

**AVALIAÇÕES DE PARTICULARIDADES
MOLECULARES DA 'FOLHA MURCHA ME'
E OUTROS *Citrus sinensis* (L.) OSBECK E
DESENVOLVIMENTO DE MARCADOR
SCAR**

HUMBERTO HENRIQUE DE CARVALHO

2008

HUMBERTO HENRIQUE DE CARVALHO

**AVALIAÇÕES DE PARTICULARIDADES MOLECULARES
DA 'FOLHA MURCHA ME' E OUTROS *Citrus sinensis* (L.)
OSBECK E DESENVOLVIMENTO DE MARCADOR SCAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Lavras como parte das exigências do Curso de
Mestrado em Agronomia, área de concentração em
Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de
“Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2008

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Carvalho, Humberto Henrique de.

Avaliações de particularidades moleculares da 'Folha Murcha Me' e outros *Citrus sinensis*(L.) Osebeck e desenvolvimento de marcador SCAR / Humberto Henrique de Carvalho. -- Lavras : UFLA, 2008.

76 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Luciano Vilela Paiva.

Bibliografia.

1. Laranjeira. 2. RAPD. 3. Dissimilaridade genética. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.240488

HUMBERTO HENRIQUE DE CARVALHO

**AVALIAÇÕES DE PARTICULARIDADES
MOLECULARES DA 'FOLHA MURCHA ME' E
OUTROS *Citrus sinensis* (L.) OSBECK E
DESENVOLVIMENTO DE MARCADOR SCAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 21 de fevereiro de 2008

Prof. Dr. Antônio Chalfun-Júnior

UFLA

Prof. Dr. Maurício de Souza

UFLA

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

A Deus, pela força em todos os momentos e pela oportunidade.

A minha família, em especial aos meus pais, José Percílio e Aparecida, os grandes responsáveis pela minha formação, que sempre me apoiaram e me incentivaram em todos os momentos de minha vida.

A minhas irmãs, Kelly e Gisele, companheiras e amigas de todas as horas, pela compreensão, paciência, apoio, carinho, incentivo e amor, especialmente nos momentos difíceis.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À UFLA e ao Setor de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade, ao CNPq, pela bolsa de estudos e pelo financiamento parcial da pesquisa. Ao Laboratório Central de Biologia Molecular, o qual proporcionou toda infra-estrutura para a execução do trabalho. Ao prof. Dr. Luciano Vilela Paiva, pelos ensinamentos transmitidos e pela confiança. Ao prof. Dr. Antônio Chalfun Júnior, por seus ensinamentos, sugestões e paciência. À Dra. Cláudia T Guimarães, pelos ensinamentos e disponibilidade. Aos professores, pelos conhecimentos transmitidos, imprescindíveis em minha formação. Ao Dr Maurício de Souza, pelos ensinamentos durante a condução deste trabalho. As amigas Karine e Karolini, pela amizade e, principalmente, por estarem presentes sempre nas horas difíceis. A Evânia e Elizângela, por sua amizade e pela ajuda na realização deste trabalho. Aos amigos do LCBM, pelo auxílio, em especial Guilherme, Anderson Ramos, Anderson Tadeu, Michelle, Lívia e Fabiana e Kalyinka. Às amigas Mina e Carolina, pelo apoio nos momentos difíceis e pela agradável convivência em Lavras. Ao amigo Marcelo Murad, pelas valiosas sugestões. Aos amigos do setor de Fisiologia Vegetal, companheiros de estudos e seminários, pelas sugestões, amizade e gratificante convivência, principalmente a Agda, Camila, Emanuelle e Jessé. Aos colegas de pós-graduação, pela amizade, convivência e troca de experiência. Aos funcionários do Setor de Fisiologia Vegetal da UFLA, pelo pronto atendimento e colaboração. Aos meus pais, pelo amor, compreensão e pelos ensinamentos de perseverança, luta, coragem e dedicação ao longo da vida. As minhas irmãs, pela compreensão e carinho. Aos tios, primos e amigos, pelo apoio nos momentos difíceis. Agradeço a todos aqueles que acreditaram em mim e contribuíram de alguma forma com minha formação e esta conquista o meu muito obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.3 Variedade Folha Murcha	6
2.4 Marcadores genéticos	8
2.5 Marcadores genéticos em <i>Citrus</i>	12
2.6 Marcador SCAR	14
2.7 Estimativa de similaridade genética.....	15
2.7.1 Coeficientes de similaridade.....	16
2.7.2 Análise de agrupamento.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Descrição do material	22
3.2 Extração do DNA.....	24
3.2.1 Reações de amplificação e eletroforese	25
3.3 Análise da similaridade genética	26
3.3.1 Similaridade genética.....	27
3.3.2 Identificação do número ótimo de marcadores	28
3.3.3 Análise bootstrap	29
3.4 Análise da consistência dos nós do dendrograma.....	29
3.5 Isolamento de bandas.....	30
3.5.1 Eluição da banda do gel.....	30
3.5.2 Ligação com vetor	31
3.5.3 Transformação e clonagem bacteriana.....	32
3.5.4 Extração dos plasmídeos contendo insertos dos DNA obtidos.....	32
3.5.5 Digestão com enzimas de restrição.....	34

3.6 Seqüenciamento	34
3.7 Obtenção dos marcadores SCAR.....	36
3.8 Análises das seqüências em banco de dados.....	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Caracterização molecular por marcadores RAPD	37
4.2 Determinação do número ótimo de marcadores moleculares	40
4.3 Análise bootstrap	43
4.4 Teste de reprodutibilidade do RAPD.....	45
4.5 Avaliação da similaridade genética	47
4.6 Polimorfismo entre a laranjeira ‘Folha Murcha Me’ e as outras variedades estudadas.....	54
4.7 Transformação e clonagem bacteriana.....	55
4.8 Seqüenciamento	57
4.9 Construção de marcadores <i>sequence characterized amplified regions</i> ou SCAR.....	59
4.10 Análises das seqüências de DNA.....	61
5 CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

RESUMO

CARVALHO, Humberto Henrique de. **Avaliações de particularidades moleculares da 'Folha Murcha Me' e outros *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e desenvolvimento de Marcador SCAR.** 2008. 76 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)* – Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

Dentre os *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, a 'Folha Murcha Me' apresenta frutos de ótima qualidade, folhas enroladas e maturação no período de entressafra, com forte demanda por laranjas. Presta-se também para a extração de sucos, podendo ser usada na diversificação para fins industriais, tornando-se necessário o conhecimento da origem de tal variedade. Marcadores moleculares RAPD são amplamente usados em estudos de biologia molecular e servem como ferramentas na análise de diversidade genética. Neste contexto, este trabalho foi realizado com os objetivos de estudar a diversidade genética entre as laranjeiras, por meio de marcadores RAPD e, paralelamente, identificar regiões amplificadas de DNA que sejam capazes de diferenciar as laranjeiras, seqüenciar essas regiões e utilizar essas seqüências para a construção de marcadores SCAR. Porcentagens de dissimilaridade foram obtidas por meio do *software* NTSYS. O número de bandas polimórficas com 17 *primers* RAPD foi eficiente para análise dos dados, gerando a marca de 28 fragmentos polimórficos, apresentando correlação de alta magnitude ($r = 0,99$). Com esse número de fragmentos, a soma dos quadrados dos desvios em relação às amostragens e o valor de estresse foram menores que 0,05 (0,0431), sugerindo alta consistência na associação das matrizes de dissimilaridades. A análise de agrupamento, realizada com o método UPGMA, produziu um dendrograma. Sugere-se a formação de dois grupos, um deles constituídos pelas laranjeiras 'Folha Murcha Me', 'Valência Tardia', 'Natal', 'Pêra Rio', 'Baía ME' e 'Baía'. Os genótipos 'Folha Murcha Me' e os mutantes de folhas normais são 100% similares. Outro grupo seria formado pelas laranjas 'Seleta' 1 e 2 e pela 'Seleta x Cravo'. Um fragmento polimórfico foi transformando em SCAR. O marcador SCAR construído se mostrou eficiente, já que não ocorreu amplificação nos indivíduos 'Folha Murcha Me' e mutantes da 'Folha Murcha Me' e se mostrou eficaz amplificando a seqüência nos indivíduos, 'Valência Tardia', 'Natal', 'Pêra Rio', 'Baía ME', 'Baía', 'Seleta' 1 e 2 e pela 'Seleta x Cravo'. Portanto, ele pode ser usado na identificação de laranjeiras.

*Comitê Orientador: Dr. Luciano Vilela Paiva - UFLA (Orientador).

ABSTRACT

CARVALHO, Humberto Henrique de. **Evaluation of molecular particularities of the “Folha Murcha Me” and others *Citrus sinensis* (L.) Osbeck and development of SCAR Marker.** 2008. 76 p. Dissertation (Master in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais Brazil*.

Amongst *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, ‘Folha Murcha Me’ presents fruits of excellent quality, rolled up leaves and maturation in the period between harvests, with strong demand for oranges. It is also useful for juice extraction and may be used in the diversification for industrial purposes. Thus, it is very important to know the origin of such variety. Molecular markers RAPD are widely used in studies of molecular biology and as tools in the analysis of genetic diversity. In this context, this work was carried out to study the genetic diversity of the orange trees through RAPD markers and, at the same time, to identify amplified regions of DNA capable of differentiating the orange trees, sequencing these regions and using them for constructing SCAR markers. Percentages of dissimilarities were gotten by means of NTSYS software. The number of polymorphic bands with 17 RAPD primers was efficient for analysis of the data, generating the mark of 28 polymorphic fragments, presenting correlation of high magnitude ($r = 0.99$). With this number of fragments, the sum of the deviation squares in relation to the samplings and the value of stress were smaller than 0.05 (0.0431), suggesting high consistency in the association of the matrices of dissimilarities. The analysis of grouping, carried out with UPGMA method, produced a dendrogram. The formation of two groups is suggested, one of them consisting of orange trees ‘Folha Murcha Me’, ‘Valência Tardia’, ‘Natal’, ‘Pêra Rio’, ‘Baía ME’ and ‘Baía’. The genotypes ‘Folha Murcha Me’ and the normal leaf mutants are 100% similar. Another group would be formed by the oranges ‘Seleta 1 and 2 and by ‘Seleta x Cravo’. One polymorphic fragment was transformed into SCAR. The constructed SCAR marker was efficient, given no amplification in the individuals ‘Folha Murcha Me’ and mutants of ‘Folha Murcha Me’ and given amplify sequence in the individuals, ‘Valência Tardia’, ‘Natal’, ‘Pêra Rio’, ‘Baía ME’, ‘Baía’, ‘Seleta’ 1 e 2 and for ‘Seleta x Cravo’. Therefore, it can be used for identifying orange trees.

*Guidance Committee: Dr. Luciano Vilela Paiva - UFLA (Adviser)

1 INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira se destaca com produção aproximada de 20 milhões de toneladas anuais e, juntamente com os Estados Unidos, China, Espanha e México, produz mais de 50% dos citros consumidos no planeta (FAO, 2006).

A safra 2006/07 de laranja no estado de São Paulo terminou com crescimento pouco maior que 1%, acima do ciclo anterior, com 353,1 milhões de caixas de 40,8 quilos, em uma área de 560,1 mil hectares (Brasil, 2007). O crescimento da safra em uma mesma área se deve a ganhos de produtividade e foi registrado ganho de 1,2% (Abecitrus, 2007). O estado de Minas Gerais apresenta participação considerável na produção de laranjas, com uma safra estimada em 572 mil toneladas por ano (Brasil, 2007).

Existem muitas variedades de citros provavelmente originadas por mutações espontâneas, muitas delas quais exploradas comercialmente. Parte da complexidade filogenética e taxonômica observada em *Citrus* deve-se a particularidades de sua biologia reprodutiva e à sua ampla história de cultivo. Seus representantes apresentam grande intercompatibilidade sexual, o que possibilita a origem natural dos híbridos intergenéricos e interespecíficos ao longo do processo de evolução do grupo (Magalhães Junior et al., 2005).

Dentre as cultivares de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, a laranjeira ‘Folha Murcha Me’ apresenta frutos de ótima qualidade, cuja maturação se dá no período considerado de entressafra em que existe forte demanda comercial por laranjas. Por sua boa performance, quando em competição com outras variedades tardias, pode ser usada na diversificação para fins industriais. A origem dessa laranjeira é de difícil estabelecimento. Ela caracteriza-se por apresentar folhas enroladas e por ser de maturação tipicamente tardia (Paiva et al., 1993; Stuchi, 2007).

Considerada originária do estado do Rio de Janeiro, cidade de Araruama, é uma das principais variedades cultivadas naquele estado. Entretanto, há controvérsias sobre a sua origem, pois alguns autores a consideram uma variação espontânea de ‘Pêra’, ‘Valência’ ou ‘Seleta’ (Magalhães Junior et al., 2005). Segundo Donadio et al. (1995), a ‘Folha Murcha’ é uma espécie tipicamente brasileira, pois não há citações de tipos semelhantes na literatura mundial. Assim, é fundamental a compreensão da origem de tal variedade, pois, sendo de maturação tardia (Paiva et al., 1993), torna-se uma ótima opção para o citricultor.

Em um pomar particular na cidade de Lavras, estado de Minas Gerais, foi observado que alguns indivíduos, denominados popularmente ‘Seleta Folha Murcha’, obtidos a partir de um mesmo indivíduo por meio da limpeza clonal por microenxertia *in vitro* (Paiva et al., 1993), apresentavam galhos maiores com folhas relativamente normais, não murchas e com limbo plano.

Com o surgimento das técnicas de biologia molecular, apareceram diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente no DNA. Dentre eles, se destaca o RAPD, que difere da PCR por utilizar *primers* únicos, decâmeros, que se anelam aleatoriamente nas duas fitas de DNA. Marcadores RAPD têm sido utilizados em estudos de mapeamento genético, na seleção de híbridos e na avaliação de diversidade genética entre tangerina-cravo (*Citrus reticulata* Blanco) e laranja-pêra *C. sinensis* (L.) Osbeck; (Oliveira et al., 2001, 2002). A caracterização de genótipos em citros por meio de marcadores RAPD também foi realizada por Cai et al. (1994), Coleta Filho (1998), Domingues (1998), Federici et al. (1998) e Bastianel et al. (2001), mostrando que tais marcadores são adequados para diferenciar genótipos de citros. Os marcadores RAPD fornecem informações sobre a distância genética e o genoma dessas variedades de citros, contribuindo para caracterizá-las molecularmente.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar particularidades moleculares da ‘Folha Murcha Me’ e outros *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, estudar a diversidade genética entre as laranjeiras por meio de marcadores RAPD e, paralelamente, identificar regiões amplificadas de DNA que sejam capazes de diferenciar as laranjeiras, seqüenciar essas regiões e utilizar essas seqüências para a construção de marcador SCAR.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A família Rutaceae

Os três gêneros principais, *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus*, pertencem à subtribo Citrinae, da tribo Citreae, da subfamília *Aurantioideae* e família Rutaceae (Swingle & Reece, 1967).

De acordo com Judd et al. (1999), a família Rutaceae é constituída de árvores ou arbustos geralmente com espinhos, cavidades secretoras de óleos aromáticos e vários tipos de tricomas. As folhas são alternadas ou opostas, raramente verticiladas, freqüentemente compostas, pinadas ou reduzidas trifoliadas ou unifoliadas, ocasionalmente palmadas, folíolos com pontuações translúcidas, margens inteiras ou crenadas, venação pinada, estípulas ausentes. Inflorescências freqüentemente reduzidas a uma única flor, terminal ou axilares. Flores bissexuais ou unissexuais, em plantas dióicas ou monóicas, geralmente radiais, quatro a cinco sépalas livres ou, às vezes, imbricadas na base; quatro a cinco pétalas distintas ou unidas; oito a dez estames; três a seis grãos de pólen; quatro a cinco carpelos muitos, sinárpicos; ovário súpero com placentação axilar; um a vários óvulos. Fruto drupa, cápsula, sâmara, folículo ou baga com mesocarpo desenvolvido ou não, casca dura a coriácea, gomos ou polpa derivados da parede do ovário ou de tricomas multicelulares preenchidos por suco. Embrião reto a curvado, endosperma presente ou ausente.

As espécies da família Rutaceae possuem distribuição principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Apresenta 155 gêneros e cerca de 930 espécies, incluindo comestíveis, como o *Citrus*, espécies ornamentais como *Murraya* e *Phellodendron* e medicinais, como a arruda (*Ruta*) (Judd et al., 1999).

2.2 Gênero *Citrus*

O sistema de classificação sugerido por Swingle & Reece (1967) compreende 16 espécies, é o mais amplamente aceito e classifica as principais espécies cultivadas do gênero *Citrus*. Entre elas: tangerinas (*Citrus reticulata* Blanco), toranjas (*C. grandis* Osbeck), laranja-azedada (*C. aurantium* L.), laranja-doce (*C. sinensis* Osbeck), limas (*C. aurantifolia* [Christm.] Swingle), cidras (*C. medica* L.), limões (*C. limon* Burm. f.) e pomelos (*C. paradisi* Osbeck).

O gênero *Citrus* é originário do sudeste da Ásia, leste do Arquipélago Índico, Filipinas e Nova Guiné, apresentando relações filogenéticas que se estendem pelas Índias Orientais, Austrália, Centro da China, Japão e África. É a culminação de um período muito longo de evolução que, certamente, começou antes de a Austrália ser separada de Nova Guiné e Ásia, provavelmente mais que 20 milhões de anos atrás (Swingle & Reece, 1967).

É representado por plantas de porte médio (arbóreo/arbustivo), flores brancas e aromáticas e frutos tipo baga, contendo vesículas preenchidas por um suco de grande interesse comercial. O número de sementes por fruto varia de zero a 25. As sementes possuem, além de embrião sexual, embriões nucelares, também chamados de assexuais, agâmicos, adventíceos, apomíticos ou somáticos. Os representantes desse gênero possuem um conjunto básico cromossômico $x=9$, sendo relatados poucos indivíduos triploides na natureza (Magalhães Junior et al., 2005).

Variações morfológicas em folhas, flores e, principalmente, em frutos, podem ser observadas em espécies de *Citrus*. O fruto maduro pode ser oblado, esférico, ovóide ou mesmo periforme, com variações no tamanho, com diâmetros de 2 cm a, até mesmo, 30 cm. A coloração da casca pode variar do amarelo ao verde, como nas limas, até ao vermelho-alaranjado, como nas tangerinas (Swingle & Reece, 1967).

