



**Universidade Federal Rural de Pernambuco
Departamento de Agronomia
Programa de Pós-Graduação em Agronomia: Melhoramento
Genético de Plantas**

RÔMULO MACIEL DE MORAES FILHO

**MARCADORES MOLECULARES NO ESTUDO DE DIVERSIDADE
DE ACEROLA (*Malpighia emarginata* D.C.) E DO GÊNERO
*Citrus***

RECIFE – PE
2010

RÔMULO MACIEL DE MORAES FILHO

MARCADORES MOLECULARES NO ESTUDO DE DIVERSIDADE DE ACEROLA (*Malpighia emarginata* D.C.) E DO GÊNERO *Citrus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Melhoramento Genético de Plantas, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Agronomia, área de concentração em Melhoramento Genético de Plantas

Orientador:

Prof^a Dra. Luiza Suely Semen Martins

Co-Orientadores:

Prof^a Dra. Rosimar dos Santos Musser

Prof^a Dra. Angelica Virginia Valois Montarroyos

Recife – PE
2010

RÔMULO MACIEL DE MORAES FILHO

**MARCADORES MOLECULARES NO ESTUDO DE DIVERSIDADE
DE ACEROLA (*Malpighia emarginata* D.C.) E DO GÊNERO *Citrus***

Banca Examinadora:

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Luiza Suely Semen Martins
Presidente

Examinadores:

Prof^a. Dr^a Rosimar dos Santos Musser
Titular

Prof^a. Dr^a Angélica Virginia Valois Montarroyos
Titular

Prof. Dr. Edson Ferreira da Silva
Titular

Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho
Suplente

**Recife – PE
2010**

DEDICATÓRIA

“Dedico esta dissertação ao DNA, a molécula da vida e meu instrumento de trabalho, sem o qual eu estaria desempregado.”

AGRADECIMENTOS

- Agradeço aos meus pais e familiares pelo apoio e suporte, sem o qual o desenvolvimento deste trabalho seria impossível.
- A minha orientadora Dra. Luiza Suely Semen Martins, pelos conselhos e orientações.
- A Prof^a. Dra. Rosimar dos Santos Musser sem a qual este projeto não poderia ter sido realizado.
- A Prof^a. Dra.. Angelica Virginia Valois Montarroyos, por todo apoio e colaboração durante o período de desenvolvimento deste trabalho.
- Aos meus companheiros de Laboratorio, Ana Luiza, Horace Gimenez e Gabriela Guerra, por todo apoio durante o período de extrações de DNA.
- Aos meus companheiros de curso de mestrado, em especial Isabel Martins, Jaislany Maria, Jacqueline Pereira e Marina Medeiros, pelo companherismo e amizade durante esta jornada.
- Aos amigos André Ayres, Hugo Vasconcelos, Rafael Maia e Renan Santos.
- Aos amigos Celso, Bruno Vila Nova e Fatima Barros pelas conversas em minhas madrugadas de insônia.
- A Larissa Albuquerque, que mesmo não se fazendo presente continua sendo inspiração e motivo para que eu me torne uma pessoa melhor.
- As amigas Carol Lima, Clarissa Pessoa e Kalyne Alves, que mesmo não tão presentes, continuam sendo pessoas sem as quais minha vida não teria sentido.
- Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Mestrado, sem a qual eu não teria conseguido concluir o projeto.
- E a cada um que, voluntariamente ou inconscientemente, me ajudou e estimulou a ir além, e completar objetivos cada vez maiores. A todos, eu serei eternamente grato

SUMÁRIO

	Páginas
Lista de Figuras.....	5
Lista de Tabelas.....	6
Resumo	7
Abstract	9
Capítulo I – Revisão Bibliográfica	
1. Introdução	12
2. Revisão de Literatura.....	14
2.1. Gênero Citrus	14
2.2. Aceroleira	17
3. Fruticultura no Brasil	21
3.1. Cultura do Gênero <i>Citrus</i>	21
3.2. Cultura da Aceroleira	23
4. Recursos Genéticos	24
4.1. Melhoramento genético do gênero Citrus	25
4.2. Melhoramento genético da aceroleira	26
5. Marcadores Genéticos	28
5.1. Marcadores Morfológicos	29
5.2. Marcadores Moleculares	29
5.2.1. Marcadores Microsatélites	32
5.2.2.1 Marcadores ISSR	33
5.2.3. Marcadores RAPD	34
6. Referências Bibliográficas	35
Capítulo II - Marcadores moleculares RAPD como sinalizador da variabilidade genética em genótipos do BAG de acerola da UFRPE	
	43
Resumo	44
Abstract	45
Introdução	47
Material e Métodos	50
Resultados e Discussão	52
Conclusões	56
Referências Bibliográficas	57
Capítulo III- Variabilidade genética em genótipos da coleção de germoplasma de Citrus, do Instituto Agrônomo de Pernambuco Brejão-PE, por meio de marcadores moleculares ISSR	
	63
Resumo	64
Abstract	65
Introdução	66
Material e Métodos	67
Resultados e Discussão	70
Conclusões	73
Referências Bibliográficas	76
Anexos	
Anexo 1. Normas da Revista Brasileira de Fruticultura.....	78

LISTA DE FIGURAS

Capítulo II - Resultados e Discussão

- Figura 1 – Análise de agrupamento de 42 acessos de aceroleira do BAG da UFRPE, Carpina-PE, obtida por meio do programa NTSYS – PC, usando a UPGMA. **55**
-

Capítulo III – Resultados e Discussão

- Figura 1 – Padrão de bandas PCR-ISSR para as 20 variedades do gênero *Citrus*, utilizando-se o primer #851. **74**
-

- Figura 2 – Análise de agrupamento de 20 variedades do gênero *Citrus* da coleção da Estação Experimental de Brejão/PE, pertencente ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), obtida por meio do programa NTSYS – PC, usando a UPGMA. **75**

LISTA DE TABELAS

Capítulo II – Anexos

Tabela 1. Procedência e características morfo-agronômicas dos 42 acessos de aceroleira do Banco Ativo de Germoplasma da UFRPE	59
Tabela 2. Relação dos <i>primers</i> de RAPD, utilizados no estudo de diversidade dos acessos do BAG de acerola da UFRPE, e número de loci amplificados, polimórficos e monomórficos observados	61
Tabela 3. Similaridade genética observada entre 42 acessos de aceroleira, do Banco Ativo de Germoplasma de Acerola da UFRPE, a partir de marcadores RAPD	62

Capítulo III – Material e Métodos

Tabela 1. Características morfo-agronômicas dos 20 acessos da coleção de Germoplasma de Citrus do IPA – Brejão/ PE.	68
Tabela 2 – Seqüências dos <i>primers</i> ISSR utilizados no estudo de diversidade de 20 acessos do gênero <i>Citrus</i>	70

Capítulo III – Resultados e Discussão

Tabela 3: Relação dos fragmentos amplificados pelos 15 <i>primers</i> ISSR utilizados no estudo de diversidade de <i>Citrus</i>	72
Figura 2. Dissimilaridade genética observada entre 20 acessos do gênero <i>Citrus</i> da coleção da Estação Experimental de Brejão/PE, pertencente ao Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA), obtida por meio do programa NTSYS – PC.	74

Resumo

O Brasil produz em torno 41 milhões de toneladas de frutas anualmente, movimentando cerca de US\$ 11 bilhões. Atualmente o Brasil é o maior produtor de laranja com uma previsão de safra para 2010 ultrapassando os 19 milhões de toneladas. No que concerne a aceroleira o Brasil também é o maior produtor mundial tendo a região Nordeste grande destaque no cenário nacional respondendo por 60% da produção do país. Apesar destes dados promissores observa-se baixa diversificação de cultivares para as duas culturas, sendo mais alarmante a situação da citricultura nordestina onde 95% da produção advém do cultivo de variedades do tipo Pêra. Os objetivos deste trabalho foram atestar a variabilidade genética, por meio de marcadores moleculares ISSR, das variedades do gênero *Citrus* a serem introduzidas e recomendadas para a região Nordeste pela Embrapa Mandioca e Fruticultura, e também caracterizar e identificar a variabilidade genética existente entre os acessos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de acerola localizado na Estação Experimental de Cana-de-açúcar de Carpina (EEAC)/UFRPE por meio de marcadores RAPD. A metodologia ISSR-PCR permitiu a visualização de um total de 167 loci com a utilização de 15 *primers*. Destes 162 (97%) exibiram polimorfismo e 5 (3%) foram monomórficos. De acordo com a análise do dendrograma e da matriz de similaridade genética foi possível agrupar as 15 variedades de laranja doce em um único grupo com 27% de diversidade entre si e 40% em relação aos outros cinco genótipos, formados por três limões, uma tangerina e um pomelo. O alto grau de polimorfismo observado entre o grupo das laranjas e os outros cinco acessos sugere grande variabilidade genética dentro do gênero, o que pode ser particularmente útil em programas de melhoramento vegetal visando desenvolver novas variedades-copa adaptadas às diversas condições ambientais, bem como a identificação de variedades promissoras em termos de produção. Os quinze *primers* RAPD utilizados apresentaram boa amplificação, identificando 182 marcadores. Destes, 166 demonstraram polimorfismo (91,2%) e 16 foram monomórficos. As aceroleiras apresentam grande variabilidade genética, nitidamente observada nos pomares comerciais, como conseqüência da extensa propagação por sementes, o que gera pomares desuniformes e pouco produtivos. Os marcadores obtidos foram analisados,

usando o método de agrupamento UPGMA. Os coeficientes de similaridade genética variaram de 0,56 (acessos 005APE e 040CMF) a 0,90 (028-CMF e 030-CMF e 026-CMF e 027-CMF). Os genótipos estudados foram classificados em dois grandes grupos, dois subgrupos e cinco agrupamentos menores, reunindo os acessos que compartilham características químicas, morfológicas e de produção, constatando que os indivíduos com maior produção de frutos apresentam os menores teores de vitamina C. Observou-se também uma relação inversa entre a produção de vitamina C e a produtividade, pois de um modo geral, genótipos mais produtivos apresentam menores índices de ácido ascórbico, enquanto os que produzem frutos mais ricos em vitamina C, têm baixa produção de fruto. A análise dos resultados revelou, por meio da diversidade genética dos acessos, que este BAG apresenta **considerável** variabilidade genética, podendo ser fonte de genes muito importantes no estudo de melhoramento genético da cultura, viabilizando um planejamento adequado dos cruzamentos a serem realizados, otimizando as combinações genéticas superiores na indicação de genótipos bem adaptados as condições ambientais regionais.

Termos para indexação: *Malpighia emarginata* D.C., Aceroleira, Variabilidade genética, Banco ativo de germoplasma, *Citrus*, Marcadores Moleculares.

