

## Diversidade genética entre híbridos de tangerina 'Cravo' e laranja 'Pêra' <sup>(1)</sup>

Roberto Pedroso de Oliveira<sup>(2)</sup>, Mariângela Cristofani<sup>(3)</sup>, Carlos Ivan Aguilar-Vildoso<sup>(3)</sup>  
e Marcos Antônio Machado<sup>(3)</sup>

Resumo – Marcadores moleculares RAPD foram utilizados para avaliar a diversidade genética em uma população de 94 híbridos de tangerina 'Cravo' (*Citrus reticulata* Blanco) com laranja 'Pêra' (*C. sinensis* (L.) Osbeck), obtidos por polinização controlada. Nas reações de amplificação foram usados 102 "primers" decâmeros de seqüência arbitrária, que amplificaram 640 fragmentos, sendo 77,2% monomórficos entre os parentais. Utilizou-se o coeficiente de Jaccard para estimar a similaridade genética entre os híbridos, o método UPGMA para gerar o fenograma (NTSYS 1,7) e o software BOOD para determinar a consistência de cada agrupamento. Verificou-se que a laranja 'Pêra' apresenta maior heterozigosidade que a tangerina 'Cravo', sendo, respectivamente, 180 e 126 os números observados de loci em heterozigose. Houve alta similaridade genética entre os parentais, caracterizada pelo baixo polimorfismo de marcadores RAPD. Não houve a formação de agrupamentos estatisticamente significativos dos híbridos entre si e com os parentais, demonstrando que a constituição genética dos híbridos foi originada pela segregação independente das marcas RAPD, sendo quebrado o efeito de ligação em função do tamanho amostral em estudo. Híbridos com maior similaridade genética em relação à tangerina 'Cravo' e laranja 'Pêra' podem ser facilmente selecionados a partir de marcadores RAPD.

Termos para indexação: frutas cítricas, marcadores genéticos, heterozigoto, variação genética.

### Genetic diversity among hybrids of 'Cravo' mandarin and 'Pêra' sweet orange

Abstract – RAPD molecular markers were used to evaluate the genetic diversity in a progeny of 94 hybrids between 'Cravo' mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and 'Pêra' sweet orange (*C. sinensis* (L.) Osbeck), obtained by controlled pollination. One hundred two random decamer primers were screened, amplifying 640 fragments, 77.2% monomorphics between the parents. The Jaccard coefficient was used to estimate the genetic similarity among the hybrids, the UPGMA method to establish the phenogram (NTSYS 1.7) and the software BOOD to determine the significance of each cluster. The results indicated that 'Pêra' sweet orange heterozygosity degree is higher than 'Cravo' mandarin, with 180 and 126 loci in heterozygose, respectively. It was observed high genetic similarity between the parents, characterized by the low degree of RAPD polymorphism. Significant statistic groups were not established among the hybrids and the parents, showing that the hybrid genetic constitution was originated by independent RAPD markers segregation. Then, the ligation effect was broken because of the sample size. Hybrids with high genetic similarity degree in relation to 'Cravo' mandarin and 'Pêra' sweet orange could be easily selected using RAPD markers.

Index terms: citrus fruits, genetic markers, heterozygotes, genetic variation.

<sup>(1)</sup> Aceito para publicação em 19 de julho de 2001.

Extraído da tese de doutorado apresentada pelo primeiro autor à Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

<sup>(2)</sup> Embrapa-Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado (CPACT), Caixa Postal 403, CEP 96001-970 Pelotas, RS. E-mail: rpedroso@cena.usp.br

<sup>(3)</sup> Instituto Agrônomo, Centro de Citricultura 'Sylvio Moreira', Caixa Postal 04, CEP 13490-970 Cordeirópolis, SP. E-mail: marcos@centrodecitricultura.br

### Introdução

O histórico da citricultura brasileira evidencia a necessidade de se buscar novas variedades. A diversidade genética dos citros é grande, porém a base genética das espécies economicamente importantes é estreita. Cruzamentos controlados em citros vêm sendo realizados desde o século XIX, obtendo-se vários híbridos de importância econômica (Moreira

& Pio, 1991). A descontinuidade nos programas de melhoramento e fatores biológicos, como a longa juvenildade, auto-incompatibilidade e incompatibilidade entre algumas espécies, alta heterozigosidade, esterilidade, depressão por endogamia, apomixia e poliploidia têm sido as principais limitações encontradas à obtenção de novas variedades de citros (Grosser & Gmitter Junior, 1990).

