



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
CURSO DE BACHARELADO EM BIOLOGIA

AMANDA GABRIELLY SANTANA SILVA

**Relação de parentesco de híbridos trifoliolados de citros utilizando
parâmetros de homozigossidade via marcadores SSR e mitocondriais**

Cruz das Almas/BA

Novembro de 2019

Relação de parentesco de híbridos trifoliolados de citros utilizando parâmetros de homozigosidade via marcadores SSR e mitocondriais

AMANDA GABRIELLY SANTANA SILVA

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao Colegiado de Graduação de Bacharelado em Biologia do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biologia.

Orientador (a): Leila de Lourdes Longo - UFRB

Co- Orientador (a): Cláudia Fortes Ferreira – EMBRAPA

Cruz das Almas/BA

Novembro de 201

Amanda Gabriely Santana Silva

RELAÇÃO DE PARENTESCO DE HÍBRIDOS TRIFOLIOLADOS DE
CITROS UTILIZANDO PARÂMETROS DE HOMOZIGOSIDADE VIA
MARCADORES SSR E MITOCONDRIAIS

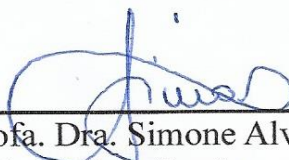
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Leila de Lourdes Longo
(orientadora)
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)



Prof. Dr. Ricardo Franco Cunha Moreira
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)



Profa. Dra. Simone Alves Silva
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)

CRUZ DAS ALMAS
DEZEMBRO-2019

A memória da minha avó Lenice Nogueira de Santana, por ter me apresentado a cada letrelinha, e por ter segurado em minhas mãos.

DEDICO

Agradecimentos

Deus. Neste nome sei que há poder. Nesses 5 anos de graduação, sou grata a muitas pessoas, mas, somente a Deus devo toda a minha gratidão. Ele esteve comigo em todos os momentos. Quando todos falharam, por quais quer motivos, ele estava comigo. Se eu cheguei até aqui, foi pelo amor que o pai tem por mim, e pela força que ele me deu em todos os momentos. Apesar de todas as dificuldades que enfrentei, é maravilhoso estar concluindo um curso onde vi a criação em todas as esferas. Sinto-me realizada como pessoa, como espírito e como alma. Obrigada Senhor!

Agradeço ao meu eu, por ter sido tão forte nos últimos cinco anos. Passei por coisas difíceis, por situações em que tive que ser forte quando me sentia tão frágil. Em vários momentos achei que não conseguiria, especialmente agora, quando cheguei em minha reta final. Hoje mais do que nunca acredito na palavra: “Pois vós não recebestes um espírito que vos escravize para andardes, uma vez mais, atemorizados, mas recebestes o espírito que os adota como filhos, por intermédio do qual podemos clamar: “Abba, Pai!”. Obrigada meu Deus, Eu te amo! E obrigada Amanda, por ter sido tão forte! Estou aprendendo a te amar.

Não consigo olhar para minha trajetória e não enxergar a mentora de tudo isso, minha avó Dona Lenice Nogueira (*in memoriam*). Grande responsável pelo meu crescimento, em todas as esferas da minha vida. Ela foi quem me ensinou a ler, escrever, ser uma pessoa melhor... Eu sou grata por tudo vó, é só o começo. Meu avô Luiz Antônio, sou eternamente grata por todo amor, cuidado e carinho que teve para comigo durante toda a minha vida. Meus avós, eu amo vocês!

Gratidão à minha mãe Ana Claudia, por sempre acreditar no meu potencial, e sempre me impulsionar para voos mais altos, por mais que quisesse me ver por perto. Obrigada por tudo que você abriu mão para que esse sonho pudesse estar sendo realizado. Ao meu pai Anselmo José, (*in memoriam*) que por tantas vezes se fez em forma de amor nas minhas lembranças, só tenho a agradecer pelos poucos e bons momentos vividos. Esses momentos formam a minha história, a minha essência, e foram revividos várias vezes nestes 5 anos, fazendo com que eu lembrasse que o amor não partiu, continua vivo.

A minha outra mãe do coração, a minha tia Renata Suely, por todas as vezes que me ouviu reclamar da faculdade, das provas... Por todas as vezes que se fez amiga, que me

aconselhou, que me ajudou, e que mesmo enfrentando lutas, tentou me alegrar em momentos difíceis, a minha gratidão! Ao meu primo Paulo Roberto por sempre fazer o meu coração bater mais forte, por trazer tanto amor nos olhinhos, por ter secado minhas lágrimas em momentos difíceis, com cada gesto de carinho mesmo tão pequeno. Gratidão a vocês que são anjos!

Aos meus irmãos Luís Anselmo e Déborah Bahia. Sou grata a Deus pela vida de vocês! Sou grata por cada riso, cada brincadeira, cada conversa... Com vocês, sei que nunca estarei sozinha. Amo vocês!

Gratidão aos meus amigos irmãos: Larissa, Ingredy, Sandra, Bianca, Natália, Karol, Taís, Lucas e Jhonata. Todos vocês tornaram essa caminhada mais leve, cada conversa, cada encontro, cada abraço, fez uma Amanda mais forte, vocês são irmãos amados de alma. Como costume dizer: “Os de sempre, pra sempre”.

Gratidão à minha orientadora Dr^a Claudia Fortes Ferreira. Quando muitas portas se fecharam, ela me recebeu, e abriu não só as portas da EMBRAPA, mas fez com que outras se abrissem, e as coisas se tornassem possíveis. Sigo a minha carreira na certeza da profissional que quero ser, como você! Obrigada por tudo!

A UFRB e aos professores do curso de Bacharelado em Biologia agradeço por tornar esse sonho possível e por todos os ensinamentos, até aqueles que me fizeram uma pessoa mais forte. Mas, em especial agradeço a professora Dr^a Leila de Lourdes Longo, que além de mentora, foi amiga, conselheira, e até mesmo uma mãe nos momentos difíceis. Levarei comigo todo o amor, atenção e dedicação que teve comigo. Obrigada por tudo!

A EMBRAPA, e a toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular. Em especial a Andresa por ter sido companheira e ter me ajudado em tudo que tive dificuldade, ser amiga em muitos momentos, obrigada por toda a dedicação! Jamais esquecerei! A Jocilene por ter me ajudado e me guiado no início de tudo, quando não sabia pra onde ir. Nunca esquecerei Joci, gratidão!

Ao CNPq e FAPESB pela concessão da bolsa, diante de um momento tão difícil e caótico no ramo da pesquisa em nosso país.

Agradeço a todos os amigos que fiz durante o período da graduação, aqueles que não citei nomes, mas que de alguma maneira sabem que contribuíram com o meu

crescimento, que me ajudaram nas horas difíceis, e sempre estavam ali, prontos pra momentos de riso, de alegrias, ou até mesmo de choros. Cada um contribuiu para que esse período de graduação fosse inesquecível e repleto de boas lembranças. Em especial, agradeço a Luiz Carlos, não só por me ajudar a terminar as minhas PCRs atrasadas, mas por ter sido amigo nas horas de alegria, e de dificuldade. Muito obrigada por todo carinho que você teve para comigo neste período. Jamais esquecerei!

Por fim, agradeço a todos aqueles que por ventura tenha esquecido de mencionar e que contribuíram grandemente para o meu crescimento como pessoa e para o meu crescimento profissional. Daqui pra frente espero alcançar e conhecer coisas novas, exercer as minhas atividades profissionais com honestidade, em defesa da vida estimulando o desenvolvimento Científico, Tecnológico e Humanístico com justiça e paz. Gratidão!

Epígrafe

“Só há duas maneiras de viver a vida: a primeira é vivê-la como se os milagres não existissem. A segunda é vivê-la como se tudo fosse milagre.”

Albert Einstein

Resumo

A citricultura exerce grande importância econômica no Brasil e no Mundo, contribuindo para o fortalecimento da economia. Os porta-enxertos (PEs) de citros são, em grande parte, responsáveis por esse sucesso, uma vez que a combinação Copa x porta-enxerto é que forma a base dos pomares e são responsáveis pela alta produtividade. A Embrapa Mandioca e Fruticultura, nos últimos 30 anos, tem observado um campo de cruzamentos onde os PEs foram selecionados por apresentarem características desejáveis, como grande número de sementes e resistência/tolerância aos principais fatores bióticos e abióticos, cujo o parentesco é indeterminado. Portanto, os principais objetivos do presente trabalho são: Determinar o parentesco de PEs selecionados e determinar o nível de homoziguidade entre as variedades de PE: Sunki Comum, Sunki Tropical e Sunki Maravilha. Este estudo contribuirá para avaliar o grau de parentesco entre sete PEs, e seus prováveis parentais para servir de informação de registro junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Foram utilizados ao todo 26 genótipos de citros, que foram divididos em três grupos. O polimorfismo entre os porta-enxertos e seus possíveis parentais foi analisado utilizando marcadores SSRs (*Simple Sequence Repeats*) e mitocondriais, através da técnica PCR, onde posteriormente as reações foram submetidas a eletroforese utilizando gel de agarose á 3%. Foi realizada a genotipagem seguindo o padrão de ausência e presença de bandas, e posteriormente as análises moleculares executadas por meio de programas estatísticos como GENES, Power Marker e R. Apesar dos genótipos apresentarem muita semelhança em relação ao material genético, foi possível determinar os supostos parentais para os PEs. Portanto, para se ter plena certeza da origem dos parentais, faz-se necessário a síntese de novos primers, para que um número maior de regiões do genoma fossem amplificadas.

Palavras chave: Citricultura; Biologia Molecular; Polimorfismos

Abstract

Citriculture has great economic importance in Brazil and in the world, contributing to the strengthening of the economy. Citrus rootstocks (PEs) are largely responsible for this success, as the Copa x rootstock combination forms the basis of orchards and is responsible for high productivity. Embrapa Cassava and Fruitculture, over the last 30 years, has observed a field of crosses where PEs were selected for presenting desirable characteristics such as large number of seeds and resistance / tolerance to major biotic and abiotic factors, whose relationship is undetermined. Therefore, the main objectives of the present work are: To determine the kinship of selected PEs and to determine the level of homozygosity between the PE varieties: Sunki Common, Sunki Tropical and Sunki Wonder. This study will help to assess the degree of kinship among seven EPs and their likely parents to serve as registration information with the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. A total of 26 citrus genotypes were used and divided into three groups. The polymorphism between rootstocks and their possible parents was analyzed using SSRs (Simple Sequence Repeats) and mitochondrial markers using PCR technique, where the reactions were electrophoresed using 3% agarose gel. Genotyping was performed following the pattern of absence and presence of bands, and later molecular analyzes performed using statistical programs such as GENES, Power Marker and R. Although genotypes are very similar to the genetic material, it was possible to determine the assumptions. parenting for PEs. Therefore, to be sure of the origin of the parents, it is necessary to synthesize new primers, so that a larger number of regions of the genome were amplified.

Keywords: Citriculture; Molecular biology; Polymorphisms

Lista de Figuras

- Figura 1.** A) Exemplo de copa x PE via enxertia do tipo garfagem em fenda; B) representação do nó formado pelo encontro da copa x PE..... 19
- Figura 2.** A) Genótipos de citros pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura onde foram coletados os 26 genótipos (Acessos em Campo). B) Acessos mantidos em casa de vegetação..... 25
- Figura 3.** Folhas jovens de citros situadas na parte apical do ramo.....25
- Figura 4.** A, B e C: A) Folha jovem coletada no campo; B) Uso de furadeira para a etapa de maceração e C) produto final da maceração para uso na metodologia CTAB de extração de DNA.26
- Figura 5.** Dendrograma gerado pelo método UPGMA para o grupo I. Em destaque, os porta enxertos, e em números, as variedades indicadas como mais próximas. H51, H53, H69, e H116 – PEs. LCC- Limoeiro ‘Cravo Comum’, TCLEOP- Tangerineira ‘Cleópatra’, PTBEN- Poncirus Trifoliata ‘Beneck’, PTFBAR- Poncirus Trifoliata ‘Barney’, CITSAC- Citrumelo ‘Sacaton’, CITR- Citrange ‘Rusky’, YUA- Yuma, LAPERA- Laranjeira ‘Pera’.....30
- Figura 6.** Dendrograma gerado pelo método UPGMA para o grupo II. Em destaque, os porta enxertos, e em números, as variedades indicadas como mais próximas H206, H207 e H208 – PEs. TSKC – Tangerineira ‘Sunki Comum’, CCOLE- Citrange ‘Colemon’, PTFDRAG- Poncirus Trifoliata ‘Flying Dragon’, PTBEN – Poncirus Trifoliata ‘Beneck’, CITHOM- Citrangequat ‘Thomasville’, CRUSK- Citrange ‘Rusk’, CTROYER- Citrange ‘Troyer’, CARG- Citrange ‘Argentina’.....31
- Figura 7.** . Eletroforese dos primers mitocondriais CSS03F e CSS03R em G1: 1- H51, 2- H53, 3- H69, 4- H116, 5- Limoeiro ‘Cravo’ Comum, 6- Tangerina ‘Cleópatra’, 7- Laranjeira ‘Pera’, 8- *Poncirus Tifoliata* ‘Benecke’, 9- *Poncirus trifoliata* ‘Barney’, 10- Citrumelo ‘Sacaton’, 11- Citrange ‘Rusk’, 12- Citrange ‘Yuma’. G2: 1- H2016, 2-H207, 3-H208, 4-

