirus trifoliata* e *C. sunki*). Entretanto, o melhoramento tradicional para obtenção de plantas cítricas com resistência combinada a diferentes patógenos é demorado e tem sido dificultado, particularmente, por caracteres de ordem botânica e genética dentro do grupo de citros. Hibridização interespecífica e intergenérica e seleção massal de mutantes naturais ou induzidos de gemas ou híbridos espontâneos têm sido os principais métodos de melhoramento de citros. Além disso, como a planta cítrica é constituída de duas partes quase sempre de espécies diferentes, o porta-enxerto resistente a doenças de colo e raiz também deve ser compatível com a espécie/variedade/copa que produza frutos com alta qualidade, fator imperioso para a indústria ou mercado *in natura*.

As espécies do gênero *Citrus* reproduzem-se sexuadamente por autopolinização e polinização cruzada e assexuadamente por apomixia nucelar adventícia. Suas sementes possuem tanto embriões zigóticos, como apomíticos, apresentando, em geral, apomixia facultativa, com número variável de embriões entre um a doze. Espécies do gênero *Citrus* e outras de gêneros correlacionados como *Poncirus* e *Fortunella* apresentam compatibilidade genética, produzindo híbridos férteis de interesse para o melhoramento.

Após hibridação com *Poncirus*, os descendentes denominados citrange (híbridos com laranja doce), citrandarim (híbridos com tangerina), citrumelo (híbridos com pomelo), entre outros, apresentam folhas trifoliadas, que é uma característica morfológica governada por um gene dominante. Contudo, vale ressaltar, que o uso de *Poncirus* como um dos genitores em programas vai muito além de sua marcante morfologia de folha trilobada, visto que esse gênero apresenta inúmeras características agrônômicas importantes, como resistência a doenças e melhor qualidade de fruta na variedade copa enxertada sobre ele.

Parte dessas limitações do melhoramento clássico de citros tem sido superada pela utilização de marcadores moleculares, que passaram a serem ferramentas essenciais na seleção de híbridos sexuais e na ampliação das combinações genéticas através de cruzamentos. No entanto, estratégias mais efetivas e duradouras para o controle de doenças causadas por patógenos em plantas de citros, por meio de plantas resistentes, poderão surgir a partir do entendimento das relações planta-patógenos.

O porta-enxerto *P. trifoliata* (L.) Rafinesque Rubidoux, espécie única do gênero, é um genótipo muito usado no Japão, Uruguai e em países de clima temperado sendo indicado para combinações com laranjas, limas ácidas e tangerinas. *P. trifoliata* induz melhor qualidade de fruto, é ideal para regiões frias e úmidas, induz baixo vigor reduzindo o porte da copa, facilitando a colheita e o adensamento do pomar e apresenta boas características fitossanitárias como: resistência a *Phytophthora* spp., nematóides, vírus da tristeza dos citros e à xiloporose. No entanto, possui aspectos negativos como: baixo desenvolvimento em viveiro, intolerância a seca, alta exigência nutricional e apresenta incompatibilidade com a laranja Pêra, limões verdadeiros e tangor Murcott (SIVIERO et al., 2002).

Tangerina Sunki (*Citrus sunki* Hort. ex. Tanaka) é originária do sudeste da China sendo indicada como porta-enxerto para laranjas, tangerinas e pomelos, possui diversas características desejáveis, como: induz boa formação de copa, apresenta resistência a tristeza, morte súbita, xiloporose, sorose e declínio, tolerância a solos salinos e a seca. No entanto,

apresenta características agronômicas indesejáveis como suscetibilidade a gomose e pequeno número de sementes viáveis por fruto (MARENGO, 2009).

Tendo em vista a importância da cultura dos citros na produção agrícola brasileira, o Centro de Citricultura Sylvio Moreira do Instituto Agronômico de Campinas desenvolveu extenso banco de dados de genoma expresso de citros (CitEST) integrando Melhoramento Genético, Genoma Funcional e Comparativo de Citros e alguns de seus patógenos, representando hoje o principal banco de dados de genoma expresso dos citros do mundo. Neste estudo, a resistência/suscetibilidade desses porta-enxertos a várias doenças foi focalizada, com base na análise de genes diferencialmente expressos nestas plantas, por meio da estratégia de condições contrastantes ‘inoculadas *versus* não inoculadas’ (TARGON et al., 2007), visando contribuir para a elucidação dos mecanismos de defesa elaborados nessas plantas na presença de diferentes patógenos. Informações genéticas valiosas foram, portanto, geradas e estão disponíveis no CitEST, as quais podem ser utilizadas para estudos de genética direta e reversa, validação de dados para completar os mapas genéticos e auxiliar programas de melhoramento tradicional visando resistência a doenças, por meio da genotipagem de indivíduos das progênes e identificação de marcadores para genes específicos relacionados com a resistência.