Abstract

Brazil produces around 41 million tons of fruit annually, moving around U.S. \$ 11 billion. Currently Brazil is the largest producer of orange with a crop forecast for 2010 exceeding 19 million tons. Regarding the acerola, Brazil is also the biggest producer and the Northeast region has great importance on the national scene, accounting for 60% of the national production. Despite these promising numbers there is a low diversification of cultivars for both crops, and the situation is more alarming for the citrus culture in Northeast region where 95% of production comes from the Pêra variety. The objective of this work was to assess the genetic variability by the use of ISSR Markers between *Citrus* varieties that were introduced and recommended to the Northeast region by the *Embrapa Mandioca e Fruticultura* and also to identify and characterize the genetic variability between accessions from Acerola's Active Germplasm Bank (AGB) located at the *Estação Experimental de Cana-de-açúcar de Carpina* (EEAC)/UFRPE through RAPD Markers. The ISSR-PCR method allowed the visualization of a total of 167 loci with the use of 15 *primers*. 162 (97%) loci exhibited polymorphism and five (3%) were monomorphic. According to the analysis of the dendrogram and the genetic similarity matrix, was possible to group the 15 varieties of sweet orange in a single group with 27% diversity between them and 40% over the five other genotypes, consisting of three lemons, a tangerine and a grapefruit. The high degree of polymorphism observed between the group of oranges and the other five accessions suggests a large genetic variability within the genus, which may be particularly useful in breeding programs aiming to develop new rootstocks adapted to many different environmental conditions as well as the identification of promising varieties in terms of production. The fifteen RAPD *primers* used showed good amplification, identifying 182 markers. Among these markers, 166 showed polymorphism (91.2%) and 16 were monomorphic. The acerola presents great genetic variability, clearly seen in commercial orchards, as a result of extensive seed propagation, which causes non uniform and unproductive orchards. These markers were analyzed using the UPGMA clustering method. The genetic similarity coefficients ranged from 0.56 (005APE and 040CMF access) to 0.90 (028-CMF and 030-CMF and 026-CMF and 027-CMF). The genotypes were

classified into two groups, two subgroups and five smaller groups, gathering hits that share chemical, morphological and production characteristics, noting that individuals with higher production of fruits had the lowest levels of vitamin C. It was observed an inverse relationship between the production of vitamin C and productivity, because in general, higher yielding genotypes had lower levels of ascorbic acid, while those that produce fruits rich in vitamin C, have low production of fruit. The analysis of the results revealed, by genetic diversity of the access, that BAG has considerable genetic variability, which may be a source of very important genes in the study of genetic improvement of acerola, enabling proper planning of crosses to be performed, optimizing the genetic combinations higher in the statement of genotypes well adapted to regional environmental conditions.

Index terms: *Malpighia emarginata* DC, acerola, genetic variability, Active Germplasm Bank, *Citrus*, Molecular markers.

CAPÍTULO I

Revisão Bibliográfica

1. Introdução

O consumo mundial de frutas tem aumentado em torno de 5% ao ano, o que representa aumento da demanda em um bilhão de dólares anuais. Segundo o Anuário Brasileiro da Fruticultura, 2007 a produção brasileira está em torno de 38 a 41 milhões de toneladas de frutas, o que corresponde a US\$ 11 bilhões do Produto Interno Bruto (PIB). Dentre as regiões produtoras o Sudeste é responsável pela metade da produção brasileira em fruticultura e o Nordeste por 27% do total, dos quais grande parte é direcionada ao comércio exterior (AGROBRASIL, 2005). No que concerne ao gênero *Citrus*, a produção nacional excede os 18 milhões de toneladas e a produção estimada para o ano de 2010 está em torno 19.068.761t com uma área plantada de pouco mais de 984 mil hectares (IBGE, 2010) sendo o Brasil o maior produtor mundial de laranjas (FAO, 2007). O Estado de Pernambuco apresenta características favoráveis para o cultivo de variedades cítricas, principalmente a região do Agreste meridional, devido à altitude, clima e proximidade dos maiores mercados consumidores (EUA e Europa) (PASSOS *et al.*, 2004).

Lins *et al.*, 1996, relatam que a Zona da Mata do Nordeste é uma região com grande potencial para o cultivo da acerola por sua adaptação as condições climáticas da região e ao aumento crescente no consumo desta fruta. A despeito destes dados promissores, observa-se uma baixa diversificação de cultivares, sendo mais alarmante a situação da citricultura no Nordeste onde apenas uma variedade é responsável por 95% da produção de frutas cítricas (PASSOS *et al.*, 2004). As atividades de introdução, preservação e caracterização de germoplasma são de grande importância para a diversificação das espécies cultivadas e como fonte de variabilidade genética para programas de melhoramento. Esta diversidade seja originária de evolução, hibridações, seleção natural ou artificial, dão suporte para a produção mundial de alimentos. Marcadores moleculares são uma ferramenta importante para o melhoramento genético de plantas e podem ser utilizados no estudo de diversidade genética, caracterização (fingerprinting), diagnóstico de doenças, mapeamento de genes e estudos taxonômicos e evolutivos (WÜNSCH e HORMAZA, 2007). Este trabalho teve por objetivo caracterizar e observar a variabilidade genética existente entre os acessos da coleção de

germoplasma de Citrus do Instituto Agronomico de Pernambuco (IPA) localizado na cidade de Brejão – PE, e do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Acerola da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) localizado na estação experimental de cana-de-açúcar de Carpina-PE por meio de marcadores moleculares ISSR e RAPD.

2. Revisão de Literatura

2.1. Gênero *Citrus*

Atualmente a taxonomia do gênero *Citrus* não é um consenso estabelecido. Muitos dos pesquisadores que trabalham com este gênero utilizam o sistema Swingle, (SWINGLE, 1943; SWINGLE e REECE, 1967), que reconhece 16 espécie ou alguma das suas modificações que reconhecem 17 especies (STONE, 1994), 36 especies (HODGSON, 1967), ou 31 especies (SINGH e NATH, 1969). Em contraste, Tanaka, 1977 reconhece mais de 162 espécies de *Citrus*. Esta falta de concordância, na descrição do gênero, reflete a diferença de opinião entre os autores sobre se o grau de diferença entre as formas ocorrentes justifica o status de espécie ou híbridos naturais (Citrus & Date Crop Germplasm Committee, 2004).

O gênero *Citrus* compreende um grande número de espécies de importância econômica, dentre laranjas (*C. sinensis*), tangerinas (*C. reticulata* e *C. deliciosa*), limões (*C. limon*), limas ácidas (Tahiti) (*C. latifolia*) e o Limão Galego (*C. aurantiifolia*), e doces como a lima da Pérsia (*C. limettioides*), pomelo (*C. paradisi*), cidra (*C. medica*), laranja-azedada (*C. aurantium*) e toranjas (*C. grandis*) (MATTOS JUNIOR *et al.*, 2005). A complexidade filogenética e taxonômica, observada no gênero *Citrus*, é em grande parte devida às particularidades de sua biologia reprodutiva e a sua extensa história de cultivo (ARAÚJO *et al.*, 2005).

Swingle e Reece (1967) definiram as espécies deste gênero como árvores perenes, que apresentam copas com ramos angulares, espinhos axilares, folhas unilobadas, flores brancas e aromáticas, isoladas ou em grupos, em geral com 4-5 sépalas, 4-8 pétalas. Androceu constituído por numerosos estames ligados em feixes e o gineceu apresenta ovário único com 8-15 carpelos fusionados, contendo normalmente 4-8 óvulos. Os frutos, com cor e forma variadas, são envolvidos por uma casca coriácea. A polpa é constituída por vesículas de suco pedunculadas e ligadas à parede dorsal do loco. Seus septos carpelares são separados pelo endocarpo (albedo). As sementes, de formato obovóide a arredondado, podem conter de um a vários embriões. Estima-se que o gênero *Citrus* e seus correlatos originaram-se em regiões subtropicais e tropicais do continente asiático, nos arquipélagos

malaios, há cerca de 20 a 30 milhões de anos. A principal forma de evolução e dispersão das espécies foi por meio de sementes (WEBBER, 1967; CARVALHO, 2005).

As plantas cítricas possuem folhas persistentes (com exceção do *Poncirus trifoliata*) e há contínua substituição de folhas, à medida que as árvores crescem e até quando atinge seu máximo desenvolvimento. A queda de folhas velhas é superada pela formação de folhas novas no decorrer do ano. As folhas novas apresentam coloração verde-clara, porém *Citrus limon* e *Citrus medica* mostram coloração vermelha. As folhas de ramos frutíferos duram, em média, 15 meses (CASTRO *et al.*, 2002).

O sistema radicular da planta de *Citrus* localiza-se geralmente em sua maior parte (80%), no primeiro metro de profundidade e é responsável pela absorção da solução do solo (CASTRO *et al.*, 2002). O crescimento vegetativo em um ano é influenciado pelo efeito residual do crescimento da estação anterior e, em plantas jovens, determina seu tamanho final e a futura capacidade de frutificação (ORTOLANI *et al.*, 1991), além de modificações nas folhas (MOREIRA & PIO, 1991). O conteúdo de água nos frutos cítricos varia de 70 a 92%, dependendo das condições de seu desenvolvimento e da umidade disponível no solo e no ar (RODRIGUEZ, 1991).

As plantas cítricas apresentam bom desenvolvimento e produção entre 25 a 30 °C, durante o dia, e 10 a 15 °C, durante a noite (RODRIGUEZ, 1991). As áreas aptas à citricultura são aquelas entre 1.900 a 2.400 mm de precipitação por ano, com cerca de 1.300 mm por ano, no mínimo (PIZZETA, 1999). As laranjas e tangerinas se adaptam melhor às condições de temperaturas amenas e clima subtropical. A distribuição dos *Citrus* no mundo, apesar de altamente influenciada pelas condições climáticas, deu-se também em função de outros fatores, como culturais, socioeconômicos, políticos e tecnológicos (ORTOLANI *et al.*, 1991).

O clima interfere de forma decisiva no cultivo dos *Citrus* em todas as etapas da cultura. Tem influência na adaptação das variedades, no comportamento fenológico, na curva de maturação, na taxa de crescimento, nas características físicas e químicas da fruta e, portanto no potencial de produção. Em climas tropicais, como no Nordeste Brasileiro, os *Citrus* podem florescer várias vezes por ano (RODRIGUEZ, 1991).

Além das diferenças varietais, o clima, especialmente a temperatura, é fator condicionante da cor interna e externa da fruta cítrica. A intensidade da cor da epiderme está associada às temperaturas baixas, sobretudo às de valores mínimos inferiores a 13°C durante estágios de maturação (ORTOLANI *et al.*, 1991).