Tangerineira 'sunki' comum, 5- Citrange 'Argentina', 6- Citrange 'Coleman', 7- Citrangequat 'Thomasville', 8- Citrange 'Rusky', 9- *Poncirus trifoliata* 'Flying Dragon', 10- *Poncirus trifoliata* 'Benecke', 11- Citrange 'Troyer'. M- Marcador de 1kb.....33

Figura 8. Eletroforese de primers mitocondriais CSL09F e CSL09R em G1: 1- H51, 2- H53, 3- H69, 4- H116, 5- Limoeiro 'Cravo' Comum, 6- Tangerina 'Cleópatra', 7- Laranja 'Pera', 8- *Poncirus Tifoliata* 'Benecke', 9- *Poncirus trifoliata* 'Barney', 10- Citrumelo 'Sacaton', 11- Citrange 'Rusk', 12- Citrange 'Yuma'. G2: 1- H2016, 2-H207, 3-H208, 4- Tangerineira 'sunki' comum, 5- Citrange 'Argentina', 6- Citrange 'Coleman', 7- Citrangequat 'Thomasville', 8- Citrange 'Rusky', 9- *Poncirus trifoliata* 'Flying Dragon', 10- *Poncirus trifoliata* 'Benecke', 11- Citrange 'Troyer'. M- Marcador de 1kb.....33

Lista de Tabelas

Tabela 1. Grupos para estudo de diversidade e parentesco (G1 e G2) e estudo para verificar se Sunki Tropical ou Sunki Maravilha são híbridos ou seleções da Sunki comum para fins de auxílio de registro junto ao MAPA.....	23
Tabela 2. Relação dos primers SSR utilizados no estudo de diversidade e relação de parentesco (Grupo I e II).....	25
Tabela 3. Primers SSR utilizados para amplificação do Grupo III.....	26
Tabela 4. Primers, sequências e temperatura de anelamento de mtDNAs utilizados.....	27

Lista de Abreviaturas e Símbolos

BAG – Banco Ativo de Germoplasma

CARG- Citrange 'Argentina'

CCOLE- Citrange 'Colemon'

CITHOM- Citrangequat 'Thomasville'

CITR - Citrange 'Rusk'

CITROYER- Citrange 'Troyer'

CITSAC- Citrumelo 'Sacaton'

CNPMF- Centro Nacional de Pesquisa em Mandioca e Fruticultura

CRUSK- Citrange 'Rusk'

CTAB - Brometo de Cetrimônio

DATP - Trifosfato de desoxiadenosina

DCTP-Desoxicitidina trifosfato

DGTP- Desoxiguanosina trifosfato

DNA – ácido desoxirribonucléico

DNTP- Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DTTP-Trifosfato de timidina

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FUNDECITRUS - Fundo de Defesa da Citricultura

HTR – Híbridos Trifoliata

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

KCl- Cloreto de potássio

LAPERA – Laranjeira 'Pera'

LCC - Limoeiro `Cravo Comum`

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

mtDNA- DNA Mitocondrial

PCR – *Polymerase Chain Reaction*/ Reação em Cadeia de Polimerase

PE – Porta-enxerto

PMG – Programa de Melhoramento Genético

PTBEN- *Poncirus Trifoliata* 'Beneck'

PTFBAR- *Poncirus trifoliata* 'Barney'

PTFDrag- *Poncirus Trifoliata* 'Flying Dragon'

SSR- *Simple Sequence Repeats*/ Sequências Simples Repetidas

STR – *Short Tandem Repeat* / Repetição Curta em Tandem

TAQ – Enzima DNA polimerase (*Thermophilus aquaticus*)

TCLEOP- Tangerineira 'Cleópatra'

TRIS/HCL – Cloridrato de Hidroximetil

TSKC- Tangerineira 'Sunki Comum'

UFRB – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

UPGMA - *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*/Método de Agrupamento Utilizando Médias Aritméticas

Sumário

Introdução	15
Revisão de Literatura.....	16
Citricultura	16
Porta-enxertos	19
Uso da genética, técnicas moleculares e biotecnologia como ferramenta auxiliares	21
Marcadores SSR	22
Material e Métodos.....	23
Coleta do material genético	23
Extração do material genético e amplificação com primers SSR	25
Análise molecular	29
Resultados e Discussão.....	29
Conclusão	34
Referências	35
Anexo	41

Introdução

A citricultura brasileira, dentro da economia nacional e mundial, exerce um papel de destaque, tanto pela maior produção mundial, como pela exportação de suco (NEVES, 2018).

Devido ao fenômeno de poliembrionia na cultura de citros, quando ocorre a germinação de sementes, geralmente os embriões nucleares nascem com mais vigor, dominando os embriões resultantes da fecundação, cujas mudas se desenvolvem pouco ou raramente. Por isso, tem-se um elevado índice de mudas com características idênticas às da planta matriz, justificando, assim, a obtenção de porta-enxertos de citros por meio de sementes (MOREIRA, 2010). Dessa forma, na história da citricultura, há evidências do quanto é fundamental o uso diversificado de porta-enxertos, e o quão importante é a necessidade de se utilizar variedades melhoradas (POMPEU JUNIOR et al., 1986).

Os porta-enxertos possuem uma influência marcante e direta sobre características anatômicas, morfológicas e produtivas, como, por exemplo, variedade de copa, maior ou menor produção, porte de árvore, qualidade dos frutos e resposta a estresses bióticos e abióticos, tais como: resistência a doenças e tolerância ao clima (POMPEU JUNIOR, 2005). Dentre os fatores abióticos que os porta-enxertos podem influenciar, pode-se destacar o déficit hídrico. Sendo assim, existe grande importância no desenvolvimento de novos estudos e tecnologias que maximizem a eficiência de porta-enxertos, pois os mesmos podem responder melhor em regiões de estresse hídrico constante, tornando eficaz o uso da água nestas regiões de déficit hídrico reconhecido (SOARES FILHO, 2017).

A utilização de apenas um porta-enxerto (PE) para todas as variedades de copa, não atende às peculiaridades de variedade, pois cada um tem a sua especificidade e a combinação copa x porta-enxerto também exerce influência no sucesso da cultura. Quando há a utilização de diversas variedades para uma única espécie de porta-enxerto, a planta, mesmo recebendo os tratamentos culturais adequados, não manifesta todo o seu potencial produtivo da mesma maneira (POMPEU JUNIOR et al., 1986). Daí a importância dos estudos de interação copa x PE, pois a depender da combinação, irá afetar o crescimento da cultura, precocidade de produção, produtividade, época de maturação, peso dos frutos, coloração da casca e frutos, teor de açúcares e ácidos, além de resistência aos principais fatores bióticos e abióticos (POMPEU JÚNIOR, 1991).

Visto que os porta-enxertos possuem uma grande importância na morfologia, fisiologia e produtividade da cultura, é de grande interesse biológico e econômico a obtenção e a identificação de variabilidade genética nos mesmos, para que se possa realizar uma seleção efetiva que resulte em ganhos genéticos significativos (BERNARDO, 2002).

O uso de marcadores moleculares é de extrema importância, pois, eles são responsáveis pela detecção do polimorfismo de DNA gerado por mutações no genoma. Para o estudo de identidade genética são considerados uma das ferramentas disponíveis mais importantes no que diz respeito à avaliação de parentesco, homozigosidade, ou heterozigosidade de genótipos de interesse (LANZA, 2000).

Marcadores moleculares do tipo SSR (*Simple Sequence Repeats*), também denominados como microssatélites, ou marcadores codominantes (capazes de diferenciar indivíduos homozigotos de heterozigotos), são altamente polimórficos e podem ser utilizados em estudos de parentesco, auxiliando quando há dúvida em cruzamentos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Vários autores têm realizado estudos com porta-enxertos, inclusive em outras culturas, utilizando marcadores SSR (PAULA, 2015; BARBOSA, ACO et al., 2015; SILVA, 2016; LEZCANO, 2018).

Marcadores mitocondriais também são amplamente utilizados para investigar as relações evolutivas entre os grupos de genótipos de plantas (GORIA, 2018).

Esses marcadores são os mais indicados para estudos de parentesco em plantas e, portanto, foram utilizados no presente trabalho para auxiliar na identificação de possíveis parentais relacionados aos porta-enxertos HTRs (híbridos trifoliatas) de citros.

Revisão de Literatura

Citricultura

De origem asiática, a cultura de citros de modo geral, chegou ao Brasil por meio das primeiras expedições colonizadoras, e começou o seu cultivo provavelmente no Estado da Bahia, e assim a cultura se expandiu e se tornou presente em todas as regiões do país (NEVES, 1996).

Em citros, a família Rutaceae é a mais importante do ponto de vista econômico, destacando as espécies do grupo das laranjas doces (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck); das

tangerinas (*Citrus reticulada* blanco e *Citrus clementina* hort. ex Tanaka); das mexericas (*Citrus deliciosa* Ten.); dos limões verdadeiros (*Citrus limon* (L.) Brum. F. e *Citrus aurantiifolia* (Christm.), Swingle); das limas ácidas (*Citrus latifolia* (Yu.Tanaka) Tanaka); das limas doces (*Citrus limettioides* Tanaka); pomelos (*Citrus paradisi* Macfad.) e das cidras (*Citrus medica* L.) (BASTOS et al., 2014). O grupo das laranjas doces é o mais expressivo nos pomares dos países citrícolas, com aproximadamente dois terços dos plantios, seguido das tangerinas, dos limões e das limas ácidas (IBGE, 2017).

A produção de citros exerce um papel importante para a sociedade brasileira com contribuição social e econômica, gerando uma movimentação de aproximadamente R\$ 11 bilhões em 2018 (IBGE, 2018). O Brasil exportou um valor de US\$ 2,5 bilhões em 2015 e agroindústria dos citros, gera mais de 230 mil postos de trabalho anuais (COMEX STAT, 2018). Diante disto, há a necessidade de cooperação entre empresas de iniciativa privada e poder público para que a citricultura venha a ser cada vez mais alavancada no país.

Um exemplo dessa cooperação é o Fundo de Defesa da Citricultura, (FUNDECITRUS) que é uma entidade de monitoramento de pragas e doenças com pesquisas renomadas no âmbito nacional e internacional. A FUNDECITRUS foi fundada por citricultores e indústrias no ano de 1977, e conseguiu conciliar uma relação entre a iniciativa privada e o poder público tornando-se assim, uma das instituições de pesquisa mais importantes e respeitadas do mundo. A instituição trabalha para o desenvolvimento de pesquisas com orçamento privado, porém também há desempenho com eventuais verbas disponibilizadas pelo governo federal e parcerias com universidades e institutos de pesquisa no Brasil e no exterior (FUNDECITRUS, 2018).

Entre os principais órgãos de pesquisa que viabilizam o fortalecimento da citricultura no Brasil, destaca-se a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que também é um círculo de cooperação que busca um modelo de agricultura genuinamente brasileiro, que visa superar barreiras na produção de alimentos, por meio de técnicas de campo e laboratoriais avançadas, viabilizando o ganho de lucros financeiros no seguimento nacional (ANDRADE, 2019).

O ganho financeiro com a citricultura é significativo para o país. Somente no ano de 2018, o valor total da produção brasileira de citros atingiu a expressiva marca de R\$ 11,9 bilhões, o que faz da citricultura um dos principais segmentos econômicos da fruticultura

nacional e o sexto maior representante do agronegócio, abaixo da soja, cana-de-açúcar, milho, café e algodão (IBGE, 2018).

O cultivo da laranja é o principal no ramo da citricultura, e está expressivamente presente em todos os estados brasileiros, com uma produção nacional de 19,2 toneladas de laranjas doces, limeiras ácidas e tangerineiras (IBGE, 2018). Com relação à produtividade, São Paulo possui 76,5% dessa produção, Bahia 5,4%, Minas Gerais 4,9%, Paraná 3,8% e outros estados como Alagoas, Rio Grande do Sul, Pará, Amapá e Goiás também contribuem com expressividade no plantio (IBGE, 2017) (Anexo I).

Apontado pelo IBGE, como segundo maior produtor de frutas em geral, o Estado da Bahia vem se tornando um dos maiores produtores de citros do país, ficando abaixo apenas do estado de São Paulo. Os polos de maior produção concentram-se no baixo sul e no norte do estado, tendo destaque na produção de laranjas (IBGE, 2017).