#### 2.4 Seleção de híbridos de interesse por marcadores

Os marcadores moleculares tem sido uma ferramenta importante adotada para auxiliar no processo monitorando dos alelos de resistência, bem como no auxílio do entendimento das relações alélicas entre as fontes de resistência em programas de melhoramento genético tradicional (FHER, 1987). Marcadores intimamente ligados aos alelos de resistência apresentam grande facilidade e precisão na seleção de indivíduos resistentes, podendo viabilizar projetos que, por meio de procedimentos clássicos, não seria possível. Em citros com o aparecimento dos marcadores moleculares, os estudos visando o mapeamento de diferentes alelos de resistência (R) aumentaram consideravelmente nos últimos anos (KELLY e MIKLAS, 1998).

O desenvolvimento de mapas genéticos é considerado uma das aplicações de maior impacto da tecnologia de marcadores moleculares, pois são úteis às análises filogenéticas, e potencialmente, ao melhoramento de plantas. Por sua vez, uma das aplicações mais importantes dos mapas genéticos é a localização de genes que controlam características de importância agronômica, como produção de grãos, altura da planta, teor de proteína,

UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO  
10/09/2010

resistência a doenças, as quais podem resultar da ação cumulativa de um conjunto de genes (MARENGO, 2009).

Os primeiros marcadores moleculares estabelecidos foram as isoenzimas, sendo diferenciadas em géis de eletroforese pelo tamanho e carga. O surpreendente nível de polimorfismo encontrado pela primeira vez dentro de populações trouxe a idéia de que a maioria das mutações é neutra. Este provavelmente é o maior legado das isoenzimas. O surgimento de técnicas de manipulação de DNA levou ao desenvolvimento de marcadores *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), que permitiram a análise de regiões não-codificadoras e de mutações silenciosas. Na década de 80, a técnica de PCR permitiu a amplificação de fragmentos de DNA, e levou ao aparecimento de marcadores como *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), microssatélites e AFLP. Esses marcadores, baseados em genes-alvo, aumentam a probabilidade de se estabelecer correlações entre fenótipo e genótipo, pois a variabilidade observada reflete diferenças fenotípicas. Mas, para a realização deste trabalho foi utilizado o marcador TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*), este é um marcador altamente reproduzível, de fácil manuseio e baixo custo, quando comparado aos demais.

## 2.5 Marcadores TRAPs (*Targed Region Amplification Polymorphisms*)

Marcadores TRAPs, ou marcadores de polimorfismo de amplificação de região alvo, são uma nova classe de marcadores moleculares baseada em PCR, desenvolvida com o objetivo de direcionar o desenvolvimento de marcadores voltados para *loci* específicos ou famílias gênicas. A técnica TRAP utiliza informações de *Expressed Sequence Tags* (ESTs) e ferramentas de bioinformática para gerar marcadores polimórficos ao redor de seqüências de genes candidatos. O polimorfismo é gerado a partir da combinação de um *primer* fixo, desenhado a partir de uma seqüência EST (pedaços de seqüências expressas) de interesse, e um *primer* arbitrário desenhado aleatoriamente. Uma vez que o advento do seqüenciamento em larga escala gerou um montante de informações de seqüências importantes a partir de muitos organismos, a utilização da técnica TRAP permite o aproveitamento de informações sobre as seqüências parciais de genes candidatos para desenhar os “primers” fixos. Sendo, dessa maneira, muito relevante nas investigações de genômica vegetal.

De acordo com Hu e Vick (2003) TRAP é um marcador dominante, que combina a facilidade dos marcadores RAPD, sendo, porém, altamente reproduzível, com abundante polimorfismo dos marcadores AFLP. Esta técnica, proposta por LI e Quiros (2001) e

modificada por Hu e Vick (2003), apresenta bons resultados como fontes de marcadores aplicados à confecção de mapas genéticos (MIKLAS et al., 2006), inclusive de espécies de citros (MARENGO, 2009).

MIKLAS *et al.* (2006) estudaram a aplicação de marcadores TRAPs para Mapeamento e localização de marcas associadas a genes de resistência a doenças em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Grande parte dos TRAPs desenvolvidos a partir de genes de resistência mapeou próximo ou dentro de “clusters” de genes relacionados à resistência a doenças. Outros mapearam próximos a QTLs relacionados à resistência a doenças. Os autores encontraram de 1,3 a 20 marcadores TRAPs por PCR e atribuíram o alto nível de polimorfismo ao tipo de população de mapeamento. Os cruzamentos entre genitores mais distantes foram os que apresentaram maior polimorfismo para os TRAPs.