No Centro de Citricultura Sylvio Moreira (CCSM-IAC), em Cordeirópolis, SP, vem sendo conduzido um programa de melhoramento visando à obtenção de novas variedades de citros. Uma população de híbridos de tangerina 'Cravo' (*Citrus reticulata* Blanco), parental feminino, com laranja 'Pêra' (*C. sinensis* (L.) Osbeck) foi obtida por cruzamentos controlados. Esses híbridos devem apresentar alta variabilidade genética e podem ser importantes por segregarem para diversas características de valor agrônômico, principalmente para o caráter resistência/suscetibilidade à clorose variegada dos citros (CVC). Segundo Machado et al. (1993), a laranja 'Pêra' é altamente suscetível à doença, e a tangerina 'Cravo' não tem apresentado sintomas no campo.

Diversos marcadores moleculares têm sido utilizados como ferramentas em programas de melhoramento por hibridação sexual, permitindo a caracterização genética de um grande número de genótipos por meio de procedimentos relativamente simples, rápidos e sem interferência ambiental. Os marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA – fragmentos de DNA amplificados ao acaso) consistem em um dos mais utilizados, por se tratar de uma técnica simples, de baixo custo e relativamente menos exigente em mão-de-obra (Huff et al., 1993). O polimorfismo de RAPD é detectado pela amplificação, de forma arbitrária, de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos, pela reação de polimerase em cadeia (PCR), na presença da enzima termoestável DNA polimerase (Williams et al., 1990).

A heterozigosidade e a similaridade genética são medidas de diversidade entre os parentais e híbridos, podendo ser estimadas por meio de marcadores moleculares (Barbosa Neto & Bered, 1998), tendo aplicação em estudos taxonômicos e de melhoramento. Informações sobre as relações genéticas existentes entre híbridos, dentro de cruzamentos, são de grande importância para os melhoristas, pois podem orientar a seleção de materiais promissores, novos cruzamentos e entendimento da herança de diversos caracteres em citros.

Este trabalho teve por objetivo avaliar a diversidade genética, utilizando marcadores moleculares RAPD, em híbridos de tangerina 'Cravo' com laranja 'Pêra'.

### Material e Métodos

Os parentais tangerina 'Cravo' e laranja 'Pêra', e uma população de 94 híbridos F<sub>1</sub> dessas variedades, obtidos por cruzamentos controlados, foram utilizados em estudos de diversidade genética.

O DNA foi extraído de folhas frescas e maduras, utilizando-se o método CTAB, proposto por Murray & Thompson (1980) e adaptado por Cristofani (1997). A quantificação do DNA extraído foi feita em gel de agarose, corado com brometo de etídio (0,5 ng mL<sup>-1</sup>), comparando-se a  $\lambda$ -DNA intacto nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 ng L<sup>-1</sup>; e a qualidade do DNA foi avaliada com base na ausência/presença e intensidade de rastro no gel após corrida eletroforética (Sambrook et al., 1989).

As reações de amplificação foram preparadas em um volume final de 13  $\mu$ L, com 1,3  $\mu$ L de tampão 10x (200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl - GIBCO BRL); soluções 1,54 mM de MgCl<sub>2</sub> (GIBCO BRL) e 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP - GIBCO BRL); 15 ng de cada "primer"; 1,5 unidade de Taq DNA Polymerase (GIBCO BRL); e 15 ng de DNA genômico. Adicionou-se 20  $\mu$ L de óleo mineral (Sigma) por reação. As amplificações foram realizadas em termocicladores MJ Research Inc., programados para 36 ciclos de 1 minuto a 92°C, 1 minuto a 36°C, 2 minutos a 72°C e 10 minutos de extensão a 72°C. Foram utilizados 102 "primers" decâmeros de seqüência arbitrária dos "kits" A, AB, AT, AV, B, C, D, E, G, H, I, M, N, P, Q, R, U e Y da Operon Technologies Inc., Alameda, CA, USA.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese, utilizando-se géis de agarose a 1,4%, contendo 5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de brometo de etídio. A corrida foi realizada a 94 V, por aproximadamente 3 horas, em tampão TAE 1X (0,04 M Tris-acetato + 1 mM EDTA). Foram aplicados 5  $\mu$ L da solução de amplificação com 1  $\mu$ L de tampão de carregamento (0,25% de azul de bromofenol + 40% de sacarose) por canaleta do gel. O marcador "Plus DNA Ladder" de 1 kb (GIBCO BRL) foi utilizado como padrão para cálculo do peso molecular. A visualização das bandas foi realizada sob luz ultravioleta. Somente foram consideradas as bandas monomórficas e polimórficas que se apresentaram de forma consistente e reproduzível nos géis de agarose.