Parte da complexidade filogenética e taxonômica observada em *Citrus* deve-se a particularidades de sua biologia reprodutiva e a sua ampla história de cultivo. Seus representantes apresentam grande intercompatibilidade sexual, o que possibilita a origem natural dos híbridos intergenéricos e interespecíficos ao longo do processo de evolução do grupo (Magalhães Junior et al., 2005).

Existem muitas variedades de citros provavelmente originadas por mutações espontâneas, muitas das quais exploradas comercialmente. Os mutantes naturais de maior impacto são aqueles de crescimento compacto, com melhores coloração de frutos, variação de ciclo e ausência de sementes meristemáticas; as mutações ocorrem em gametas, diretamente no pólen ou no óvulo, nos tecidos do nucelo dentro da semente e ou nas células somáticas (mutações de gemas). A causa de tais alterações é pouco conhecida, mas existem indícios de que estresse ambiental ou nutricional, constituição genética da variedade estudada, bem como radiações naturais auxiliam esse processo (Domingues, 1998).

2.3 Variedade Folha Murcha

Esforços vêm sendo realizados a fim de selecionar novas variedades de laranja-doce, que apresentem interesse comercial e maior tolerância a doenças (Cristofani et al., 2001). Dentre as cultivares de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, a laranjeira Folha Murcha é uma variedade com frutos de ótima qualidade, cuja maturação se dá nos meses de janeiro a março, período considerado de entressafra e no qual existe forte demanda por laranjas. Sartori et al. (2002) citam a laranja 'Folha Murcha' como extremamente tardia. Os frutos apresentam boa conservação na planta, medem 6,35 cm de altura, 6,48 cm de diâmetro, apresentam forma arredondada, levemente achatada, a casca é fina, levemente rugosa, de cor laranja, típica das laranjas-doces. A polpa é fina, com eixo central compacto (Donadio et al., 1995).

Por sua boa performance, quando em competição com outras variedades tardias, pode ser usada na diversificação para fins industriais. Essa laranja, também conhecida como ‘Valência Folha Murcha’, ‘Natal Folha Murcha’ e ‘Seleta Folha Murcha’, tem sua origem de difícil estabelecimento, caracterizando-se por apresentar folhas enroladas e de maturação tipicamente tardia (Stuchi, 2007). A ‘Folha Murcha’ é a segunda variedade mais plantada no Paraná, por apresentar características agrônomicas e industriais desejáveis (Stenzel et al., 2005).

A característica típica desta variedade é apresentar as folhas enroladas ou retorcidas, o que lhe confere o nome. Medições realizadas em Jaboticabal, em folhas adultas, forneceram os seguintes dados: comprimento 9,08 cm, largura 5,56 cm, pecíolo pouco alado, com comprimento de 1,75 cm e largura de 0,51 cm. A folha, devido à sua forma enrolada, parece ter apenas 2 cm de largura (Donadio et al., 1995). Estes autores citam que é comum, nas plantas, aparecerem ramos com folhas “normais” ou mais vigorosas do que as típicas numa mesma planta, se tornando um problema de natureza agrônômica, pois ocorre ausência de fixação de caracteres fenotípicos.

Considerada originária do estado do Rio de Janeiro, cidade de Araruama, é uma das principais variedades cultivadas naquele estado. Entretanto, há controvérsias sobre a sua origem, pois alguns autores a consideram uma variação espontânea da ‘Pêra’, ‘Valência’ ou ‘Seleta’ (Magalhães Junior et al., 2005). Segundo Donadio et al. (1995), a variedade ‘Folha Murcha’ é uma espécie tipicamente brasileira, pois não há citações de tipos semelhantes na literatura mundial. Assim, é de fundamental importância compreender a origem de tal variedade, pois, sendo de maturação tardia (Paiva et al., 1993; Sartori et al., 2002; Stuchi, 2007), ela se torna uma ótima opção para o citricultor. Financeiramente, é muito viável, pois, em fevereiro de 2008, época de maturação da laranja ‘Folha Murcha’, uma caixa de laranja ‘Pêra Rio’

custava cerca de R\$ 28,00, enquanto que, no mês de junho de 2007, período de safra da laranja 'Pêra', a mesma caixa chegou a custar R\$ 12,00 (Ceasa-MG, 2008).

2.4 Marcadores genéticos

A primeira idéia de se utilizar marcadores genéticos, visando à seleção de um caráter quantitativo, ocorreu em 1923, no feijoeiro (Ramalho et al., 2004).

A caracterização de cultivares pode se basear nas diferenças de morfologia ou das moléculas de proteínas ou de DNA, as quais são, comumente, denominadas de diferenças moleculares (Conti et al., 2002). Os primeiros marcadores a serem utilizados foram os morfológicos, os quais agrupam populações de acordo com similaridades morfológicas de frutos, sementes, flores, etc. Entretanto, tais marcadores são controlados por genes dominantes, o que não lhes permite distinguir plantas heterozigotas. Além disso, muitos desses marcadores dependem da ontogenia do vegetal e são bastante influenciados por variações ambientais (Robinson, 1998).

Diferentes métodos filogenéticos têm sido empregados no estudo da divergência genética e na caracterização da diversidade entre e dentro de espécies vegetais. Tais métodos variam conforme o tipo de informação considerada, como as características morfológicas, fisiológicas, ecológicas e as características genético-moleculares (Diniz Filho, 2000).

Marcadores genéticos são quaisquer características, processos bioquímicos ou fragmentos de DNA que permitem a distinção de indivíduos geneticamente diferentes. Segundo Sakiyama (1993), a palavra marcador tem sido utilizada para designar fatores morfológicos, fisiológicos, bioquímicos ou genéticos, passíveis de serem identificados e que permitem o estudo comparativo de genótipos e sua progênie.

A decisão sobre qual método utilizar depende dos recursos disponíveis e do grau de confiabilidade do método. A comparação entre métodos de caracterização é uma maneira de estimar o poder de resolução de cada um. Com dados morfológicos e agronômicos ou com moleculares é possível estimar o grau de similaridade entre cultivares (Conti et al., 2002).

Os marcadores moleculares surgiram recentemente, com o advento da biologia molecular, o que permitiu que fossem detectados polimorfismos genéticos no DNA. O número de marcadores disponíveis para análise genética passou a ser virtualmente ilimitado e sua utilização pode ser estendida às espécies menos estudadas (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Além disso, eles permitem um grande número de informações em curto espaço de tempo e por um custo acessível (Xavier, 2001).

Os marcadores moleculares vêm sendo utilizados na construção de mapas genéticos e na seleção de germoplasma, em programas de melhoramento, permitindo a caracterização de diferentes genótipos (*fingerprinting*), o estabelecimento de filogenias, a seleção assistida de genes para caracteres de interesse, a determinação de similaridades entre indivíduos, usando análises de agrupamento e a clonagem de genes baseada em mapa (Painting, 1996). Atualmente, os marcadores moleculares são as principais ferramentas em estudos de diversidade genética, localização de genes de interesse econômico e construção de mapas genéticos de riqueza genômica (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Os marcadores moleculares e bioquímicos, ao contrário dos marcadores morfológicos, são mais sensíveis à detecção do polimorfismo, pois inferem comparações no DNA, propiciando uma estimativa mais apurada das heranças genéticas, com a vantagem de oferecer um estoque quase ilimitado de características moleculares, dentro e entre populações, sem ater-se aos efeitos ambientais e ao ciclo de vida da planta (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Segundo

Lacerda et al. (2002), os avanços dos estudos moleculares trouxeram um aumento significativo dos conhecimentos na área de genética de populações, com diversas aplicações em estudos evolutivos, permitindo avaliar a diversidade genética diretamente no DNA, livre de influências do ambiente ou do estágio de desenvolvimento do organismo analisado.

O marco inicial para a ‘era dos marcadores moleculares’ aconteceu a partir da década de 1980, com o aparecimento da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Esta técnica envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase e baseia-se na síntese enzimática de um fragmento específico de DNA utilizando dois oligonucleotídeos inicializadores (*primers*) que se anelam nas fitas opostas de um fragmento de DNA molde, flanqueando a regiões de interesse (Mullis & Faloona, 1987). Vem sendo utilizada na construção de mapas genéticos e na seleção de germoplasma, em programas de melhoramento, permitindo a caracterização de diferentes genótipos (*fingerprinting*), o estabelecimento de filogenias, a seleção assistida de genes para caracteres de interesse e a determinação de similaridades entre indivíduos, usando análises de agrupamento e a clonagem de genes (Painting, 1996).

Com o surgimento das técnicas modernas de biologia molecular, apareceram diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente no DNA.

Os tipos de marcadores hoje disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade no DNA. Os principais tipos de marcadores podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los. São eles: hibridização ou amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização, estão os polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) e os minissatélites ou número variável de repetições em tandem (VNTR). Já aqueles revelados por amplificação incluem

os marcadores do tipo polimorfismos de DNA amplificados ao acaso (RAPD), regiões amplificadas de seqüências caracterizadas (SCAR), microssatélites ou seqüências simples repetidas (SSR) e polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP). Destes, Milach (1998) destaca o RAPD, em função da simplicidade, baixos custos e viabilidade de uso por qualquer pesquisador.

Muitos métodos tradicionais de clonagem, seqüenciamento e análise de polimorfismo de DNA foram acelerados ou substituídos pelo uso das inúmeras derivações da técnica de PCR. Em 1990, o PCR foi modificado pela utilização de iniciadores de seqüência aleatória e o procedimento passou a ser chamado de polimorfismos de DNA amplificados ao acaso (RAPD) (Ramalho et al., 2004).

As características moleculares mais comumente usadas até início da década de 1990, em espécies vegetais de interesse agrônômico, eram isoenzimas e proteínas. A partir de então, marcadores moleculares do tipo RAPD passaram a predominar em estudos de caracterização de germoplasma. A tecnologia RAPD envolve a amplificação simultânea de vários locos anônimos no genoma, utilizando *primers* de seqüência arbitrária (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Com a diversidade de técnicas moleculares disponíveis, estudos comparativos surgiram, com o propósito de buscar marcadores mais sensíveis. Patzak (2001) demonstrou que, entre os marcadores AFLP, SSR e RAPD utilizados para variedades de *Humulus lupulus* L., os dois últimos demonstraram alto coeficiente de correlação genética (0,996). Muitos estudos nessa linha foram desenvolvidos e há um especial destaque para o marcador RAPD (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Enfim, a principal vantagem do RAPD em relação aos demais marcadores é que este focaliza-se na utilização de *primers* mais curtos e de seqüência arbitrária, permitindo número ilimitado de marcadores, haja vista a ocorrência de um número maior de anelamentos; a rapidez operacional, por não

requerer isolamento de uma sonda específica e o baixo custo, diante das facilidades de síntese de *primers* menores. Além disso, a implantação dessa técnica em análise de diversidade genética facilitou e acelerou estudos genômicos de espécies tradicionais e permitiu análises em espécies não contempladas (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

2.5 Marcadores genéticos em *Citrus*

O estudo de diversidade genética com variedades de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck utilizando marcadores moleculares já vem sendo realizado em muitas partes do mundo e inúmeras contribuições para a construção de mapas genômicos de laranjeiras já foram feitas.

Marcadores moleculares RAPD têm sido utilizados em estudos de mapeamento genético e na seleção de híbridos e avaliação de diversidade genética entre tangerina-cravo (*Citrus reticulata* Blanco) e laranja-pêra *C. sinensis* (L.) Osbeck. As bandas polimórficas permitiram a seleção mais eficiente com apenas uma reação de amplificação, contornando as limitações relacionadas à natureza dominante dos marcadores RAPDs (Oliveira et al., 2001, 2002).

A caracterização de genótipos em citros também foi realizada por Bastianel et al. (2006), observando alto grau de polimorfismo nos materiais estudados. De acordo com os autores, a utilização de um número maior de *primers* aumenta a probabilidade de se encontrar diferenças no genoma de plantas.

Cai et al. (1994) utilizaram marcadores RAPD e RFLP na construção de mapas de ligação genética em citros. Eles afirmaram a estabilidade e a reprodutibilidade de RAPD no estudo com citros, uma vez desconsideradas as bandas com menor intensidade, mostrando a praticidade de marcadores RAPD na construção desses mapas em frutíferas. Marcadores RAPD foram usados

também para avaliar a similaridade genética entre acessos de mandarins, permitindo que os autores propusessem ser o grupo de mandarins uma única espécie, *C. reticulata* Blanco, composta de diversos indivíduos geneticamente diferentes e de um grande número de híbridos (Coleta Filho et al., 1998).

Federici et al. (1998) estabeleceram relações filogenéticas entre o gênero *Citrus* e gêneros relacionados pela análise de marcadores moleculares RAPD e RFLP. Os dados mostram que diversos acessos de citros foram, provavelmente, designadas em espécies erradas.

Domingues (1998), ao caracterizar 61 acessos de laranja-doce existentes no banco de germoplasma de *Citrus* do Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, verificou, pela análise de isoenzimas e RAPD, a baixa variabilidade intra-específica, originando geralmente bandas monomórficas. O elevado polimorfismo morfológico e agrônômico confrontado com o baixo polimorfismo molecular constitui, segundo o autor, evidência da predominância das mutações somáticas como fonte principal de variabilidade intra-específica em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.

O uso de marcadores moleculares tem sido um valioso e preciso instrumento para compreender a genética do citros. Microsatélites são seqüências com um a quatro nucleotídeos, repetitivos em tandem, que são abundantes na eucromatina dos vertebrados, dos insetos e das plantas. São considerados marcadores ideais para traçar o genoma, a identificação e a discriminação genética e física dos genótipos, os estudos de genética de populações e os estudos forenses, dentre outros (Koehler-Santos et al., 2003). O polimorfismo resultado das unidades repetidas pode ser facilmente detectado por PCR, usando os *primers* que flanqueiam as seqüências SSR.

Chen et al. (2006) e Jiang et al. (2006) investigaram seqüências simples repetidas (EST) de laranjas-doces (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), laranjas trifoliadas (*Poncirus trifoliata* Raf) e outras cultivares. Em conseqüência, no

segundo trabalho, foram projetados, com sucesso, 25 *primers* e, por meio de PCR, eles conseguiram demonstrar a existência de polimorfismo em seis cultivares, confirmando que a base de dados de EST pode ser eficientemente explorada para o desenvolvimento de marcadores SSR. Produtos de microssatélites derivados de EST podem ser usados para a obtenção de mapas genéticos e físicos de EST-SSR (Chen et al., 2006).

Vinte e quatro marcadores microssatélites (SSR) foram usados para detectar polimorfismos em uma coleção de germoplasma de citros da Universidade da Califórnia, sustentando a hipótese de que havia um pequeno número de espécies de *Citrus* de ocorrência natural e um grande número surgiu por hibridização dessas formas (Barkley et al., 2006). Novelli et al. (2006) desenvolveram esses marcadores moleculares microssatélites (SSR) para laranja-doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). Nesse estudo, foram encontrados quatro loci microssatélites considerados eficientes, úteis na certificação de variedades.

Em função de toda essa variabilidade, avaliações moleculares podem servir, num futuro próximo, como indicadores de seleção de produtividade de novas variedades para as regiões com potencial para o cultivo comercial da ‘Folha Murcha’, não somente no estado de Minas Gerais, mas também em todo o país. Também podem ser uma contribuição para a compreensão das variedades de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.

2.6 Marcador SCAR

O RAPD consiste em utilizar *primers* de seqüência arbitrária para dirigir reações de amplificação, gerando, assim, grande quantidade de polimorfismo de fragmentos de DNA, oriundos de diferentes partes, espalhados por todo o genoma (incluindo regiões de DNA repetitivo). Essa técnica pode ser usada no *fingerprinting*, além de permitir a detecção de divergências mínimas entre

espécies ou clones (Brammer, 2000). Uma abordagem mais recente é a conversão dos marcadores RAPD em regiões amplificadas de seqüências caracterizadas (SCAR), termo utilizado por Paran & Michelmore (1993) para definir marcadores RAPD cuja seqüência interna tenha sido determinada, permitindo compor *primers* mais longos, se possível ricos em GC e de seqüência específica. A conversão dos marcadores RAPD em marcadores do tipo SCAR possibilita contornar o problema da reprodutibilidade, podendo ser usada na identificação varietal. Os produtos RAPD são clonados e seqüenciados, redesenhando *primers* PCR mais longos e, então, convertendo esses marcadores ao acaso para regiões amplificadas caracterizadas por seqüência (SCAR). Nesse caso, a amplificação da seqüência específica do DNA ocorre em temperaturas de pareamento mais elevadas, o que torna o processo mais reproduzível (Carvalho et al., 2000).

Os marcadores SCAR podem ser utilizados como pontos de referência física do genoma, servindo para mapeamento ou como marcadores genéticos, quando estão associados a algum genótipo de interesse (Ling et al., 2000; Nicolosi et al., 2000; Noir et al., 2003; Domingues et al., 2006).

2.7 Estimativa de similaridade genética

Estudos de divergência e relacionamentos filogenéticos, entre espécies de interesse agrônômico, têm sido uma das contribuições mais importantes dos marcadores moleculares. Para isso, são utilizadas técnicas multivariadas, como análises de agrupamento e ordenação, para uma representação simplificada dos resultados. O ponto inicial destas análises é a construção de uma matriz de similaridade entre os genótipos que estão sendo avaliados, obtida a partir de um coeficiente de similaridade (Duarte, 1998). Vários coeficientes têm sido utilizados, não existindo uma justificativa para a preferência por algum deles em particular. A análise de agrupamentos (*cluster analysis*) é o termo usado para

descrever diversas técnicas numéricas cujo propósito fundamental é classificar os valores da matriz de dados sob estudo em grupos discretos.

A análise multivariada pode ser empregada como uma poderosa ferramenta para estimar a dissimilaridade genética (distância genética relativa), no intuito de auxiliar na escolha de constituições genéticas que poderão resultar, por meio de suas progênies, em recombinações superiores (Gaur et al., 1978).

A utilização de técnicas multivariadas para estimar a divergência genética é muito eficiente em estudos de dissimilaridade genética (Machado, 1999) e tem se tornado comum, sendo empregada em vários trabalhos e em diversas culturas, tais como milho (Miranda et al., 2003), arroz (Areias et al., 2006) e feijão (Bonett et al., 2006; Ceolin et al., 2007; Elias et al., 2007).