A propagação comercial dos *Citrus* é assexuada para a variedade copa, sendo o método da borbulhia o mais empregado, e sexuada para o porta-enxerto pelas vantagens associadas ao melhor desenvolvimento do sistema radicular. A ocorrência de poliembrionia possibilita a obtenção de plântulas de origem nucelar, de maneira que, mesmo envolvendo o uso de sementes, a propagação sexuada pode ser considerada assexuada (CARVALHO *et al.*, 2005).

A fisiologia dos *Citrus* é fundamental no estabelecimento de um manejo racional da cultura e orientadoras dos programas de melhoramento genético (MEDINA *et al.*, 2005). A temperatura exerce influência no desenvolvimento da planta de maneira que, temperaturas elevadas durante todo o ano estimulam o rápido crescimento, diversas florações e várias colheitas (COELHO *et al.*, 1981).

A estrutura da copa está relacionada com a eficiência com que as folhas interceptam e utilizam a radiação solar na fotossíntese, além disso, a forma da copa influencia no espaçamento entre as plantas. Existe uma grande variação no tamanho das folhas em função da idade da planta, sendo que as maiores folhas foram encontradas em plantas com três anos de idade. A área foliar mínima de 3,2 m² para produzir um quilo de fruto foi encontrada em árvores com nove anos de idade. O tronco adquire formas distintas e varia em função do gênero, da espécie, da variedade, da sanidade da planta e da combinação entre porta-enxerto e copa (CASTRO *et al.*, 2002).

Os cítricos utilizados em plantios comerciais como variedades copas estão, basicamente, distribuídos em seis grupos: laranjas, tangerinas, limões, limas ácidas, pomelos e outros de menor importância. No entanto, o grupo das tangerinas e seus híbridos ocupam posição de destaque em relação aos plantios comerciais de cítricos em todo o mundo (PIO, 2003).

Apesar dos avanços da citricultura nacional, existe pouca diversidade de variedades em cultivo (PIO *et al.*, 2005), não havendo também muito

investimento em cultivares apropriadas para mesa, devido ao fortalecimento da indústria de suco que é um dos principais fatores para essa não-modernização (BOTEON & NEVES, 2005).

As tangerinas apresentam pequena diversidade em São Paulo, reunindo apenas quatro variedades comerciais: tangerinas Poncã e Cravo, tangor Murcote e mexerica do Rio. A tangerina Poncã (*C. reticulata* Blanco) é a variedade mais cultivada no país, e o tangor Murcote (*C. reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osbeck) o principal híbrido de tangerina (FIGUEIREDO *et al.*, 2006). As variedades comercializadas no Brasil são poucas e a maioria é importada da Espanha e do Uruguai (PIO, 2007). Apesar disso, o Brasil ainda não produz tangerinas em escala comercial que são preferidas em mercados exigentes (PIO, 2003).

2.2. Aceroleira

A aceroleira (*Malpighia emarginata* DC., syn. *M. puniceifolia* L. ou *M. glabra* L.) é uma planta arbustiva encontrada de forma natural em diversas ilhas do caribe, na América Central e em regiões da Amazônia (CARRINGTON e KING, 2002). Pertence à família Malpighiaceae, com distribuição tropical e subtropical, possuindo cerca de 70 gêneros e aproximadamente 1200 espécies. No Brasil ocorrem 38 gêneros e aproximadamente 300 espécies (SOUZA e LORENZI, 2005). Do ponto de vista econômico, destaca-se a aceroleira (*Malpighia emarginata*), também conhecida como “Cereja-das-Antilhas”, “Barbados Cherry” e “West Indian Cherry”, que é cultivada visando o aproveitamento dos frutos, ricos em vitamina C.

A aceroleira já foi classificada como *M. puniceifolia* ou *M. glabra*, o que gerava bastante confusão em sua classificação botânica. Os taxonomistas Woodbury e Sawant do Departamento de Genética da Agricultural Experiment Station de Rio das Pedras, de Porto Rico, concluíram ser a aceroleira uma planta resultante da hibridação da *M. puniceifolia* e *M. glabra* (SIMÃO, 1971). Segundo Oliveira *et al.* (2003), estudos do Herbário de Linnaeus e de outras fontes demonstraram que a *M. puniceifolia* e *M. glabra* referem-se a uma mesma espécie, que produz frutos pequenos, insípidos e com pouco suco, distinta da aceroleira. A partir de 1986, o Comitê Internacional de Recursos Genéticos de Plantas (IBPGR), hoje Instituto Internacional para os Recursos Fitogenéticos

(IPGRI), adotou para a espécie, que é conhecida atualmente, a denominação *M. emarginata* D.C. (IBPGR, 1986).

A dispersão da aceroleira teve início antes da descoberta das Américas e contou com o auxílio dos nativos, que a transportavam de ilha em ilha, na Região do Caribe e também com o auxílio de pássaros (SIMÃO, 1971). Em 1880, a acerola foi introduzida na Flórida, através de Havana (Cuba) (SOARES FILHO *et al.*, 2003) e a seguir em outro países do Continente americano. Hoje, a acerola é cultivada no Brasil, Porto Rico, Cuba e Estados Unidos (Havaí e Flórida). Há também registro de cultivo na Venezuela, Colômbia, algumas ilhas do Caribe e países asiáticos (CARDOSO *et al.*, 2003).

Na região Nordeste, a cultura foi introduzida em 1958, pela professora da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Maria Celene Cardoso de Almeida, por meio de sementes trazidas de Porto Rico (SOARES FILHO e OLIVEIRA, 2003).

Atualmente, a cultura da aceroleira se distribui em distintas regiões brasileiras: Nordeste (Pernambuco, Bahia, Ceará, Sergipe, Alagoas, Paraíba, Rio Grande do Norte); Norte (Pará); Sul (Paraná) e Sudeste (São Paulo). Relata-se ainda a ocorrência de plantios bem sucedidos em regiões semi-áridas, desde que irrigados regularmente (KONRAD, 2002).

Tanto a acerola *in natura* como o seu suco natural, são também excelentes fontes de carotenóides precursores da vitamina A (MEZADRI *et al.*, 2005). Além de conterem quantidades consideráveis de vitaminas do complexo B como tiamina, riboflavina, niacina e ácido pantotênico. São também ricas em minerais como cálcio, ferro e fósforo (FREITAS *et al.*, 2006). Segundo Mezadri *et al.* (2006), a composição do fruto e de seus produtos depende das condições climáticas, do manejo do cultivo, da localização geográfica, da aplicação de defensivos, do estágio de maturação e do processamento e armazenamento.

A acerola pode apresentar, em sua composição, teores de ácido ascórbico que variam entre 1,0 e 3,0 g por 100 g de polpa. Tal variação deve-se a uma série de fatores, como variedade, estágio de maturação, época do ano da colheita, métodos culturais, disponibilidade de nutrientes do solo, clima, manuseio pós-colheita e condições de estocagem (FOLEGATTI e MATSUURA, 2003). De acordo com os resultados obtidos por Nogueira *et al.* (2002), o

conteúdo de vitamina C decresce com a maturação do fruto, independente da matriz estudada ou estação climática. Righetto *et al.* (2005) relataram conteúdo de vitamina C de 1,9 g/100 g para o suco com acerola imatura e 0,97 g/100 g para o suco de acerola madura. Assim, quando não há interesse no sabor ou aroma, acerolas imaturas podem ser usadas para obter produtos com elevado conteúdo de vitamina C.

A aceroleira, quando adulta, pode ser descrita como um arbusto de tamanho médio, de 2 a 3 metros de altura (SIMÃO, 1971), embora algumas plantas possam atingir cerca de 5 metros de altura. A estrutura da copa pode apresentar uma conformação globular, ereta ou intermediária, com muita ramificação, pouca ramificação ou ramificação intermediária. O caule e os ramos apresentam casca levemente rugosa, com coloração normalmente marrom nos ramos jovens e, acinzentada nos ramos mais velhos e caule (OLIVEIRA, *et al.* 2003).

As folhas são opostas, de pecíolo curto, ovaladas a elípticas (SIMÃO, 1971; OLIVEIRA *et al.*, 2003) com comprimento variando entre 2,5 a 9,0 cm e a largura entre 1,2 a 6,0 cm, a base e principalmente o ápice são agudos (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Apresentam-se inteiras, freqüentemente onduladas, exibindo coloração verde-escura e brilhante na parte superior e verde-pálida e opaca na parte inferior (SIMÃO, 1971; OLIVEIRA *et al.*, 2003); com pilosidade, de intensidade variável entre diferentes plantas e entre folhas de uma mesma planta, sendo mais intensa nas folhas jovens (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

As flores são hermafroditas, dispostas em pequenos cachos auxiliares pedunculados de três a cinco flores, medindo de 1 a 2 cm de diâmetro (SIMÃO, 1971). Antes da fecundação e dependendo do genótipo, as flores podem ser brancas, róseas-claras, róseas-escuras ou violetas, após a fecundação, estas últimas tornam-se brancas (OLIVEIRA *et al.*, 2003). O número de sépalas e glândulas que circundam a base da flor varia de 6 a 7 e de 9 a 10 respectivamente (GOMES, *et al.*, 2001). A corola é composta de cinco pétalas franjadas ou irregularmente dentadas, com garras finas. Há dez estames com os filetes unidos na parte basal (SIMÃO, 1971; FREITAS *et al.* 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2003) e as anteras apresentam fendas de deiscência longitudinal ou rimosas, com duas tecas (GOMES, *et al.*, 2001). O ovário é tri-carpelado,

globular e súpero, com um óvulo por lóculo e, três estiletos. Os estiletos atingem a mesma altura dos estames (FREITAS, *et al.* 1999) e apresentam a superfície receptiva do pólen voltada para o interior da flor (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

O fruto é do tipo drupa, variando em tamanho, forma e peso (SIMÃO, 1971), com superfície que varia entre lobulada, lisa e intermediária. Apresenta epicarpo fino, mesocarpo de células grandes, endocarpo constituídos de três caroços alongados e lignificados. A forma do fruto pode ser redonda, oval ou subglobosa com peso que varia de 3 a 16 g (OLIVEIRA *et al.* 2003). De acordo com os resultados obtidos por Musser *et al.*(2005), os frutos são, em média, mais largos que altos, variando de 1,74 a 2,07 cm no comprimento, e de 1,94 a 2,46 cm no diâmetro, o que define um formato, geralmente subgloboso. Eles dispõem-se isolados ou em panículas de duas ou três em axilas foliares em pedúnculos curtos (SIMÃO, 1971).