As heterozigosidades da tangerina 'Cravo' e da laranja 'Pêra' foram comparadas pelo somatório do número de bandas presentes nos parentais que segregavam na população de híbridos (Cristofani, 1997). O coeficiente de Jaccard foi utilizado para estimar a similaridade genética entre os parentais e híbridos, sendo obtido o fenograma com o método da média aritmética não ponderada para agrupamento aos pares (UPGMA - Unweighted pair group arithmetic average), de acordo com Sneath & Sokal (1973), utilizando-se o software NTSYS 1,7 - Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (Rohlf, 1992). Os valores de "bootstrap" de cada agrupamento foram determinados com o software BOOD (Coelho, 2000).

### Resultados e Discussão

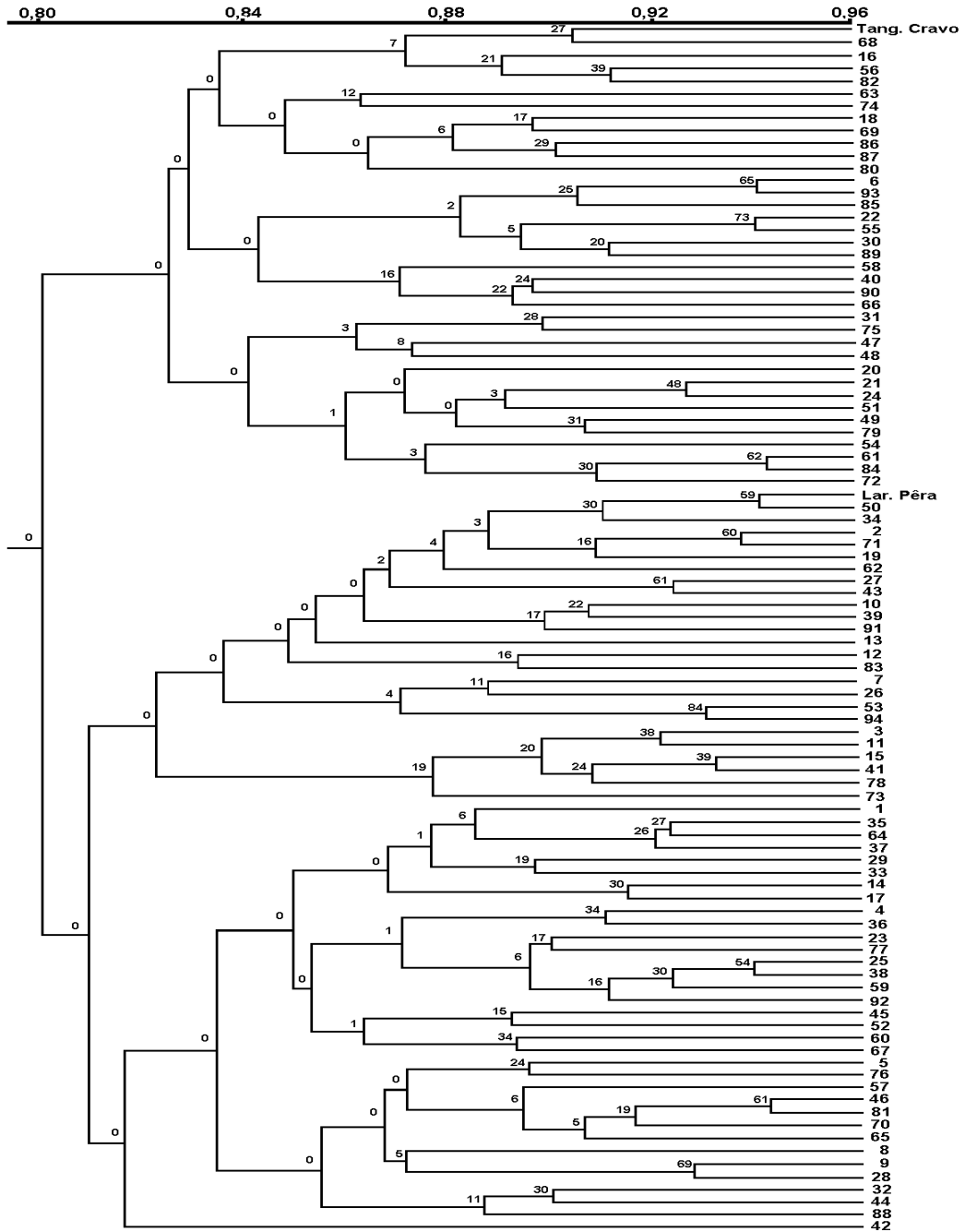
A partir de 102 "primers", selecionados por apresentarem amplificação de pelo menos um fragmento com padrão adequado, foram obtidos 146 marcadores RAPD revelando polimorfismo entre os parentais e segregação na progênie, e 80 marcadores não-polimórficos, mas com segregação na progênie. Desta forma, 180 loci em heterozigose em laranja 'Pêra' e 126 em tangerina 'Cravo' foram avaliados. Como o número de fragmentos que apresentaram polimorfismo na progênie é diretamente proporcional ao número de loci em heterozigose (Barbosa Neto et al., 1996), esses dados indicam que a heterozigosidade em laranja 'Pêra' é maior do que em tangerina 'Cravo'. Federici et al. (1998) fizeram uma classificação de espécies cítricas, utilizando marcadores RFLP, baseada em um índice de heterozigosidade, tendo observado variações de 0,766 a 1,472 para as espécies estudadas, sendo de 1,032 e 1,185 para *C. reticulata* e *C. sinensis*, respectivamente. Esses resultados concordam com os observados neste trabalho e com as hipóteses de origem do gênero *Citrus*. Em geral, espécies inferidas como de origem híbrida, como as laranjas doces (*C. sinensis*), apresentam um número de fragmentos polimórficos maior do