2.7.1 Coeficientes de similaridade

A avaliação da similaridade genética por meio de informações obtidas por estudos moleculares é estabelecida por um coeficiente de similaridade, que permite melhor visualização dos relacionamentos entre os indivíduos (Krzanowsky, 1998). Diversos coeficientes de similaridade podem influenciar as análises subsequentes de agrupamento e a ordenação dos genótipos estudados. Segundo Dias (1994), a escolha do coeficiente mais adequado está diretamente relacionada com as propriedades inerentes a cada coeficiente. Para Krzanowsky (1998), a escolha é direcionada por aspectos como a natureza dos dados e o tipo de análise a ser realizada.

Além do grande número de coeficientes de similaridade encontrados na literatura, é possível observar diferentes coeficientes sendo utilizados com o mesmo propósito, assim como os mesmos coeficientes sendo aplicados com propósitos diferentes (Emygdio et al., 2003). No entanto, nem todos os autores justificam a razão da escolha de determinado coeficiente. Segundo Jackson et al.

(1989), a escolha subjetiva do método de agrupamento ou coeficiente de similaridade pode causar problemas, comprometendo a natureza da análise.

Os coeficientes de similaridade mais simples relacionam-se com as variáveis dicotômicas, em que cada variável tem somente dois valores. Os marcadores RAPD são binários e incluídos nessa variável. Os vários coeficientes de similaridade se diferenciam por considerar ou não a ocorrência das quatro combinações possíveis (Bicalho, 2006), conforme apresentado na Tabela 1.

TABELA 1 Possíveis resultados de comparações de dois genótipos por marcadores RAPD

Genótipo j	Genótipo i	
	1	0
1	a (1,1)	b (1,0)
0	c (0,1)	d (0,0)

em que combinam-se os genótipos *i* e *j*: (a) presença de banda no par de genótipos; (b) presença no genótipo *i* e ausência em *j*; (c) ausência no genótipo *i* e presença em *j* e (d) ausência de bandas no par de genótipos (Dias, 1994; Cruz & Carneiro, 2003).

Os coeficientes de similaridade têm sido propostos baseados nos padrões de coincidência ou não coincidência das variáveis, na comparação de dois genótipos, combinando as quantidades de (a), (b), (c) e (d). Conforme os diferentes pesos dos valores de (a), (b), (c) e (d) atribuídos pelos diferentes coeficientes e o modo pelo qual são considerados, o agrupamento dos genótipos pode ser influenciado (Emygdio et al., 2003).

De acordo com Cruz & Carneiro (2003), três coeficientes se destacam como os mais empregados: o de coincidência simples, o de Jaccard e o de Sorensen Dice (Nei & Li), dos quais os dois últimos excluem a coincidência do tipo (00) como fator de similaridade.

Para Duarte (1998), a comparação entre os dois principais coeficientes de similaridade utilizando marcadores RAPD em feijoeiro mostrou pequenas alterações nas análises de agrupamento e considerou o coeficiente de Sorensen-Dice como o mais adequado para o estudo da divergência genética em feijoeiro, utilizando RAPD. Meyer (2002) comparou coeficientes de similaridade usados em análises de agrupamento com dados de marcadores moleculares dominantes, Jaccard, Sorensen-Dice, Andenberg, Ochiai, *simple matching*, Rogers e Tanimoto, Ochiai II e Russel e Rao. Os resultados indicam que os coeficientes de Jaccard e Sorensen-Dice mostram resultados semelhantes entre si, o que foi atribuído ao fato de eles apresentarem como propriedade comum a desconsideração da ausência conjunta de bandas.

2.7.2 Análise de agrupamento

As linhas e as colunas dos dados obtidos podem ser aplicadas em qualquer matriz retangular destinada a representações gráficas. O tipo de matriz gerada pode ser de similaridade ou dissimilaridade, a qual contém informações sobre proximidades entre os indivíduos. A matriz de similaridade pode ser convertida em dissimilaridade, usando qualquer método matemático de transformação (Krzanowsky, 1998). Para Cruz & Carneiro (2003), pode-se avaliar a diversidade genética entre acessos por meio das informações obtidas pelos marcadores moleculares, a partir dos quais é avaliada a presença ou a ausência de marcas (bandas), codificadas em zeros (0) e uns (1).

A estimativa de similaridade (sg_{ij}) é uma medida estabelecida entre um genótipo (i) e outro (j). Com base nesses valores podem ser obtidas as medidas

de dissimilaridade, em que $dg_{ij} = 1 - sg_{ij}$ (Cruz & Carneiro, 2003; Emygdio et al., 2003).

Vários são os tipos de técnicas de agrupamento encontradas na literatura. Manly (1995) destacou que, nas técnicas que produzem dendrogramas, o primeiro passo é calcular as medidas de dissimilaridade (ou similaridade) entre todos os pares possíveis de indivíduos e, assim, formar os grupos por processos aglomerativos ou divisórios. Inicialmente, na aplicação dessas técnicas, são estabelecidos centros de grupos, arbitrariamente, e cada indivíduo é agrupado em relação ao centro mais próximo.

Análise de agrupamento (*cluster analysis*) é um termo usado para descrever diversas técnicas numéricas, cujo propósito fundamental é classificar os valores de uma matriz de dados, sob estudo em grupos discretos, com o objetivo de classificar, por algum critério (populações, clones, variedades, cultivares, procedências, progênies, etc.), em vários grupos, de tal forma que exista homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre grupos, com o uso de medidas de dissimilaridades (Dias, 1994; Cruz & Regazzi, 1997; Cruz & Carneiro, 2003).

De maneira geral, ao se fazer o agrupamento, as informações individuais são perdidas, restando apenas aquelas referentes à média dos grupos. Porém, quando se trabalha com muitos indivíduos, o número de estimativas de similaridade/dissimilaridade obtidas é relativamente grande, o que dificulta o reconhecimento de grupos homogêneos (Arriel et al., 2006).

Para Cruz & Carneiro (2003), os métodos de agrupamentos classificam-se em dois tipos: hierárquicos e não hierárquicos. A diferença entre eles está no fato de o primeiro envolver a construção de dendrograma. Vários tipos de agrupamentos hierárquicos foram descritos por este autor, destacando-se o método das médias das distâncias, *Unweighted Pair Group Method Using*

Arithmetic Averages, ou UPGMA, que utiliza, como critério para a formação dos grupos, a média das distâncias entre os pares de itens que formam cada grupo.

A análise de agrupamento permite a construção de um dendrograma, identificando-se os grupos homogêneos. Para Cruz & Regazzi (1997), os métodos de agrupamento mais utilizados têm sido o método do vizinho mais próximo, o método do vizinho mais distante e o método das médias das distâncias. De acordo com Cruz & Carneiro (2003), esses métodos estabelecem o dendrograma de acordo com os genótipos com maior similaridade. O primeiro tem como desvantagem a incapacidade de discernir grupos pobremente separados. O que há de comum entre todos os três métodos de agrupamento é que eles operam sobre a matriz de distância, dispensando o retorno à matriz de dados originais (Dias, 1994).

Arriel et al. (2006) descreve uma comparação entre os métodos de agrupamento, incluindo os três descritos anteriormente e mostra que o UPGMA apresenta um melhor ajuste para as distâncias originais e estimadas. A construção de dendrogramas, por Totti et al. (2001), mostrou que o método UPGMA foi superior aos outros métodos utilizados, por apresentar grupos de acessos mais coerentes, com menor grau de encadeamento entre espécies e com alto valor de correlação cofenética.

Dentro do não hierárquico, tem-se o método de otimização, desenvolvido por Tocher (Rao, 1952), que estabelece grupos otimizando-se determinados critérios de agrupamento, cujas médias das medidas de distância, dentro de cada grupo (intragrupos), são sempre menores que as distâncias médias entre quaisquer grupos (intergrupos). A sua diferença, em relação aos hierárquicos, reside no fato de os grupos formados serem homogêneos e mutuamente exclusivos entre si (Cruz, 1990; Dias, 1994; Pereira, 1989). Segundo Cruz (1990), as delimitações dos grupos podem ser definidas por meio de exame visual do dendrograma.

Como o emprego de técnicas multivariadas no reconhecimento da diversidade genética impõe certo grau de estrutura nos dados, é importante que diferentes critérios de agrupamento sejam utilizados e que se considere como correta a estrutura resultante da maior parte deles, para se assegurar que o resultado obtido não seja um artefato da técnica utilizada (Arriel et al., 2006).

Conti et al. (2002), trabalhando com marcadores moleculares em morangueiros, formaram dendrogramas a partir das matrizes de coeficientes de similaridade e analisaram, pelo método do desempenho seqüencial de aglomeração hierárquica de grupos (“*Sahn Clustering*” – *seqüencial, agglomerative hierarquic, nonoverlapping clustering methods*), com o coeficiente do método da média aritmética entre pares não ponderados (UPGMA).

A distorção produzida no processo de agrupamento é estimada por um coeficiente de correlação cofenética (Rodrigues & Diniz-Filho, 1998). A matriz cofenética C é a matriz de distâncias entre os pares de genótipos, constituída de elementos c_{ij} que representam os níveis de fusão verificados no dendrograma. Para se obter a correlação cofenética, basta correlacionar os elementos d_{ij} e c_{ij} das matrizes D e C , respectivamente. Valores de r_c acima de 0,80 indicam um bom ajuste entre as duas matrizes (Dias, 1994).

A comparação entre as matrizes D e C é realizada com base no teste de Z de Mantel, que compara duas matrizes por meio de permutações, sendo, portanto, um teste de significância (Manly, 1997).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição do material

O experimento foi executado no Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras. O material vegetal (folhas jovens) foi coletado em uma propriedade rural particular situada no município de Lavras (latitude de 21°14S, longitude 45°00W), estado de Minas Gerais. Foram utilizados dois indivíduos denominados ‘Folha Murcha Microenxertada’, os quais apresentavam ramos mutantes com folhas não murchas, totalizando quatro amostras e um indivíduo ‘Folha Murcha Me’, que não apresentava mutação. Tais indivíduos são clones de segunda geração, nos quais os primeiros enxertos foram obtidos após microenxertia *in vitro* (Paiva et al., 1993).

Para a comparação com os genótipos da ‘Folha Murcha’, foram coletadas amostras utilizadas comercialmente, entre elas ‘Valência Tardia’, ‘Pêra-rio’, ‘Bahia’, ‘Bahia Microenxertada’ e ‘Natal’, todas provenientes do município de Lavras, MG. Também variedades de ‘Seleta’ do estado do Rio de Janeiro, uma delas provenientes da cidade Silva Jardim e duas provenientes de Araruama, sendo uma delas enxertada em limoeiro cravo.

Na Figura 1, observam-se os indivíduos ‘Folha Murcha Me’. Em detalhe, a ‘Folha Murcha Me’ característica, seguida pela comparação com uma folha de aspecto normal.



FIGURA 1: Em A, laranjeira ‘Folha Murcha’. Em B, detalhe de um ramo. Em C, aspecto de uma folha mutante com aspecto normal, em contraste com uma folha enrolada.

A descrição dos 13 genótipos analisados, bem como os respectivos códigos, é apresentada na Tabela 2.

TABELA 2 Indivíduos utilizados na análise da distância genética entre variedade de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.

Planta	Código	Variedade
1	FMIM	Folha Murcha Me I: mãe do mutante I
1	MI	Mutante I
2	FM2M	Folha Murcha Me II: mãe do mutante II
2	MII	Mutante II
3	FMI	Folha Murcha Me Isolada sem mutante
4	VT	Valência tardia
5	N	Natal
6	PR	PêraRio
7	B	Bahia
8	BM	Bahia Microenxertada
9	S1	Seleta de Silva Jardim, RJ
10	S2	Seleta de Araruama, RJ
11	S x C	Seleta de Araruama x cravo

3.2 Extração do DNA

Para extração do DNA, foram utilizadas folhas verdes, sadias, jovens, dos 13 genótipos de laranjeira, identificados na Tabela 2. As folhas de cada planta foram identificadas, embaladas, congeladas, armazenadas em nitrogênio líquido e conduzidas ao Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras, para a extração do DNA.

Os DNAs foram extraídos utilizando-se metodologia semelhante à descrita por Wadt (1997), com algumas modificações. Foram feitas duas repetições para cada amostra. Cerca de 500 mg de folhas jovens foram maceradas em almofariz de porcelana contendo N₂ líquido, até a obtenção de um pó fino. Em seguida, o pó foi transferido para microtubos congelados em N₂ líquido e adicionaram-se 800 µl de tampão de extração CTAB [2% de CTAB, 100 mM de Tris (pH 8,0), 20mM de EDTA (pH 8,0), 1,4M de NaCl]. Foram adicionada 2 µl de β-mercaptoetanol, a 65°C. O material macerado foi colocado em banho-maria, por 60 minutos, a 65°C e homogeneizado a cada 15 minutos. A extração dos ácidos nucléicos foi realizada com solução de clorofórmio:álcool isoamil, na proporção de 24:1, separando-se a fase orgânica da aquosa por centrifugação a 18.000 g, por 5 minutos, e coletando-se o sobrenadante. Com a fase aquosa em novo tubo, foi feita mais uma extração com clorofórmio:álcool isoamil (24:1), para a eliminação de impurezas. A precipitação das moléculas de ácidos nucléicos, contidas em solução aquosa recuperada após centrifugação com clorofórmio, foi feita pela adição 900 µl isopropanol gelado (mantido em freezer a -20°C). Os microtubos foram incubados a 20°C, por um período mínimo de 30 minutos.

Após precipitação do DNA, centrifugou-se por 3 minutos, a 1.8000g, à temperatura de 20°C, descartando-se o sobrenadante em seguida. Ao precipitado acrescentaram-se 300 µl de etanol 70% gelado e, em seguida, fez-se uma

centrifugação a 18.000 g, por 3 minutos, à temperatura ambiente. O precipitado formado foi colocado em câmara de fluxo laminar para secar. Posteriormente, os ácidos nucléicos foram solubilizados em tampão TE (100µl) [1 mM de Tris e 0,1 mM EDTA] e a concentração desses compostos obtida por espectrofotometria.

A quantificação total do DNA, em ng, foi realizada em aparelho “GeneQuant” (*Amersham Biosciences*) e gel de agarose 1,2%, corado com brometo de etídio (0,5 ng.ml⁻¹), a partir dos valores em ng.µl⁻¹. A partir de testes de diluições, as amostras se apresentaram totalmente adequadas para as reações de PCR-RAPD. O DNA estoque foi diluído 200 vezes (200x) em água ultrapura autoclavada, obtendo-se a concentração final de, aproximadamente, 10 ng.µl⁻¹, sendo tanto a solução estoque como a de trabalho mantidas a 4°C.

3.2.1 Reações de amplificação e eletroforese

As 13 amostras de DNA isoladas, utilizadas neste estudo, foram submetidas a amplificações com diferentes *primers* RAPD (série Operon), visando à diferenciação molecular entre os indivíduos.

Cada reação foi preparada em um microtubo de 200 µl, sendo o volume final de cada reação de amplificação de 12 µl, contendo 3 µl de DNA (10 ng.µl⁻¹), 1,2 µl 10X PCR Buffer (200mM Tris-HCl, pH 8,4, 500mM KCl), 0,24 µl de dNTPs (25 mM de cada base, 50 mM MgCl₂), 1,8 µl do *primer* RAPD (10 ng/µl) correspondente e 0,6 µl de enzima *Taq* DNA polimerase (5 U/µl). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo Mastercycler (Eppendorf, Hanburg, Germany), utilizando-se um programa com desnaturação inicial, a 95°C, por 60 segundos, seguido por desnaturação 94°C, por 10 segundos, anelamento a 36°C, por 60 segundos e extensão a 72°C, por 30 segundos. Os passos da desnaturação, anelamento e extensão foram repetidos 34

vezes e, em seguida, a reação foi finalizada por uma extensão, a 72°C, por 7 minutos.

Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose 1,2% (m/v), com eletroforese a 100 V em tampão TAE (0,001 mol/L; EDTA pH 8,0; 0,04 mol/L ta pH 8,0; 0,02 mol/L ácido acético) por um período de 1 a 2 horas em cuba horizontal contendo TAE sob voltagem de 100V. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 µg. ml⁻¹.) por 20 minutos, sendo visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento EDAS 290 (Kodak®). Para análise, somente foram consideradas as bandas monomórficas e polimórficas que se apresentaram de forma consistente e reproduzível nos géis de agarose.

Para minimizar a baixa reprodutibilidade da técnica RAPD, discutida amplamente na literatura, foram feitas repetições dos indivíduos no gel e também repetições dos *primers* polimórficos. Para obter resultados mais consistentes, os géis com bandas de difícil visualização foram repetidos ou descartados.

3.3 Análise da similaridade genética

A fim de determinar o número de bandas monomórficas e polimórficas, foi feita uma análise cuidadosa das fotografias dos géis, com base na resolução e no grau de amplificação por meio de avaliação visual. Essas bandas geradas pela técnica RAPD foram contadas, gerando uma matriz de dados binários 0 e 1, por meio da presença ou da ausência das bandas, presentes nos 13 genótipos. Cada banda foi designada como um único caráter, no qual a presença foi representada por “1” e a ausência por “0”. A matriz obtida foi utilizada para estimar a similaridade genética e o número ótimo de bandas polimórficas.

3.3.1 Similaridade genética

As estimativas de dissimilaridade genética ($d_{sg_{ij}}$), entre cada par de genótipo, foram avaliadas pelo coeficiente mais citado na literatura, o de Jaccard (Anderberg, 1973), no *software* NTSYS-pc versão 2.1 (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) (Rohlf, 2000). Essas estimativas são obtidas de acordo com a expressão: $sg_{ij} = a/(a+b+c)$. As variáveis a, b e c se referem à Tabela 1.

O dendrograma foi gerado usando o algoritmo UPGMA pelo método de clusterização SAHN do *software* NTSYS-pc 2.1 (Rohlf, 2000), de acordo com o coeficiente de Jaccard, a partir das estimativas de similaridade genética.