A região do Recôncavo da Bahia também vem expandindo a citricultura de modo geral, em especial das laranjeiras devido ao declínio econômico da cana-de-açúcar e do fumo, culturas que eram mais comuns na região (DE ALMEIDA, 2019). Desde 2003, o cultivo da laranja no Recôncavo apresenta crescimento e se mantém em primeiro lugar entre outras culturas perenes nos seguintes quesitos: quantidade produzida (toneladas), rendimento médio da produção e valor da produção (IBGE, 2018).

A concentração da produção de citros, chamada de cinturão citrícola paulista, tornou-se um grande polo de terras voltadas somente para a produção da laranja, onde inúmeros investimentos em mecanização e insumos são feitos, porém, o estado de São Paulo, considerado o maior produtor de citros do país, (em especial de laranjas) passa por um momento de crise na produção, especialmente na produção de laranjas devido ao surgimento de pragas e por questão de déficit hídrico na região em tempos de estiagem. No período de 1990 a 2017, a área colhida no estado reduziu 45% e no mesmo período, no Brasil houve queda de 29% (MAPA, 2017).

Em virtude dos cenários de mudanças climáticas globais, há uma tendência de que os períodos de déficit hídrico se tornem mais frequentes e severos, o que influenciará na produção mundial não só de citros, mas de todas as culturas em geral (ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA, 2017). Diante deste cenário, faz-se necessário o

desenvolvimento de variedades mais tolerantes ao déficit hídrico, ou combinações entre copa e porta-enxertos que promovam alto rendimento independente dos fatores bióticos e abióticos.

Porta-enxertos

Há mais de um século, a citricultura vem se beneficiando das vantagens da enxertia, em que uma planta cítrica é formada pela combinação de copa x porta-enxerto, agregando os benefícios de ambas as partes em sua interação (BASTOS, 2014). O cavalo ou o porta-enxerto, que é responsável pelo sistema radicular e, portanto, pela absorção de água e nutrientes do solo, é unido a um enxerto ou cavaleiro, que formará a copa, sendo responsável pela fotossíntese, floração e frutificação da planta (RIBEIRO et al., 2005). Depois de um determinado período, a planta formará uma cicatriz na região do enxerto, havendo assim a interação copa x porta-enxerto (Figura 1: A e B).

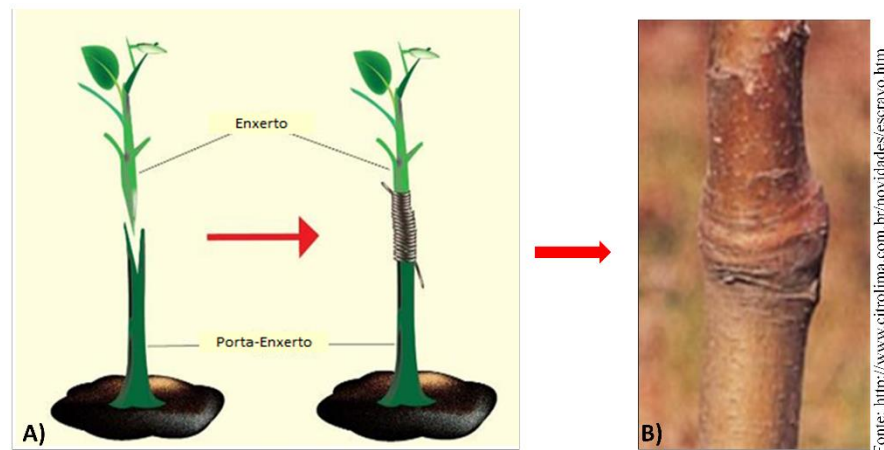


Figura 1. A) Exemplo de copa x PE via enxertia do tipo garfagem em fenda; B) representação do nó formado pelo encontro da copa x PE.

Os porta-enxertos podem influenciar em diversas características principalmente fatores agrônômicos, morfológicos, e fisiológicos, como de produção, qualidade de frutos e tolerância a diversos fatores bióticos e abióticos.

A escolha de um porta-enxerto é tão importante quanto à da copa, pois a planta só irá obter o seu melhor desempenho se a escolha de ambas as partes forem corretas atendendo as necessidades uma da outra, adequando-se ao ambiente que estão sendo inseridos (BASTOS, 2014). Porém, na citricultura brasileira, não existe muita variabilidade de porta-enxertos, o que caracteriza um risco eminente ao setor, devido à suscetibilidade para certas pragas e doenças como ocorreu em décadas passadas em diversos pomares (DA CRUZ, 2019).

Como o porta-enxerto exerce um papel fundamental também em relação ao uso da água, é de extrema importância que sob deficiência hídrica a interação entre o porta-enxerto e a copa venha a tornar-se mais significativa, influenciando assim no grau de tolerância à seca da copa (SOUZA et al., 2001). Por isso, é de fundamental importância que haja variabilidade nos porta-enxertos utilizados, para que se possa conciliar características desejáveis, a fim de que haja uma influência positiva sobre a copa, e o estresse hídrico não venha a afetar a produção dos frutos.

A citricultura brasileira tem se limitado ao uso do limoeiro ‘Cravo’ e outras poucas variedades de porta-enxerto devido às características de boa produtividade, precocidade de produção, compatibilidade com a maioria das copas comerciais e boa adaptação nas regiões com ocorrência de seca (POMPEU JUNIOR, 2005; FUNDECITRUS, 2013). A não diversificação do uso de porta-enxertos, ou a escolha de uma copa incompatível e/ou vice-versa, não só podem causar problemas fitossanitários, como também a má qualidade dos frutos, fazendo com que haja interferência no fruto quanto ao tamanho, sabor, quantidade de polpa, gerando um problema econômico, pois o Brasil é considerado maior exportador de suco para indústria internacional (DI GIORGI et al., 1993; CARLOS et al., 1997).

Para fins de produção em larga escala, a poliembrionia ou apomixia, é uma característica muito importante para os porta-enxertos, pois esta característica em sementes geram embriões com o mesmo genoma da planta mãe, obtendo-se uma planta idêntica à matriz, além de conferir uma uniformidade, tanto no viveiro, quanto no pomar (CARLOS et al., 1997). Portanto, essa característica faz com que consequentemente haja uma perda da variabilidade genética na cultura, fazendo-se necessário a introdução de novas cultivares e o desenvolvimento de programas de melhoramento genético para que se possa ampliar a base genética, fortalecendo cada vez mais a citricultura no país (BASTOS, 2014).

A principal vantagem da apomixia no melhoramento vegetal refere-se ao fato dos embriões apomíticos serem, via de regra, originados por divisões mitóticas de uma célula somática do óvulo, tornando-os geneticamente idênticos à planta-mãe. Esta situação traz um óbvio benefício à agricultura, pois se a apomixia puder ser introduzida em grupos de plantas economicamente importantes, ela poderá ser um meio de perpetuar um dado genótipo, preservando características de interesse, como a heterose, ao longo das gerações via semente (HANNA e BASHAW, 1987).

Uso da genética, técnicas moleculares e biotecnologia como ferramenta auxiliares

Para a melhoria no desenvolvimento da cultura e a obtenção de frutos que atendam a exigência do mercado internacional, faz-se necessário um conjunto de tecnologias que vão desde a implantação do pomar, ao uso das ferramentas que auxiliem o melhoramento genético (ANDRADE, 2019).

Pesquisas e programas envolvendo melhoramento genético e o uso da biotecnologia estão sendo cada vez mais utilizados no Brasil (CRESTANA, 2017). A incorporação da biotecnologia aos programas de melhoramento genético de plantas é hoje uma realidade que permite acelerar o processo de obtenção de variedades com características superiores de uma maneira mais apurada e eficiente (BRASILEIRO, 1998).

O desenvolvimento de um programa de melhoramento envolve múltiplas áreas de conhecimento, em particular a biologia celular e molecular, além de fazer uso de processos que vão desde a prospecção ao isolamento de genes de interesse até a inserção de transgênicos mais promissores no campo (BRASILEIRO, 1998).

O melhoramento genético de citros, também envolve os PEs. As variedades mais utilizadas são as que possuem maior tolerância à seca. Esta qualidade é de extrema importância para o Programa de Melhoramento de Citros (PMG) da EMBRAPA, e de outras instituições, devido à escassez de água ter se tornado um problema em muitas localidades produtoras (CRESTANA, 2017). Porém, o melhoramento de citros como um todo, leva em consideração o estudo não só dos PEs, mas das copas, e suas interações (MACHADO, 2005).

Uma das fases do melhoramento genético é reconhecer a procedência das mudas oriundas de cruzamento, para que se possa haver um conhecimento do material que está sendo utilizado pelo citricultor em campo. Portanto, estudos que visam conhecer a identidade genética de genótipos em geral, são de extrema importância para auxiliar os melhoristas a conhecerem a origem dessas plantas, (BORÉM & CAIXETA, 2009) visto que à mistura de material genético entre copas e porta-enxertos, e até mesmo o cruzamento de diversas variedades sem controle, a fim de se obter mudas de boa qualidade, fazem com que as plantas muitas vezes deixam a desejar no que diz respeito à sua procedência, gerando assim uma vulnerabilidade do pomar a patógenos, e contaminações (SCHAFER, 2001).

Diante da dificuldade em distinguir, identificar e ter um controle das relações de parentesco dos genótipos torna-se essencial, conhecer a origem e identidade dos materiais genéticos, não somente para verificar a correta procedência, e identificação, mas também para a sua utilização em futuras etapas do melhoramento, bem como para a adequada multiplicação e distribuição dos materiais repassados aos produtores (BORÉM & CAIXETA, 2009).

Os programas de melhoramento tornaram-se mais efetivos com as inúmeras ferramentas de biologia molecular e bioinformática que avançam a cada ano. Foi através da criação de marcadores moleculares que as análises genéticas em plantas foram facilitadas e potencializadas, quanto a seleção de plantas superiores tornando-se assim uma das ferramentas que se tornam cada vez mais úteis e indispensáveis (CERVERA et al., 1996).

Marcadores SSR

Os marcadores moleculares têm sido utilizados em larga escala com o objetivo de avaliar relações genéticas entre cultivares, espécies e híbridos intra e interespecíficos, além de serem usados na construção de mapas genéticos (FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1998).

A caracterização genética por meio de técnicas combinadas de análise molecular resulta em maior eficácia para a elucidação da verdadeira identidade do material vegetal (BIANCHI, 2016). Os produtos gerados pelos marcadores moleculares estão sendo utilizados como estudos complementares de caracterização, pois muitas vezes são ilimitados, à cerca de informação genética, e não são influenciados pelo ambiente (BIANCHI et al., 2004).

Através da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ou Reação em Cadeia da Polimerase, é possível obter bilhões de cópias de um fragmento de DNA por meio de reações de amplificação na presença da enzima DNA polimerase. Esta técnica consiste na síntese enzimática *in vitro* de um segmento de DNA de interesse (após a escolha do marcador), que é usado como “molde”, e de primers (iniciadores), que são sequências específicas de nucleotídeos de fita simples (BARBOSA, 2015).

Existem diversos tipos de marcadores moleculares que podem ser utilizados para diferentes pesquisas a fim de verificar e selecionar características genéticas de interesse agrônomico, com diferentes finalidades no melhoramento genético, como genótipos com alelos que conferem resistência a patógenos e pragas, tolerância a fatores abióticos como seca, uniformidade de maturação, época de maturação, dentre outros (BARBOSA, 2015).

Os marcadores SSR (*Simple Sequence Repeat*), STR (*Short Tandem Repeat*), ou microssatélites, possuem altas taxas de polimorfismo, são codominantes, multialélicos, além de possuírem especificidade local e alta reprodutibilidade (FERRAO et al., 2015). Essas inúmeras características, tornam este marcador uma ferramenta eficaz não somente em estudos de diversidade, mas também na identificação de parentesco entre indivíduos muito semelhantes.

A avaliação dos marcadores mitocondriais é de grande importância em estudos genéticos de plantas, principalmente em Bancos germoplasma, onde a base genética é estreita. Dentre as principais características de um DNA mitocondrial, podemos citar: um genoma pequeno e circular, a herança materna e ausência de recombinação, a presença de poucos genes codificadores de proteínas, onde estes genes possuem uma taxa de substituição elevada, quando comparada ao genoma nuclear (SILVA, 2016). Por apresentar estas características genéticas e estruturais extremamente peculiares e únicas, o genoma mitocondrial tem chamado a atenção dos pesquisadores para aplicação em diversos estudos evolutivos (AVISE, 1994)

A utilização de marcadores mitocondriais também pode trazer algumas vantagens quando comparada às limitações de outros tipos de marcadores. O acúmulo de mutações nucleotídicas no DNA mitocondrial, é maior do que no DNA nuclear, logo, em comparação, pode haver um maior número de diferenças observáveis nas populações quando esses marcadores são utilizados (AVISE, 2009). Além disso, o DNA mitocondrial é herdado de forma uniparental, servindo como um marcador do parental feminino, uma vantagem adicional a depender do interesse do estudo.