### 3 METODOLOGIA

Este trabalho é parte de um projeto maior intitulado INCT de genômica dos citros, aprovado pelo CNPq/Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia sob coordenação de Dr. Marcos Antonio Machado, pesquisador do Centro APTA Citros Sylvio Moreira, Cordeirópolis-SP, do qual a Universidade Federal de Campina Grande é instituição colaboradora. As atividades desenvolvidas neste trabalho foram realizadas nos laboratórios de Biologia Molecular do Centro de Educação e Saúde, Campus de Cuité da UFCG, e da EMBRAPA Algodão, Campina Grande PB.

#### 3.1 Identificação dos genótipos vegetais

O material vegetal utilizado é produto do melhoramento genético dos citros sob coordenação da Dra. Mariângela Cristofani, pesquisadora do Centro APTA Citros Sylvio Moreira, Cordeirópolis-SP, quem gentilmente nos cedeu os DNAs dos genótipos e os *primers*. Para este trabalho foi utilizado um total de vinte e quatro amostras, sendo dois parentais, *Poncirus trifoliata* (L.) Raf cv. Rubidoux e *Citrus sunki* Hort. ex. Tan., e dez indivíduos (híbridos) da progênie F1 escolhidos ao acaso dentre o total de 136 híbridos F1, resultante do cruzamento dos referidos parentais, e suas repetições, conforme descrição na Tabela 1.

**TABELA 1-** Identificação dos genótipos de parentais e híbridos de *Poncirus trifoliata* e *Citrus sunki* utilizados nas reações de TRAP-PCR.

IDENTIFICAÇÃO	PARENTAIS	HÍBRIDOS	REPETIÇÕES
P1	<i>Poncirus trifoliata</i>		T
P1			T
P2	<i>Citrus sunki</i>		S
P2			S
1		1	1.2
1			1.3
2		2	2.4
2			2.3
3		4	4.4
3			4.3
4		5	5.3
4			5.2
5		14	14.1
5			14.3
5			14.4
6		17	17.2
6			17.1
7		19	19.3
7			19.2
8		20	20.1
9			23.3
9		23	23.4
10			24.3
10		24	24.4

### 3.2. Descrição dos primers usados

Para o desenvolvimento dos marcadores TRAPs, “primers” fixos (genes alvo) foram desenhados usando as informações do banco de dados de ESTs (pedaços de seqüências expressas) de citros (CitEST) do Centro APTA de citros Sylvio Moreira. O “primer” arbitrário (19 a 20 pb), possui em sua extremidade 3', 3 a 4 nucleotídeos seletivos, 4 a 6 nucleotídeos no centro da seqüência (rica em AT ou em GC), intercalada por um “intron” ou “exon”, respectivamente (LI & QUIROS, 2001).

Os “primers” fixos foram obtidos a partir da região codificadora de seqüências gênicas significativamente expressas em plantas de *P. trifoliata* infectadas com o vírus da tristeza dos citros (CTV) e que codificam quatro proteínas relacionadas à produção de energia: clorofila A/B-binding proteína, Ribulose 1,5-bifosfato carboxilase oxidase (RuBisCO), NADP-dependente gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; uma enzima do metabolismo de açúcar e amido, sacarose síntase e uma proteína relacionada com a defesa, a PR10 SRG1

(CRISTOFANI *et al.*, 2007). As seqüências de nucleotídeos dos primers estão descritas na Tabela 2.

**Tabela 2-** Seqüências dos “primers” fixos e arbitrários utilizados para amplificar marcadores TRAPs nos híbridos de *C. sunki* e *P. trifoliata*.

Primers	ORFs <sup>1</sup>	Nome do Primer <sup>2</sup>	Seqüência de nucleotídeos (5' → 3')
Primers Fixos	Sacarose síntase	F3	CAATCGTGGCTGTCGTGA
	Sacarose síntase	R3	ATATACCCCAGCCAATGT
	Ribulose	F4	AATGGGGGTTTCGGTTTGT
	Ribulose	R4	GATCATCATGGGGGTTAC
	<sup>3</sup> NADP gliceraldeído-3-fosfato	F5	ACGCGTCCGCCACTCTCA
	NADP gliceraldeído-3-fosfato	R5	CCTTTCCCGGTGATACAG
	Clorofila	F6	TGGCAGCATCGTCAACT
Primer Arbitrário Reverso <sup>4</sup>	SRG1	F7	GGCACCGCACTCACCATC
		PA1	GACTGCGTACGAATTAAT

<sup>1</sup>ORF, open reading frame. <sup>2</sup>F, forward/R, reverse. NADP-dependente gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). <sup>4</sup>De acordo com LI & QUIROS (2001).