A casca do fruto imaturo normalmente é de cor verde, podendo também se apresentar alvacentos e verdes-roxeados. Os frutos maduros apresentam a casca predominantemente vermelha, podendo variar de vermelho-amarelada à vermelha-púrpura (OLIVEIRA *et al.*, 2003). A cor vermelha da acerola, no estágio maduro, é devido a presença de antocianinas (LIMA *et al.*, 2002). A polpa representa, em média, de 70 a 80% do peso total do fruto, podendo ser amarela, laranja ou vermelha, ácida ou sub-ácida, ligeiramente doce ou doce acidulada (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

O fruto da acerola apresenta três sementes pequenas, não albuminadas (COSTA *et al.*, 2003; OLIVEIRA, *et al.*, 2003), com uma pequena saliência na extremidade mais estreita, a radícula embrionária (OLIVEIRA, *et al.*, 2003). Essas sementes apresentam baixa porcentagem de germinação e, ainda, dependendo do grau de maturação do fruto, podem levar meses para germinarem. Sendo também comum a ocorrência de sementes inviáveis, em relação à futura germinação (COSTA *et al.*, 2003). De acordo com Simão (1971), menos de 20% das sementes possuem embriões. Costa *et al.* (2003) constataram que 34,87% delas apresentavam embriões normais, 44,13% possuíam embriões deformados e 21% não possuíam embriões.

3. Fruticultura no Brasil

O consumo mundial de frutas tem aumentado cerca de 5% ao ano, o que representa uma expansão de demanda comercial de um bilhão de dólares anuais, alcançando 22 bilhões de dólares por ano para a comercialização de frutas frescas (PEREIRA & ARAÚJO, 2002). A fruticultura brasileira está presente em todas as regiões do país, com pólos de produção consolidados em vários Estados. A produção anual brasileira varia de 38 a 41 milhões de toneladas de frutas, o que corresponde a US\$ 11 bilhões do Produto Interno Bruto (PIB) (Anuário Brasileiro da Fruticultura, 2007). A região Sudeste é responsável por aproximadamente 50% da produção brasileira em fruticultura e o Nordeste por 27% do total, dos quais grande parte é direcionada ao comércio exterior, e o Sul por 15% (AGROBRASIL, 2005).

3.1. Cultura do gênero *Citrus*

O consumo de frutas cítricas foi incrementado a partir de 1950, devido ao conteúdo de vitaminas e de substâncias minerais, tornando-se parte integrante da dieta alimentar em países mais desenvolvidos. Dessa forma, o consumo in natura e o mercado internacional de suco concentrado de laranja, tornaram-se mais expressivos (PIZETTA, 1999).

Em 2009 o Brasil produziu mais de 18 milhões de toneladas de laranja e a produção estimada para o ano de 2010 está em torno 19.068.761t com uma área plantada de pouco mais de 984 mil hectares (IBGE, 2010) sendo o maior produtor mundial (FAO, 2007).

Em 2004, o Brasil exportou cerca de 90 mil toneladas de laranja, 37 mil toneladas de limão/lima ácida Tahiti e 18 mil toneladas de tangerina in natura (BOTEON e NEVES, 2005). Em 2006, com mais de 50 mil toneladas exportadas, os negócios com a laranja *in natura* aumentaram 64% em volume e 85% em valor em comparação com 2005 (AGROBRASIL, 2006).

O volume de frutas frescas exportado pelo país não é mais expressivo devido à falta de tradição na produção de fruta para consumo in natura (RADMANN & OLIVEIRA, 2003; BOTEON & NEVES, 2005) e ao fato da maioria dos produtores destinarem sua produção às indústrias (BOTEON &

NEVES, 2005). Ao contrário do que acontece com o Uruguai onde mais de 90% da tangerina produzida se destina ao mercado externo (FACIO, 2006).

A citricultura está presente desde a Região Nordeste até o Sul do país, abrangendo diversos tipos de clima e altitude (SENTELHAS, 2005). Os principais municípios produtores de laranja se encontram em São Paulo, estado responsável por 79% de toda a produção brasileira. A exceção é o município baiano de Rio Real, o sexto maior produtor nacional, que responde por 38,86% da produção de laranja da Bahia (IBGE, 2004). Em 2009 o Brasil produziu mais de 18 milhões de toneladas de laranja e a produção estimada para o ano de 2010 está em torno 19.068.761t com uma área plantada de pouco mais de 984 mil hectares (IBGE, 2010). Em 2005, o estado de Pernambuco foi o 13º produtor de *Citrus* (laranja, limão e tangerina), com produtividade média de 38,51 ton/ha (IBGE, 2007).

A Região Nordeste é privilegiada para o cultivo de *Citrus* por estar mais próxima dos grandes mercados importadores (Europa e Estados Unidos), como também devido à ausência de doenças não endêmicas, o reduz o uso de defensivos agrícolas, fato importante para os pequenos agricultores que carecem de mais informações técnicas geradas pela Embrapa, empresas estaduais de desenvolvimento agropecuário e universidades. Segundo Passos *et al.*, (2005), o Município de Garanhuns e os municípios vizinhos do Agreste Meridional apresentam potencial de expansão para o cultivo de *Citrus* de mesa devido principalmente à altitude (acima de 700 m).

Entre a década de 1970 e 1980 houve um crescimento expressivo da citricultura onde 80% da produção eram destinadas à indústria e 20% para o consumo de frutas frescas (PIZETTA, 1999). Há produtores que diversificam sua comercialização com o mercado da fruta in natura. A partir do ano 2000, o mercado interno representou uma alternativa para o escoamento, aumentando, consideravelmente, a disponibilidade da fruta para este mercado. No entanto, o escoamento para o mercado interno pode ser mais difícil devido à maior concorrência com outros tipos de frutas disponíveis o ano todo e com excelente qualidade.

Para o desenvolvimento do mercado interno e de exportação da fruta fresca, deve-se observar a melhoria da qualidade, organização da comercialização, redução das barreiras tarifárias e fitossanitárias e

aproveitamento das oportunidades do mercado externo (BOTEON e NEVES, 2005).

A citricultura apresenta-se extremamente vulnerável porque os pomares comerciais são constituídos de poucas cultivares, tanto para copas como para porta-enxerto (MOREIRA & PIO, 1991), conseqüentemente, poucas são as chances de escolha para o consumidor brasileiro. As variedades de laranjas Pêra, Natal, Valência e Hamilin representam 92% da citricultura. No que concerne às tangerinas, somente a Murcote é exportada e com restrições devido ao número excessivo de sementes de seus frutos (PIO, 2003).

A presença de sementes em cultivares de *Citrus* destinados ao consumo de mesa é uma característica indesejável sob o ponto de vista comercial, pois a demanda por frutos sem sementes tem aumentado, principalmente no mercado internacional (RODRIGUES, *et al.*, 1999). A ausência de sementes é um dos objetivos que vem sendo buscado nos trabalhos de melhoramento (PIO *et al.*, 2005). As plantas de laranjeira Salustiana, de tangerineira Clemenules e do híbrido Ortanique produzem frutos sem sementes que apresentam grande aceitação no mercado internacional, e são cultivadas comercialmente em vários países (RADMANN & OLIVEIRA, 2003).

3.2. Cultura da Aceroleira

Devido ao seu elevado conteúdo de vitamina C, tem se observado uma crescente demanda pelo fruto da aceroleira por parte do consumidor (FREITAS *et al.* 2006). Nos últimos anos, o cultivo da acerola, vem se destacando no Brasil, principalmente pela adaptação da plantada ao clima tropical e subtropical. O Brasil é o maior produtor mundial de acerola, superando o Havaí (USA) e Porto Rico, que possuem mais tradição em relação à cultura (OLIVEIRA *et al.*, 1998). Estima-se que, no Brasil, a área planta com a cultura seja superior a 10.000 ha (SOARES FILHO e OLIVEIRA, 2003), sendo o Nordeste a principal região produtora com 7.236 ha (CARDOSO *et al.*, 2003), com um volume de produção superior a 60% do total nacional (SOARES FILHO e OLIVEIRA, 2003). Os pequenos produtores (pomares com menos de 20 ha) representam 65% da área planta no país, os médios produtores

(pomares entre 20 a 50 ha) 16% e os grandes produtores (pomares acima de 50 ha) 22%. Conforme os dados disponíveis, o volume de produção de acerola no Brasil é de aproximadamente 150 mil toneladas de frutos, estando a produtividade média em torno de 10 t/ha (OLIVEIRA *et al.*, 1998)

Quanto à produção de acerola, parte considerável não é aproveitada, visto que os frutos são altamente perecíveis, estimando-se em 40% as perdas pós-colheita. Cerca de 60% da produção são destinados ao mercado interno e 40% ao mercado externo. Estados Unidos da América, Alemanha, França, Japão, Países Baixos, Porto Rico, Barbados, Trinidad, Hungria, São Vicente, Coréia e Israel são importadores de acerola do Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 1998). O Japão tem sido o maior importador, e é também o intermediário da distribuição para a Europa (CARDOSO *et al.*, 2003).

4. Recursos Genéticos

Germoplasma vegetal são tecidos vivos de plantas dos quais novas plantas podem se originar. Estes tecidos contêm informação genética que dá as plantas suas características individuais e liga uma geração de plantas vivas à outra. A diversidade genética de plantas, originárias da evolução, hibridações, seleção natural e artificial, dão suporte para a produção mundial de alimentos. Esta diversidade é ameaçada pela perda de habitat, e uso de uma pequena quantidade de cultivares entre outros fatores.

As atividades de introdução, preservação e caracterização de germoplasma são prioritárias para a diversificação das espécies cultivadas e estudo do seu comportamento em diferentes ecossistemas. Situado em região tropical, o Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de *Citrus* pertencente à Embrapa Mandioca e Fruticultura procura dar ênfase a espécies e variedades adaptáveis a ambientes nela prevalentes, principalmente relacionados ao Norte e Nordeste brasileiros (Soares Filho, 1998).

O BAG de *Citrus* da Embrapa Mandioca e Fruticultura tem características peculiares: condições tipicamente tropicais (paralelo 12, latitude sul), sendo, talvez, a única experiência no mundo nesse tipo de ambiente. O BAG de *Citrus* tem sido utilizado como elemento de suporte ao Programa de

Melhoramento Genético (PMG) de *Citrus* da Embrapa Mandioca e Fruticultura, tanto na identificação de variedades promissoras nele introduzidas, copas e porta-enxertos, quanto apoiando a trabalhos de hibridação tendo como objetivo a criação de novas cultivares. Desta forma, os trabalhos de caracterização do germoplasma têm se concentrado em caracteres de interesse agrônomo, como tolerância à seca, tolerância ao alumínio, tolerância/resistência à gomose de *Phytophthora*, tolerância/resistência à “tristeza”, grau de poliembrionia, entre outros caracteres de interesse. Esta caracterização vem sendo feita com o auxílio de descritores mínimos definidos pela Embrapa Mandioca e Fruticultura e pelo *International Plant Genetic Resources Institute-IPGRI*, e pelo uso de marcadores moleculares e de técnicas de citogenética baseadas em bandeamento cromossômico (Soares Filho, 1998).