Material e Métodos

Coleta do material genético

Para o estudo de relação de parentesco foram coletados 7 porta-enxertos híbridos (oriundos de cruzamentos controlados): 051, 053, 069, 116, 206, 207 e 208 e 19 variedades como possíveis parentais, a citar: Limoeiro 'Cravo Comum', tangerineira 'Cleópatra', laranjeira 'Pera', poncirus trifoliata 'Beneck', poncirus trifoliata 'Barney', citrumelo 'Swingle', citrumelo 'Sacaton', citrange 'Rusk', 'Yuma', tangerineira 'Sunki Comum', citrange 'Argentina', citrange 'Colemon', citrangequat 'Thomasville', poncirus trifoliata 'Flying Dragon', poncirus trifoliata 'Beneck', citrange 'Troyer', Sunki Comum, Sunki Tropical e Sunki Maravilha. Todos os

genótipos do estudo, foram provenientes do BAG-Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura (Figura 2 – A e B) situada no município de Cruz das Almas, Recôncavo Baiano, nas coordenadas geográficas 12° 40' 39" de latitude sul e 39° 06' 23" de longitude oeste. Esses genótipos foram divididos em três grupos de estudo: G1 e G2: estudo de parentesco e G3: estudo de homoziguidade para verificar se Sunki Tropical ou Sunki Maravilha são híbridos ou seleções da Sunki comum para auxiliar o registro das mesmas junto ao MAPA (Tabela 1).

Tabela 1. Grupos para estudo de diversidade e parentesco (G1 e G2) e estudo para verificar se Sunki Tropical ou Sunki Maravilha são híbridos ou seleções da Sunki comum para fins de auxílio de registro junto ao MAPA.

Indivíduos	Grupos			Ref. na foto de eletroforese
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	
Porta-Enxertos (PEs)	51	206	*	1
	53	207	*	2
	69	208	*	3
	116	*	*	4
Variedades de Híbridos Trifoliata (HTR)	Limoeiro `Cravo Comum´	Tangerineira 'Sunki Comum'	Sunki Comum	5/SC
	Tangerineira 'Cleópatra'	Citrange 'Argentina'	Sunki Tropical	6/ST
	Laranjeira 'Pera'	Citrange 'Colemon'	Sunki Maravilha	7/SM
	Poncirus Trifoliata 'Beneck'	Citrangequat 'Thomasville'	*	8
	Poncirus trifoliata 'Barney'	Citrange 'Rusk'	*	9
	Citrumelo 'Sacaton'	Poncirus Trifoliata 'Flying Dragon'	*	10
	Citrange 'Rusk'	Poncirus Trifoliata 'Beneck'	*	11
	Yuma'	Citrange 'Troyer'	*	12

Embora seja realizado o mesmo tipo de estudo, os PEs foram divididos em Grupo 1 e 2, porque cada PE possuía uma provável variedade feminina como parental dentro do seu grupo (comunicação pessoal – Dr. Walter Soares), pois partilhavam do plantio em uma mesma área dos híbridos.



Figura 2. A) Genótipos de citros pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura onde foram coletados os 26 genótipos (Acessos em Campo). B) Acessos mantidos em casa de vegetação. Fonte: Dr. Orlando Passos.

Foram coletadas 3 folhas jovens (folhas situadas na parte apical do ramo) de cada material vegetal a ser estudado (Figura 3). Logo após a coleta, as amostras foram embaladas em papel alumínio com a sua devida identificação, e foram levadas ao laboratório de biologia molecular para a extração do material genético.



Figura 3. Folhas jovens de citros situadas na parte apical do ramo.

Extração do material genético e amplificação com primers SSR e mitocondriais

O DNA total foi extraído das folhas jovens, utilizando-se o método CTAB (FERREIRA, 2019) (Figura 4). As reações de amplificação para os marcadores SSR foram preparadas para um volume final de 15 μ L, contendo os seguintes reagentes: tampão de enzima 1X [KCl 25 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3)], 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 0,5 μ M de cada *primer*, 20 ng de DNA total e uma unidade de *Taq* DNA polimerase.



Figura 4. A, B e C: A) Folha jovem coletada no campo; B) Uso de furadeira para a etapa de maceração e C) produto final da maceração para uso na metodologia CTAB de extração de DNA. Fonte: Rogério Mercês.

Para análise de relação de parentesco, no grupo I e II, foram utilizados 20 primers (FROELICHER, 2018), com temperaturas de anelamento distintas, devido a ligação tripla existente entre guanina e citosina (Tabela 2).

Tabela 2. Relação dos primers SSR, sequência e temperatura de anelamento utilizados no estudo de diversidade e relação de parentesco.

Primer	Sequência	Temperatura de Anelamento
F: SPCC3F	5' GAT GTA GCC AAG TGG ATC A 3'	47,5°C
R: SPCC3R	5' TAA TTT GAT TCT TCG TCG C 3'	
F:SPCC9F	5' TGG AGA AGG TTC TTT TTC AAG C 3'	54,1°C
R:SPCC9R	5' CGA ACC CTG GGT ACG ATT AA 3'	
F:SPCC11F	5' GGC CAT AGG CTG GAA AGT 3'	53,9°C
R:SPCC11R	5' GTT TAT GCA TGG CGA AAA GG 3'	
F:TAA1F-	5' GAC AAG CAT CAA CAA CAG CAA GAG C 3'	57,1°C
R:TAA1R	5' AAG AAG AAG AGG CCC CAT TAG C 3'	
F:TAA27F	5' GGA TGA AAA ATG CTC AAA ATG 3'	52,6°C
R:TAA27R	5' TAG TAC CCA CAG GCA AGA GA 3'	
F:TAA52F	5' GAT CTT GAC TGA ACT TAA AG 3'	39,6°C
R:TAA52R	5' ATG TAT TGT GTT GAT AAC G 3'	
F:CAC15F	5' TAA ATC TCC ACT CTG CAA AAG C 3'	53,6°C
R:CAC15R	5' GAT AGG AAG CGT CGT AGA CCC 3'	
F:CAC33F	5' GGT GAT GCT GCT ACT GAT GC 3'	53,5°C
R:CAC33R	5' CAA TTG TGA ATT TGT GAT TCC G 3'	
F:CCT01F	5' TCA ACA CCT CGA ACA GAA GG 3'	52,8°C
R:CCT01R	5' CCC ACA TGC TAG CAC AAA GA 3'	
F:CT02F	5' ACG GTG CGT TTT GAG GTA AG 3'	53,4°C
R:CT02R	5' TGA CTG TTG GAT TTG GGA TG 3'	
F:AC01F	5' TTT GAC ATC AAC ATA AAA CAA GAA A 3'	50,7°C
R:AC01R	5' TTT TAA AAT CCC TGA CCA GA 3'	
F:Çi02B07F	5' CAG CTC AAC ATC AAA GG 3'	42,6
R:Çi02B07R	5' TTG GAC AAC AGG ATG G 3'	
F:Çi06A05bR	5' TCT CTG GTT GGT TTT TGT GA 3'	49,8°C
R:Çi06A05bF	5' ATG ATG AAA AGC AAG GGG 3'	
F:Çi08C05F	5' TCC ACA GAT TGC CCA TTA 3'	48°C
R:Çi08C05R	5' CCC TAA AAA CCA AGT GAC A 3'	

F:mCrCIR01E02F	5' TGA ATG GTA CGG GAA ATG C 3'	54,4°C
R:mCrCIR01E02R	5' CAG GGT CGG TGG AGA GGA T 3'	
F:mCrCIR06B05F	5' GAA CGA TGG AAT GAA GTG 3'	43,8°C
R:mCrCIR06B05R	5' ATG TTG ATT ACG AGA CTT T 3'	
F:mCrCIR08B08F	5' TTC CGT AGA TTC CAA AGT G 3'	47,1°C
R:mCrCIR08B08R	5' GTC CAA GGT CAA CAA CAA G 3'	
F:CMS-4F	5' CCT CAA ACC TTC TTC CAA TCC 3'	51,9°C
R:CMS-4R	5' CTG TAA AGT ACA TGC ATG TTG G 3'	
F:CMS-14F	5' GGC TTC TCT TCT ACT AGA ACG G 3'	52,6°C
R:CMS-14R	5' ACG CCA CGT AAG CAA TAA CC 3'	
F:CMS-19F	5' GGC TTT TGC CCA ATG ATG 3'	54°C
R:CMS-19R	5' GTT GAC CTA AAA AGG GGG CAG 3'	

As amplificações foram conduzidas em termociclador da marca Applied Biosystems modelo Veriti® 96-Wells com o seguinte programa de amplificação: uma etapa inicial de 94°C por 3 min., seguido de 35 ciclos de 94°C por 30s, temperatura de anelamento x° (que variou de acordo com o primer-Ta-Tabela 2) por 30s, 72°C por 45s, com extensão final de 72°C por 7 min. e 10° C ∞. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 3%, corados com brometo de etídio e fotodocumentados utilizando o sistema de captura de imagens Kodak Carestream gel logic 212 Pro.

Posteriormente, quando as análises com o grupo III começaram, mais 20 primers comprados anteriormente chegaram ao laboratório, por isso, neste grupo foram utilizados um total de 40 primers (LIU, 2005) (Tabela 3). As reações de PCR, amplificações e eletroforese seguiram o mesmo protocolo que foi utilizado para os grupos I e II.

Tabela 3. Primers SSR , seqüências e temperaturas de anelamento utilizados para a amplificação do grupo III.

Primer	Seqüência	Temperatura de Anelamento (Ta)
R: SSRsLiu1	5' TTTATAATACGGAACGTTGGGAGG3'	50°C
F: SSRsLiu1	5' CCCGTTAAAATTGTAACCCACAG3'	
R: SSRsLiu2	5' CTGCAGAGGAGCTTCCTTACTCAA3"	50°C
F: SSRsLiu2	5' TGTTTGTTACAAGGCAAGGCAAG3	
R: SSRsLiu3	5' CAACAGATTTGTTACTGGAAGGGG3'	50°C
F: SSRsLiu3	5' CGAAGAAGAATTGAAAGAGCCAGA3'	
R: SSRsLiu4	5' CTGTAATCCACTCGGTAATCCGAC3'	50°C
F: SSRsLiu4	5' TTCACCACAAACGAAGACTCAGAC3'	
R: SSRsLiu5	5' ACGGTATCTTCGTCATCAA3'	50°C
F: SSRsLiu5	5' TCAATCAACTTCCTCCTCTT3'	
R: SSRsLiu6	5' ATTAGTTCTTCGTCAGTTGGGTGG3'	50°C
F: SSRsLiu6	5' AATAACCCCTTCAACCTCAAAA3'	
R: SSRsLiu7	5' ATCTTCAATGCTTTTGGAGCAAAC3'	50°C
F: SSRsLiu7	5' AAACCCAAGTCATAAACGTCAGGA 3'	
R: SSRsLiu8	5' CCGATCATGGAAGAGCAG3'	50°C

F: SSRCSLiu8	5' CCAAAATGAAGTCAACAACC 3'	
R: SSRCSLiu9	5' GGAAAGTCTCGGAACCCATT3'	50°C
F: SSRCSLiu9	5' GCACGTCCATCACTGCTTAA3'	
R: SSRCSLiu10	5' CTTAGTCTGACATGGCGTAG3'	50°C
F: SSRCSLiu10	5' CTATCGGAGCAATCCTGGTA3'	
R: SSRCSLiu11	5' AACCTGGTCATCAATGTCCTCA3'	50°C
F: SSRCSLiu11	5' TTCAAGTTCAAAGGGTCTC3'	
R: SSRCSLiu12	5' ATTCGGAGTGTTGCCAGAGAGTAG3'	50°C
F: SSRCSLiu12	5' ACAACATTTTCAGGAATCCCACAAC3'	
R: SSRCSLiu13	5' ACAACATTTTCAGGAATCCCACAAC3'	50°C
F: SSRCSLiu13	5' ATTCGGAGTGTTGCCAGAGAGTAG3'	
R: SSRCSLiu14	5' AGGGGAGACAGAACACTTGA3'	50°C
F: SSRCSLiu14	5' CGGGCGGACATTTACATATT3'	
R: SSRCSLiu15	5' TAAATGGGTTATGGGACAGG3'	50°C
F: SSRCSLiu15	5' CTCCTACGCTCAGATTTTGC3'	
R: SSRCSLiu16	5' AACAGGATCAATCGCCAAGT3'	50°C
F: SSRCSLiu16	5' CTGACCTCAAGTGCAGCAA3'	
R: SSRCSLiu17	5' TGTCCCTTTCATCATCGTTA3'	50°C
F: SSRCSLiu17	5' TTCCATTCCTCCGTCGTCAC3'	
R: SSRCSLiu18	5' CGAGGATGACTCAAGTGATGAAGA3'	50°C
F: SSRCSLiu18	5' TCTTGGTCTTTGGCTTTTCTCAG3'	
R: SSRCSLiu19	5' TTTGTTTGTTACAAGGCAAGGCA3'	50°C
F: SSRCSLiu19	5' TACAAGTTGTGAGGGGGTGAATTT3'	
R: SSRCSLiu20	5' ATGAAGGCTTTTATAGAGCCGAGTT3'	50°C
F: SSRCSLiu20	5' ATAATAGGGGCCCACTTGACTTG3'	

As reações de amplificação para os marcadores mitocondriais foram preparadas para um volume final de 15 µL, contendo os seguintes reagentes: tampão de enzima 1X [KCl 25 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3)], 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 0,5 µM de cada *primer*, 10 ng de DNA total e uma unidade de *Taq* DNA polimerase. Para análise de relação de parentesco feminino no grupo I e II foram utilizados 11 primers (CHENG, 2005) (Tabela 4), cada combinação a temperatura de anelamento de 50°C.