Neste trabalho foram avaliadas 08 combinações de “primers”, sendo 08 fixos e 01 aleatório, as quais estão descritas na Tabela 3.

**Tabela 3-** Combinações de “primers” fixos e arbitrários utilizadas para amplificar marcadores TRAPs nos híbridos de *C. sunki* e *P. trifoliata*.

P. Fixos / P. Arbitrário	*F3	F4	F5	F6	F7	*R3	R4	R5
	PA1	PA1/F3	PA1/F4	PA1/F5	PA1/F6	PA1/F7	PA1/R3	PA1/R4

\*F, forward; R, reverse.

### 3.3 TRAP-PCR: Polimorfismo de amplificação de região alvo (TRAP) por meio de Reações em cadeia da polimerase (PCR)

As reações de amplificação foram conduzidas a um volume final de 15  $\mu\text{L}$  com os seguintes componentes: 50-80 ng da amostra de DNA de parentais ou híbridos extraídos conforme MARENGO (2009), 1X do tampão  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  da Taq (750 mM Tris-HCl, pH 8.8, 200 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.1% (v/v) Tween 20, Fermentas Lab Science), 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM de cada dNTP, 1  $\mu\text{L}$  de cada “primer” da combinação arbitrário/fixo e 1,5 U de Taq DNA polimerase (Fermentas Lab Science). As reações foram realizadas em Termociclador, sob as seguintes condições térmicas: 94°C por 2 min para desnaturação inicial do DNA, seguido por cinco ciclos a 94°C por 45 s de desnaturação, 35°C por 45 s anelamento dos primers, e 72°C por 1 min de extensão, seguido por 35 ciclos a 94°C por 45 s 50°C por 45 s, e 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 7 min.

### 3.4 Eletroforese dos produtos de TRAP-PCR

Após a reação de amplificação, ao volume de 15  $\mu\text{L}$  de reação de cada amostra foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra 5X (1mM de EDTA; 0,25% de Azul de Bromofenol; 0,25% de Xilenocianol; 25% de Ficoll 400) e 3  $\mu\text{L}$  de corante intercalante *Sybr Green* (Invitrogen) e aplicados em gel de agarose a 2%. A eletroforese foi conduzida a 150 V por três horas em cuba horizontal, utilizando o tampão TBE (89 mM de Tris HCl, 89 mM de Ácido bórico e 2 mM de EDTA). Os fragmentos amplificados e corados com *Sybr Green* foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados em fotodocumentador.

### 3.5 Análise dos dados

O polimorfismo entre os genótipos foi estimado loco a loco por meio da presença ou ausência de bandas amplificadas por PCR com o auxílio do marcador 50 pb DNA Ladder (Invitrogen) para estimar o tamanho dos fragmentos. Os marcadores TRAPs de boa intensidade e reprodutibilidade foram identificados e analisados quanto à segregação Mendeliana esperada (1:1) nos 10 indivíduos da progênie, por meio do teste de Qui-quadrado.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

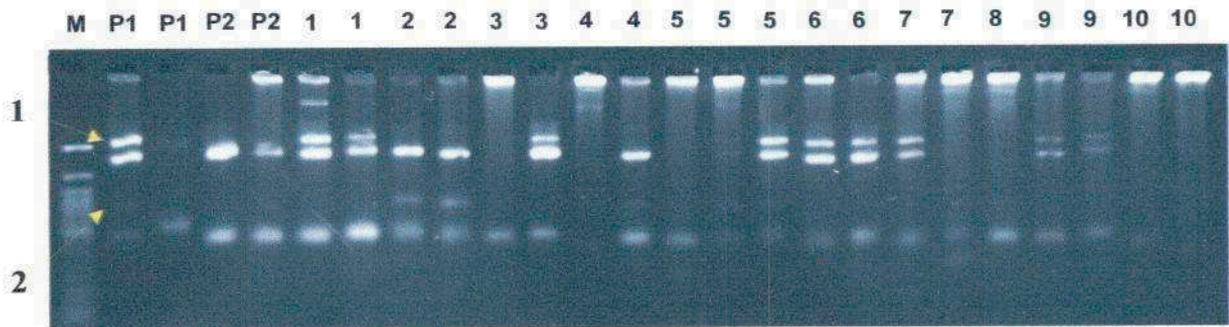
### 4.1 Identificação de marcadores moleculares do tipo TRAP em híbridos de *Poncirus trifoliata* e *Citrus sunki*

Por intermédio da técnica TRAP, das 8 combinações de “primers” testadas 2 combinações apresentaram polimorfismo, gerando um total de 4 marcas e um número médio de marcadores por par de “primer” no valor de 2 (Tabela 4; Figuras 2 e 3). O peso molecular das marcas não foi possível determinar com precisão devido a falhas durante a corrida de eletroforese. Este número médio de marcadores foi menor do que o encontrado por Marengo (2009), no valor de 3,5 o usando a técnica TRAP em população oriunda de genótipos dos mesmos parentais.