que as espécies não híbridas, como as tangerinas (*C. reticulata*). Segundo Federici et al. (1998), *C. sinensis* possui uma quantidade de loci em heterozigose próxima à dos híbridos produzidos pelo homem, enquanto a espécie *C. reticulata* possui heterozigose menor, sendo, por isso, considerada uma espécie ancestral do gênero *Citrus* (Roose, 1988).

As reações de RAPD proporcionaram 640 produtos de amplificação, sendo 77,2% monomórficos entre os parentais. Houve elevada similaridade genética entre tangerina 'Cravo' e laranja 'Pêra' (74,5%), mesmo utilizando o coeficiente de Jaccard, que é recomendado para dados binários de populações bastante semelhantes. Durante a seleção dos marcadores RAPD, a existência de bandas sem polimorfismo entre os parentais e segregação na progênie (12,5%) consistiu em um indício de mesmos loci gênicos em heterozigose simultânea nos parentais. Cristofani (1997) raramente observou esse polimorfismo ao trabalhar com o cruzamento intergenérico *C. sunki* x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf..

Apenas 226 (35,2%) fragmentos apresentaram polimorfismo na progênie; maior proporção de polimorfismo foi obtida por Al-Janabi et al. (1993), Cai et al. (1994) e Grattapaglia & Sederoff (1994) ao trabalharem com cana-de-açúcar, outras espécies de citros, e eucalipto, respectivamente. O baixo polimorfismo pode ser explicado pela maior similaridade genética entre os parentais. Esse resultado era esperado, pois, taxonomicamente, essas espécies são classificadas como próximas (Davies & Albrigo, 1994), e vários autores acreditam que a espécie *C. sinensis* seja um híbrido proveniente de *C. reticulata*. Segundo Federici et al. (1998), a espécie *C. sinensis* deve ser um híbrido de *C. maxima* com *C. reticulata*. No entanto, a taxonomia do gênero *Citrus* é ainda bastante complexa, em razão da ocorrência de mutação, hibridação, apomixia e seleção por muitos séculos de cultivo (Herrero et al., 1996).