Tabela 4. Primers, seqüências e temperatura de anelamento de mtDNAs utilizados neste estudo.

Primer	Seqüência	Temperatura de Anelamento
F: CSS03	5' ctagtatgaggacgctTCATTAACCAACTCCGTACCA3'	50°C
R: CSS03	5' gtttcttGGCGCGTCAATAACAAATCT3'	
F: CSS04	5'ctagtattaggacgccGTGGTAAAGACAAGATACTTGG3'	50°C
R: CSS04	5' gtttcttATGGCATGAAACAACCCGA 3'	
F: CSL01	5' ctagtatcaggacgacCAGTGCTAGTTATCCAGTTACAGA3'	50°C
R: CSL01	5' gtttcttCGGGCAACCCATTCTTATTATT 3'	
F: CSL09	5' ctagtatcaggactacCGCACACTAAGCATAGCAAT 3'	50°C
R: CSL09	5' gtttcttCCTCTACAAACCATTGGAGCTA 3'	
F: ccmp2.2	5' ctagtatcaggacgacATCGTACCGAGGGTTCGAAT3'	50°C
R: ccmp2.2 R	5' GATCCAGGGCGTAATCCCG3'	

F: ccmp6.2F	5' ctagtattaggacgccCGATGCATATGTAGAAAGCC3'	50°C
R: ccmp6.2R	5' CATTACGTGCGACTATCTCT3'	
F: ccmp7.2	5' ctagtattaggaccgACATCATTATTGTATACTCTTTTC3'	50°C
R: ccmp7.2	5' CAACAGATAAAACTGTCAAG 3'	
F: ccmp10.2	5' ctagtattaggacaggTTTTTTTTTAGTGAACGTGTCA3'	50°C
R: ccmp10.2	5' TTCGCCGCCGTACTAAATAG3'	
F: rrn5/rrn18-1	5' ctagtattaggacgctGGGTGAAGTCGTAACAAGGT3'	50°C
R: rrn5/rrn18-1	5' GAGGTCCGAATGGGATCGGG 3'	
F: nad2/4-3	5' ctagtattaggaccgGACCTTCACCTCAAATCA3'	50°C
R: nad2/4-3	5' TTCAGATAACACGCACC3'	
F: nad7/1-2	5' ctagtattaggacaggGGAACATAGCATAGGG3'	50°C
R: nad7/1-2	5' TTTGATATAGGCTCGCT3'	

As amplificações foram conduzidas em termociclador da marca Applied Biosystems modelo Veriti® 96-Wells com o seguinte programa de amplificação: uma etapa inicial de 94°C por 5 min., seguido de 40 ciclos de 94°C por 30s, temperatura de anelamento 50°C por 1min, 72°C por 1min e 30s com extensão final de 72°C por 4 min. e 10° C ∞. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e fotodocumentados utilizando o sistema de captura de imagens Kodak Carestream gel logic 212 Pro.

Análise molecular

No grupo I e II, para o estudo do grau de parentesco, foi construída uma matriz de dissimilaridade no software POWER MARKER (LIU, 2005). Essa matriz foi usada para a construção dos dendrogramas com base no de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean*), no programa STATISTICA (STATISTICA, 2002). O ponto de corte foi feito segundo Mingoti (2005).

Para o grupo III foi avaliada a % de homozigidade por meio de análise de *chi*-Quadrado (χ^2) utilizando o software R (CORE TEAM, 2018).

Resultados e Discussão

Para os grupos I e II foram amplificados 20 primers de microssatélites. No primeiro grupo, 13 primers detectaram polimorfismo entre os porta-enxertos e as variedades. No segundo grupo, 12 primers apresentaram bandas polimórficas. Somente os primers que

apresentaram bandas polimórficas foram contabilizados e utilizados para as análises moleculares.

O dendrograma para os híbridos do grupo I (Figura 5) permitiu a formação de 6 grupos distintos, porém, houve uma maior dificuldade em se estabelecer um parentesco para os porta enxertos H53, H69 e H116, pois ambos se encontraram em um mesmo grupo, e apresentaram-se muito próximos geneticamente segundo os valores das distâncias genéticas. Isso sugere que todos os três PEs tenham o mesmo parental em comum. Apesar do H116 ter obtido um valor mais próximo da LAPERA, esse porta-enxerto foi agrupado com H53, H69 e H116, e considerado mais próximo de CITR e YUMA. Observa-se, também, que esses porta-enxertos se apresentaram mais próximos dessas variedades.

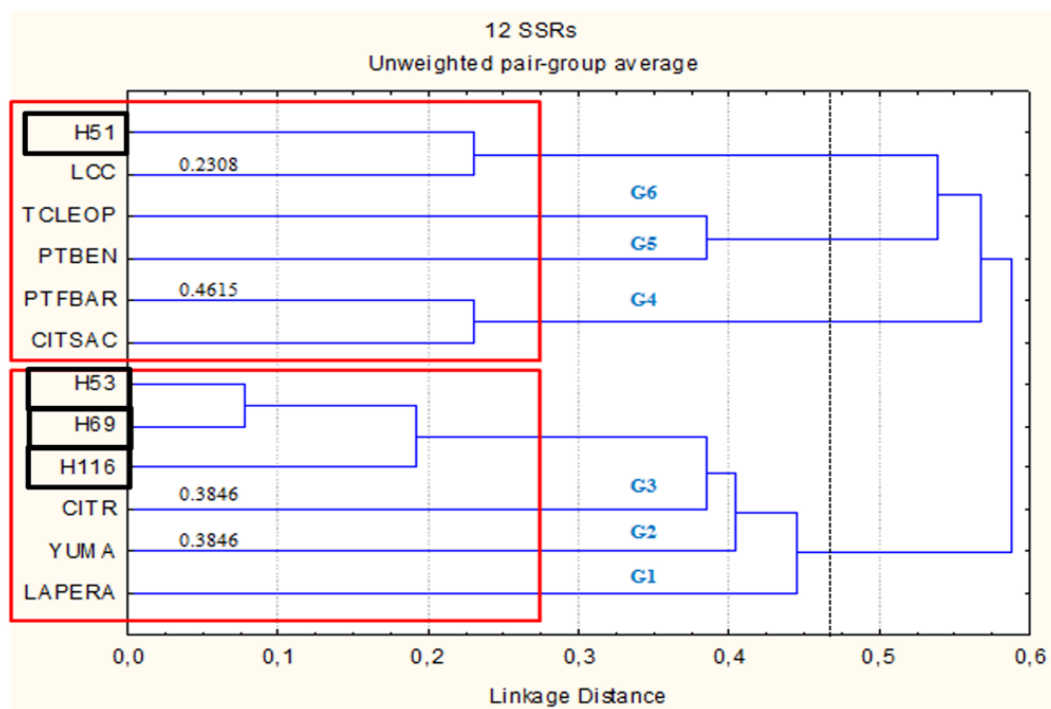


Figura 5. Dendrograma gerado pelo método UPGMA para o grupo I. Em destaque, os porta enxertos, e em números, as variedades indicadas como mais próximas. H51, H53, H69, e H116 – PEs. LCC- Limoeiro ‘Cravo Comum’, TCLEOP- Tangerineira ‘Cleópatra’, PTBEN- Poncirus Trifoliata ‘Beneck’, PTFBAR- Poncirus Trifoliata ‘Barney’, CITSAC- Citrumelo ‘Sacaton’, CITR- Citrange ‘Rusky’, YUA- Yuma, LAPERA- Laranjeira ‘Pera’ No grupo II, 4 grupos foram gerados, (Figura 6) e cada porta-enxerto ficou dentro de um grupo específico, facilitando a identificação dos parentais e sugerindo que cada um tinha um parental diferente.

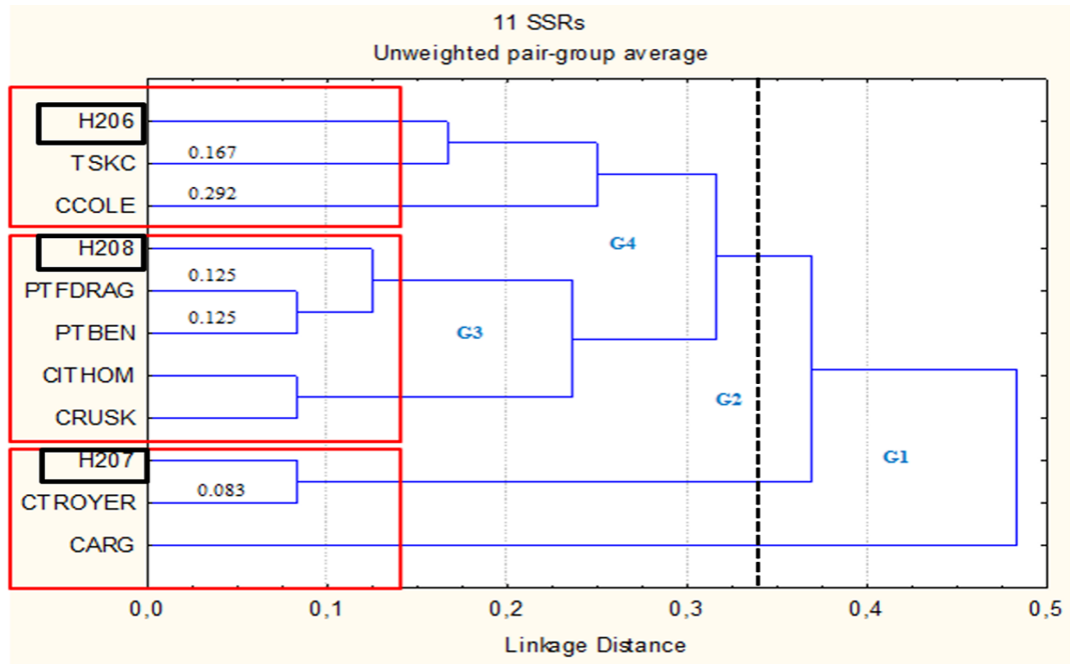


Figura 6 . Dendrograma gerado pelo método UPGMA para o grupo II. Em destaque, os porta enxertos, e em números, as variedades indicadas como mais próximas H206, H207 e H208 – PEs. TSKC – Tangerineira ‘Sunki Comum’, CCOLE- Citrange ‘Colemon’, PTFDRAG- Poncirus Trifoliata ‘Flying Dragon’, PTBEN – Poncirus Trifoliata ‘Beneck’, CITHOM- Citrangequat ‘Thomasville’, CRUSK- Citrange ‘Rusk’, CTROYER- Citrange ‘Troyer’, CARG- Citrange ‘Argentina’

Foi utilizado em conjunto os dados da matriz de dissimilaridade e dendrograma para a identificação dos respectivos parentais. Essa identificação se baseou nas menores distâncias entre os porta-enxertos e relatos dos possíveis genitores. A matriz foi utilizada para que se houvesse uma confiabilidade maior nos dados gerados pelo dendrograma, pois reflete a exata da distância genética entre os indivíduos.

Com base na matriz de dissimilaridade (Anexo – Quadro I), foi possível notar que a distância genética variou de 0,1538 a 0,7692. Por estar geneticamente mais próximos dos porta-enxertos, o Limoeiro Cravo Comum (LCC), foi considerado a planta parental possuidora do megasporângio, que deu origem ao porta-enxerto H51, onde apresentou um valor de 0,2308 de dissimilaridade com H51. A Tangerina “Cleópatra”, (TCLEOP) foi considerada uma das variedades mais distantes geneticamente, seguido por Citromelo “Sacaton” (CITSAC). Poncirus Trifoliata “Beneck” (PTBEN), e Poncirus Trifoliata “Barney” (PTFBAR), foram considerados genitores possuidores de microsporângio, sendo PTFBAR considerada a mais próxima, com valor de 0,4615, ou seja, menor em comparação com outras variedades.