**Tabela 4.** Características dos Marcadores TRAPs selecionados no presente trabalho usando 10 híbridos F<sub>1</sub> de *C. sunki* x *P. trifoliata*.

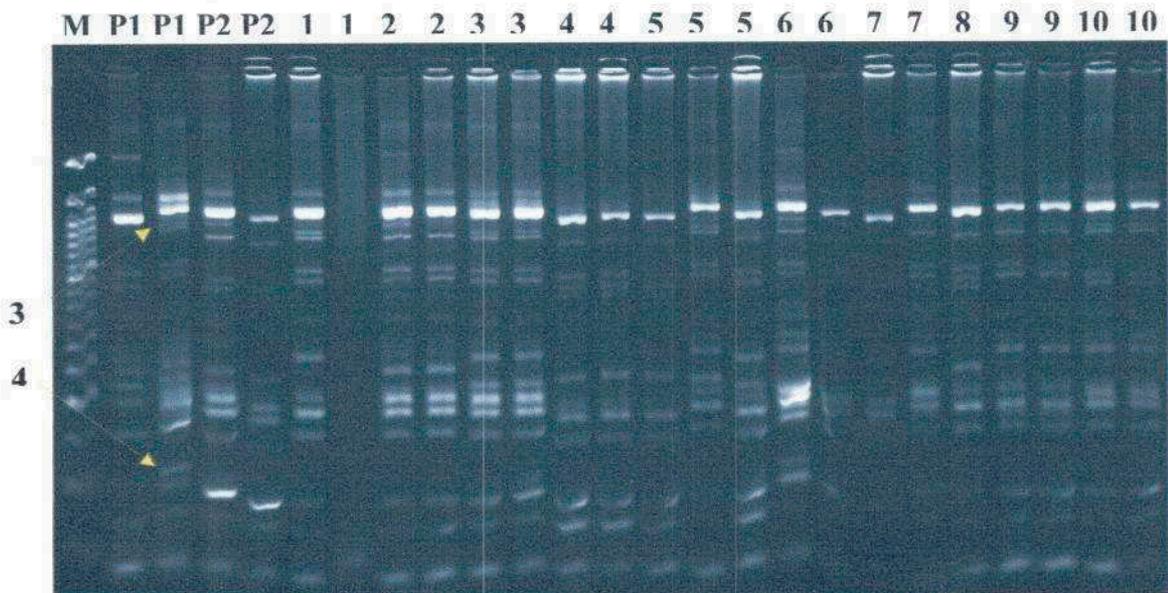
Marcador	Nº total de combinações de “primers” avaliados	Nº de combinações de “primers” polimórficos	Nº total de marcas encontradas	Nº total de marcadores por par de primer
TRAP	8	2	4	2

O uso da combinação de primers TRAPs PA1/R5 (NADP-dependente gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) gerou duas marcas polimórficas observadas no parental resistente *Poncirus trifoliata*, indicadas pelas setas 1 e 2, as quais estão ausentes no parental suscetível *Citrus sunki* (Figura 2). A marca 1 também está presente em 06 dos 10 híbridos estudados, enquanto que a marca 2 também está presente em 05 dos 10 híbridos estudados, indicativas de bandas polimórficas que apresenta segregação nos híbridos e contraste entre os parentais. Dentro das repetições, é possível observar que os resultados não foram idênticos em alguns casos, a exemplo do híbrido indicado com o número 3, repetições 4.4 e 4.3, em que a marca 1 não foi amplificada em ambas as repetições. Isto pode ter acontecido devido a fatores, incluindo diferenças na concentração e pureza dos DNA das amostras e falha técnica durante a manipulação preparatória das reações.



**Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose 2% de fragmentos amplificados por TRAP-PCR usando a combinação de primers PA1/R5. P1, *Trifoliata*; P2, *Sunki*. Híbridos, 1-10, respectivamente: (1) 1.2/ 1.3; (2) 2.4/ 2.1; (3) 4.4/ 4.3; (4) 5.3/ 5.2; (5) 14.1/ 14.3/ 14.4; (6) 17.2/ 17.1; (7) 19.3/ 19.2; (8) 20.1; (9) 23.3/ 23.4; (10) 24.3/ 24.4. Bandas polimórficas indicadas por setas numeradas.