A consistência do dendrograma foi avaliada pela correlação cofenética entre as distâncias geradas pelo dendrograma e as distâncias genéticas entre pares de populações. A significância dessa correlação foi testada pelo teste de Mantel, fazendo-se 1.000 permutações aleatórias. Foi analisada e comparada a consistência de cada agrupamento por meio do cálculo do valor da correlação cofenética entre matrizes dos coeficientes de similaridade (dg_{ij}) e dos valores cofenéticos, denominado teste Z de Mantel (Manly, 1997), no *software* NTSYS-pc 2,1 (Rohlf, 2000). A significância desse valor de Z pode ser obtida comparando-se o valor observado com valores de uma distribuição nula, construída recalculando-se os valores de Z diversas vezes, aleatorizando, em cada uma delas, a ordem dos elementos de uma das matrizes (Telles et al., 2003). Este teste foi desenvolvido por Mantel (1967) e compara duas matrizes entre si, elemento por elemento, fornecendo um valor de correlação (r) que quantifica o grau de relacionamento entre duas matrizes (Oliveira, 2005).

Os indivíduos geneticamente diferentes são identificados no dendrograma, considerando-se as variações de distâncias de dissimilaridade.

3.3.2 Identificação do número ótimo de marcadores

Para verificar se o número de bandas polimórficas geradas pelos *primers* de RAPD foi suficiente para determinar, com precisão, as estimativas de similaridades genéticas entre os genótipos, foi realizada a análise de número ótimo de marcadores.

Para cada indivíduo, a similaridade genética foi estimada a partir de simulações com reamostragens de diferentes tamanhos (1, 3, 5,...,28), por meio do software Genes (Cruz & Schuster, 2004). Neste software são geradas as estimativas de correlação de valores da matriz de similaridade original com os de outras matrizes de similaridade, as quais são obtidas levando-se em consideração diferentes números de bandas. Dois outros parâmetros também são disponibilizados durante as análises: a soma de quadrados dos desvios (SQ) em relação às reamostragens e o valor de estresse (E), que indica o ajuste entre matriz original e a matriz amostral, por meio da expressão:

$$E : \sqrt{\frac{(\dot{S}_{ij} - S_{ij})^2}{\sum \dot{S}_{ij}^2}}$$

em que:

E: estresse;

\dot{S}_{ij} : similaridade genética média entre todos os pares de indivíduos, estimada para cada amostragem;

S_{ij} : similaridade genética média entre todos os pares de indivíduos, estimada a partir do total de bandas polimórficas.

O número ideal de bandas polimórficas, segundo Kruskal (1964) e Dias & Kageyama (1998), é considerado quando o estresse assume valor menor que 0,05.

3.3.3 Análise bootstrap

O método bootstrap tem sido empregado para responder se o número de locos marcadores são necessários para amostrar o genoma da espécie em questão, estimando o coeficiente de variação (y) associado ao número de bandas (x), ajustando-se uma potência do tipo $y = ax^b$ (Moura et al., 2005). O número mínimo de locos foi determinado encontrando-se o valor de x correspondente ao ponto de curvatura máxima da equação ajustada.

A principal virtude desse método é a de que produz tendências e erros padrões de forma automática e fornece intervalos de confiança para as estatísticas calculadas (Pequeno et al., 2003).

O processo de “bootstrap” foi realizado por meio do programa dBoot (Coelho, 2000). Em cada nível de locos (L), foram feitas até 1.000 reamostragens. Com base nos valores de CV%, o número mínimo de locos foi encontrado por meio da expressão $x_c = [a^2b^2(2b-1/b-2)]^{1/(2-2b)}$, em que x_c é o ponto de máxima curvatura da função e corresponde à quantia mínima de locos a ser amostrada no genoma.

3.4 Análise da consistência dos nós do dendrograma

A consistência de cada nó do dendrograma é também conhecida como bootstrap. A estabilidade de cada nó do dendrograma foi testada por análise de reamostragens, utilizando o programa Bood, desenvolvido por Coelho (2000). O software compara os agrupamentos realizando 1.000 reamostragens e a percentagem da formação do agrupamento.

3.5 Isolamento de bandas

Após confirmação do polimorfismo entre os indivíduos, foram feitos, no gel, dois cortes, um acima e outro abaixo da banda de interesse e colocadas duas fitas de papel filtro. O gel foi novamente submetido a eletroforese (100V) por 3 minutos, a fim de que o fragmento fosse absorvido pelo papel. Apenas o papel localizado abaixo da banda foi utilizado no experimento, sendo o papel acima descartado.

Foram cortados pedaços de, aproximadamente, 3 mm² e submeteu-se a uma nova reação de RAPD, para confirmar a presença de apenas um fragmento de DNA. O fragmento obtido foi recortado do gel com bisturi e transferido para um microtubo.

3.5.1 Eluição da banda do gel

O fragmento recortado do gel foi submetido à eluição por meio kit MinElute (QIAGEN®), de acordo com as informações do fabricante.

A fatia do gel foi pesada e acrescentados 3 volumes do tampão QG a cada volume de gel. Os microtubos foram incubados, a 50°C, por 10 minutos ou até a dissolução completa do gel, agitando-se no vórtex a cada 3 minutos, durante a incubação.

Foi adicionado 1 volume de isopropanol à amostra, invertendo-se várias vezes o microtubo. A amostra foi aplicada em uma coluna MinElute inserida dentro de um microtubo de 2mL e centrifugada, a 10.000 g. por 1 minuto, sendo o filtrado posteriormente descartado. Adicionaram-se 500 µl do tampão QG, seguindo-se centrifugação por um minuto. Para lavar o DNA, adicionaram-se 750 µl do tampão PE à coluna e centrifugou-se por 1 minuto. O filtrado foi descartado e a coluna foi centrifugada novamente, a 10.000 g, por 1 minuto.

A coluna foi colocada em um tubo limpo de 1,5 ml e adicionaram-se 10µl do tampão EB bem no centro da membrana (10 mM Tris HCl, pH 8,5). A coluna foi deixada em repouso por 1 minuto e, então, centrifugada, por 1 minuto, a 10.000 g.

3.5.2 Ligação com vetor

O produto da eluição foi submetido à clonagem no vetor pDrive Cloning Vetor (QIAGEN® PCR Cloning Kit) (Figura 2). A reação de ligação do fragmento ao vetor foi realizada a 10°C, por 16 horas, misturando-se 2 µl do produto, 2 µl de água deionizada, 1 µl de pDrive Cloning Vetor e 5 µl de Ligation Master Mix 2x (contendo a enzima T4 DNA ligase).

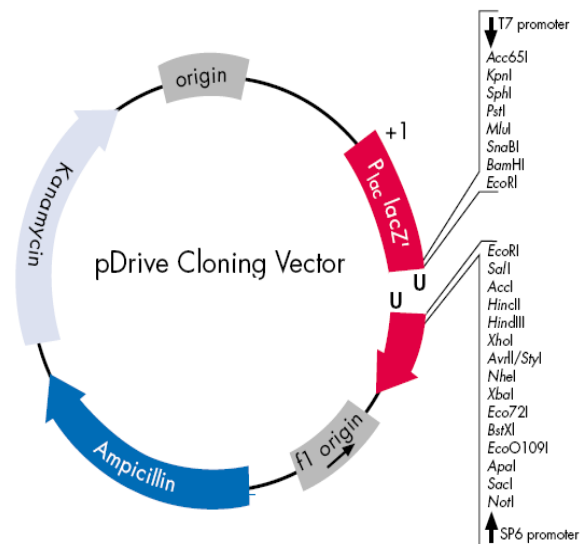


FIGURA 2 Detalhes do vetor *pDrive Cloning* (QIAGEN®), tais como a origem de replicação, os marcadores selecionáveis de resistência à canamicina e à ampicilina, o operon LacZ interrompido por sítios de enzimas de restrição.

3.5.3 Transformação e clonagem bacteriana

O produto da reação de ligação, item 3.5.2, foi utilizado para transformar células competentes das bactérias *E. coli* DH5 α TM *Phage Resistant* (Promega), em que 2 μ l do produto da ligação foram misturados com 50 μ l de células competentes DH5 α e colocados em gelo, por 20 minutos. Logo em seguida, 45 segundos a 42°C e, novamente, 2 minutos no gelo. Em seguida, adicionaram-se 0,9 ml de meio SOC e incubou-se, por uma hora, a 37°C. Logo após a incubação, o plaqueamento foi feito utilizando-se alíquotas de 250 μ l de ligação por placa de Petri, contendo 20 ml de meio de cultura Luria-Bertani (LB) + ágar, 40 μ l ampicilina [100 μ g/ml] e 25 μ l de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galactosídeo [40 mg/ml]).

Após o plaqueamento, as culturas foram mantidas a 37°C, durante 16 horas, para permitir o crescimento das colônias bacterianas. Após esse período, colônias brancas transformadas foram coletadas aleatoriamente, com auxílio de palitos esterilizados e transferidas individualmente para tubos Falcons de 15 ml contendo 2 ml de meio Luria-Bertani (LB líquido) com ampicilina (100 μ g/ml). Em seguida, os tubos foram mantidos, a 37°C, sob agitação, durante 18 horas, em agitador orbital ajustado para 3.000 g, para possibilitar o crescimento das células de *E. coli*.

Após o período, o meio contido nos tubos foram utilizados para a extração dos plasmídeos.

3.5.4 Extração dos plasmídeos contendo insertos dos DNA obtidos

Os plasmídeos foram extraídos das células bacterianas por lise alcalina, de acordo com o método desenvolvido por Birnboim & Doly (1979). O conteúdo de cada tubo foi submetido à centrifugação por 3 minutos, a 20°C, 10.000 g, para sedimentação das células bacterianas. Em seguida, o meio de

cultura foi descartado e os tubos foram invertidos sobre papel absorvente. As células sedimentadas (pellet) foram ressuspensas em 100 µL de solução I (GET: glucose 50 mM, EDTA 10 mmol.L⁻¹, Tris-HCl 25 mmol.L⁻¹ pH 8,0) e mantidas no gelo. Para a lise celular, foram adicionados, para cada tubo, 200 µl de solução II (880 µl de água, 100 µl de SDS 10%, 20 µl de NaOH 10 mol.L⁻¹), misturados por inversão e estocados no gelo. Após resfriamento, foram adicionados 150 µl de uma solução de acetato de potássio 3 mol.L⁻¹ em cada tubo e deixados em gelo por 5 minutos. Essa etapa permite a separação entre o DNA genômico e o DNA plasmidial. Enquanto o DNA genômico é desnaturado e retido no sedimento com os resíduos celulares, o DNA plasmidial permanece solúvel no sobrenadante. Em seguida, os tubos foram centrifugados, a 10.000 g, por 5 minutos, a 20°C. Após centrifugação, o sobrenadante contendo o DNA plasmidial foi transferido para um novo tubo e adicionado 0,9 ml de etanol 95%, invertendo-se os tubos várias vezes e deixando-se à temperatura ambiente, até que a precipitação se torne visível a olho nu (aproximadamente 3 minutos). Logo após essa precipitação, as amostras foram centrifugadas, a 10.000 g, por 5 minutos, a 20°C, para a formação de um pellet de DNA plasmidial e descarte do sobrenadante. Adicionou-se 1 ml de etanol 70% para lavagem do pellet que, após agitação, foi centrifugado, a 10.000 g, por 2 minutos, a 20°C. Descartou-se o sobrenadante e o pellet contendo o DNA plasmidial foi seco totalmente em capela de fluxo laminar e ressuspensado em 104 µl de solução de RNase (100 µl de TE pH 8,0 e 4 µl de RNase A [10 mg.ml⁻¹]), seguido de incubação, a 37°C, por 40 minutos. Uma limpeza do produto foi feita adicionando-se 104 µl de fenol:clorofórmio, na proporção 1:1 e, após 5 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g, por 10 minutos, e a fase superior recolhida para um novo tubo. A precipitação deste sobrenadante (fase superior) foi realizada adicionando-se 10 µl de acetato de sódio 3 mol.L⁻¹ pH 7,5 e 220 µl de etanol 95%. Centrifugação a 10.000 g, por 5 minutos, a 20°C. Descartado o

sobrenadante, adicionaram-se ao pellet 0,5 ml de etanol 70% e, uma vez dissolvido o pellet, nova centrifugação foi realizada a 10.000 g, por 5 minutos, a 20°C. Ao término descartou-se o sobrenadante e o pellet foi seco totalmente em capela de fluxo laminar, por 15 minutos. Após secagem completa, o pellet foi ressuspenso em 35 µl de água estéril. A qualidade dos DNAs plasmidiais foi checada por eletroforese em gel de agarose 1,2%/EtBr em tampão TAE [1X] e, posteriormente, os DNAs foram armazenados a -20°C, até serem submetidos a seqüenciamento.

3.5.5 Digestão com enzimas de restrição

Para confirmação da transformação bacteriana, o DNA foi digerido com enzimas de restrição *Eco* RI e *Bam* HI (Invitrogen®), em que foram misturados 4 µl de DNA plasmidial (108 ng/µl), 2µl de tampão de reação (10x REact 3 – Invitrogen ®), 1µl de enzima *Eco* RI, 1µl de enzima *Bam* HI e 12µl de água ultrapura. A reação foi mantida em incubação, a 37°C, por 12 horas. O resultado da digestão foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1,2%.

3.6 Seqüenciamento

Os plasmídeos contendo os insertos de DNA de interesse, conforme descrito no item 3.5.4., foram seqüenciados no seqüenciador automático de DNA, Mega Bace 1000 (*Amersham Biosciences*). Para o seqüenciamento, foi utilizado o método enzimático baseado na síntese de DNA *in vitro*, na presença de nucleosídeos trifosfatados terminadores de cadeia (Sanger et al., 1977).

Os plasmídeos purificados foram amplificados por PCR, na presença de DNA polimerase, de um *primer* universal (M13) que se anela à seqüência do vetor utilizado para a clonagem, de dNTPs em excesso e de uma pequena quantidade de didesoxirribonucleosídeos trifosfatos terminadores de cadeia

(ddNTPs), marcados com substância fluorescente (diclororhodamina ligada à fluoresceína). Quando ddNTPs (ddATP, ddTTP, ddCTP e ddGTP), os quais não apresentam o grupo 3'-OH da desoxirribose presente em nucleotídeos normais, são aleatoriamente incorporados na cadeia de DNA que está sendo sintetizada, a adição do nucleosídeo seguinte é bloqueada. Dessa forma, a reação enzimática gera fragmentos de DNA marcados com substância fluorescente, os quais são posteriormente separados por eletroforese e detectados, permitindo a determinação da seqüência completa da fita molde de DNA. O seqüenciamento foi realizado com o kit "Big Dye Terminator" (*Applied Biosystems*). Para a reação de seqüenciamento, foram adicionados a uma microplaca para PCR contendo 96 cavidades, 1 µl de cada plasmídeo e 4 µl de "Big Dye Terminator" (DNA polimerase/dNTPs/ddNTPs) diluído [4X] no tampão de seqüenciamento (Tris-HCl 50 mmol.L⁻¹ e cloreto de magnésio 1,25 mmol.L⁻¹), acrescido de 5 picomoles de *primer forward* e *reverse* M13. A reação foi realizada em termociclador *Eppendorf Mastercycler gradient*, utilizando-se o seguinte programa: 30 ciclos de 95°C, por 20 segundos; 50°C, por 15 segundos e 60°C, durante 1 minuto. Os produtos amplificados da reação de seqüenciamento foram precipitados adicionando-se 1 µl de acetato de amônio (7,5 mol.L⁻¹) às amostras em cada cavidade da microplaca de PCR. Em seguida, adicionou-se duas vezes o volume com etanol 95%. Posteriormente, as placas foram vedadas com adesivo, agitadas manualmente por inversão, permanecendo à temperatura ambiente por 15 minutos. Após centrifugação, por 45 minutos, a 4.000 xg, 20°C, os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos foram lavados com 100 µl de etanol 70%. As placas foram centrifugadas, por 15 minutos, a 4.000 xg, 20°C. Os sobrenadantes foram descartados e as microplacas foram novamente centrifugadas de forma invertida sobre papel absorvente (1.000 xg, 1 minuto) para remover o excesso de etanol, sendo, em seguida, mantidas a 37°C, por 10 minutos, para secagem.

Depois, foram adicionados 10 µl de *loading solution* em cada poço da microplaca, a qual foi injetada no Mega Bace 1000. Os parâmetros de eletroforese utilizados foram: voltagem de injeção: 2 Kv; tempo de injeção: 80 segundos; voltagem de corrida: 6 Kv e tempo de corrida: 240 minutos. As seqüências foram determinadas utilizando-se o programa *Sequence Analyzer*.

3.7 Obtenção dos marcadores SCAR

Os *primers* para a obtenção dos marcadores SCAR foram desenhados baseados na seqüência do *primer* RAPD e da seqüência de bases contínuas a este, baseadas no seqüenciamento citado anteriormente. Para confirmar se o marcador foi eficiente ou não, foi realizada uma reação de PCR com uma combinação de *primers forward* e *reverse*, com todos os indivíduos analisados.

3.8 Análises das seqüências em banco de dados

As seqüências de DNA de fragmentos isolados de laranjas obtidas foram comparadas com aquelas presentes no banco de dados internacionais “*National Center for Biotechnology Information*” (NCBI), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Essa comparação com o banco de dados foi feita utilizando-se o programa BlastX (Altschul et al., 1997). Foi buscada a relação das seqüências mais similares de genes presentes no GeneBank, encontradas pelo programa.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização molecular por marcadores RAPD

Os *primers* selecionados nas análises da similaridade genética em *Citrus* apresentaram qualidade, em termos de resolução e polimorfismo. Na Figura 3 estão ilustrados os perfis de amplificação do *primer* OPP-12 nos indivíduos identificados de 1 a 13 (Tabela 2). Como exemplo, observa-se o polimorfismo entre o indivíduo ‘Pêra Rio’ e os demais.