Em 1998, a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), iniciou o Programa de Melhoramento Genético da acerola (*Malpighia emarginata* D.C.), com a implantação de um Banco Ativo de Germoplasma com 12 acessos trazidos de regiões tradicionais produtoras, visando a caracterização e a seleção de genótipos mais promissores que poderão elevar o potencial de expansão da cultura na Zona da Mata do Nordeste Brasileiro. Em 2000, foram introduzidos mais 30 acessos, totalizando 42 (MUSSE, 2001). O banco encontra-se na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar do Carpina (E.E.C.A.C./UFRPE), município de Carpina- PE, latitude 7° 51' 04”, longitude 35° 14' 27” W, a 178m de altitude, onde, segundo a classificação de Köppen, predomina o tipo climático “AS” tropical chuvoso com verão seco (MUSSE *et al.*, 2005).

4.1. Melhoramento genético do gênero *Citrus*

No Brasil, os programas de melhoramento mais expressivos de *Citrus* encontram-se no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e na Embrapa, com ampla variabilidade genética conservada em bancos de germoplasma. Existem 3023 acessos de *Citrus* spp. e outros gêneros afins conservados em 4 coleções de germoplasma no país (FERREIRA, 1999). A conservação do germoplasma de *Citrus* tem papel fundamental nos trabalhos de diversificação

de cultivares copa e porta-enxerto, fornecendo os parentais necessários à obtenção de novas variedades.

O melhoramento de *Citrus* é de longo prazo devido à natureza da planta e suas características reprodutivas. Além de resistência a doenças, os aspectos de maior importância comercial no melhoramento de *Citrus* são a qualidade do fruto, aumento de produtividade e tolerância a estresses ambientais, especialmente salinidade (TEROL *et al.*, 2007). A avaliação desses aspectos é fundamental para o acompanhamento da adaptação e desenvolvimento do material antes da indicação para determinada região.

Segundo Sentelhas (2005), as plantas cítricas têm grande capacidade de se adaptarem a diferentes tipos de ambiente, porém apresentam como consequência variações nas repostas quanto à exigência hídrica (evapotranspiração, rendimento, fenologia); duração do ciclo e época de maturação dos frutos (coloração interna e externa e sabor). A avaliação de novas variedades requer observação durante um longo período e em diversas condições de meio ambiente. Os materiais que apresentam características promissoras devem ser colocados em ensaios de competição, os quais devem ser distribuídos em diversas regiões produtoras ou com potencial de produção (MOREIRA & PIO, 1991).

No melhoramento de *Citrus* é importante conhecer quais são os caracteres da variedade devido ao estágio juvenil da planta, além disso, reduzir o número de sementes em algumas variedades já em uso como Murcote, Mexerica, e em outras que poderão ser promissoras; selecionar variedades comerciais copas e porta-enxertos que atendam uma possível expansão da citricultura para áreas onde sua importância ainda é pequena (MOREIRA & PIO, 1991).

4.2. Melhoramento genético da aceroleira

A despeito de sua introdução no Brasil ter se dado em meados da década de 1950, somente no final dos anos 80 e início dos anos 90 houve um crescimento expressivo e ao mesmo tempo desordenado dos plantios de aceroleira, devido à grande demanda do produto apresentada pelo mercado interno e externo, em decorrência do seu alto teor de vitamina C. Como consequência, o interesse pelo desenvolvimento de variedades de acerolas,

adaptadas às condições de clima e solo locais. Sendo assim cultivo da acerola é uma atividade relativamente recente no Brasil, no qual ainda prevalecem características de alta variabilidade nos pomares, em função da maioria dos plantios terem sido originados a partir de mudas produzidas por sementes (CORDEIRO & RITZINGER, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 1998).

O Centro de Pesquisa do Trópico Semi-Árido (CPATSA) – Embrapa Semi-Árido, desde 1992, vem desenvolvendo pesquisas com aceroleira, visando introduzir, caracterizar, selecionar e difundir genótipos adequados e adaptados às condições endofoclimáticas da região, principalmente para as áreas de agricultura irrigada (GONZAGA NETO, 1999). No mesmo ano, a Universidade Estadual de Londrina também iniciou o programa de melhoramento da acerola, com a implantação de um pomar constituído de 31 genótipos, selecionados em plantios comerciais nos Estados do Paraná e São Paulo e propagados através de estaquia (CARPENTIERI-PÍPOLO *et al.* 2002).

As aceroleiras apresentam grande variabilidade genética como conseqüência da extensa propagação por sementes. Essa variabilidade genética é nitidamente observada em pomares comerciais que são formados basicamente por plantas obtidas através de sementes, com hábito de crescimento diferenciado e produção de frutos quantitativamente e qualitativamente heterogênea (CARPENTIERI-PÍPOLO *et al.*, 2002). Portanto, esses pomares são bastante desuniformes e conseqüentemente pouco produtivos. Segundo Musser *et al.* (2005), em plantios comerciais a produção média varia de 3 a 30 Kg/planta/ano. A variabilidade genética existente nos plantios comerciais é suficiente para permitir a identificação de genótipos agronomicamente superiores que, acompanhada do emprego de técnicas adequadas de manejo da cultura, poderá aumentar substancialmente a produtividade média dos pomares brasileiros (OLIVEIRA *et al.*; 1998).

Segundo Ritzinger *et al.* (2003), as plantas selecionadas devem reunir certas características consideradas essenciais, como elevada produção de frutos com tamanho variando entre médio e grande e com alto conteúdo de suco, teor de vitamina C acima de 1.000 mg de ácido ascórbico/100 g de polpa, casca vermelha para frutos de mesa, grossa, e polpa firme visando resistir a danos mecânicos durante a colheita e transporte.

Dependendo dos teores de sólidos solúveis totais (SST) e acidez total titulável (ATT) nos frutos maduros, as variedades de acerolas podem ser classificadas em doces, semi-doces e ácidas. Segundo Laskowski e Bautista (1998), citado por Ritzinger *et al.* (2003) as variedades doces apresentam valores de SST elevados, iguais ou superiores a 11 °Brix, e valores de ATT iguais ou superiores a 1% de ácido málico.

As variedades Acaal, Flor Branca, Jumbo Vermelhos, Okinawa, Rubi Tropical e Sertaneja, desenvolvidas por meio de clonagem de genótipos agronomicamente superiores, têm sido cultivadas no Vale do Rio São Francisco, nos Estados da Bahia, Minas Gerais, Pernambuco e Sergipe (RITZINGER *et al.*, 2003). Gonzaga Neto e Bezerra (2000) selecionaram a variedade Sertaneja que, nas condições de Pernambuco, apresenta teor de vitamina C superior a 1500 mg/100 g de polpa e produção de até 100 kg/planta/ano. Segundo Ritzinger *et al.* (2003) as variedades Jumbo Vermelho e Rubi Tropical foram provavelmente introduzidas do Havaí, e a variedade Okinawa do Japão.

No Estado do Pará, além da Flor Branca, são cultivadas as variedades Número 1, Inada Barbados e 54/02. Carpentieri-Pípolo *et al.* (2002) selecionaram as variedades Dominga, Lígia e Natália e recomendam para o plantio no Norte do Paraná, ou em regiões de clima semelhante. Na região de Junqueirópolis, Estado de São Paulo, é cultivada a variedade Oliver (KONRAD, 2002).

5. Marcadores Genéticos

Marcadores genéticos são regiões específicas de um cromossomo que podem auxiliar na análise genômica. Estes marcadores são divididos basicamente em dois tipos: marcadores morfológicos e os marcadores moleculares (KUMAR, 1999)

5.1. Marcadores Morfológicos

A principal característica destes marcadores é a possibilidade de monitorá-los visualmente sem a necessidade de técnicas moleculares ou bioquímicas. Características morfológicas que são controlados por um único locus podem ser usadas como marcadores genéticos devido à sua reprodutibilidade em diversos ambientes. No entanto, além do ambiente a expressão destes caracteres podem ser influenciadas por interações epistáticas e pleiotrópicas. O número de marcadores morfológicos disponíveis é muito limitado, além disso, estes marcadores são considerados dominantes, ou seja, é impossível distinguir indivíduos heterozigotos dos indivíduos homozigotos dominantes.

5.2. Marcadores Moleculares

A biotecnologia tem representado um importante papel na agricultura, sendo aplicada no estudo de células, em cultura de tecidos, para promover a rápida propagação de uma espécie, em diagnóstico de pragas e doenças, na engenharia genética, bem como em programas de melhoramento genético. Em várias metodologias, o monitoramento com marcadores moleculares, ao lado dos conhecidos marcadores morfológicos, trouxeram progressos significativos (KUMAR, 1999). A utilização de marcadores moleculares é uma ferramenta chave que possibilita aos programas de melhoramento determinar o mapeamento e diagnósticos genéticos, taxonomia molecular, análises de integridade genética e estudos evolutivos de macro e microrganismos. Alternativamente, o uso de marcadores genéticos baseados na identificação de polimorfismo de DNA, é utilizado pelo melhorista para criar um padrão genético próprio de cada cultivar (WÜNSCH e HORMAZA, 2007).

Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*; BOTSTEIN *et al.*, 1980) e minissatélites ou locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*; JEFFREYS *et al.*, 1985). Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo: RAPD (*Random Amplified*

Polymorphic DNA; WILLIAMS *et al.*, 1990), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*), Microsatélite (LITT e LUTY, 1989) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*; VOS *et al.*, 1995) (MILLACH, 1998).

A técnica de RFLP, desenvolvida por Botstein *et al.* (1980), é uma técnica elaborada, demorada em relação às outras técnicas para obtenção de resultados, tem um custo relativamente alto e tem revelado um grau de polimorfismo de intermediário a baixo, conforme a espécie. A metodologia RFLP utiliza enzimas de restrição que clivam o DNA diversas vezes em sítios específicos gerando fragmentos de tamanhos diferentes. Os marcadores de RFLP têm sido utilizados em estudos de mapeamento comparativo por causa da consistência dos resultados obtidos. Estes tendem a ser mais caros e mais difíceis de implementar em programas de melhoramento. Uma sonda RFLP é uma seqüência de DNA marcada que hibridiza com um ou mais fragmentos do DNA digerido, que em seguida são separados por eletroforese revelando um padrão característico para um genótipo específico e para um locus específico (NCBI, 2008).

A técnica de RAPD, dentre as apresentadas, é a de menor custo, número de etapas, tempo para obtenção dos resultados, sendo assim de fácil implementação. A técnica RAPD não necessita de um conhecimento prévio da seqüência de DNA do organismo alvo a ser amplificado. Esta técnica se utiliza de um pequeno *primer* (até 10 pb) que anela com o DNA molde em diferentes posições gerando assim um padrão de bandas. Contudo, ela tem a desvantagem de ser de repetibilidade baixa e pouco consistente de um laboratório para o outro, o que dificulta a comparação de dados obtidos em diferentes locais. Assim, cuidados devem ser tomados na padronização da técnica no laboratório para a caracterização de cultivares (MILLACH, 1998).