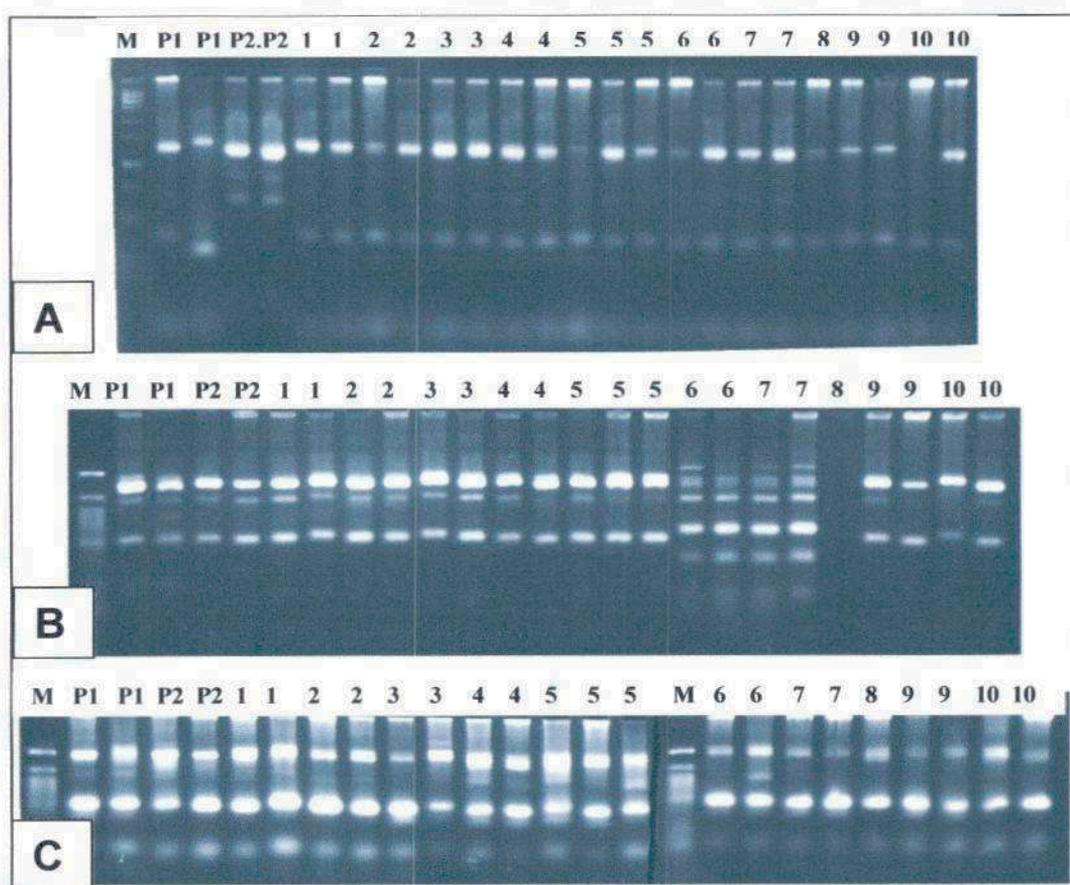
Similarmente, o uso da combinação de primers TRAPs PA1/R3 (Ribulose 1.5-bifosfato carboxilase oxidase –RUBISCO-) também levou a formação de duas marcas polimórficas observadas no parental resistente *Poncirus trifoliata*, indicadas pelas setas 3 e 4, as quais estão ausentes no parental suscetível *Citrus sunki* (Figura 3).



**Figura 3.** Eletroforese em gel de agarose 2% de fragmentos amplificados por TRAP-PCR usando a combinação de primers PA1/R3. P1, *Trifoliata*; P2, *Sunki*. Híbridos, 1-10, respectivamente: (1) 1.2/ 1.3; (2) 2.4/ 2.1; (3) 4.4/ 4.3; (4) 5.3/ 5.2; (5) 14.1/ 14.3/ 14.4; (6) 17.2/ 17.1; (7) 19.3/ 19.2; (8) 20.1; (9) 23.3/ 23.4; (10) 24.3/ 24.4. Bandas polimórficas indicadas por setas numeradas.

A marca 3 também está presente em 06 dos 10 híbridos estudados, enquanto que a marca 4 está presente em 07 dos 10 híbridos estudados, indicativas de bandas polimórficas. Também neste gel, dentro das repetições, é possível observar que os resultados não foram idênticos em alguns casos, a exemplo do híbrido indicado com o número 1, repetições 1.2 e 1.3, em que as marcas 3 e 4 não foram amplificadas em ambas as repetições.