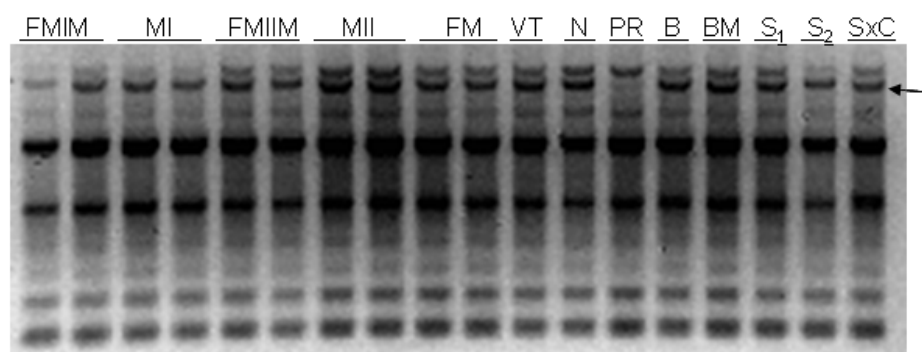


FIGURA 3 Perfil do gel de agarose 1,2%, mostrando o polimorfismo detectado pelo *primer* OPM-12 em genótipos de citros. FMIM = Folha Murcha Me mutante I, MI = Mutante I, FMIIM = Folha Murcha Me mutante II, MII = Mutante II, FMI = Folha Murcha Me, VT = Valência tardia, N = Natal, PR = PêraRio, B = Baía, BM = Baía Me, S₁ = SELETA 1, S₂ = Seleta 2 e SxC = Seleta x Cravo.

Dos 98 *primers* RAPD testados, 17 amplificaram pelo menos um produto com padrão adequado e polimórfico, sendo utilizados nas análises subsequentes. Foram obtidos 28 (16%) fragmentos com perfil polimórfico e 122 (84%) monomórficos, entre os indivíduos avaliados com um número médio de 1,65 fragmento polimórfico por *primer*, variando de 1 (OPG-01, OPG-19, OPH-

047, OPI-12, OPM-04, OPP01, OPP-07, OPU-18, OPX-19 e OPZ-10) a 5 (OPG-17). A relação dos *primers* que geraram bandas polimórficas encontra-se na Tabela 3.

TABELA 3 Fragmentos polimórficos e monomórficos obtidos pelos *primers* de RAPD em genótipos de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.

<i>Primers</i>	Fragmentos polimórficos	Fragmentos monomórficos	Seqüência
OPG-13	2	7	CTCTCCGCCA
OPG-17	5	3	ACGACCGACA
OPG-01	1	8	CTACGGAGGA
OPG-19	1	5	GTCAGGGCAA
OPH-04	1	9	GGAAGTCGCC
OPI-12	1	6	AGAGGGCACA
OPM-04	1	7	GGCGGTTGTC
OPN-03	3	6	GGTACTCCCC
OPN-05	2	10	ACTGAACGCC
OPP-01	1	8	GTAGCACTCC
OPP-07	1	8	GTCCATGCCA
OPP-10	2	8	TCCCGCCTAC
OPP-12	2	6	AAGGGCGAGT
OPP-17	2	10	TGACCCGCCT
OPU-18	1	3	ACCTGGGGAG
OPX-19	1	11	TGGCAAGGCA
OPZ-10	1	7	CCGACAAACC

Os 81 *primers* restantes geraram apenas fragmentos monomórficos, os quais foram desconsiderados, por não influenciarem nas análises dos dados.

O número de fragmentos polimórficos utilizados na avaliação da variabilidade genética em plantas é bastante variável, independente da espécie e aumenta de acordo com o número de indivíduos analisados. O número baixo de 1 a 5 fragmentos polimórficos por *primer* verificados neste trabalho é condizente com os resultados mostrados no trabalho de Oliveira et al. (2001). Ao selecionarem marcadores RAPD para mapeamento genético e seleção de híbridos de citros, estes autores encontraram de 1 a 6 fragmentos polimórficos. Analisando a diversidade genética entre híbridos de tangerina ‘Cravo’ e laranja ‘Pera’, Oliveira et al. (2002), a partir de 102 *primers*, obtiveram 146 marcadores polimórficos e 80 monomórficos. Diferentemente, Cai et al. (1994), construindo mapas de ligação em *Citrus* por meio de marcadores RAPD, utilizaram 140 *primers* aleatórios, dentre eles 69 (49%) amplificaram produtos consistentes, totalizando 402 fragmentos polimórficos que variaram de 1 até 11 bandas por *primer*. Número alto de fragmentos polimórficos também foi encontrado por Bastianel et al. (2001), durante a caracterização de genótipos de *Citrus* spp. Os 12 oligonucleotídeos inicializadores utilizados produziram um total de 85 bandas, sendo 64 polimórficas, variando de 3 a 10 por *primer*.

Já Schäfer et al. (2004), investigando a diversidade genética de porta-enxertos cítricos, baseada em marcadores moleculares RAPD com apenas 9 oligonucleotídeos inicializadores, obtiveram, em 67 fragmentos amplificados, um total de 57 polimórficos, com polimorfismo variando de 1 a 12 por *primer*. Nicolosi et al. (2000) também observaram alto polimorfismo com o uso dessa técnica em estudos de filogenia e origem genética de citros por meio de marcadores moleculares, cerca de 3 a 15 fragmentos polimórficos por *primer*, resultando em 260 marcadores gerados por 70 *primers*.

Para outras espécies de importância econômica, as quantidades de marcadores são variáveis. No estudo de similaridade genética de mandioca (*Manihot esculenta*), 12 *primers* utilizados geraram 211 marcadores, dos quais

73 eram polimórficos, variando de 5 a 24 bandas por *primer* (Costa et al., 2003). Na comparação de caracteres morfológicos e agronômicos com moleculares em morangueiros, 5 *primers* geraram 73 marcadores (Conti et al., 2002), não sendo descrito o número de polimorfismo por *primer*. Na caracterização e na identificação de cultivares de pessegueiros por meio de marcadores RAPD, Zimback et al. (2003) também não citam o número de fragmentos por *primer*, mas 7 *primers* foram avaliados e obtidos 31 marcadores genéticos polimórficos. Já em abacaxizeiro (*Ananas comosus* L, Merrill.), 11 *primers* geraram 79 regiões polimórficas (Pereira & Kerr, 2001).

As diferenças entre os números de fragmentos polimórficos descritos na literatura e o número encontrado neste trabalho se devem ao fato de as análises serem feitas entre diversas espécies do gênero *Citrus* e não entre variedades e cultivares de laranjeiras apenas.

Entretanto, a baixa variabilidade genética entre variedades de laranja doce é demonstrada por outros estudos moleculares (Federici et al., 1998), o que pode justificar o baixo polimorfismo verificado neste trabalho.

4.2 Determinação do número ótimo de marcadores moleculares

De acordo com Duarte (1998), o polimorfismo, mesmo dentro de uma espécie, é dependente do grau de divergência dos genótipos estudados. Entretanto, independente de o número de fragmentos polimórficos ser alto ou baixo, deve-se levar em consideração se este número é capaz de representar a diversidade genética existente entre os indivíduos. O número de fragmentos não limita o emprego do RAPD. Exemplos disso são os trabalhos de Landergott et al. (2001), que obtiveram sucesso com apenas 27 fragmentos polimórficos em samambaia (*Dryopteris cristata*); Sedra et al. (1998), que encontraram 56 bandas polimórficas analisando a diversidade genética de tâmara e Bastianel et al.

(2006), que produziram 33 bandas polimórficas entre laranja-doce e um híbrido de tangerina.

Observações parecidas sobre o número variável de fragmentos em estudos de diversidade genética por meio de RAPD em outras espécies também são descritas por Gomes (2002), Moura (2003), Sousa (2003), Oliveira (2005) e Bicalho (2006).

No intuito de determinar se os 28 fragmentos polimórficos foram eficazes ao representar com precisão os indivíduos, foram realizadas análises de reamostragens para determinar o número ótimo de marcadores, empregando-se os 28 fragmentos gerados nos 13 indivíduos, por meio do *software* Genes (Cruz & Schuster, 2004). Os resultados obtidos estão resumidos na Figura 4.

Observa-se que houve uma relação direta entre o número de bandas analisadas e a magnitude de correlação dos valores da matriz de dissimilaridade original obtida a partir de reamostragens com diferentes números de bandas, com consistência a partir de 25 bandas, quando a correlação atingiu 0,99. Com esse número de bandas, a soma dos quadrados dos desvios em relação às reamostragens ($SQ_d = 0,07$) e o valor do estresse foi 0,0431, menor que 0,05, sugerindo alta consistência na associação das matrizes, de acordo com Kruskal (1964) e a soma dos quadrados dos desvios reduz significativamente. Assim, o aumento do número de bandas não altera significativamente, a estimativa da distância genética entre os indivíduos estudados.

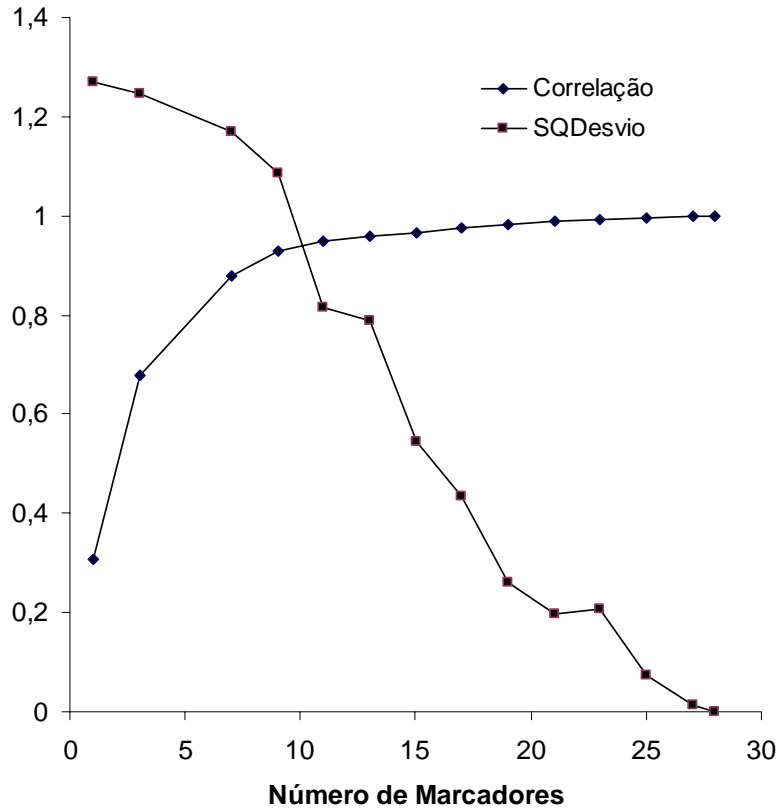


FIGURA 4 Resumo da análise de reamostragem contendo as correlações e as somas dos quadrados dos desvios obtidas para diferentes números de fragmentos polimórficos do marcador RAPD na determinação do número ideal de bandas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.

Esses números estão coerentes com valores citados por vários autores. Bicalho (2006), ao determinar a identidade genética de clones de seringueira, também obteve correlação $r=0,96$, $SQ_d=0,63$ e $S=0,042$, determinando o número ótimo em 83 entre os 121 analisados. Oliveira (2005), ao realizar análises de reamostragens, empregando 263 fragmentos, originados de 116 acessos de açazeiro (*Euterpe oleracea*), considerou o número ótimo de marcadores ao

atingir 180 bandas, com valores de correlação ($r = 0,96$), soma de quadrados dos desvios (SQ_d) e estresse (E) iguais a 5,30 e 0,046, respectivamente. Já Mendonça (2006), avaliando diversidade genética de duas populações de *Calophyllum brasiliense* Camb. por marcadores RAPD, encontrou valores de $r=0,97$ e $0,96$ para cada população e estresse $0,045$ e $0,040$.

Segundo Kruskal (1964), resultados em que os valores de estresse são inferiores a $0,05$ representam um excelente indicativo de precisão. Com base no exposto, pode-se, então, inferir que as 28 bandas selecionadas foram consideradas suficientes nos estudos de similaridade genética.

4.3 Análise bootstrap

O método bootstrap tem sido empregado para responder se o número de locos marcadores é necessário para amostrar o genoma da espécie em questão. O processo de “bootstrap” foi realizado por meio do programa dBoot (Coelho, 2000). Em cada nível de locos (L), foram feitas até 1.000 reamostragens e, com base nos valores de CV%, o número mínimo de locos foi encontrado por meio da expressão $x_c = [a^2b^2(2b-1/b-2)]^{1/(2-2b)}$, em que x_c é o ponto de máxima curvatura da função e corresponde à quantia mínima de locos a ser amostrada no genoma.

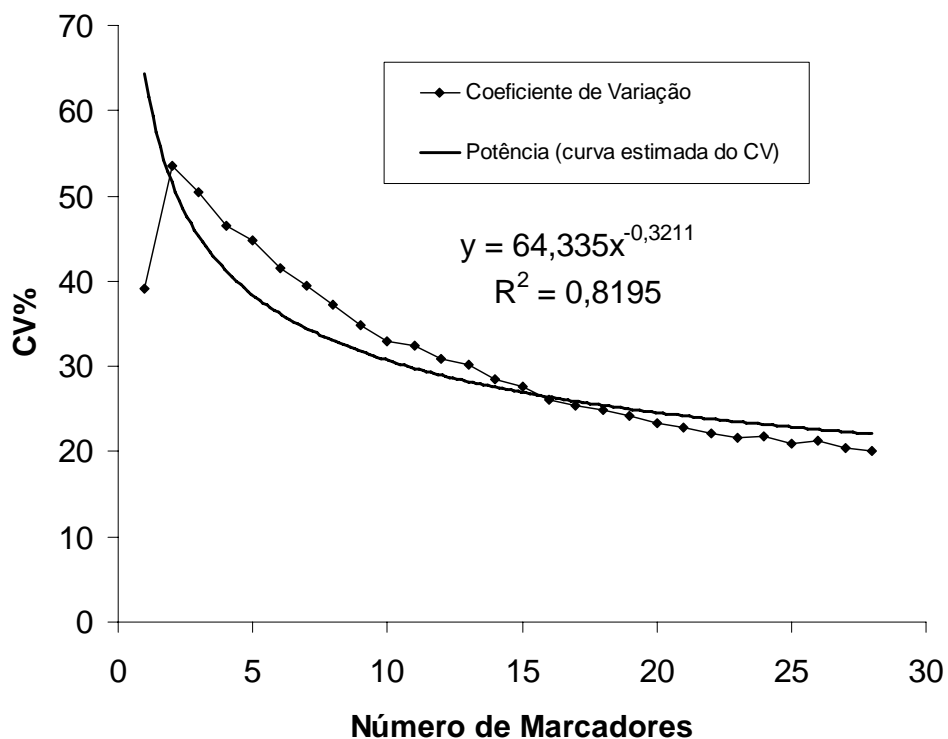


FIGURA 5 Valores observados e estimados de CV% (Y), em função do número de locos marcadores (x) em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, com base nas dissimilaridades genéticas S_{ij} obtidas pelo método de “bootstrap” com 1.000 reamostragens. x_c representa o ponto de curvatura máxima da função

Na Figura 5 está representado o coeficiente de determinação da função estimada para a matriz de dissimilaridade com valor de 0,8195, mostrando um bom ajuste dos valores observados à curva. O ponto de curvatura máxima da função ajustada foi $x_c = 8,75$, correspondente a um CV de 35%, obtendo-se o número mínimo de marcas necessárias para se obter com precisão satisfatória as estimativas obtidas a partir dos dados. Isso indica que o uso entre 8 a 9 locos marcadores proporcionaria a precisão obtida para as estimativas. O parâmetro b da equação representa uma medida da heterogeneidade entre bandas e o valor

encontrado neste estudo, de $b = 0,32$, mostra boa heterogeneidade entre as bandas, já que o valor máximo esperado para este parâmetro é de 0,5. Os resultados obtidos indicam tendência de diminuição do coeficiente de variação na medida em que se aumenta o número de locos marcadores. Chega-se ao ponto em que o aumento do número de locos marcadores representa um aumento insignificante na precisão experimental, não justificando os acréscimos no esforço laboratorial (Pequeno et al., 2003; Moura, 2003).

4.4 Teste de reprodutibilidade do RAPD

Um dos problemas mais discutidos, relacionados ao RAPD, é a baixa reprodutibilidade da técnica. De acordo com Clark & Lanigan (1993), esse problema pode ser minimizado por meio de testes, como, por exemplo, amplificação com único *primer* aleatoriamente várias vezes, a fim de avaliar o padrão reprodutibilidade. Estes testes foram capazes de diminuir este impasse, uma vez que, em todos os testes, verificou-se um mesmo padrão de fragmentos, embora alguns apresentem diferenças de intensidade das mesmas (Figura 6). Neste trabalho foram escolhidas bandas com maior intensidade.

Para Cruz & Milach (1998) e Ferreira & Grattapaglia (1998), a reprodutibilidade está fortemente associada à qualidade do DNA e à padronização das condições de reação. Seguindo o mesmo raciocínio de Pereira & Kerr (2001), para cada *primer* foram computadas apenas as bandas que mostraram boa reprodutibilidade e intensidade, pois estes cuidados reduzem a possibilidade de eventuais erros na contagem incorreta de produtos fracamente amplificados que não correspondam à verdadeira história evolutiva da espécie.

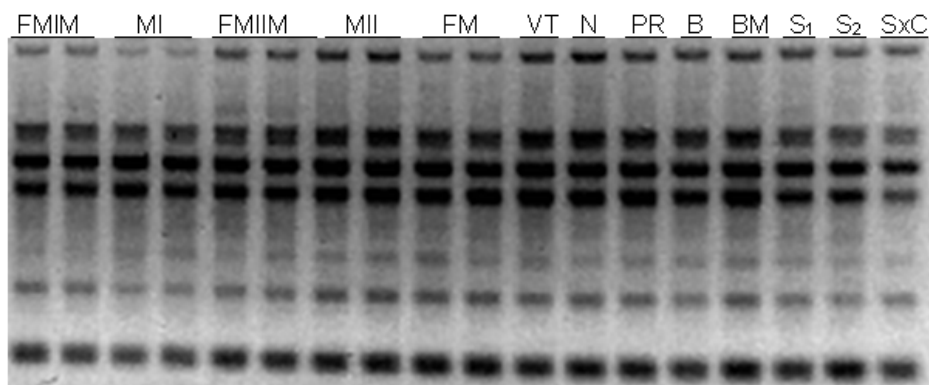


FIGURA 6 Padrão de amplificação do DNA de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, repetido 3 vezes, pelo *primer* OPN07. FMIM = Folha Murcha Me mutante I, MI = Mutante I, FMIIM = Folha Murcha Me mutante II, MII = Mutante II, FMI = Folha Murcha Me, VT = Valência tardia, N = Natal, PR = PêraRio, B = Baía, BM = Baía Me, S₁ = SELETA 1, S₂ = Seleta 2 e SxC = Seleta x Cravo.