Para os outros porta-enxertos, H53, H69 e H116, foi possível observar que, apesar de se apresentarem muito próximos geneticamente identifica-se um provável parental possuidor do megasporângio, apesar da mesma não oferecer valores muito próximos, com variação de 0,3077 a 0,4615 para os três porta-enxertos, sendo essa progênie a Laranjeira Pêra. Um provável genitor possuidor de microsporângio que também pode ser atribuído à origem desses porta-enxertos são: Citrange “Rusky” (CITR) e Yuma, (YUMA) ambos com valor de 0,3846 para cada porta-enxerto. Contudo, devido ao pequeno número de primers utilizados nas análises sugere-se utilizar mais iniciadores SSR, a fim de se obter uma maior cobertura genômica e consequentemente um resultado mais conciso.

Outros autores também sugerem que em situações onde não é possível distinguir com confiabilidade a relação de parentesco entre determinados acessos com um determinado marcador, indica-se o uso de marcadores adicionais (JAKSE, 2005). Porém, uma proximidade genética também pode sugerir uma estreita base genética do material analisado (DELLAGOSTIN, 2011)

Em relação ao grupo II, pode-se perceber que a distância genética variou de 0,1679 a 0,6250 (Anexo – Quadro II)

A Tangerina Sunki Comum, (TSKC) aparece como suposta progênie possuidora de megasporângio de todos os porta-enxertos do grupo II, com distâncias genéticas variando de 0,167 a 0,375, o que mostra que a variedade é muito próxima geneticamente dos três porta-enxertos, sendo esse grau de similaridade maior do que o observado entre progênies e variedades do grupo I.

Citrance “Colemon”, (CCOLE) aparece como possível progênie possuidor de microsporângio do porta-enxerto H206, com distância de dissimilaridade de 0,292. Citrange “Troyer”, (CTROYER) e Citrange “Argentina”, (CARG) como possível progênie possuidor de microsporângio de H207, sendo que CTROYER apresentou dissimilaridade de 0,083, enquanto CARG 0,500 em relação a esse híbrido. Para o porta enxerto H208, Poncirus Trifoliata “Dragon” (PTFDRAG), Poncirus Trifoliata “Benek”, (PTBEN) Citrangequat “Thomasville”, (CITHOM) e Citrange “Rusk”, (CRUSK) se mostraram como possível progênie possuidor de microsporângio, sendo que as progênies mais próximas foram PTFDRAG e PTBEN, ambas com valor de 0,125 de dissimilaridade.

Porém, estudos relatam que o *P. trifoliata* ‘Flying Dragon’ conferem à copa melhores desempenhos em termos de eficiência produtiva e qualidade de frutos (CANTUARIAS-AVILÉS et al., 2011; 2012).

Com o intuito de melhorar a acurácia do estudo de parentesco, nos grupos I e II, também foram amplificados primers mitocondriais. No entanto, dos 11 primers amplificados, apenas um deles mostrou que alguns indivíduos não possuíam bandas, foram eles: Citrumelo ‘Sacaton’ no grupo I, e Citrange ‘Rusk’ e *Poncirus Trifoliata* ‘Flying Dragon’ no grupo II (Figura 7). O restante desses primers se apresentaram altamente monomórficos (Figura 8), não podendo fazer inferências mais precisas quanto aos verdadeiros parentais. Dois primers não traduziram em resultados confiáveis, visto que é um número muito pequeno de sequências a serem analisadas.

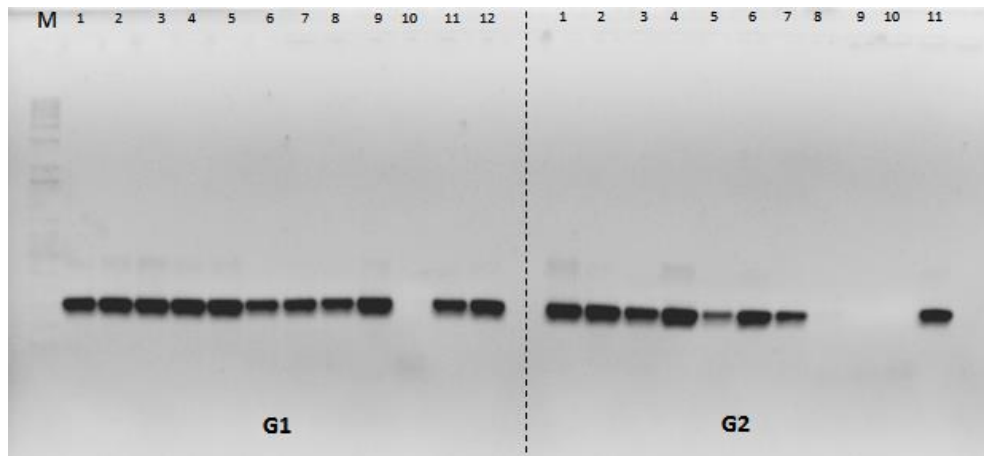


Figura 7. Eletroforese dos primers mitocondriais CSS03F e CSS03R em G1: 1- H51, 2- H53, 3- H69, 4- H116, 5- Limoeiro ‘Cravo’ Comum, 6- Tangerina ‘Cleópatra’, 7- Laranja ‘Pera’, 8- *Poncirus Tifoliata* ‘Benecke’, 9- *Poncirus trifoliata* ‘Barney’, 10- Citrumelo ‘Sacaton’, 11- Citrange ‘Rusk’, 12- Citrange ‘Yuma’. G2: 1- H2016, 2-H207, 3-H208, 4- Tangerineira ‘sunki’ comum, 5- Citrange ‘Argentina’, 6- Citrange ‘Coleman’, 7- Citrangequat ‘Thomasville’, 8- Citrange ‘Rusky’, 9- *Poncirus trifoliata* ‘Flying Dragon’, 10- *Poncirus trifoliata* ‘Benecke’, 11- Citrange ‘Troyer’. M- Marcador de 1kb. Foto: Amanda Gabrielly.

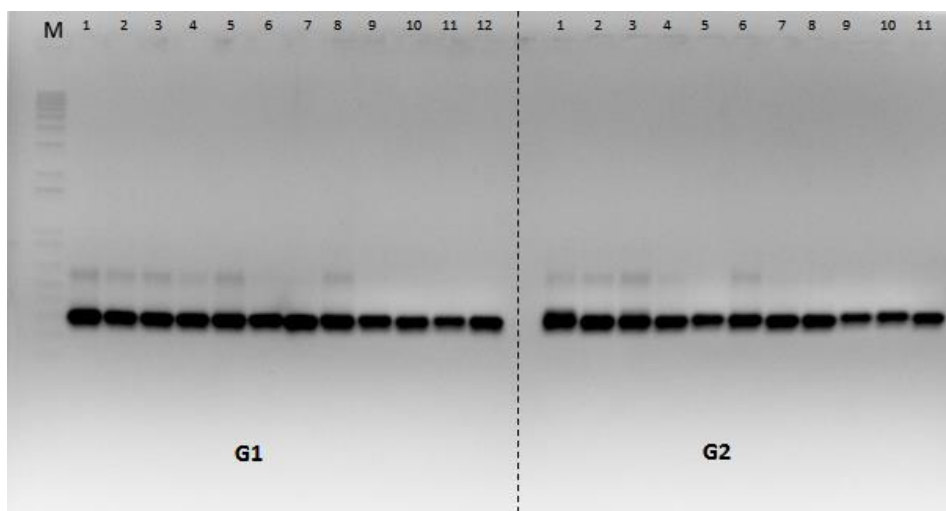


Figura 8. Eletroforese de primers mitocondriais CSL09F e CSL09R em G1: 1- H51, 2- H53, 3- H69, 4- H116, 5- Limoeiro ‘Cravo’ Comum, 6- Tangerina ‘Cleópatra’, 7- Laranja ‘Pera’, 8- *Poncirus Trifoliata* ‘Benecke’, 9- *Poncirus trifoliata* ‘Barney’, 10- Citrumelo ‘Sacaton’, 11- Citrange ‘Rusk’, 12- Citrange ‘Yuma’. G2: 1- H2016, 2-H207, 3-H208, 4- Tangerineira ‘sunki’ comum, 5- Citrange ‘Argentina’, 6- Citrange ‘Coleman’, 7- Citrangequat ‘Thomasville’, 8- Citrange ‘Rusky’, 9- *Poncirus trifoliata* ‘Flying Dragon’, 10- *Poncirus trifoliata* ‘Benecke’, 11- Citrange ‘Troyer’. M- Marcador de 1kb. Foto: Amanda Gabrielly.

No grupo III, foi realizado um estudo de homozigotidade para descobrir qual a proximidade de Sunki Tropical e Sunki Maravilha em relação à Sunki comum, se são híbridos ou possíveis seleções desta última. Esse estudo é de extrema importância para PMG do CNPMF (Centro Nacional de Pesquisa em Mandioca e Fruticultura) e servirá de informação desses materiais junto ao MAPA.

O teste de chi-quadrado objetiva verificar se a frequência absoluta observada de uma variável é significativamente diferente da distribuição de frequência absoluta esperada. Neste estudo, de acordo com a análise de chi-quadrado (χ^2) pode inferir que a Sunki Maravilha e a Sunki Comum possuem mais diferenças ($p = 0,04$) entre si, sugerindo ser um híbrido da Sunki Comum.

Já a Sunki Tropical apresentou valor de $p = 0,3173$ - não significativo, assim provavelmente a Sunki Tropical seja uma seleção e não um híbrido da Sunki Comum. No entanto, esse é um estudo preliminar e vários outros marcadores SSR serão testados para aumentar a confiabilidade dos dados.

As tangerineiras ‘Sunki’ são indicadas como importantes genitores em programas de melhoramento de citros em geral, via hibridação, pela baixa poliembrião, elevada frequência de híbridos, principalmente quando se usa como genitor associado o *P. trifoliata* ou seus híbridos (SOARES FILHO et al., 2000), portanto, é de extrema importância que se saiba a origem dessas variedades de tangerineiras para aumentar as informações junto ao MAPA visando registro desses materiais.

Conclusão

Os dados avaliados no grupo I sugerem que o Limoeiro Cravo Comum, e *Poncirus Trifoliata* ‘Barney’, são os parentais mais próximos do H 51. A laranja Pêra, Citrange ‘Rusk’ e Yuma, nessa primeira análise são os possíveis parentais mais próximos dos híbridos H53, H69 e H116, uma vez que os valores das distâncias genéticas foram baixos. No grupo II, a Tangerina Sunki Comum possivelmente é um dos parentais dos porta-enxertos,

seguido de Citrange “Colemon” para o H206, Citrange “Troyer” para H207 e Poncirus Trifoliata “Dragon” e Poncirus Trifoliata “Benek”, para H208.

É notório que houve pouca diferença nas medidas de dissimilaridade genética entre os materiais avaliados, visto que o número de primers que foram contabilizados para avaliação foi pequeno devido a vários apresentarem bandas monomórficas. Por isso, faz-se necessário neste estudo não só a utilização de uma quantidade maior de primers para uma obtenção de resultados mais confiáveis, mas também se percebeu a necessidade de desenhar e sintetizar novos primers com sequências específicas que possam detectar uma taxa de polimorfismo maior entre os porta-enxertos e as variedades dos três grupos.

O porta-enxerto Sunki Tropical está mais próximo geneticamente da Sunki Comum, podendo ser considerado um seleção da mesma, ao passo que a Sunki Maravilha, por ser mais distante, provavelmente seja híbrido tendo a Sunki Comum como um dos parentais.

Referências

ANDRADE, Adelli Carla Silva Nascimento de. **Circuito espacial da produção e círculos de cooperação na citricultura no estado de Sergipe**. 2019.

ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA. Santa Cruz do Sul: **Editores Gazeta**, 2017. 88 p.

ARGE, Luis Willian Pacheco. **Diversidade, estrutura e relação genética de porta-enxertos de Prunus avaliados pela análise de caracteres morfológicos e de loci SSR**. 2012.

AVISE, John C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of biogeography**, v. 36, n. 1, p. 3-15, 2009.

BARBOSA, ACO et al. Fingerprint molecular de híbridos e porta-enxertos (PEs) de citros via marcadores moleculares ISSRs e SSR. In: **Embrapa Mandioca e Fruticultura-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. In: JORNADA CIENTÍFICA EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA, 9., 2015: Cruz das Almas, BA. Pesquisa: para quê? para quem?: resumos. Brasília, DF: Embrapa, 2015.

BARBOSA, W. M. et al. **Técnicas moleculares e biotecnológicas aplicadas ao café**. 2015.

BASTOS, D. C. et al. Cultivares copa e porta-enxertos para a citricultura brasileira. **Embrapa Semiárido-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2014.