Marcadores SCAR são amplificados com *primers* específicos, desenvolvidos com base em seqüências já mapeadas ou caracterizadas (PARAN e MICHELMORE, 1993). Muitos desses *primers* são obtidos da conversão de marcadores RAPD em SCAR. Essa conversão em geral resulta na diminuição do nível de polimorfismo obtido por SCAR. Contudo, isso pode ser amenizado com a digestão com enzimas de restrição dos produtos amplificados e com o seqüenciamento das bandas monomórficas e subsequente desenvolvimento de *primers* que amplificam seqüências mais

variáveis entre os genótipos. A técnica de SCAR é muito semelhante à de RAPD, com a vantagem de ser mais consistente e desvantagem de envolver o desenvolvimento de *primers*, o que eleva o custo (MILLACH, 1998).

Os Microsatélites envolvem o desenvolvimento de *primers* específicos, que é um processo elaborado e caro por necessitar de um conhecimento prévio da seqüência de DNA do organismo alvo, mas uma vez que estes estejam disponíveis, o custo da técnica assemelha-se a de RAPD, com exceção de que os géis para resolver os fragmentos de DNA devem ser de policrilamida e esses são de custo mais elevado (MILLACH, 1998). Os marcadores SSR-microsatélites, por serem altamente polimórficos, co-dominantes e serem facilmente reproduzíveis e de fácil interpretação, com possibilidade de automação e análise, além de não necessitar de hibridização e de meios radioativos, vêm se destacando pelo seu uso na caracterização varietal e na possibilidade de transferibilidade entre espécies correlacionadas (FERNANDES-FERNANDEZ *et al.*, 2006).

A metodologia AFLP é a mais elaborada das técnicas de PCR e é protegida por patente. A técnica descrita por Vos *et al.* (1995), associa os polimorfismos gerados por enzimas de restrição com a capacidade de detecção da técnica de PCR. O DNA total é clivado por enzimas de restrição, originando um número extremamente elevado de fragmentos que, em função da concentração, não são detectados em eletroforese. Pequenas seqüências de DNA (adaptadores) são acopladas às extremidades desses fragmentos de restrição, as quais se anelam com *primers* específicos, durante a PCR (pré-amplificação e amplificação seletiva). Os fragmentos gerados são então separados por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (VOS *et al.*, 1995).

Dentre as técnicas citadas o AFLP é preferível por possuir grande capacidade para detecção de variabilidade genética e uso em caracterização de cultivares, dispensar prévio conhecimento das seqüências analisadas e ter uma boa repetibilidade. Por isto tem sido utilizado com sucesso em feijão-caupi para essa finalidade (COULIBALY *et al.*, 2002). Entre as vantagens do uso estão o alto grau de polimorfismo e o mais alto número de marcadores obtidos por gel analisado. Esses marcadores não são somente aplicáveis para estudos de diversidade genética, sendo também efetivos para identificação de parentais

utilizados em programas de melhoramento visando estabelecer variedades mais adaptadas a várias condições ambientais (MASSAWE *et al.*, 2002).

5.2.1 Marcadores Microsatélites

Genomas eucariotos apresentam uma alta frequência de seqüências simples repetidas, as quais consistem em um a seis nucleotídeos repetidos *in tandem*. Essas repetições recebem o nome de Microsatélites, SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou STR (*Short Tandem Repeats*) (POWELL *et al.*, 1996; OLIVEIRA, 2006).

De acordo com Weber (1990), os microsatélites podem ser classificados em três classes. (I) Perfeitos: quando a seqüência repetida não é interrompida por qualquer base que não pertença ao motivo; (II) Imperfeitos: quando existe entre os motivos, pares de bases que não correspondem ao mesmo; (III) Compostos: quando a seqüência contém duas seqüências distintas adjacentes.

Os microsatélites estão presentes por todo genoma, tanto em regiões codificantes quanto em regiões não codificantes e são caracterizados pelo alto polimorfismo que é decorrente das altas taxas de mutação que variam de loco para loco, numa taxa de 10^{-2} a 10^{-6} nucleotídeo por loco por geração (SCHLÖTERER, 2000). Morgante, Hanafey e Powell (2002) estimaram a densidade de microsatélites em *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Glycine max*, *Zea mays* e *Triticum aestivum*, que têm genomas haploides entre $1,25 \times 10^8$ a $5,6 \times 10^9$ e demonstraram que a frequência de microsatelites é significativamente maior em ESTs (seqüências expressas) do que no DNA genômico em todas as espécies estudadas.

Os microsatélites com motivos de dinucleotídeos, que são o tipo mais estudado, apresentam variações entre o DNA genômico e as seqüências expressas. As repetições AG/CT apresentam uma maior frequência dentro de ESTs em relação às repetições com o motivo AT. Os microsatélites com motivos de trinucleotídeos são particularmente abundantes em ESTs, principalmente em arroz (MORGANTE *et al.*, 2002).

As seqüências de DNA que flanqueiam os microsatélites são geralmente conservadas dentro de uma mesma espécie, e freqüentemente, entre espécies correlatas, permitindo a seleção de *primers* específicos que possibilitarão a

amplificação via PCR, de fragmentos de DNA repetitivo de diversos genótipos. Quando os microssatélites são individualmente amplificados, quase que invariavelmente demonstram polimorfismo para tamanho. Esta variação para tamanho é decorrente da variação do número de repetições dos motivos dentro da estrutura do microssatélite (MORGANTE e OLIVIERI, 1993; McCOUCH *et al.*, 1997; CREGAM *et al.*, 1999). Desta forma, vários alelos podem ser detectados para uma determinada população. Indivíduos homozigóticos possuem o mesmo número de repetições nos cromossomos homólogos, enquanto os indivíduos heterozigóticos possuem um número de repetições diferentes nos dois homólogos, sendo esta diferença identificada por este marcador, que é definido como co-dominante (OLIVEIRA, 2006).

A importância dos microssatélites reside em dois principais fatores: seu alto conteúdo informativo e a facilidade da genotipagem. A habilidade para distinguir dois indivíduos estreitamente relacionados é particularmente importante para muitas espécies cultivadas que tendem a ter uma estreita base genética (POWELL *et al.*, 1996).

Marcadores SSR tem sido utilizados com êxito para caracterização molecular em diversas fruteiras, como pêssegueira (BIANCHI *et al.*, 2004) e aceroleira (SALLA *et al.*, 2002), para a verificação da ocorrência de fecundação cruzada entre duas espécies do gênero *Theobroma* (Cacau) (FALEIRO *et al.*, 2003) e para construção de mapas genéticos em maracujá (OLIVEIRA, 2006)

5.2.2. Marcadores ISSR

Marcadores ISSR são marcadores baseados em microssatélites capazes de diferenciar indivíduos altamente aparentados. Esta técnica envolve amplificação de segmentos de DNA entre duas regiões de microssatélites idênticas. O ISSR-PCR utiliza um único *primer* com cerca de 16 e 25 pares de base. Este *primer* consiste em um di, tri, tetra ou penta nucleotídeos repetidos *in tandem* e com de dois a quatro nucleotídeos arbitrários degenerados na extremidade 3' ou 5'. Por estas características os marcadores ISSR combinam vantagens de metodologias como AFLP e SSR com a universalidade dos marcadores RAPD. Como desvantagem, estes marcadores compartilham a característica de dominância dos marcadores RAPD e AFLP (BORÉM e

CAIXETA, 2009; SHASAVAR *et al.*, 2007). Marcadores ISSR tem sido usados para caracterização de germoplasma (SHASAVAR *et al.*, 2007) e análise de diversidade (KUMAR, *et al.*, 2009) do gênero *Citrus*.

5.2.3. Marcadores RAPD

Marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (WILLIAMS *et al.*, 1990) ou AP-PCR (*Arbitrarily Primed PCR*) (WELSH e McCLELLAND, 1990) baseiam-se na utilização de um único *primer* com cerca de 10pb arbitrariamente determinados, visando a geração de um padrão de fragmentos amplificados de qualquer amostra de DNA. Frequentemente, um ou mais destes fragmentos são polimórficos, muitas vezes devido à mudança de apenas uma base no sítio de anelamento do *primer*. Deleções, e inserções também podem ser fontes dos polimorfismos detectados por estes marcadores. A característica básica dos marcadores RAPD é a sua dominância, o que impede a diferenciação de indivíduos homocigotos dominantes de indivíduos heterocigotos em uma população (BORÉM e CAIXETA, 2009).

No entanto, em alguns casos, pode ocorrer amplificação de marcadores co-dominantes, ou seja, a amplificação de ambos os alelos de um loco de um indivíduo diplóide heterocigoto, utilizando-se o mesmo *primer*. A co-dominância de marcadores RAPD resulta de pequenas inserções e deleções entre os dois sítios adjacentes de pareamento do *primer*. A detecção de marcadores RAPD co-dominantes só é possível ser feita pela análise dos produtos da amplificação de progênies segregantes lado a lado com seus dois genitores, no mesmo gel, para efeitos de comparação (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995; CAIXETA, *et al.*, 2006).

A facilidade de execução, a sua universalidade e a rapidez na obtenção de resultados estão entre as vantagens desta técnica. Aliada ao seu baixo custo e a não necessidade de mão de obra altamente especializada a tornam uma técnica indicada para análise de diversidade genética e caracterização de germoplasmas de diversas espécies (Borém e Caixeta, 2009; Dodgson *et al.* (1997). Esta metodologia tem sido utilizada para caracterização de frutíferas como no caso da aceroleira (MUSSER, 2001; SALLA *et al.*, 2002), bananeira (SOUZA, 2008) *Citrus*, (BASTIANEL *et al.*, 2001; SCHÄFER *et al.*, 2004) e maracujazeiro (BELLON *et al.*, 2007; JUNQUEIRA *et al.*, 2007).

6. Referencias Bibliográficas

AGROBRASIL Revista. **Balanço brasileiro do agronegócio 2005**: a retomada. p.106-108, 2005.

ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA 2007. Erna Regina Reetz [et al.]. Santa Cruz do Sul: Editora gazeta Santa Cruz, 2007. 136p.

ARAÚJO, E. F.; ROQUE, N. Taxonomia dos Citros. In: MATTOS Jr., D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M. POMPEU Jr., J. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e FUNDAG, 125-145p, 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY (AOAC). **Official methods of analysis**. 15.ed. Arlington: AOAC International, 1990.

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

BOTEON, M.; NEVES, E. M. Citricultura brasileira: aspectos econômicos. In: MATTOS Jr., D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M. POMPEU Jr., J. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e FUNDAG, 19-36p, 2005.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.I.; SKOLNIC, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man inusing restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Washington D.C., 32:314-331, 1980.