Keil & Griffin (1994) obtiveram padrões de bandas RAPDs bastante consistentes, ao trabalharem com *Eucalyptus*, verificando pequena ou nenhuma variação durante as repetições. Resultados semelhantes também foram obtidos por Bicalho (2006), aumentando a confiabilidade dos dados por meio de repetições, conseguindo melhores resultados na determinação de identidade genética de seringueira. O mesmo teste de repetibilidade foi feito por Brandão (2002), trabalhando com duas espécies de jatobá (*Hymenaea courbaril* e *H. stigonocarpa*), no intuito de selecionar *primers*, baseando-se no número de fragmentos nítidos, distintos, bem corados e com melhor repetibilidade, em duas repetições da reação.

Segundo Vital et al. (2005), é possível otimizar o número de *primers* utilizados por marcadores RAPD. Quando poucos *primers* promovem boa formação de bandas em uma população, maior número de *primers* será necessário para a adequada estimativa da variabilidade. Portanto, os problemas

de repetibilidade podem, realmente, ser contornados com a padronização dos procedimentos envolvidos na técnica.

4.5 Avaliação da similaridade genética

A partir da matriz de dados binários, foi estimada a similaridade genética entre os indivíduos e, a partir desta, obteve-se a matriz de dissimilaridade por meio do cálculo $dg_{ij} = 1 - sg_{ij}$, relacionando todos os genótipos dois a dois. Por meio da expressão $n(n-1)/2$, em que n é o número de genótipos, obtiveram-se 78 estimativas de dissimilaridade. As estimativas de dissimilaridade entre os indivíduos variaram entre 0% (semelhantes) a 88,9% (mais distantes), apresentando média de 45%. A distribuição de frequência das estimativas de dissimilaridades genéticas obtidas entre os pares de acessos de laranjas doce em intervalos de 0,1 pode ser observada na Figura 7.

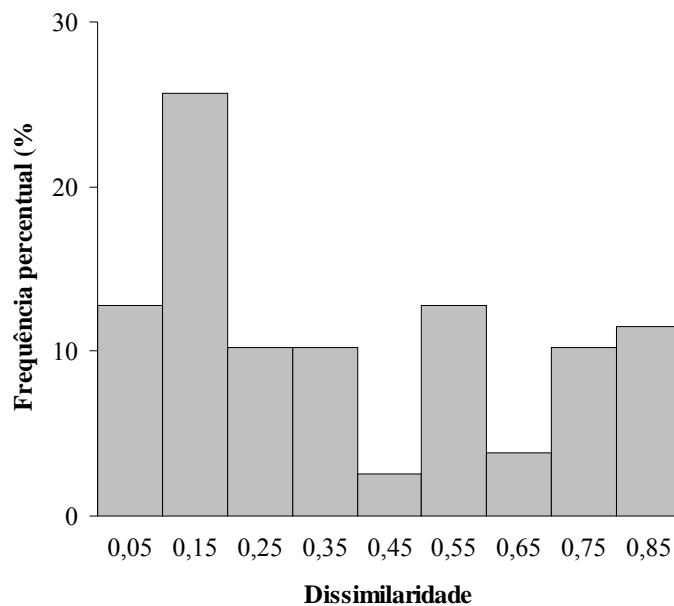


FIGURA 7 Histograma das estimativas de dissimilaridades genéticas obtidas pelo complemento aritmético do coeficiente de Jaccard, entre os 13 genótipos de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck analisados

No que diz respeito à distribuição de frequência das dissimilaridades obtidas entre os pares formados na matriz genética, verifica-se que aproximadamente 25,64% dos pares ficaram incluídos na classe variando de 0,1 a 0,2. Outra informação relevante é a de que a média de dissimilaridade (0,45) se encontra na quinta classe, a qual não é a que se apresenta com maior porcentagem. Pode-se observar, de modo geral, que a maioria dos valores é menor, indicando menor dissimilaridade entre os indivíduos e resultando em um histograma com tendência de distribuição assimétrica à direita. Moura et al. (2005), caracterizando germoplasma de açaizeiro, encontrou valores maiores de dissimilaridade, resultando num histograma com distribuição de classes exibindo um padrão de com tendência de distribuição normal.

O valor médio de dissimilaridade genética é relativo e depende do número de fragmentos polimórficos usados e do grau de parentesco entre os genótipos. Em citros, já foram relatadas dissimilaridades genéticas com diferentes valores. Andrade et al. (2007), ao detectarem polimorfismos em porta-enxertos de citros, para o limão-cravo, observaram taxas de dissimilaridade que chegaram a 22%, enquanto a tangerina 'Sunki' mostrou dissimilaridade de 17%. Alta taxa de dissimilaridade foi ainda observada por Bastianel et al. (1998), utilizando RAPD para distinguir plântulas nucelares e zigóticas resultantes do cruzamento entre as tangerineiras 'Montenegrina' (*Citrus deliciosa* Tenore) e 'King' (*C. nobilis* Loureiro), identificando 54 plantas de origem sexual de um total de 202 indivíduos. A análise de agrupamento com os parentais e a progênie separou os indivíduos em grupos distintos, com dissimilaridade genética máxima de 20%.

As variações genéticas entre a laranjeira 'Folha Murcha Me' e as demais variedades de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck foram analisadas pela amplitude das estimativas de dissimilaridade e de acordo com o dendrograma (Figura 8),

obtido por procedimento estatístico de agrupamento de dados pelo método UPGMA, propiciando melhor visualização da similaridade entre os indivíduos.

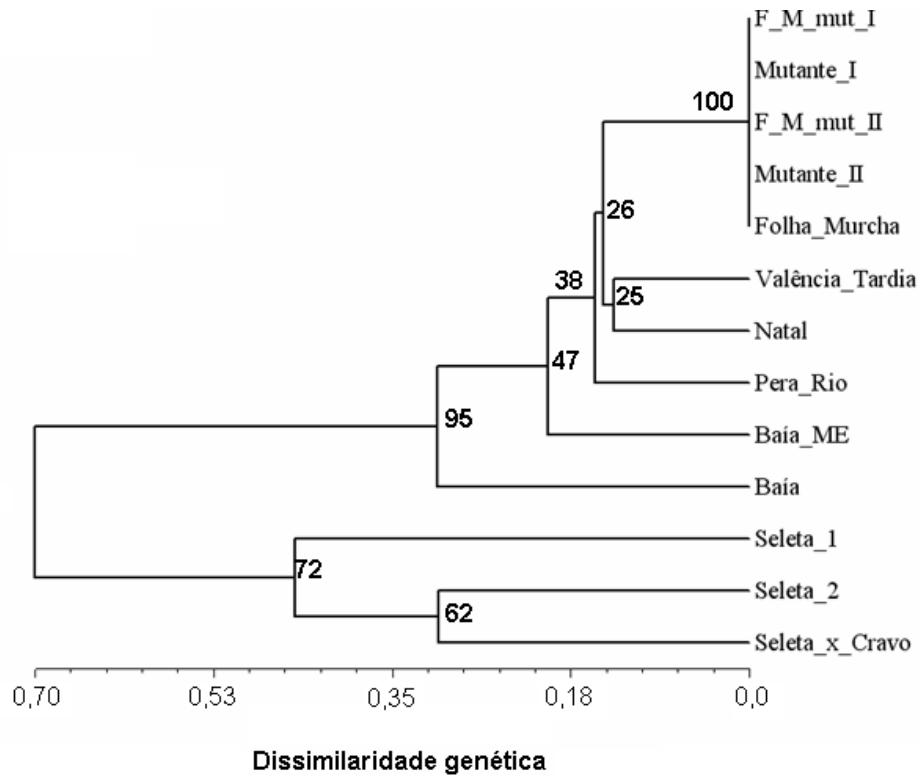


FIGURA 8 Dissimilaridade genética entre os 13 genótipos de laranjas, definida pelo critério de agrupamento UPGMA, com base no coeficiente de Jaccard e a porcentagem da consistência dos agrupamentos gerados pelo *software* Bood.

Segundo Pigato & Lopes (2001), a média de dissimilaridade obtida pode ser utilizada para formar grupos. Assim, a 45%, sugere-se a formação de dois grupos, um deles constituídos pelas laranjeiras ‘Folha Murcha Me’, seus

mutantes, ‘Valência Tardia’, ‘Natal’, ‘Pêra Rio’, ‘Baía Me’ e ‘Baía’, e outro grupo formado pelas laranjas ‘Seleta’ 1 e 2 e pela ‘Seleta x Cravo’.

A consistência de cada nó ou grupo do dendrograma foi avaliada pelo *software* dBoob (Coelho, 2000). Observam-se boas porcentagens dos dois grupos formados. O primeiro grupo citado anteriormente, em 1.000 reamostragens de todos os indivíduos, por exemplo, se repete 95% das vezes, enquanto o segundo grupo, formado pelas laranjas ‘Seleta’, se repete 72% das vezes. Oliveira et al. (2002) citam 84% como uma ótima porcentagem de reamostragens. Bastianel et al. (2006) publicaram dados de diversidade genética entre híbridos de laranja-doce e tanger ‘Murcott’, avaliada por AFLP e RAPD, que não revelaram consistência estatística entre os nós. Observa-se que, dentro dos grupos, as porcentagens diminuem. Isso significa que os subgrupos podem ser formados e os indivíduos podem mudar de posição, exceto pelos indivíduos ‘Folha Murcha Me’ e seus mutantes, cujo subgrupo se formou em 100% das reamostragens. Por isso, esses valores baixos não causariam mudanças significativas no dendrograma.

Dos 13 genótipos comparados entre si, 5 foram analisados em repetições no gel (‘Folha Murcha Me mutante I’, ‘mutante I’, ‘Folha Murcha Me mutante II’, ‘mutante II’ e ‘Folha Murcha Me’), conforme mostrado na Figura 3, comprovando a similaridade genética entre os indivíduos ‘Folha Murcha Me’ e os seus ramos mutantes. O grau de similaridade encontrado neste trabalho não permite a diferenciação dessas laranjeiras; os valores de dissimilaridades entre eles são nulos e a análise de consistência do agrupamento atingiu o valor máximo de 100%, ou seja, não se observam diferenças genéticas entre elas com os *primers* utilizados. Isso pode ser explicado pelo fato de serem clones obtidos por meio de microenxertia *in vitro* (Paiva et al., 1993), porém, podem-se inferir distâncias entre a ‘Folha Murcha Me’ e as outras variedades analisadas.

Bastianel et al. (2001), caracterizando genótipos de *Citrus* spp, por meio de marcadores RAPD, encontraram similaridade genética de 100% entre os genótipos de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck analisados e entre eles estavam as laranjas ‘Valência’ e a ‘Pêra Rio’, ambas analisadas neste trabalho. As similaridades genéticas encontradas por Sawazaki et al. (1992) entre ‘Natal’, ‘Valência’ e ‘Pêra’, dentre outras, também não permitiram a diferenciação entre os genótipos de laranjeiras-doce estudados. Resultados semelhantes também foram verificados por Luro et al. (1995). Os resultados podem ser explicados de acordo com Scora (1975), o qual menciona que as laranjeiras-doce apresentam estreita base genética, visto que, provavelmente, são híbridos interespecíficos.

As estimativas de dissimilaridade se apresentaram em grande amplitude, a qual aumenta de acordo com a diferença entre os indivíduos analisados. Por exemplo, entre os indivíduos ‘Folha Murcha Me’ e ‘Natal’ e ‘Folha Murcha Me’ e ‘Seleta’, a estimativa de dissimilaridade foi uma das menores registradas (14,3%). A estimativa de dissimilaridade aumenta de acordo com a separação dos indivíduos e chega a 88,3% entre a ‘Folha Murcha Me’ e a ‘Seleta2’. Portanto, os valores sugerem que existe divergência genética entre as variedades de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck avaliadas.

Entre ‘Valência’ e ‘Natal’, foi observada dissimilaridade genética de 13,4%, formando um grupo muito próximo das laranjeiras ‘Folha Murcha Me’ e seus mutantes. Semelhanças entre essas três laranjeiras foram relatadas por Magalhães Junior et al. (1999), ao avaliarem curvas de maturação de laranjas por análise de agrupamento, sugerindo a existência de quatro grupos. Um deles é formado pelas laranjeiras ‘Folha Murcha Me’, ‘Natal’, ‘Valência’ e outras. Este mesmo grupo pôde ser observado no presente trabalho, no qual esses mesmos indivíduos também formam um grupo com, aproximadamente, 80% de semelhança, sugerindo que marcadores genéticos apresentaram resultados parecidos com características bioquímicas ou morfológicas, o que aumenta a

confiabilidade dos dados. Donadio et al. (1995) admitem que a ‘Natal’ seja uma mutação ou clone de laranja ‘Valência’, com a qual é muito similar.

A laranjeira ‘Pêra Rio’ apresenta dissimilaridade de, aproximadamente, 20% do grupo formado pelas variedades ‘Folha Murcha Me’ e mutantes, ‘Valência’ e ‘Natal’. De fato, Sartori et al. (2002), analisando a maturação de frutos de seis cultivares de laranjas doces na depressão central do Rio Grande do Sul, demonstraram que esses três tipos de laranjeira apresentam maturação tardia, sendo a ‘Folha Murcha Me’ a mais tardia delas. Isso permite inferir que ‘Folha Murcha Me’, ‘Pêra Rio’ e ‘Valência’ apresentam maior similaridade (menor dissimilaridade), o que pode ser comprovado pela visualização do dendrograma.

As laranjas ‘Baía’ e ‘Baía Me’ apresentaram coeficiente de dissimilaridade de, aproximadamente, 20%. Essa diferença pode ser atribuída a várias razões, como, por exemplo, problemas durante o processo de microenxertia, erro de identificação ou, até mesmo, mistura de clones. Provavelmente, a reprodutibilidade da técnica do RAPD não é a causa desta diferença, já que a baixa reprodutibilidade da técnica não foi considerada como um agravante da técnica, pois os parâmetros foram otimizados, por meio de testes.

O grupo formado pelos três indivíduos ‘Seleta’ apresentou alta confiabilidade, se repetindo 72% das vezes em que foi reamostrado. Eles formaram um grupo à parte, 70% dissimilares dos outros genótipos avaliados, observando-se dissimilaridade genética de, aproximadamente, 50%, dentro da variedade. Tal discrepância pode ser explicada pela origem das seletas selecionadas. A seleta de Silva Jardim, RJ, manteve-se distante do subgrupo formado pelos dois genótipos de Araruama, RJ.

Bastianel et al. (2001) caracterizaram genótipos de *Citrus* spp utilizando marcadores RAPD. Dentre os *Citrus* avaliados, quatro variedades de *Citrus*

sinensis foram incluídas: ‘Caipira’, ‘Valência’, ‘Pêra Rio’ e ‘Cipó’. Essas quatro cultivares apresentaram similaridade máxima de 100%, mostrando que os oligonucleotídeos iniciadores utilizados não foram eficientes em detectar diferenças dentro da espécie. Já Novelli et al. (2006) desenvolveram e caracterizaram marcadores microssatélites polimórficos para laranjas-doce *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. Dos 171 *primers* testados, apenas 4 formaram fragmentos polimórficos, mesmo assim, os índices de similaridade foram altos, não permitindo a diferenciação dos genótipos. A baixa variabilidade genética entre variedades de laranja-doce foi demonstrada por outros estudos moleculares (Federici et al., 1998).

A confiabilidade do dendrograma foi verificada pelo teste desenvolvido por Mantel (1967), o qual compara duas matrizes entre si, elemento por elemento, fornecendo um valor de correlação cofenética (r_c) que quantifica o grau de relacionamento entre duas matrizes (Oliveira, 2005). Obteve-se um valor de correlação cofenética (r_c) de 0,95, probabilidade $\leq 0,0001$ para 10.000 permutações, valor alto em relação ao mínimo sugerido por Rohlf (2000) como indicativo de boa adequação do método de agrupamento em resumir a informação do conjunto de dados. Portanto, evidencia-se boa consistência do agrupamento formado.

Os resultados obtidos confirmam que os 28 fragmentos polimórficos obtidos dos 17 *primers* RAPD foram eficientes para estimar a dissimilaridade genética de genótipos de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, pois o dendrograma gerado agrupou os indivíduos com confiabilidade. Esses resultados permitem uma análise preliminar da diferenciação entre o material em estudo, fornecendo subsídio para a realização de outros trabalhos. A continuidade dessas pesquisas é de fundamental importância, pois servirá de base para a melhor compreensão dos processos fisiológicos e genéticos desta variedade nas mais variadas

condições ambientais, além de confirmar a identidade genética do genótipo ‘Folha Murcha Me’.

De acordo com Xavier (2001), os resultados gerados pelo RAPD, com os devidos ajustes da metodologia, são muito confiáveis, pois foram analisados em âmbito molecular. Isso significa que toda a variação detectada por essa técnica é de causa genética, desconsiderando a influência do ambiente.

4.6 Polimorfismo entre a laranjeira ‘Folha Murcha Me’ e as outras variedades estudadas

Dos 98 *primers* inicialmente testados para as reações de RAPD, somente 17 apresentaram diferenças (presença ou ausência de bandas) entre os indivíduos. E, dentre estes, somente o *primer* OPX-19, cuja seqüência determinada pelo fabricante é TGGCAAGGCA, mostrou polimorfismo entre ‘Folha Murcha Me’ e as outras variedades de laranjas (Figura 9A). Essa banda polimórfica foi considerada como um potencial marcador para diferenciar a ‘Folha Murcha Me’ das principais cultivares de laranjas-doce. Após confirmação do polimorfismo, ou seja, ausência de banda nos genótipos ‘Folha Murcha Me’ e seus mutantes e presença de bandas nos demais genótipos, o fragmento foi objeto de desenvolvimento de marcador SCAR.