BERNARDO, R. Breeding for quantitative traits in plants. Woodbury. **Minn: Stemma**, 2002.

BIANCHI, V.J.; SANSVINI, S.; FACHINELLO, J.C. Microsatellite markers for identification of Prunus spp. rootstocks. **Scientia Agrícola**, v. 61, n.3, p. 303-306, 2004.

BIANCHI, et al. VARIABILIDADE GENÉTICA EM PLANTAS DO GÊNERO *Alternanthera* Forssk.(Amaranthaceae). **Revista da Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa-Congrega Urcamp**, p. 1178-1192, 2016.

BORÉM, A. & CAIXETA, E. T.; Marcadores Moleculares. 2ª. **Editora UFV**. 532p. Viçosa, 2009.

BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de C. Manual de transformação genética de plantas. **Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen**, 1998.

CANTUARIAS-AVILÉS, T.; MOURÃO-FILHO, F.A.A.; STUCHI, E.S.; SILVA, S.R.; ESPINOZA-NUNEZ, E. Horticultural performance of ‘Folha Murcha’ sweet Orange onto twelve rootstocks. **Scientia horticulturae**, Amsterdam, v. 129, n. 2, p. 259-265, 2011.

CANTUARIAS-AVILÉS, T.; MOURÃO-FILHO, F.A.A.; STUCHI, E.S.; SILVA, S.R.; ESPINOZA-NUNEZ, E. Rootstocks for high fruit yield and quality of ‘Tahiti’ lime under rain-fed conditions. **Scientia horticulturae**, Amsterdam, v. 142, p. 105-111, 2012.

CARLOS, E. F.; STUCHI, E. S.; DONADIO, L. C. Porta-Enxertos Para Citricultura Paulista. **Boletim Citrícola - UNESP/FUNEP/EECB**, Jaboticabal, p.1-52, 1997

CARLOS, E. F.; DONADIO, L. C.; STUCHI, E. S. **Porta-enxertos para a citricultura paulista**. Funep, 1997.

CASTLE, W. S. A. Career perspective on citrus rootstocks, their development, and commercialization. **HortScience**, v. 45, n. 1, p. 11-15, 2010.

CERVERA, M.T.; GUSMÃO, J.; STEENACKERS, M.; VANGYSEL, A.; VANMONTAGU, M.; BOERJAN, W. Application of AFLPTM–based molecular markers to breeding of *Populus* spp. **Plant Growth Regulation**, Dordrechtm, v.20, n.1, p.47-52, 1996.

CHENG, Y. et al. A set of primers for analyzing chloroplast DNA diversity in *Citrus* and related genera. **Tree physiology**, v. 25, n. 6, p. 661-672, 2005.

COMEX STAT. Disponível em: <http://comexstat.mdic.gov.br/pt/home>. Acesso em 05 de Novembro de 2019.

CRESTANA, S.; FOSCHINI, M. M.; FERREIRA, M. D. Desafios da produção de frutas e hortaliças frente aos extremos climáticos-Estudo de caso da citricultura paulista. **Embrapa Instrumentação-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2017.

CRISTOFANI, M. et al. Identificação de híbridos de cruzamentos interespecíficos em citros utilizando marcadores RAPD e SSR. **Laranja**, v. 22, n. 1, p. 231-241, 2001.

CRUZ, C. D. **Programa GENES**: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2006. 442 p.

DA CRUZ, ELAINE SILVA; **HÍDRICAS, RELAÇÕES**; ILHÉUS, BAHIA. UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ–UESC PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL-PPGPV. 2019.

DE ALMEIDA, M. B. et al. Espacialização de áreas aptas para a citricultura no Recôncavo da Bahia. In: **Área de Informação da Sede-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In:

SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO, 19, 2019, Santos. Anais... São José dos Campos: INPE, 2019.

DE PAULA, L. A.; BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C. Caracterização molecular e variabilidade genética entre porta-enxertos de pessegueiro com base em marcadores codominantes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 2, p. 193-199, 2012.

DELLAGOSTIN, M. et al. Dissimilaridade genética em população segregante de soja com variabilidade para caracteres morfológicos de semente. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 4, p. 689-698, 2011.

DI GIORGI, F. et al. Qualidade da laranja para industrialização. **Laranja, Cordeirópolis**, v. 14, n. 1, p. 97-118, 1993.

DORNELLES, C.M.M. Citricultura do Rio Grande do Sul. In: RODRIGUES, O. et al. **Citricultura brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1991. V.1, p.38-41.

FARIA, P. N. et al. Métodos de agrupamento em estudo de divergência genética de pimentas. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 428-432, 2012.

FERRÃO, L. F. V.; CAIXETA, E. T.; PENA, G.; ZAMBOLIM, E. M.; CRUZ, C. D.; ZAMBOLIM, L.; FERRÃO, M. A. G.; SAKYAMA, N. S. New EST-SSR markers of Coffea arabica: transferability and application to studies of molecular characterization and genetic mapping. **Molecular Breeding**, v. 35, n. 1, p. 31, 2015.

FERREIRA, C. F. et al. Uso de marcadores RAPD e SSR na detecção de acessos duplicados de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). In: **Embrapa Mandioca e Fruticultura-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 14.; FEIRA BRASILEIRA DA MANDIOCA, 1., 2011, Maceió. Mandioca: fonte de alimento e energia: anais. Maceió: ABAM: SBM, 2011. 1 CD-ROM.

FERREIRA, C. F. et al. Rapid plant DNA and RNA extraction protocol using a bench drill. **Genetics and Molecular Research**, p.8, 2019.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3.ed. Brasília: **Embrapa- CENARGEN**, 1998. 220p.

FROELICHER, Y. et al. Characterization of microsatellite markers in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco). **Molecular ecology resources**, v. 8, n. 1, p. 119-122, 2008.

FUNDECITRUS – **Fundo de defesa da citricultura** – Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br>.

FUNDECITRUS. Diversificar porta-enxertos traz vantagens ao citricultor. **Citricultor**. Ano V, n. 22, p. 14-15, 2013.

FUNDECITRUS. **Mesmo estabilizada, incidência de greening permanece alta no cinturão cítrico de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro**. Araraquara, SP, 2017. (Comunicação).

GÓRIA, Paula Salles et al. **Variação gênica e estrutura populacional de *Euglossa cordata* (Linnaeus, 1758) acessadas por meio de marcador mitocondrial e locos microsatélites**. 2018.

- HANNA, W.W.; BASHAW, E.C. Apomixis: its identification and use in plant breeding. *Crop Science*, Madison, v. 27, p.1136-1139, 1987.
- IBGE. SIDRA (Sistema IBGE de Recuperação Automática) **Banco de Dados Agregados** 2017.
- JAKSE, J; MARTIN, W; MCCALLUM, J; HAVEY, M. J. Single nucleotide polymorphisms, indels, and simple sequence repeats for onion cultivar identification. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v. 130, p. 912-917, 2005
- KOLLER, O.C. **Citricultura: laranja, limão e tangerina**, Porto Alegre : Rigel, 1994. 446p.
- LANDE, R.. Genetics and demography in biological conservation. *Science*, v. 241, p. 1455-1460, 1998.
- LANZA, M. A.; GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2000.
- LEZCANO, Cecilia Carolina. **Caracterización de pomelo " Paraná" mediante marcadores moleculares**. 2018. Tese de Doutorado. Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Ciências Agrarias.
- LIU, J. et al. The use of DNA barcoding as a tool for the conservation biogeography of subtropical forests in China. *Diversity and Distributions*, n. 2, v. 21, p. 188- 199, 2015.
- LIU, K; , S.V. PowerMarker: An integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*, v. 21, p.2128-2129, 2005.
- MACHADO, M. A. et al. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. *Citros*, p. 222-277, 2005.
- MARCHIORO, V. S. et al. Dissimilaridade genética entre genótipos de aveia. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 27, n. 2, p. 285-294, 2003.
- MINGOTI, S.A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada**: uma abordagem aplicada. Belo Horizonte: UFMG, 2005. 295p.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Projeções do agronegócio: Brasil 2016/17 a 2026/27: projeções de longo prazo**. Brasília, DF: MAPA/SPA, 2017. 103 p.
- MOREIRA, R. A.; RAMOS, J. D.; CRUZ, M. C. M. Caracterização de frutos e poliembrião em sementes de 'Flying Dragon' e de híbridos de porta-enxerto de citros. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 32, n. 2, 2010.
- NEITZKE, R. S. et al. Dissimilaridade genética entre acessos de pimenta com potencial ornamental. *Horticultura Brasileira*, v. 28, n. 4, p. 47-53, 2010.
- NEVES, E. M. et al. Citricultura brasileira: efeitos econômico-financeiros. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 23, p. 432-436, 1996.
- NEVES, M. F.; KALAKI, R. B. Perspectivas para a produção brasileira. *AgroANALYSIS*, v. 35, n. 6, p. 26-27, 2015.

- NEVES, M. F. et al. O retrato da citricultura brasileira. **Ribeirão Preto: CitrusBR**, 2010.
- JUNIOR, MATTOS. D. de; NEGRI, JD; PIO, RM; POMPEU JUNIOR. J. **Citros. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag**, 2005.
- PAULA, L. B. de. **Diversidade genética em populações de Candidatus Liberibacter asiaticus determinada por marcadores SSR**. 2015.
- POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: RODRIGUEZ, O. et al. (Ed.). **Citricultura brasileira**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v. 1, p. 265- 280.
- POMPEU JÚNIOR, J.; FIGUEIREDO, J.O.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; JORGE, J.P.N.; JACON, J.R. Competição de clones de limão ‘Cravo’ e de limão ‘Volkameriano’ como porta-enxerto para laranja ‘Natal’. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA**, 8., Brasília, 1986. Anais. Brasília: SBF, 1986. p. 147-151.
- R Development Core Team (2018) R: a language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>
- RIBEIRO, G. D.; COSTA, J. N. M.; VIEIRA, A. H.; SANTOS, M. R. A. Enxertia em fruteiras. **Recomendações técnicas n° 92 – Embrapa**, Porto Velho – RO, 2005.
- SCHÄFER, G. et al. Diversidade genética de porta-enxertos cítricos baseada em marcadores moleculares RAPD. **Ciência Rural**, 2004.
- SCHAFER, G.; BASTIANEL, M.; DORNELLES, A. L. C. Porta-enxertos utilizados na citricultura. **Ciência rural**, Santa Maria. V. 31, n. 4, p. 723-733, 2001.
- SILVA, S. M. da. **Mapeamento citogenético em Citrus: análises evolutivas e integração com dados genômicos**. 2016.
- SOARES FILHO, W. dos S. Porta-enxertos de citros tolerantes à seca: ações da Embrapa Mandioca e Fruticultura. **Citricultura: atual: Revista do Grupo de Consultores em Citros**, Cordeirópolis, SP, v.20, n. 113, p. 19-21, maio, 2017.
- SOARES FILHO, W.S.; MOREIRA, C.S.; CUNHA, M.A.P.; SOBRINHO, A.P.C.; PASSOS, O.S. Poliembrião e frequência de híbridos em citrus ssp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 4, p.857-864, 2000.
- SOUZA, C. R.; SOARES, A. M.; REGINA, M. A. Trocas gasosas de mudas de videira, obtidas por dois porta-enxertos, submetidas à deficiência hídrica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 1221-1230, 2001.
- STATISTICA for Windows. 2002. **Computer program manual**. Version 6. Tulsa: Statsoft, 1CD-ROM
- VIEIRA, E.A.; CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, A.C.; MARTINS, L.F.; BENIN, G.; SILVA, J.A.G; KOPP, M.M.; HARTWIG, I.; CARVALHO, M.F.; VALÉRIO, I.P. Associação da distância genética em trigo estimada a partir de caracteres morfológicos, caracteres fenológicos e dos componentes do rendimento de grãos. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.13, n.2, p.161-168, 2007.
- VIEIRA, E.A.; CARVALHO, F.I.F; OLIVEIRA, A.C.; BENIN, G.; ZIMMER, P.D.; SILVA, J.A.G.; MARTINS, A.F.; BERTAN, E.; SILVA, G.O.; SCHMIDT, D.A.M. Comparação

entre medidas de distância genealógica, morfológica e molecular em aveia em experimentos com e sem a aplicação de fungicida. **Bragantia**, v.64, n.1, p.51- 60, 2005.