Por outro lado, na Figura 4 estão ilustrados os resultados de ampliações por TRAP-PCR usando combinações de primers cujas ampliações não produziram bandas polimórficas. Entretanto, a aplicação da técnica TRAP para buscar marcadores em citros, inclusive nos genomas de *Poncirus trifoliata* e *Citrus sunki* tem sido realizada com sucesso por outros pesquisadores (Marengo, 2009). Isto é indicativo da necessidade de otimização do protocolo nas condições de Laboratório de Biologia Molecular no CES.



**Figura 4.** Eletroforese em gel de agarose 2% de fragmentos amplificados por TRAP-PCR usando as combinações de “primers” PA1/F5 (A), PA1/F7 (B) e PA1/R4 (C). P1, Trifoliata; P2, Sunki. Híbridos, 1-10, respectivamente: (1) 1.2/ 1.3; (2) 2.4/ 2.1; (3) 4.4/ 4.3; (4) 5.3/ 5.2; (5) 14.1/ 14.3/ 14.4; (6) 17.2/ 17.1; (7) 19.3/ 19.2; (8) 20.1; (9) 23.3/ 23.4; (10) 24.3/ 24.4.

Os dados observados nos géis de agarose foram dispostos na Tabela 5 atribuindo-se o valor 1 para a presença da marca polimórfica e 0 para a ausência em cada um dos indivíduos estudados. Com base nas informações da Tabela 3 é possível notar que o híbrido 3 apresentou os quatro marcadores TRAP identificados neste trabalho.

**Tabela 5-** Seqüência dos marcadores polimórficos com base na sua presença (valor 1) ou ausência (valor 0).

M	P1	P1	P2	P2	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	5	6	6	7	7	8	9	9	10	10
M 1	1	1	0	0	1	1	0	0	#	1	#	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	#
M 2	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	#	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
M 3	0	1	0	0	#	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
M 4	1	1	0	0	#	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1

#, reação dessa amostra não funcionou bem. M, marcadores TRAPs identificados neste trabalho (1 a 4 em vermelho). P1, *Poncirus trifoliata*, P2 *Citrus sunki*. Híbridos, 1 a 10.

Para que os marcadores encontrados possam ser utilizados na construção de mapas de ligação é necessário que estes apresentem segregação mendeliana. Por isso, o teste de Qui-quadrado foi aplicado individualmente aos marcadores TRAPs para verificar a hipótese nula de segregação mendeliana (1:1). Como resultado, 100% dos marcadores identificados segregam na proporção 1:1 (Tabela 6).

**Tabela 6.** Segregação dos Marcadores TRAPs em 10 indivíduos da progênie F<sub>1</sub> e teste de homogeneidade para segregação esperada 1:1.

Marcador TRAP	Número de Progênes (+/-)	Freqüência esperada	X <sup>2</sup>
M1	6:2	1:1	1,6
M2	5:5	1:1	0
M3	6:4	1:1	0,4
M4	8:2	1:1	3,6

Como os valores encontrados para o teste de homogeneidade de  $\chi^2$  são menores que o valor tabelado  $\chi^2 = 3,85$  ( $\alpha=0,05$  e  $GL=1$ ), a hipótese nula de segregação (1:1) não é rejeitada. Assim, a frequência observada corresponde à segregação mendeliana para todos os marcadores. Portanto, estes marcadores poderão ser introduzidos no mapa de ligação de *Poncirus trifoliata*, desenvolvido por CRISTOFANI et al. (1999).

A importância de se conhecer os genes amplificados está na identificação de marcadores ao redor de genes candidatos que governam características agrônômicas de interesse. Dessa forma, é possível selecionar os indivíduos com base na genotipagem do marcador, sem que haja a necessidade de avaliar o fenótipo da característica, o que implica em rapidez na seleção de híbridos em programas de melhoramento de plantas.

Neste contexto, as regiões amplificadas pelos marcadores TRAPs identificados neste trabalho, caracterizadas como regiões polimórficas, ou seja, os marcadores identificaram alelos diferentes entre os parentais, provavelmente envolvem parte de genes *NADP-GAPDH* (marcadores 1 e 2) e *sucrose synthase* (marcadores 3 e 4) no genoma de *Poncirus trifoliata*. Uma vez que esses genes se mostraram significativamente expressos em *P. trifoliata* durante interação com vírus da tristeza dos citros (CTV), e considerando que esta planta é resistente a este vírus, portanto, estes genes podem estar envolvidos nos mecanismos de defesa de *P. trifoliata* a esse patógeno (CRISTOFANI et al., 2007), embora os mecanismos ainda não estejam elucidados.