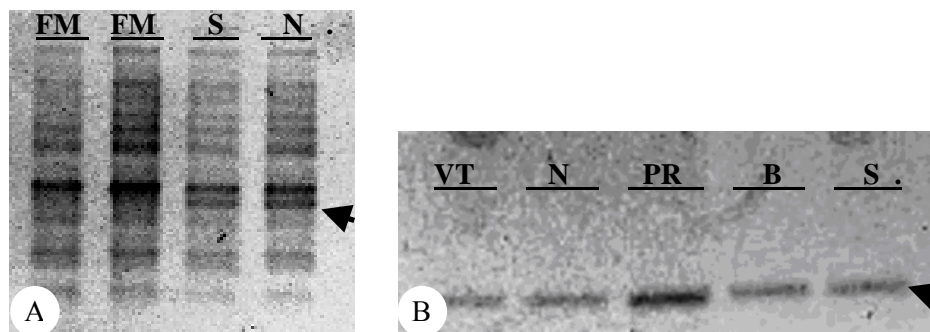


FIGURA 9: (A) Exemplo de polimorfismo detectado pelo primer OPX 19, entre ‘Folha Murcha Me’ (FM), ‘Seleta’ (S) e ‘Natal’ (N), a seta indica presença de banda nos indivíduos ‘Seleta’ e ‘Natal’. (B) A seta indica o Fragmento de DNA isolado dos indivíduos: VT (Valência tardia), N (Natal), PR (PêraRio), B (Bahia) e S (Seleta).

4.7 Transformação e clonagem bacteriana

O produto da eluição proveniente do *primer* OPX-19 foi submetido à clonagem no vetor *pDrive Cloning Vector* (QIAGEN® PCR Cloning Kit).

O produto da reação de ligação foi utilizado para transformar células competentes das bactérias *E. coli* DH5 α TM *Phage Resistant* (Promega). Após o plaqueamento, notou-se o crescimento das colônias bacterianas. Foram observadas colônias brancas transformadas e colônias azuis não transformadas.

Em duas placas, foram verificadas, aproximadamente, 145 colônias azuis e 57 colônias brancas. As colônias brancas, as quais possivelmente continham insertos, foram coletadas aleatoriamente com auxílio de palitos esterilizados e transferidas individualmente para tubos Falcons contendo meio LB líquido com ampicilina (100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$), para possibilitar o crescimento das células de *E. coli*.

Os plasmídeos isolados dos vetores bacterianos, provenientes de colônias brancas, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2% e podem ser

observados na Figura 10A. Para confirmar a transformação das colônias escolhidas, procedeu-se à digestão com enzimas de restrição *Eco* RI e *Bam* HI (Figura 10B).

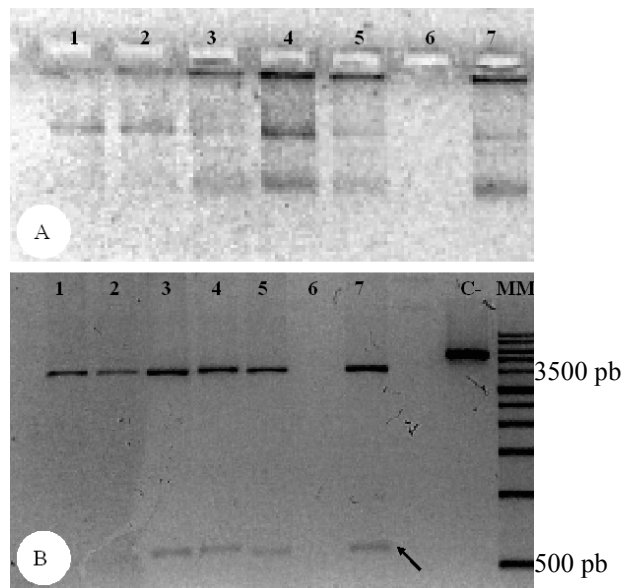


FIGURA 10: (A) DNAs plasmidiais extraídos das colônias 1 a 7. (B) Produtos da digestão de DNA's plasmidiais com *Eco*R I e *Bam*H I. A seta indica o inserto. C - controle negativo. Em (C) Marcador de peso molecular (Invitrogen).

O resultado positivo pode ser observado na Figura 10B, em que o fragmento maior corresponde ao plasmídeo pDRIVE e o menor corresponde ao inserto, confirmando a transformação eficiente em 4 das 7 colônias analisadas, comparado ao controle negativo para o inserto no vetor pSPORT.

O fragmento de DNA isolado e clonado se encontra entre os marcadores de 650 e 500 pares de bases, possuindo, portanto, aproximadamente, 580 pares,

de acordo com o marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) (Figura 10C).

4.8 Seqüenciamento

Foram seqüenciadas as colônias de números 1 a 7, com os *primers* M13 *forward* e *reverse*, porém, somente as colônias 5 e 7 apresentaram resultados com confiabilidade, gerando uma seqüência *forward* da colônia 5 e duas seqüências *reverse* das colônias 5 e 7. As seqüências da colônia 5 se encontram na Tabela 4.

TABELA 4 Sequências *forward* e *reverse*, obtidas pelo sequenciamento do plasmídeo pDrive transformado.

Colônia 5	<p>Seqüência <i>forward</i> CCAGGGTTTACGGAGCTTCGGGCCCCCAGTGTGNTATACAGCTAG CCTTAGCTCGAGAACGCTTGTGCGACGAATCAGATTTGGCAAGGAAA GAGCTGAGAATTGTCTGAGGATAAGCGTAGAAAAGGGCATACTTA TTAAAAAGTTAGTTCGCCTTTACTCTTGATATTGATTTTCTCGCTTA TTGACTGTTTGGTATTACTCTTACAAGATTTATTTNTCCTATNNCTT TGAATAGTTTAGATTTGAATGAGAAATGAGCTTAGCGGGGACAGGC TTATATAGCTGACAGCATTGTTGAACAGTTCTTACACTTGCACACGT GGAACATTTCGNTCGGCCAGGGCAACT</p>
	<p>Seqüência <i>reverse</i> TTTCAGTACACGCATGCTGCAGACGCGTNACGTATCGGATCCAGAA TTCGTGATTTGGCAAGGCACTAAATAGAAGTGAGAAGAGAAGC TGATCCGTTGATTTATTGTTTACATAAACACAGAACAGTGGAGCAA ACTTATTTCTGGCCCACTTCAAAACCATAAAAAATTACAGCACCTTG CAGCATAAAGCAGTAAGTATACATTTGCCTATACTCCACAAATTCAT AATTTTCCAGTACACAAGCGGACCTGTCACCTGGCCAGTTCATTT TCTCTCGACTTTGAACATTGGCTCAGTGATTTCAATAACAGATAACA TAGGCAGAGCACATTGATCAAAATTATTCTTATTATCACTCAACAAG CAAATTCAGTTCCTTTCCATCAATTTTCCACTGTGCAATTTAAACT TTCAACAATCTTCAGCTAAATAAGCCTTCCACCCAACCTCATTCTCA TTCAAATCTAAACTATCAAAGAACAAGGAAAAATAAACTTGANGAG TAATACCAAAAAACAGTCAATAAGCGAGAAAATCAAAACAAGAGA CAAGGCAACTAAACTTTTATAACAGGTATGCCCTTTTACATACCGA CTTTATCCTCAGGACAATTCTCAGCTCTTGCCTTGACCA</p>
Colônia 7	<p>Seqüência <i>reverse</i> TTATCGGATCCAGAATTCGTGATTTGGCAAGGCATTCCAGTTGGAC CCACAGGTAGTGAAAGATCTTCAGAATAAACTCATGAATGGCGATT AGAGAAACATTGTCAAATGCACCCTCATTGGAATAATGTAATAAAG AGGTTGCATAATACGTATGCATGTACATATGTATACCTCAAGCCTT CTTCTATGTCTGTGTTCTTAATTAATAGAATATGAATTGAATATCC TCCTATGTCAATTTTCGATTGATTAAGAAAAACTTGAACCAAAAACG CACATGATCAGAAAATTTACATGGCGGTTGAGGCTTAAATGCTCAA GAAGCATTGGTCAATTCAACATCAGCTGAAGTTAGTACTGAGCAA GATTTCTCTTAAACCTATGAAAAACAAGGGAAAAAAACCAATAA TCGTAGAAGCCTGAGCCCTGCAAGGTTAACCATGATCGGANATTTT GACAATAATACATCAAAGAACAAAAACCATATAAGTNTATATCTTT ACTNTTACAAAACCTAATAGATTGACTTGACACAA</p>

As seqüências sublinhadas **TGGCAAGGCA** correspondem à seqüência do *primer* RAPD OPX-19. Anteriormente a essa seqüência, foram observadas a seqüência do plasmídeo, que já era conhecida e a seqüência do *primer* universal M13 utilizado no seqüenciamento, aumentando a confiabilidade do método utilizado.

De acordo com o *software MegaBACE Sequencing ScoreCard*, obteve-se da colônia 5 um total de 351 nucleotídeos *forward*, com 84% de confiabilidade e 644 nucleotídeos *reverse*, com 95% de confiabilidade. Da colônia 7, foram obtidos 543 nucleotídeos *reverse*, com 92% de confiabilidade. Os resultados das colônias que seqüenciaram poucos nucleotídeos ou que tiveram baixa confiabilidade foram descartados.

Foram observadas duas seqüências *reverse* diferentes. Isso pode ocorrer devido ao fato de o RAPD amplificar fragmentos diferentes com, aproximadamente, o mesmo tamanho, indistinguíveis pelo gel de agarose e de os plasmídeos, possivelmente, terem incorporados dois fragmentos diferentes.

4.9 Construção de marcadores *sequence characterized amplified regions* ou SCAR

As seqüências dos produtos RAPD do *primer* OPX-19, clonados e seqüenciados, foram utilizadas para redesenhar *primers* PCR, mais longos e, assim, converter esses marcadores ao acaso para regiões amplificadas caracterizadas pela seqüência (marcadores SCARs). Três *primers* foram desenhados utilizando a própria seqüência de RAPD e os 10 nucleotídeos à frente dessa seqüência. A colônia 5 resultou em uma seqüência *forward* **TGGCAAGGCACAATA** e uma seqüência *reverse* **TGGCAAGGCAAGAGCTGAGA**. A colônia 7 resultou em apenas um *primer reverse* **TGGCAAGGCATTCCAGTTGG**; as outras colônias não apresentaram confiabilidade no seqüenciamento e não foram utilizadas.

Para confirmar se o marcador SCAR foi eficiente ou não, foi realizada uma reação de PCR com duas combinações de *primers forward* e *reverse*, com todos os indivíduos analisados (Tabela 3). A primeira combinação foi feita com os *primers SCAR forward* e *reverse* da colônia 5. A segunda combinação foi feita com o *primer reverse* da colônia 5 e o *primer forward* da colônia 7. Foram realizadas ampliações da sequência específica do DNA em temperaturas de pareamento mais elevadas, o que torna o processo mais reproduzível (Carvalho et al., 2000). A temperatura ideal verificada foi de 60°C.

Apenas a combinação de *primers* da colônia 5 foi capaz de amplificar um fragmento de DNA (Figura 11).

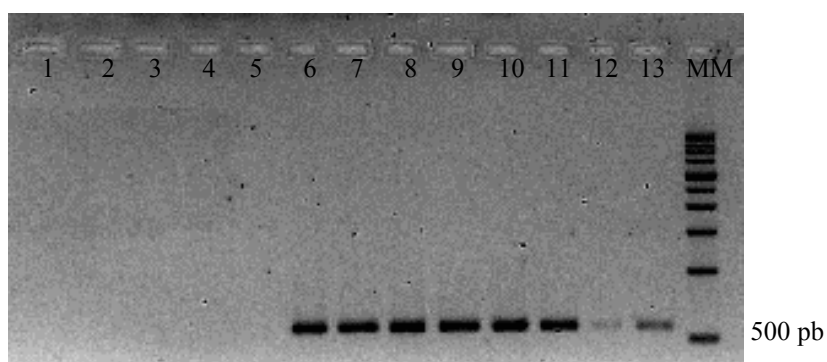


FIGURA 11 Gel de agarose contendo polimorfismo detectado pelo *primers SCAR forward* e *reverse* entre os genótipos 1a 5 (FMIM, MI, FMIIM, MII E FM) e 6 a 13 (VT, N, PR, B, BM, S1, S2 e SxC) de citros, de acordo com a Tabela 2.), MM = Marcador de peso molecular (Invitrogen).

Observa-se que ocorreu amplificação do fragmento isolado nos indivíduos ‘Valência Tardia’ (VT), ‘Natal’ (N), ‘Pêra Rio’ (PR), ‘Baía’ (B), ‘Baía Microenxertada’ (BM), ‘Seleta 1’ (S1), ‘Seleta 2’ (S2) e ‘Seleta’ x ‘Cravo’ (SxC). Este fragmento está ausente nos indivíduos ‘Folha Murcha Me’ e

mutantes, confirmando o polimorfismo do *primer* OPX-19 e a eficiência do marcador SCAR, construído para diferenciar as variedades de *Citrus sinensis* (L) Osbeck estudadas da variedade ‘Folha Murcha Me’.

4.10 Análises das seqüências de DNA

Por meio da seqüência *reverse* da colônia 5, foi obtida a seqüência reversa complementar e, em seguida, fez-se o alinhamento com a seqüência *forward* pelo software MEGA 4 (Tamura et al., 2007), de acordo com a Figura 12.

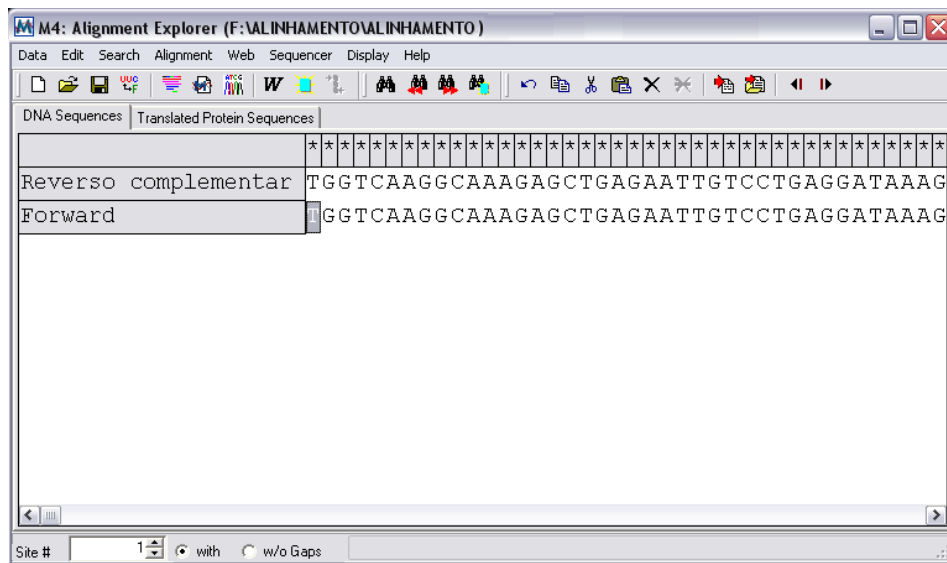


FIGURA 12 Alinhamento das seqüências *Forwad* e *Reverse* pelo software Mega 4 (Tamura et al., 2007).

Como a seqüência do *primer* RAPD era conhecida, ele foi encontrado nas duas fitas de DNA. Isso permite inferir que o fragmento de DNA isolado e clonado foi seqüenciado completamente. As bordas do fragmento apresentaram

grande confiabilidade, porém, a região central apresentou muitos *gaps* (espaços vazios). Isso ocorre para que o alinhamento seja perfeito.

O tamanho da seqüência foi de, aproximadamente, 580 pares de bases, de acordo com o esperado, segundo o marcador de peso molecular da Figura 10.

A seqüência não apresentou homologia em bancos de dados existentes para a identificação de genes, devido, possivelmente, ao grande número de *gaps* existentes. Num futuro próximo, deve ser realizado um novo seqüenciamento, a fim de eliminar o máximo possível de espaços e aumentar a confiabilidade da seqüência.

Outra explicação para a falta de homologia pode ser relacionada com a abrangência do RAPD. Como essa técnica cobre todo o genoma, a seqüência em questão pode ser uma região não funcional e, portanto, não apresenta homologia no banco de dados.

5 CONCLUSÕES

O polimorfismo gerado pela técnica de RAPD, neste trabalho, possibilitou inferir que não existem diferenças entre os indivíduos 'Folha Murcha Me' entre si, e nem com os genótipos mutantes. Mas, existem diferenças entre eles e as outras variedades de *Citrus sinensis* (L) Osbeck estudadas, utilizando os 28 marcadores polimórficos.

A construção do marcador SCAR foi eficiente, comprovada pela amplificação nos genótipos 'Valência Tardia', 'Natal', 'Pêra Rio', 'Baía', 'Baía Me', 'Seleta' 1, 'Seleta' 2 e 'Seleta' x 'Cravo' e ausência nos genótipos 'Folha Murcha Me' e mutantes da 'Folha Murcha Me'. Portanto, os *primers* SCAR foram capazes de diferenciar os *Citrus sinensis* (L.) Osbeck analisados da 'Folha Murcha Me'.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, Sept. 1997.

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

ANDRADE, R. A.; LEMOS, E. G. M.; LUZ, F. J. F.; SILVA, M. T. H. Detection of polymorphism in rootstocks for *Citrus*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 2, p. 345-349, Aug. 2007.

AREIAS, R. G.; BIASE, M. de; PAIVA, D. M.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Similaridade genética de variedades crioulas de arroz, em função da morfologia, marcadores RAPD e acúmulo de proteína nos grãos. **Bragantia**, Campinas, v. 65, n. 1, p. 19-28, 2006.

ARRIEL, N. H. C.; DI MAURO, A. O.; DI MAURO, S. M. Z.; BAKKE, O. A.; UNÊDA-TREVISOLI, S. H.; COSTA, M. M.; CORRADO, A. R. Técnicas multivariadas na determinação da diversidade genética em gergelim usando marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 5, p. 801-809, maio 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE CÍTICOS. **Abcitrus**: clipping. 2007. Disponível em: <<http://www.abecitrus.com.br>>. Acesso em: 8 jan. 2008.

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

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

BASTIANEL, M.; OLIVEIRA, A. C.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A. Diversidade genética entre híbridos de laranja-doce e tangor 'Murcott' avaliada

por AFLP e RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 5, p. 779-784, maio 2006.

BASTIANEL, M.; SCHWARZ, S. F.; COLETTA FILHO, H. D.; LIN, L. L.; MACHADO, M. A.; KOLLER, O. C. Identification of zygotic and nucellar tangerine seedlings (*Citrus* spp.) using RAPD. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 21, n. 1, Mar. 1998.

BICALHO, K. C. **Identidade genética entre clones de seringueira *Hevea* spp, de diferentes procedências, baseada em marcadores rapd**. 2006. 55 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 7, n. 6, p. 1513-1523, 1979.