Anexo

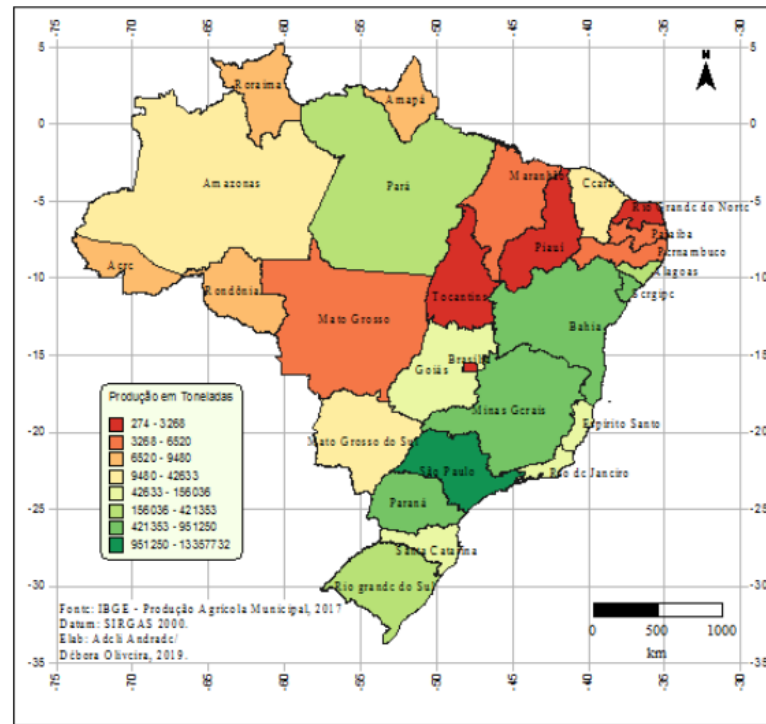


Figura 1. Mapa de produção de citros no Brasil. IBGE, 2017.

	H51	H53	H69	H116	LCC	TCLEOP	LAPERA	PTBEN	PTFBAR	CITSAC	CITR	YUMA
H51	0.0000	0.3846	0.4615	0.4615	0.2308	0.6154	0.5385	0.5385	0.4615	0.6154	0.5385	0.5385
H53	0.3846	0.0000	0.0769	0.2308	0.5385	0.6154	0.3846	0.4615	0.5385	0.4615	0.3846	0.3846
H69	0.4615	0.0769	0.0000	0.1538	0.6154	0.6923	0.4615	0.5385	0.6154	0.5385	0.3846	0.3846
H116	0.4615	0.2308	0.1538	0.0000	0.6154	0.6923	0.3077	0.5385	0.6923	0.5385	0.3846	0.3846
LCC	0.2308	0.5385	0.6154	0.6154	0.0000	0.5385	0.4615	0.4615	0.5385	0.7692	0.7692	0.7692
TCLEOP	0.6154	0.6154	0.6923	0.6923	0.5385	0.0000	0.6154	0.3846	0.3846	0.6154	0.7692	0.7692
LAPERA	0.5385	0.3846	0.4615	0.3077	0.4615	0.6154	0.0000	0.4615	0.6923	0.6923	0.5385	0.5385
PTBEN	0.5385	0.4615	0.5385	0.5385	0.4615	0.3846	0.4615	0.0000	0.5385	0.6154	0.6154	0.6923
PTFBAR	0.4615	0.5385	0.6154	0.6923	0.5385	0.3846	0.6923	0.5385	0.0000	0.2308	0.6154	0.6154
CITSAC	0.6154	0.4615	0.5385	0.5385	0.7692	0.6154	0.6923	0.6154	0.2308	0.0000	0.4615	0.5385
CITR	0.5385	0.3846	0.3846	0.3846	0.7692	0.7692	0.5385	0.6154	0.6154	0.4615	0.0000	0.4615
YUMA	0.5385	0.3846	0.3846	0.3846	0.7692	0.7692	0.5385	0.6923	0.6154	0.5385	0.4615	0.0000

Quadro 1. Matriz de dissimilaridade genética para o grupo I.

	H206	H207	H208	TSKC	CARG	CCOLE	CITHOM	CRUSK	PTFDRA/PTBEN	CTROYER	
H206	0.000	0.333	0.375	0.167	0.500	0.292	0.250	0.333	0.333	0.250	0.333
H207	0.333	0.000	0.458	0.333	0.500	0.542	0.167	0.250	0.417	0.333	0.083
H208	0.375	0.458	0.000	0.375	0.458	0.333	0.292	0.292	0.125	0.125	0.542
TSKC	0.167	0.333	0.375	0.000	0.500	0.208	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250
CARG	0.500	0.500	0.458	0.500	0.000	0.625	0.500	0.500	0.333	0.333	0.583
CCOLE	0.292	0.542	0.333	0.208	0.625	0.000	0.375	0.375	0.375	0.375	0.458
CITHOM	0.250	0.167	0.292	0.250	0.500	0.375	0.000	0.083	0.250	0.167	0.250
CRUSK	0.333	0.250	0.292	0.250	0.500	0.375	0.083	0.000	0.167	0.250	0.333
PTFDRA	0.333	0.417	0.125	0.250	0.333	0.375	0.250	0.167	0.000	0.083	0.500
PTBEN	0.250	0.333	0.125	0.250	0.333	0.375	0.167	0.250	0.083	0.000	0.417
CTROYER	0.333	0.083	0.542	0.250	0.583	0.458	0.250	0.333	0.500	0.417	0.000

Quadro 2. Matriz de dissimilaridade genética para o grupo II.

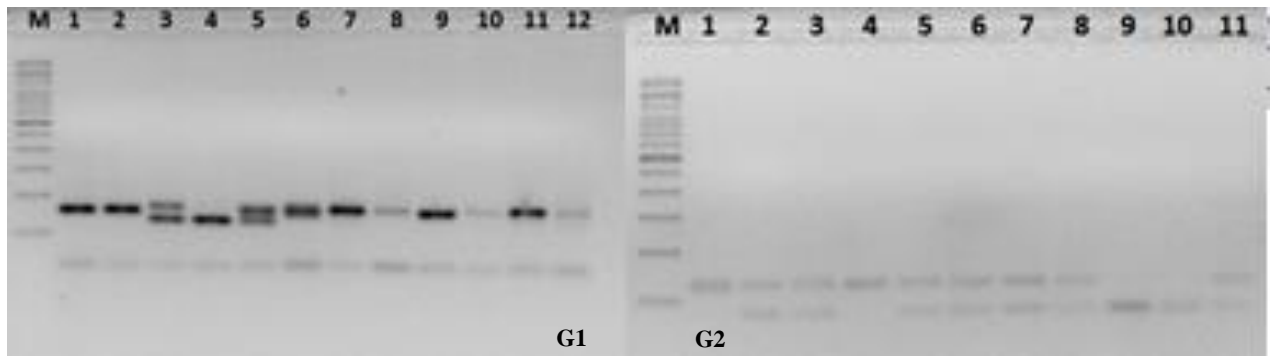


Figura 2. Amplificações com primer polimórfico de SSR dos grupos I e II. Em G1: 1- H51, 2- H53, 3- H69, 4- H116, 5- Limoeiro ‘Cravo’ Comum, 6- Tangerina ‘Cleópatra’, 7- Laranja ‘Pera’, 8- *Poncirus Tifoliata* ‘Benecke’, 9- *Poncirus trifoliata* ‘Barney’, 10- Citrumelo ‘Sacaton’, 11- Citrange ‘Rusk’, 12- Citrange ‘Yuma’. G2: 1- H2016, 2-H207, 3-H208, 4- Tangerineira ‘sunki’ comum, 5- Citrange ‘Argentina’, 6- Citrange ‘Coleman’, 7- Citrangequat ‘Thomasville’, 8- Citrange ‘Rusky’, 9- *Poncirus trifoliata* ‘Flying Dragon’, 10- *Poncirus trifoliata* ‘Benecke’, 11- Citrange ‘Troyer’. M- Marcador de 1kb. Foto: Amanda Gabrielly.

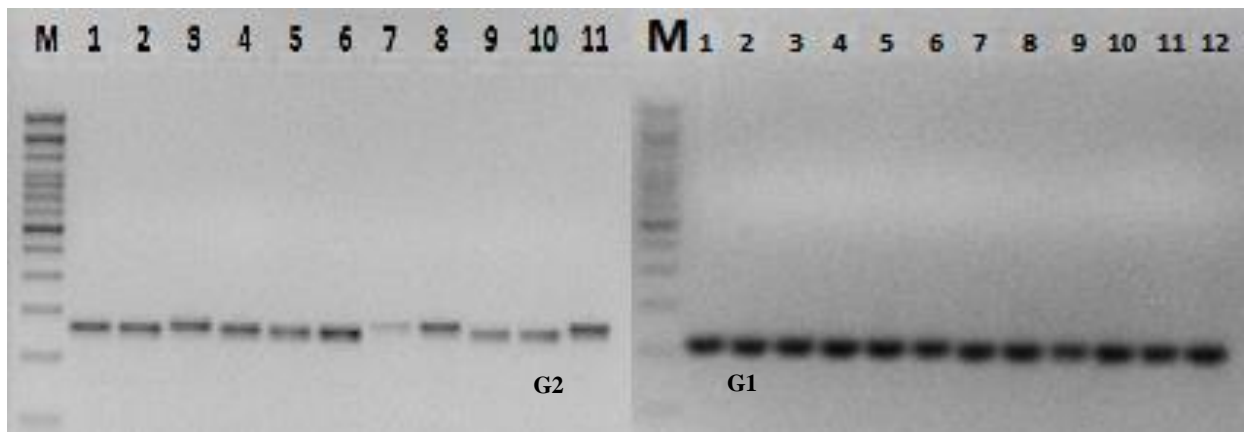


Figura 3. Amplificações com primer monomórfico de SSR dos grupos I e II. Em G1: 1- H51, 2- H53, 3- H69, 4- H116, 5- Limoeiro ‘Cravo’ Comum, 6- Tangerina ‘Cleópatra’, 7- Laranja ‘Pera’, 8- *Poncirus Tifoliata* ‘Benecke’, 9- *Poncirus trifoliata* ‘Barney’, 10- Citrumelo ‘Sacaton’, 11- Citrange ‘Rusk’, 12- Citrange ‘Yuma’. G2: 1- H2016, 2-H207, 3-H208, 4- Tangerineira ‘sunki’ comum, 5- Citrange ‘Argentina’, 6- Citrange ‘Coleman’, 7- Citrangequat ‘Thomasville’, 8- Citrange ‘Rusky’, 9- *Poncirus trifoliata* ‘Flying Dragon’, 10- *Poncirus trifoliata* ‘Benecke’, 11- Citrange ‘Troyer’. M- Marcador de 1kb. Foto: Amanda Gabrielly.

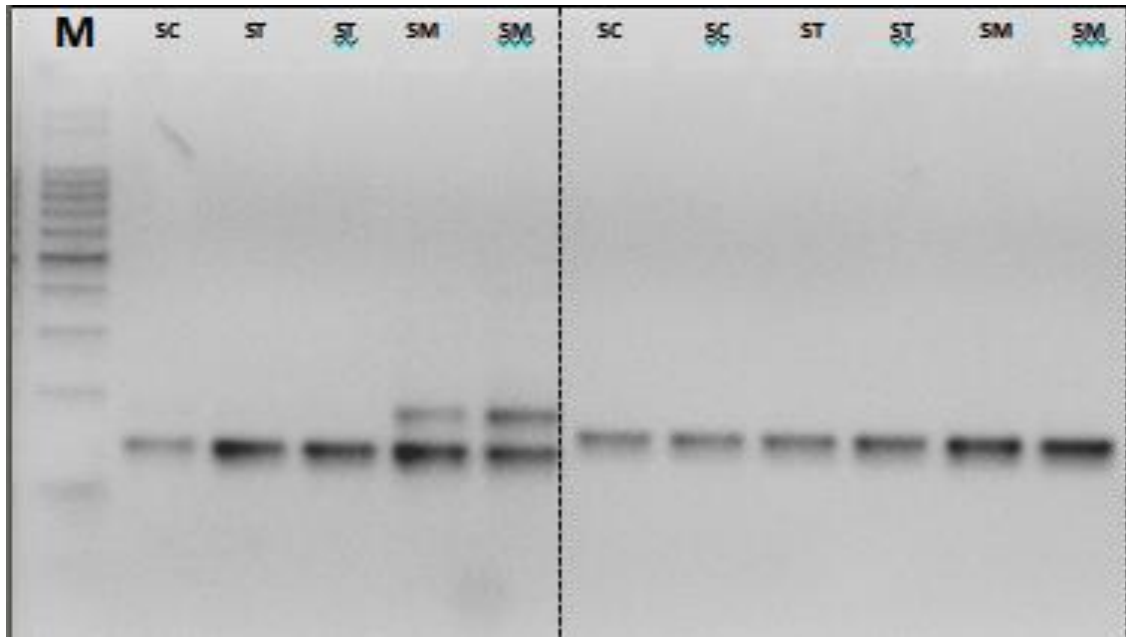


Figura 4. Amplificação com SSR no grupo III. SC- Sunki Comum, ST- Sunki Tropical e SM- Sunki Maravilha. M- Marcador de 1kb. Foto: Amanda Gabrielly