BOREM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. 2ª. Ed. UFV – Viçosa. 2009. 532p.

CARDOSO, C. E. L.; LOPES, R. L.; ALMEIDA, C. O. de. Aspectos econômicos. In: In: RITZINGER, R.; KOBAYASHI, A. K.; OLIVEIRA, J. R. P., ed. **A cultura da aceroleira**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, p.185-198. 2003.

CARPENTIERI-PÍPOLO, V.; PRETE, C. E. C.; GONZALEZ, M. G. N.; POPPER, I. O. Novas cultivares de acerola (*Malpighia emarginata* DC): UEL 3 – Dominga, UEL 4 – Lígia e UEL 5 – Natália. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 24, n. 1, p. 124-126, 2002.

CARRINGTON, C.M.S.; KING, R.A.G. Fruit development and ripenig in Barbados cherry, *Malpighia emarginata* D.C. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.92, n.1, p.1-7, 2002

CARVALHO, S. A.; GRAF, C. C. D.; VIOLANTE, A. R. Produção de material básico e propagação. In: MATTOS Jr., D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M. POMPEU Jr., J. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e FUNDAG, 279-318p, 2005.

CASTRO, P. R. C.; MARINHO, C. S.; PAIVA, R.; MENEGUCCI, J. L. P. Fisiologia da produção de citros. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v.23, n.216, p.26-38, 2002.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: UFLA, 2005. 785p.

CITRUS & DATE CROP GERMPLASM COMMITTEE. Citrus & Date Germplasm: Crop Vulnerability, Germplasm Activities, Germplasm Needs. **Citrus & Date Crop Vulnerability Statement**, 2004. disponível em http://www.ars-grin.gov/npgs/cgc_reports/citrusdate2004.pdf

COELHO, Y. S.; PASSOS, O. S.; CALDAS, R. C. Efeitos do clima sobre a maturação da laranja "Bahia". In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 6, 1981, Recife, PE. **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Fruticultura, p.615-625, 1981.

CORDEIRO, Z.J.M.; RITZINGER, R. Doenças e seu controle. In: RITZINGER, R.; KOBAYASHI, A.K.; OLIVEIRA, J.R.P. (Ed.). **A cultura da aceroleira**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. p.111-118.

COULIBALY, S.; PASQUET, R.S.; PAPA, R.; GEPTS, P. AFLP analysis of the phenetic organization and genetic diversity of *Vigna unguiculata* L. Walp. reveals extensive gene flow between wild and domesticated types. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, 104:358–366, 2002

CREGAN, P.B; MUDGE, J.; FICKUS, E. W.; MAREK, L.F.; DANESH, D.; DENNY, R.; SHOEMAKER, R.C.; MATTHEWS, B.; JARWIK, T; YOUNG, N.D. Targeted isolation of simple sequenc repeat markers through the use of bacterial artificial chromosomes. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.98, p.919-928, 1999.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus Rosário**, v. 1, p. 13-15, 1991.

FACIO, S. L. Poda já é uma realidade. **Ciência & Prática**. n.23, 23-24 p. 2006. FERREIRA, F. R. (editor). Workshop para Curadores de Bancos de Germoplasma de Espécies Frutíferas (1997: Brasília), **Anais...** Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. 190p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO) Orange Production, 2007 Disponível em <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> acesso em Maio de 2010

FERNANDES-FERNANDEZ, F.; HARVEY, G. & JAMES, C.M. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers from European pear (*Pyrus communis* L.). **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 1039-1041. 2006.

FIGUEIREDO, J. O.; NEGRI DE, J. D.; MATOS JUNIOR, D.; PIO, R. M.; AZEVEDO, F. A.; GARCIA, V. X. P. Comportamento de 16 porta-enxertos para

o tangor Murcott na região de Itirapina-SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal. v.28, n.1, p.76-78, 2006.

FREITAS, C. A. de; MAIA, G. A.; COSTA, J. M. C. da; FIGUEIREDO, R. W. de; SOUZA, P.H. M. de. Acerola: produção, composição, aspectos nutricionais e produtos. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 12, n. 4, p. 395-400, 2006

FOLEGATTI, M. I. da S.; MATSUURA, F. C. A. U. Produtos. In: RITZINGER, R.; KOBAYASHI, A. K.; OLIVEIRA, J. R. P., ed. **A cultura da aceroleira**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. p.164-184.

GOMES, J. E.; PAVANI, M. do C. M. D.; PERECIN, D.; MARTINS, A. B. G. Morfologia floral e biologia reprodutiva de genótipos de acerola. **Scientia Agricola**. Piracicaba, v. 58, n. 3, p. 519-523, 2001.

GONZAGA NETO, L. Melhoramento genético da aceroleira na Embrapa Semi-Árido. In: QUEIRÓZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S.R.R., ed. **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste brasileiro**. (on line). Versão 1.0. Petrolina-PE: Embrapa Semi-Árido / Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, nov. 1999. Disponível via Word Wide Web <http://www.cpatia.embrapa.br>. ISBN 85-7405-001-6. Acesso em: 23 jul 2007.

GONZAGA NETO, L.; BEZERRA, J.E.F. Acerola Sertaneja In: **Novas variedades Brasileiras de Frutas**, Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2000. p. 26-27

HODGSON, R.W.; Horticultural varieties of citrus. Pp 431-591 in: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (eds). *The Citrus Industry*. Vol I. History, World Distribution, Botany, and Varieties. **University of California**, Div of Agricultural Sci, Berkeley, 1967.

IBGE. Comunicação Social. Produção Agrícola Municipal – 2003. <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/25112004pam.shtm>. Acesso em 14/01/2007.

IBGE. Produção Agrícola Municipal. Rendimento médio de lavouras permanentes em 2005. <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl1.asp?z=t&o=10&i=P> . Acesso em 15/01/2007.

IBPGR (INTERNATIONAL BOARD OF PLANT GENETIC RESOURCES). *Malpighia emarginata* (Acerola). In: **Genetic resources of tropical and subtropical fruits (excluding musa)**. Roma: IBPGR, 1986. p. 52-54.

IPGRI. **Descritores para los cítricos. Citrus spp**. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia. 2000. 63p.

JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. **Nature**, Londres. 316:76-79, 1985

KONRAD, M. **Efeitos de sistemas de irrigação localizada sobre a produção e qualidade da acerola (*Malpighia spp*) na região da Nova Alta Paulista.**

2002. 119 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de concentração: Sistema de Produção). Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” Faculdade de Engenharia – Campus de Ilha Solteira.

KUMAR, L. S. DNA markers in plant improvement: an overview. **Biothechnology Advances**, new york 17: p.143-182, 1999.

LINS, C. J. C. et al. Programa de ação para o desenvolvimento da Zona da Mata do Nordeste. Recife, SUDENE/DPO/SER, 166 p. 1999

LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics** Washington D.C., 44:388-396, 1989.

MASSAWE, F.J.; DICKINSON, M.; ROBERTS, J.Á.; AZAM-ALI, S.N. Genetic diversity in bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc) landraces revealed by AFLP markers. **Genome** 45: 1175-1180, 2002.

MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI J. D.; FIGUEIREDO, J. O.; POMPEU JUNIOR, J. CITROS: principais informações e recomendações de cultivo. Texto preparado para a versão eletrônica do **Boletim Técnico 200 (IAC)**, 2005
Disponível em <http://www.iac.sp.gov.br/Tecnologias/Citros/Citros.htm>

MATTOS JUNIOR., D.; QUAGGIO, J. A.; CANTARELLA, H. Calagem e adubação dos citros. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.22, n.209, p.39-46. 2001.

MEDINA, C. L.; RENA, A. B.; SIQUEIRA, D. L.; MACHADO, E. C. Fisiologia dos citros. In: MATTOS Jr., D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M. POMPEU Jr., J. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e FUNDAG, p.147-195, 2005.

McCOUCH, S.R.; CHEN, X.; PANAUD, O.; TENBYKH,S.; XU, Y.; CHO, Y.G.; HUANG, N.; ISHII, T.; BLAIR, M. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetic and breeding. **Plant Molecular Biology**, Oxford, v.35, p.89-99, 1997

MEZADRI, T; PÉREZ-GÁLVEZ, A.; HORNERO-MÉNDEZ, D. Carotenoid pigments in acerola fruits (*Malpighia emarginata* DC.) and derived products. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, 220:63–69, 2005.

MEZADRI, T; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S.; VILLAÑO, D.; GARCÍA-PARRILLA, M. C.; TRONCOSO, A. M. El fruto de la acerola: composición y posibles usos alimenticios. **Alan**, Caracas, v.56 n.2 , p.101-109, 2006.

MILLACH, S. C. K. Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas. In: QUEIROZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R., (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o**

Nordeste Brasileiro. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Disponível em <http://www.cpatsa.embrapa.br>

MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature**, Londres v.3, 2002.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M PCR-amplified microsatellites as markers in plants genetics. **The Plant Journal**, Gainesville, v.3, p.175-182, 1993

MOREIRA, C. S.; PIO, R. M. Melhoramento de citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F. POMPER JR., J.; AMARO, A.A. **Citricultura Brasileira**. Fundação Cargill, 2ed. v.1, 1991.

NASCIMENTO, A. S.; MAGALHÃES, A. F. J.; AZEVEDO, C. L. L.; ALMEIDA, C. O.; COELHO, E. F.; SANTOS FILHO, H. P.; CARVALHO, J. E. B.; SOUZA, L. D.; PEREIRA, M. E. C.; FOLEGATTI, M. L. S.; PASSOS, O. S.; COELHO, Y. S. **Produção Integrada de Citros** – BA. Versão eletrônica Dez/2003. <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Citros/CitrosBahia.htm>. Acesso em 20 de janeiro de 2007.

NASCIMENTO, A.S.; SIMÕES, J.C.; KATO, C.M.; FOUREAUX, L.V. Manejo integrado de pragas dos citros. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, V.22, n.209. p.71-77. 2001

NATIONAL CENTER BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI) www.ncbi.nlm.nih.gov (consultado em 18 de fevereiro de 2008)

NOGUEIRA, R. J. M. C.; MORAES, J. A. P. V. de; BURITY, H. A.; SILVA JÚNIOR, J. F. da. Efeito do estágio de maturação dos frutos nas características físico-químicas de acerola. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 4, p. 463-470, 2002.

OLIVEIRA, J. R. P.; SOARES FILHO, W. dos S. S.; KOBAYASHI, A. K.; RITZINGER, R. Aspectos botânicos. In: RITZINGER, R.; KOBAYASHI, A. K.; OLIVEIRA, J. R. P., ed.. **A cultura da aceroleira**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. p.17-23.