BONETT, L. P.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; SCHUELTER, A. R.; VIDIGAL FILHO, P. S.; GONELA, A.; LACANALLO, G. F. Divergência genética em germoplasma de feijoeiro comum coletado no Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, p. 547-560, 2006.

BRAMMER, S. P. **Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000. (Documentos online, 3). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do03.htm>. Acesso em: 5 dez. 2007.

BRANDÃO, R. L. **Variabilidade e estrutura genética de duas espécies vicariantes, *Hymenaea courbaril* (jatobá da mata) e *H. stigonocarpa* (jatobá do cerrado)**. 2002. 55 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Estatísticas 2007**. 2007. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 8 jan. 2008.

CAI, Q.; GUY, C. L.; MOORE, G. A. Extension of the linkage map in citrus using random amplified polymorphic DNA and RFLP mapping of cold-acclimation-responsive loci. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 89, p. 606-614, 1994.

CARVALHO, M. L. M.; VIEIRA, M. G. G. C.; PINHO, E. R. von. Técnicas moleculares em sementes: aplicação de técnicas moleculares no controle de qualidade das sementes. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 3, p. 44-47, 2000.

CENTRAIS DE ABASTECIMENTO DE MINAS GERAIS. **CEASA-MG**. Disponível em: <http://www.ceasaminas.com.br/informacoes_mercado.asp>. Acesso em: 8 fev. 2008.

CEOLIN, A. C. G.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; VIDIGAL FILHO, P. S.; KVITSCHAL, M. V.; GONELA, A.; SCAPIM, C. A. Genetic divergence of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) group Carioca using morpho-agronomic traits by multivariate analysis. **Hereditas**, [S.l.], v. 144, p. 1-9, 2007.

CHEN, C.; ZHOU, P.; CHOI, Y. A.; HUANG, S.; GMITTER JUNIOR, F. G. Mining and characterizing microsatélites from citrus ESTs. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 112, n. 7, p. 1248-1257, 2006.

CLARK, A. G.; LANIGAN, C. M. S. Prospects for estimating nucleotide divergence with RAPDS. **Molecular Biology Evolution**, Lawrence, v. 10, n. 5, p. 1096-1111, Sept. 1993.

COELHO, A. S. G. **Boot**: avaliação dos erros associados a estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap com número variável de marcadores. Goiânia: UFG, 2000. CD-ROM.

COLETTA FILHO, H. D.; MACHADO, M. A.; TARGON, M. L. P. N.; MOREIRA, M. C. P.; POMPEU JUNIOR, J. Analysis of the genetic diversity among mandarins (*Citrus* spp.) using RAPD makers. **Euphytica**, Wageningen, v. 102, p. 133-139, 1998.

CONTI, J. H.; MINAMI, K.; TAVARES, F. C. A. Comparação de caracteres morfológicos e agrônômicos com moleculares em morangueiros cultivados no Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 419-423, 2002.

COSTA, M. R.; CARDOSO, E. R.; OHAZE, M. M. M. Similaridade genética de cultivares de mandioca (*Manihot Esculenta*) por meio de Marcadores RAPD. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 158-164, jan./fev. 2003.

CRISTOFANI, M.; NOVELLI, V. M.; OLIVEIRA, A. C.; OTAVIANO, A. R.; SOUZA, A. A.; MACHADO, M. A. Identificação de híbridos interespecíficos

em citros utilizando marcadores RAPD e SSR. **Laranja**, [S.l.], v. 22, p. 231-241, 2001.

CRUZ, C. D. **Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas**. 1990. 188 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 2003. v. 2, 585 p.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 1997. 390 p.

CRUZ, C. D.; SCHUSTER, I. **GQMOL – aplicativo computacional ara análises de dados moleculares e de suas associações com caracteres quantitativos**. Versão 2.1. Viçosa: UFV, 2004.

CRUZ, R. P.; MILACH, S. C. K. Análise de RAPD. In: MILACH, S. C. K. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: [s.n.], 1998. p. 107-116.

DIAS, L. A. S. **Divergência genética e fenética multivariada na predição de híbridos e preservação de germoplasma de cacau (*Thebroma cacao* L.)**. 1994. 94 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

DIAS, L. A. S.; KAGEYAMA, P. Y. Multivariate genetic distance and hybrid performance of cacao (*Thebroma cacao*). **Brazilian Journal of Genetic**, Ribeirão Preto, v. 20, n. 1, p. 63-70, 1998.

DINIZ FILHO, J. A. **Métodos filogenéticos comparativos**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. 120 p.

DOMINGUES, D. S.; FARRO, A. P. C.; COSCRATO, V. E.; MELO, E. J. S. de; MARINO, C. L. Identificação de marcador RAPD e SCAR relacionados ao caractere florescimento precoce em *Eucalyptus grandis*. **Ciência Florestal**, [S.l.], v. 16, n. 3, p. 251-260, 2006.

DOMINGUES, E. T. **Caracterização morfológica, agronômica, isoenzimática e por RAPD de variedades de laranja doce – *Citrus sinensis* (L.) Osbeck**.

1998. 251 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

DONADIO, L. C.; FIQUEIREDO, J. O.; PIO, R. M. **Variedades cítricas brasileiras**. Joboticabal: FUNEP, 1995. 228 p.

DUARTE, J. M. **Estudo da divergência genética em raças de Feijão por meio de marcadores RAPD**. 1998. 78 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ELIAS, H. T.; VIDIGAL, M. C. G.; GONELA, A.; VOGT, G. A. Variabilidade genética em germoplasma tradicional de feijão-preto em Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, Brasília, v. 42, n. 10, p. 1443-1449, out. 2007.

EMYGDIO, B. M.; ANTUNES, I. F.; CHOER, E.; NEDEL, J. L. Eficiência de coeficientes de similaridade em genótipos de feijão mediante marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, p. 243-250, 2003.

FEDERICI, C. T.; FANG, D. Q.; SCORA, R. W.; ROOSE, M. L. Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analyses. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 96, p. 812-822, 1998.

FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa-Cernagen, 1998. 220 p.

FOOD AGRICULTURAL ORGANIZATION. **Statistical**: database. 2006. Disponível em: <www.apps.fao.org>. Acesso em: 3 nov. 2006.

GAUR, P. C.; GRUPTA, P. K.; KISHORI, H. Studies on genetic divergence in potato. **Euphytica**, Wageningen, v. 27, p. 316-368, 1978.

GOMES, G. A. C. **Divergência genética entre cultivares e certificação genética e fitossanitária de matrizes de bananeira**. 2002. 124 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

JACKSON, A. A.; SOMERS, K. M.; HARVEY, H. H. Similarity coefficients: measures for co-occurrence and association or simply measures of occurrence. **American Naturalist**, Chicago, v. 133, p. 436-453, 1989.

- JIANG, D.; ZHONG, G. Y.; HONG, Q. B. Analysis of microsatellites in *Citrus unigenes*. **Acta Genetica Sinica**, Beijing, v. 33, p. 345-353, 2006.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. Sunderland: Sinauer Associates, 1999. 464 p.
- KRZANOWSKY, W. J. **Principles of multivariate analysis: a user's perspective**. Oxford: Oxford Science, 1998. 563 p.
- KEIL, M.; GRIFFIN, A. R. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in the discrimination and verification of genotypes in Eucalyptus. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 89, p. 442-450, 1994.
- KOEHLER-SANTOS, P.; DORNELLES, A. L. C.; FREITAS, L. B. de. Characterization of mandarin *Citrus* germplasm from southern Brazil by morphological and molecular analyze. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, p. 797-806, 2003.
- KRUSKAL, J. B. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a no metric hypothesis. **Psychometrika**, Williamsburg, v. 29, n. 1, p. 1-27, 1964.
- LACERDA, D. R.; ACEDO, M. D. P.; LOVATO, M. B. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. **Lundiana**, Belo Horizonte, v. 3, p. 87-92, 2002. Disponível em: <<http://www.icb.ufmg.br/~lundiana/Contents/full/vol322002/1.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2008.
- LANDERGOTT, U.; HOLDEREGGER, R.; KOZLOWSKI, G.; SCHNELLER, J. J. Historical bottlenecks decrease genetic diversity in natural populations of *Dryopteris crisata*. **Heredity**, Oxford, v. 87, n. 3, p. 344-355, Sept. 2001.
- LING, P.; DUNCAN, L. W.; DENG, Z.; HUANG, X. H. S.; GMITTER JUNIOR, F. G. Inheritance of citrus nematode resistance and its linkage with molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, p. 1010-1017, 2000.
- LURO, F.; BOVÉ, J. M.; OLLITRAULT, P. DNA amplified fingerprinting, a useful tool for determination of genetic origin and diversity analysis in *Citrus*. **HortScience**, Alexandria, v. 30, n. 5, p. 1063-1067, 1995.

MACHADO, C. F. **Procedimentos para a escolha de genitores de feijão**. 1999. 118 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MAGALHÃES JUNIOR, D.; GONZALES, A. F.; PALHARES JUNIOR, J.; PARAZZI, C. Avaliação de curvas de maturação de laranjas por análise de agrupamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 12, p. 2203-2209, dez. 1999.

MAGALHÃES JUNIOR, D. M.; NEGRI, J. D. P.; PALHARES JUNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico; Fundag, 2005. 929 p.

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

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, Baltimore, v. 27, p. 209-220, 1967.

MENDONÇA, E. G. **Análise da diversidade genética de *Calophyllum brasiliense* Camb. por marcadores RAPD em populações de mata ciliar**. 2006. 60 p. Monografia (Graduação) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MEYER, A. S. **Comparação de coeficientes de similaridade usados em análises de agrupamento com dados de marcadores moleculares dominantes**. 2002. 106 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Estatística e Experimentação Agronômica) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, Piracicaba.

MILACH, S. C. K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: _____. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p. 17-28.

MIRANDA, G. V.; COIMBRA, R. R.; GODOY, C. L.; SOUZA, L. V.; GUIMARÃES, L. J. M.; MELO, A. V. Potencial de melhoramento e divergência genética de cultivares de milho-pipoca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 6, p. 681-688, jun. 2003.

MOURA, E. F. **Divergência genética entre acessos de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*)**. 2003. 75 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MOURA, N. F.; CHAVES, L. J.; VENCOVSKY, R.; ZUCCHI, M. I.; PINHEIRO, J. B.; MORAIS, L. K.; MOURA, M. F. Seleção de marcadores

RAPD para o estudo da estrutura genética de populações de *Hancornia speciosa* Gomes. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 21, n. 3, p. 119-125, set./dez. 2005.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 155, p. 335-350, 1987.

NICOLOSI, E.; DENG, Z. N.; GENTILE, A.; LA MALFA, S.; CONTINELLA, G.; TRIBULATO, E. *Citrus* phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, p. 1155-1166, 2000.

NOIR, S. F.; ANTHONY, B.; BERTRAND, M. C.; COMBRES; LASHERMES, P. Identification of a major gene (Mex-1) from *Coffea canephora* conferring resistance to *M. exigua* in *Coffea arabica*. **Plant Pathology**, Dordrecht, v. 52 p. 97-103, 2003.

NOVELLI, V. M. et al. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for the sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. **Genetic Molecular Biology**, São Paulo, v. 29, n. 1, 2006.

OLIVEIRA, M. S. P. **Caracterização molecular e morfo-agronômica de germoplasma de açazeiro**. 2005. 171 p. Tese (Doutorado em genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

OLIVEIRA, R. P.; CRISTOFANI, M.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; MACHADO, M. A. Diversidade genética entre híbridos de tangerina 'Cravo' e laranja 'Pêra'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 4, 2002.

OLIVEIRA, R. P.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A. Marcadores RAPD para mapeamento genético e seleção de híbridos de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, 2001.

PAINTING, K. **Measuring genetic variation using molecular markers: international plant genetic resource**. Rome: Brain Ford-Lloyd; University of Birmingham, 1996. 82 p.

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

PARAN, I.; MICHELMORE, R. W. Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 85, p. 985-993, 1993.

PATZAK, J. Comparison of RAPD, STS ISSR e AFLP molecular methods used for assessment of genetic diversity in hop (*Humulus lupulus* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 121, n. 1, p. 9-18, 2001.

PEQUENO, A. S.; PINHEIRO, J. B.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; COELHO, A. S. G.; TRINDADE, M. G. Determinação do número de marcadores RAPD para estudos da diversidade genética em soja utilizando o método Bootstrap. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 19, n. 2, p. 45-48, May/Aug. 2003.

PEREIRA, C. D.; KERR, W. E. Genetic divergence among twelve genotypes of pineapple (*Ananas comosus* L, Merril.) estimated by rapd markers. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 335-338, 2001.

PEREIRA, V. A. **Utilização de análise multivariada na caracterização de germoplasma de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.)**. 1989. 180 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

PIGATO, S. M. P. C.; LOPES, C. R. Caracterização silvicultural, botânica e avaliação da variabilidade genética por meio do marcador molecular RAPD em um teste de progênies de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake. **Scientia Forestalis**, n. 60, p. 135-148, dez. 2001.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na Agropecuária**. 3. ed. rev. Lavras: UFLA, 2004. 472 p.

RAO, C. R. **Advanced statistical methods in biometric research**. New York: Wiley, 1952. 390 p.

ROBINSON, I. P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, 1998. cap. 7, p. 329-358.

RODRIGUES, F. M.; DINIZ-FILHO, J. A. F. Hierarchical structure of genetic distances: effects of matrix size, spatial distribution and correlation structure among gene frequencies. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 21, n. 2, p. 233-240, June 1998.

ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system.** Version 2.1. New York: Exeter Software, 2000. 38 p.

SAKIYAMA, N. S. Marcadores moleculares e as hortaliças. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 11, n. 2, p. 204-206, 1993.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chainterminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, June 1977.

SARTORI, I. A.; KOLLER, O. C.; SCHWARZ, S. F.; BENDER, R. J.; SCHÄFER, G. Maturação de frutos de seis cultivares de laranjas-doces na depressão central do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 364-369, ago. 2002.

SAWAZAKI, H. E.; SODEK, L.; PIO, R. M.; MULLER, G. W. Identificação de espécies de citros mediante polimorfismo enzimático. **Bragantia**, Campinas, v. 51, n. 2, p. 121-128, 1992.

SCHAFER, G.; BASTIANEL, M.; DORNELLES, A. L. C. Genetic diversity of *Citrus* rootstocks based on RAPD marker analysis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 5, 2004.

SCORA, R. W. On the history and origin of citrus. **Bulletins of the Torrey Botanical Club**, [S.l.], v. 102, n. 6, p. 396-375, 1975.

SEDRA, M. H.; LASHERMES, P.; TROUSLOT, P.; COMBES, M. C.; HAMON, S. Identification and genetic diversity analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) varieties from Morocco using RAPD markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 103, n. 1, p. 75-82, 1998.

SOUSA, N. R. **Variabilidade genética e estimativas de parâmetros genéticos em germoplasma de guaranazeiro.** 2003. 99 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

STENZEL, N. M. C.; NEVES, C. S. V. J.; SCHOLZ, M. B. S. Performance of 'Folha Murcha' orange on seven rootstocks in northwest of Paraná. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 408-411, 2005.

STUCHI, E. S. **Estação experimental de citricultura de bebedouro (EECB).**

Disponível em: <<http://www.megaagro.com.br/frutas/laranjeira.asp>>. Acesso em: 9 mar. 2007.

SWINGLE, W. T.; REECE, P. C. The botany of citrus and its wild relatives. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L. D.; WEBER, H. J. **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1967. p. 190-430.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. H. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis: software: version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, [S.l.], v. 24, n. 8, p. 1596-1599, May 2007.

TELLES, M. P. C.; VALDA, F. D.; BANDEIRA, L. F.; COELHO, A. S. G. Genetic characterization of natural populations of "araticunzeiro" (*Annona crassiflora* Mart. - Annonaceae) collected in the State of Goiás, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 1, 2003.

TOTTI, R.; VENCOVSKY, R.; BATISTA, L. A. R. Utilização de métodos de agrupamentos hierárquicos em acessos de *Paspalum* (Graminea - Poaceae). **Ciencias Exatas Tecnologia**, Londrina, v. 22, p. 25-35, dez. 2001.

VITAL, R. A.; LAMEGO, F. P.; NUNES, A. L. Otimização do número de primers empregados em RAPD para detectar variabilidade genética entre acessos de picão-preto. **Scientia Agraria**, Piracicaba, v. 6, n. 1/2, p. 71-77, 2005.

XAVIER, K. G. **Divergência genética em clones de *Eucalyptus* avaliada por marcadores RAPD, e variações nas propriedades da madeira**. 2001. 107 p. Dissertação (Mestrado em Florestas de Produção) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

ZIMBACK, L.; BARBOSA, W.; MORI, S. Characterization and identification of tropical and Douradão peach varieties by RAPD markers. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 352-354, 2003.

ANEXOS

TABELA 1A Matriz de similaridade genética entre os 13 genótipos de Citros 76

ANEXO 1A Matriz de similaridade genética entre os 13 genótipos de laranjeiras

	Folha Murcha mutante I	Mutante II	Folha Murcha mutante II	Mutante II	Folha Murcha	Valência	Natal	PêraRio	Baía	Baía ME	Seleta 1	Seleta 2	Seleta x Cravo
Folha Murcha mutante I	0	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Mutante I	0	0	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Folha Murcha mutante II	0	0	0	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Mutante II	0	0	0	0	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Folha Murcha	0	0	0	0	0	----	----	----	----	----	----	----	----
Valência	0,143	0,143	0,143	0,143	0,143	0	----	----	----	----	----	----	----
Natal	0,143	0,143	0,143	0,146	0,143	0,134	0	----	----	----	----	----	----
PêraRio	0,154	0,154	0,154	0,154	0,154	0,143	0,143	0	----	----	----	----	----
Baía	0,334	0,334	0,334	0,334	0,334	0,313	0,313	0,215	0	----	----	----	----
Baía ME	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,188	0,188	0,2	0,25	0	----	----	----
Seleta 1	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,524	0,524	0,55	0,5	0,477	0	----	----
Seleta 2	0,889	0,889	0,889	0,889	0,889	0,858	0,815	0,889	0,852	0,778	0,542	0	----
Seleta x Cravo	0,731	0,731	0,731	0,731	0,731	0,704	0,654	0,731	0,693	0,616	0,48	0,305	0