Komatsu et al. (2002) demonstraram que diferentes genes *sucrose synthase* em citros diferem entre si na sua estrutura molecular e nos potenciais papéis fisiológicos, podendo um gene desempenhar uma função no suplemento de material para o desenvolvimento e construção da parede celular, enquanto que outros poderia suplementar a *sucrose-phosphate synthase* com substratos (UDP-glicose e frutose) para a re-síntese de sacarose. Entretanto, a demonstração de uma função para genes *sucrose synthase* relacionada com os mecanismos envolvidos com a resistência da planta ainda não foi relatada. Neste sentido, uma hipótese que poderia ser testada é o possível fortalecimento da parede celular, embasada na demonstração de que uma *sucrose synthase* associada à membrana possui uma possível função na síntese de celulose e calose em plantas (AMOR et al., 1999).

Entretanto, inúmeras combinações de *primers* ainda precisam ser testadas para a identificação de marcadores TRAPs que possam completar os mapas de *Poncirus trifoliata* e *Citrus sunki* além de genotipar os indivíduos da população F1 do cruzamento entre estes dois parentais. É importante ressaltar que nas 8 combinações de “primers” fixos que foram testadas neste trabalho com apenas 10 indivíduos da progênie F1, apenas um (1) “primer” arbitrário

UFPA



## 5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, é possível concluir que:

- 1) É possível acessar a diversidade genética de progênies de *Poncirus trifoliata* X *Citros sunki*, por meio de marcadores TRAPs usando os primers dos genes-alvo *sucrose synthase* e *NADP-GAPDH* com segregação para *Poncirus*;
- 2) Os quatro marcadores TRAPs identificados obedecem ao padrão de segregação Mendeliana na proporção 1:1;
- 3) Os marcadores obtidos poderão ser introduzidos no mapa de ligação de *Poncirus trifoliata*, desenvolvido por CRISTOFANI et al. (1999).
- 4) Os marcadores obtidos poderão ser usados na genotipagem de todos os indivíduos da população F1 de *Poncirus trifoliata* X *Citros sunki*.

União de 2017

## REFERÊNCIAS

- AMOR, M., ROMBALDI, C. PECH, J-C.,BOUZAYEN, M. Biosynthese of mode action of hormone vegetal ethylene. **Fruits**, v. 50, n. 5, p.379-396, 1999.
- 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 gene. **Euphytica**, 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-YALY, M.; BERGER, I. J.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M. A.; DORTA, S. O.; FREITAS-ASTUA, J.; SOUZA, A. A.; BOSCARIOL-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**, v.30, p.972-979, 2007.
- FEHR, W. R. **Principles of Cultivar Development**, Vol. 1: Theory and Technique. New York. Macmillan. 1987.
- 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.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Principais produtos das lavouras permanentes. Produção agrícola municipal**. 2002, 2003 e 2004. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia>>. Acesso em: 21 Maio. 2010.
- IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola**: Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Rio de Janeiro, RJ: 1995. 66p.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

TELLY, J. D.; MIKLAS, P. N. The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. **Molecular Breeding**, Amsterdam, v.4, n.1, p.1-11, Jan. 1998.

KOMATSU, A., Moriguchi, T., Koyama, K., Omura, M., Akihama, T. Analysis of sucrose synthase genes in citrus suggests different roles and phylogenetic relationships. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 366, p. 61-71, 2002.

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.

MARENGO, S. A.; **Mapeamento genético de tangerina sunki e *Poncirus trifoliata* para resistência ao Huanglongbing (greening) dos citros**. Dissertação de mestrado; Instituto Agrônomico de Pós- Graduação – IAC, Campinas-SP, 2009.

MICHELMORE, R. H.; I. Paran. R.V. Kesseli. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.88. p.9828-9832. 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.

SIVIERO, A., FURTADO, E. L., BOAVA, L.P., BARBASSO, D. V. & MACHADO, M.A. **Avaliação de métodos de inoculação de *Phytophthora parasitica* em plântulas e plantas jovens de citros**. Fitopatologia Brasileira 27:574-580. 2002.

TARGON, M. L. P. N.; TAKITA, M. A.; AMARAL, A. M. do; SOUZA, A. A. de; FABRIS, E. C. L.; DORTA, S. de O.; BORGES, K. M.; SOUZA, J. M. de; RODRIGUES, C. M.; LUCHETA, A. R.; ASTUA, J. F.; MACHADO, M. A. CitEST Libraries. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 3, suppl., p. 1019-1023, 2007