Houve alta similaridade genética também entre os híbridos (74,18% a 99,72%). Esse resultado era esperado pela pronunciada semelhança fenotípica entre plantas híbridas com 1,5 ano de idade, cultivadas em casa de vegetação. Embora os híbridos fossem bastante semelhantes, não foram encontrados gêmeos, os quais podem ocorrer em citros devido à poliembrião por clivagem do embrião sexual ou pela existência de mais de um gametófito normal no óvulo (Frost & Soost, 1968). Medina Filho et al. (1993) relataram a ocorrência de 2% de híbridos gêmeos em cruzamentos entre diferentes espécies de *Citrus* com *P. trifoliata*.

O fenograma revelou a separação dos híbridos em dois grupos geneticamente distintos em função de cada parental (Figura 1). A maior parte dos híbridos,



**Figura 1.** Similaridade entre híbridos do cruzamento de tangerina ‘Cravo’ (*Citrus reticulata* Blanco) com laranja ‘Pêra’ (*C. sinensis* (L.) Osbeck), gerada pelo coeficiente de Jaccard e agrupada por UPGMA. A consistência de cada agrupamento foi determinada com o software BOOD.

58 (60,4%), apresentou maior similaridade genética com laranja 'Pêra', enquanto os 36 híbridos restantes foram mais similares à tangerina 'Cravo'. Segundo Lynch & Milligan (1994), quando se trabalha com marcadores dominantes (RAPD), existe a tendência de aproximar os híbridos ao parental com maior número de loci em heterozigose. Procurou-se aumentar a acurácia dos resultados das análises de agrupamento trabalhando-se com um número de loci (640) superior ao comumente utilizado. Luro et al. (1995), Bastianel et al. (1998) e Cristofani (1997) utilizaram 25, 31 e 253 loci, respectivamente, em análises de agrupamento de híbridos.

Com base nos resultados de similaridade genética dos híbridos em relação a seus parentais, podem-se escolher híbridos mais próximos de laranja 'Pêra' e de tangerina 'Cravo', em função dos objetivos do programa de melhoramento.

No fenograma, verificou-se a presença de possíveis agrupamentos entre os híbridos por UPGMA (Figura 1), porém as análises de "bootstrap" revelaram baixa consistência desses agrupamentos (menos de 84%). Essa informação demonstra que a constituição genética dos híbridos foi originada pela segregação independente das marcas RAPD, e foi quebrado o efeito de ligação, em razão do tamanho amostral em estudo. Agrupamentos de híbridos de *C. deliciosa* Tenore x *C. nobilis* Loureiro foram obtidos por Bastianel et al. (1998), provavelmente por trabalharem com número reduzido de marcadores moleculares e de indivíduos. No presente trabalho, a consistência estatística dos agrupamentos diminuiu à medida que os grupos representados no fenograma passaram a conter maior número de híbridos, chegando a menos de 2% nos agrupamentos com mais de nove indivíduos. Esse resultado indica que não se formaram agrupamentos estatisticamente significativos entre os híbridos.

Embora a similaridade genética entre os híbridos e parentais tenha sido calculada com base em dados moleculares, que, muitas vezes, não correspondem a regiões expressas do DNA (Barbosa Neto & Bered, 1998), os resultados apresentados devem ser bastante consistentes, em decorrência de não haver interferência do ambiente, o que é comum em dados fenotípicos, e dos marcadores RAPD geralmente proporcionarem uma ampla cobertura do genoma (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Os resultados gerados apresentam grande utilidade ao melhoramento

de tangerina 'Cravo' e laranja 'Pêra', pois permitem maior compreensão sobre a genética dos citros e fornecem subsídios para programas de seleção de híbridos e de retrocruzamento.

### Conclusões

1. Híbridos com maior similaridade genética em relação à tangerina 'Cravo' e à laranja 'Pêra', em cruzamentos entre essas variedades, podem ser facilmente selecionados, utilizando-se marcadores moleculares RAPD.

2. A laranja 'Pêra' apresenta uma heterozigosidade maior do que a tangerina 'Cravo'.

3. Existe similaridade genética elevada entre tangerina 'Cravo' e laranja 'Pêra', caracterizada pelo polimorfismo reduzido de marcadores RAPD.

4. Não ocorrem agrupamentos estatisticamente significativos entre híbridos de uma população F<sub>1</sub>, quando se trabalha com um número representativo de marcadores moleculares e de indivíduos.

### Referências

- AL-JANABI, S. M.; HONEYCUTT, R. J.; McCLELLAND, M.; SOBRAL, B. W. S. A genetic linkage map of *Saccharum spontaneum* L. "SES 208". **Genetics**, Oxford, v. 134, p. 1249-1260, 1993.
- BARBOSA NETO, J. F.; BERED, F. Marcadores genéticos e diversidade genética no melhoramento de plantas. In: MILACH, S. C. K. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p. 29-40.
- BARBOSA NETO, J. F.; SORRELLS, M. E.; CISAR, G. Prediction of heterosis in wheat using coefficient of parentage and RFLP-based estimates of genetic relationship. **Genome**, Ottawa, v. 39, p. 1142-1149, 1996.
- BASTIANEL, M.; SCHWARTZ, 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, p. 123-127, 1998.
- CAI, Q.; GUY, C. L.; MOORE, G. A. Extension of the linkage map in *Citrus* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of cold-acclimation-responsive loci. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 89, p. 606-614, 1994.
- COELHO, A. S. G. **BOOD**: avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades ge-

- néticas através do procedimento de bootstrap. Goiânia: UFG, 2000. (Software). 1 disquete.
- CRISTOFANI, M. **Mapas de ligação de *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux e localização do gene de resistência ao vírus da tristeza.** 1997. 140 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. 1997.
- DAVIES, F. S.; ALBRIGO, L. G. **Citrus.** Wallingford: CAB International, 1994. 254 p.
- 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 analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 96, p. 812-822, 1998.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3. ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220 p.
- FROST, H. B.; SOOST, R. K. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L. D.; WEBBER, H. J. (Ed.). **The citrus industry.** Berkeley: University of California Press, 1968. v. 2, p. 290-324.
- GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, Oxford, v. 137, p. 1121-1137, 1994.
- GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR., F. G. Somatic hybridization of *Citrus* with wild relatives for germplasm enhancement and cultivar development. **HortScience**, Alexandria, v. 25, p. 147-151, 1990.
- HERRERO, R.; ASÍNS, M. J.; PINA, J. A.; CARBONELL, E. A.; NAVARRO, L. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. II: genetic relationships among genera and species. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 93, p. 1327-1334, 1996.
- HUFF, D. R.; PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm.]. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 86, p. 927-934, 1993.
- LURO, F.; BOVÉ, F. L.; 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, p. 1063-1067, 1995.
- LYNCH, M.; MILLIGAN, B. G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 3, p. 91-99, 1994.
- MACHADO, M. A.; SILVERIO, J. L.; BAPTISTA, C. R.; LARANJEIRA, F. F.; BERETTA, M. J. G. Avaliação de transmissão e seleção de variedades à clorose variegada dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 14, p. 167-176, 1993.
- MEDINA FILHO, H. P.; BORDIGNON, R.; BALLVE, R. M. L.; SIQUEIRA, J. S. Genetic proof of the occurrence of mono and dizygotic hybrid twins in citrus rootstocks. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 16, p. 703-711, 1993.
- MOREIRA, C. S.; PIO, R. M. Melhoramento de citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A. S. **Citricultura brasileira.** 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. p. 116-152.
- MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v. 8, p. 4321-4325, 1980.
- ROHLF, F. S. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system.** New York: State University of New York, 1992. 2 disquetes.
- ROOSE, M. L. Isozymes and DNA restriction fragment length polymorphisms in citrus breeding and systematic. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 6., 1988, Tel Aviv. **Proceedings...** Tel Aviv: International Society of Citriculture, 1988. v. 1, p. 155-165.
- SAMBROOK, J.; FRISTSH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. v. 2.
- SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy.** San Francisco: Freeman, 1973. 573 p.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, p. 6531-6535, 1990.