OLIVEIRA, J. R. P.; REINHARDT, H. D.; SOARES FILHO, W. dos S. Colheita. In: RITZINGER, R.; KOBAYASHI, A. K.; OLIVEIRA, J. R. P., ed. **A cultura da aceroleira**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. p.145-163

OLIVEIRA, E. J. **Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites para construção e integração de mapas genéticos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Deg.*)**. Universidade de São Paulo, Piracicaba 2006 (Tese de doutorado), 152p.

OLIVEIRA, R. P., SCIVITTARO, W. B., VILDOSO, C. I. A., NAKASU, B. H. **Manual técnico sobre o cancro cítrico**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2001, 24p. (Embrapa Clima Temperado. Circular Técnica, 27).

ORTOLANI, A.A.; PEDRO JUNIOR, M.J.; ALFONSI, R.R. Agroclimatologia e o cultivo dos citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F. POMPER JR., J.; AMARO, A.A. **Citricultura Brasileira**. Fundação Cargill, 2ed. v.1, 1991.

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

PARRA, J.R.P.; LOPES, J.R.S., ZUCCHI R.A.; GUEDES J.V.C.. Biologia de insetos-praga e vetores. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J.D. ; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**. 1. ed. Campinas: Instituto Agronômico e Fapesp. p. 655-687, 2005

PASSOS, O. S.; ALMEIDA, C.O.; PEIXOUTO, L. S. Potencialidade da Chapada Diamantina para citricultura. **Bahia Agrícola**. v.7, n.1. 2005.

PASSOS, O. S. *et al.*, Certificação e Diversificação da Citricultura do Nordeste Brasileiro. Comunicado técnico 101 **Embrapa Mandioca e Fruticultura**, Cruz das Almas-BA, 2004.

PEREIRA, J.; ARAÚJO, S. C. B. Desenvolvimento de material propagativo adequado à certificação de mudas de plantas frutíferas. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v.23, n.216, p.7-11, 2002.

PIO, R. M. A qualidade e as exigências do mercado de Tangerinas. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.25, n.3, p. 375-558. 2003.

PIO, R. M. Beleza e manejo. **Frutas e Derivados**. IBRAF. Ano 2, Ed. 6, p.24-25, 2007.

PIO, R. M.; FIGUEIREDO, J. O.; STUCHI, E. S.; CARDOSO, S. A. B. Variedades copa. In: MATTOS Jr., D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M. POMPEU Jr., J. **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico e FUNDAG, 37-60p, 2005.

POWELL, W.; MACHRAY, G.C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.1, p.209-245, 1996.

PIZETTA, L. C. Cultura de citros. Jaboticabal: Funep, 1999. 147p.

RADMANN, E. B.; OLIVEIRA, R. P. Caracterização de cultivares apirênicas de citros de mesa por meio de descritores morfológicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.9, p.1123-1129, 2003.

RIGHETTO, A. M.; NETTO, F. M.; CARRARO, F. Chemical composition and antioxidant activity of juices from mature and emature acerola (*Malpighia emarginata* DC). **Food Science and Technology International**, Londres, v.11, 315-321, 2005.

RITZINGER, R.; SOARES FILHO, W. dos S.; OLIVEIRA, J. R. P. Variedade e melhoramento. In: RITZINGER, R.; KOBAYASHI, A. K.; OLIVEIRA, J. R. P., ed **A cultura da aceroleira**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. p.65-72.

RODRIGUES, L. R.; DORNELLES, A. L. C.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Poliembrionia e Número de Sementes por Fruto de Quatro Cultivares de tangerineira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 3, p. 469-474, 1999.

RODRIGUEZ, O. Aspectos fisiológicos, nutrição e adubação dos citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F. POMPER JR., J.; AMARO, A.A. **Citricultura Brasileira**. Fundação Cargill, 2ed. v.1, 1991.

ROSSETTI, V. Doenças dos citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F. POMPER JR., J.; AMARO, A.A. **Citricultura Brasileira**. Fundação Cargill, 2ed. v.1, 1991.

SCHÄFER, G.; BASTIANEL, M.; DORNELLES, A. L. C. Diversidade genética de porta-enxertos cítricos baseada em marcadores moleculares RAPD. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.5, p.1437-1442, 2004

SHAHSAVAR A.R.; IZADPANAH K.; TAFAZOLI, E.; SAYED TABATABAEI, B.E. Characterization of citrus germplasm including unknown variants by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam v.112, 310–314, 2007

SCHLÖTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellites DNA. **Chromossoma**, Berlin, v.109, p.365-371, 2000.

SENTELHAS, P. C. Agrometeorologia dos Citros. In: MATTOS Jr., D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M. POMPEU Jr., J. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e FUNDAG, 317-344p, 2005.

SIMÃO, S. Cereja das Antilhas. In: SIMÃO, S. **Manual de fruticultura**. São Paulo: Ceres, 1971. p. 477-485

SINGH, R.; NATH, N. Practical approach to the classification of citrus. Proc, **1st Intl Citrus Symposium**, 435-440, 1969

SOARES FILHO, W. dos S., OLIVEIRA, J. R. P. Introdução. In: RITZINGER, R.; KOBAYASHI, A. K.; OLIVEIRA, J. R. P., ed. **A cultura da aceroleira**. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, 2003. p.15-16.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: **Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas na flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 640p.

SOUZA, C.M.P.; VIANA, A. P.; FERREIRA, C. F.; SILVA, S. O.; CARVALHO, A. J. C.; BERBERT, P.A.; SOUSA, E. F. Avaliação da dissimilaridade genética em genótipos de Bananeira (*musa spp.*) via marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 30, n. 2, p. 419-424, 2008

STONE, B.C. Citrus fruits of Assam: a new key to species, and remarks on *C. assamensis* Bhattacharya and Dutta, 1956. **Gardens' Bulletin** (Singapore) n. 46, p.105-112, 1994.

SWINGLE, W.T. The botany of citrus and its wild relatives of the orange subfamily. in: WEBBER, H.J; BATCHELOR, L.D. eds. **The Citrus Industry**. History, Botany, and Breeding. **University of California Press**, Berkeley, 1943, Pp 129-474, Vol I.

SWINGLE, W.T.; REECE, P.C. The botany of citrus and its wild relatives. in: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. eds. **The Citrus Industry**. History, World Distribution, Botany, and Varieties. **University of California Div of Agr Sci**, Berkeley, 1967, Pp 190-423, Vol I.

TANAKA, T. Fundamental discussion of citrus classification. **Studia Citrologica**, 14:1-6. 1977.

TEROL, J.; CONESA, A; COLMENERO, J.M.; et al. Analysis of 13000 unique Citrus clusters associated with fruit quality, production and salinity tolerance . **BGM Genomics**, v.8, n.31, 2007.

VALE, A. A. S.; SANTOS, C. D.; ABREU, C. M. P.; CORRÊA, A. D.; SANTOS, J. A. Alterações Químicas, Físicas e Físico-Químicas da Tangerina Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco) Durante o Armazenamento Refrigerado. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n.4, p. 778-786, 2006.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M. van de LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Londres, v.23, n.21, p.4.407-4.414, 1995.

ZAMBOLIM, L. **Manejo integrado: produção integrada: fruteiras tropicais: doenças e pragas**. Viçosa, MG, 2003. 587p

WEBER, J. L. Informativeness of human (dC-dA)_n (dG-dT)_n polymorphisms. **Genomics**, San Diego, v.7, p.524-530, 1990.

SCHLÖTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellites DNA. **Chromossoma**, Berlin, v.109, p.365-371, 2000.

WILLIAMS, J., KUBELIK, A., LIVAK, K., RAFALSKI, A.; TINGEY, S. DNA polymorphism amplified by arbitrary *primers* are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Londres, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WÜNSCH, A.; HORMAZA, J.I. Characterization of variability and genetic similarity of European pear using microsatellite loci developed in apple. **Scientia horticultrae**, Amsterdam, v.113, p. 37-43.2007

Capitulo III

Marcadores moleculares RAPD como sinalizador da variabilidade genética em genótipos do BAG de acerola da UFRPE

Trabalho a ser enviado para a **Revista Brasileira de Fruticultura**

Marcadores moleculares RAPD como sinalizador da variabilidade genética em genótipos do BAG de acerola da UFRPE

Moraes Filho, Rômulo Maciel de¹; Martins, Luíza Suely Semen²; Musser, Rosimar dos Santos³; Montarroyos, Angélica Virgínia Valois⁴; Silva, Edson Ferreira da⁵.

¹Mestrando do Curso de Melhoramento Genético Vegetal/UFRPE, romulommfilho@yahoo.com.br

²Professora Associada – Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Bairro: Dois Irmãos, CEP:52171-900, Recife-PE. Autor para correspondência. luiza@db.ufrpe.br

³Professora Associada - Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, rmusser@depa.ufrpe.br

⁴Professora Adjunta - Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, angelicavalois@gmail.com

⁵Professor Adjunto - Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco. edson@db.ufrpe.br

Resumo

O Brasil é o maior produtor mundial de acerola (*Malpighia emarginata* D.C.), sendo o Nordeste a região que mais se destaca, com produção superior a 60% do total nacional. Diante da necessidade de identificar materiais genéticos mais promissores, a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) implantou em julho/1998 um Banco Ativo de Germoplasma (BAG) localizado na Estação Experimental de Cana-de-açúcar de Carpina (EEAC)/UFRPE, possuindo atualmente 42 acessos. Estes foram analisados usando marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Dos quinze *primers* foram obtidos 182 marcadores. Destes, 166 demonstraram polimorfismo (91,2%) e 16 foram monomórficos. As aceroleiras apresentam grande variabilidade genética, nitidamente observada nos pomares comerciais, como consequência da extensa propagação por sementes, o que gera pomares desuniformes e pouco produtivos. Os marcadores obtidos foram analisados, usando o método de agrupamento UPGMA. Os coeficientes de similaridade genética variaram de 0,56 (acessos 005APE e 040CMF) a 0,90 (028-CMF e 030-CMF e 026-CMF e 027-CMF). Os genótipos estudados foram classificados em dois grandes grupos, dois subgrupos e cinco agrupamentos menores, reunindo os acessos que compartilham características químicas, morfológicas e de produção. Observou-se uma relação inversa entre a produção de vitamina C e a produtividade, pois de um modo geral, genótipos mais produtivos apresentam menores índices de ácido ascórbico, enquanto os que produzem frutos mais

ricos em vitamina C, têm baixa produção de fruto. A análise dos resultados revelou, através da diversidade genética dos acessos, que este BAG apresenta considerável variabilidade genética, podendo ser fonte de genes muito importantes no estudo de melhoramento genético da cultura, viabilizando um planejamento adequado dos cruzamentos a serem realizados, otimizando as combinações genéticas superiores na indicação de genótipos bem adaptados as condições ambientais regionais.

Termos para indexação: *Malpighia emarginata* D.C., Aceroleira, Variabilidade genética, Banco ativo de germoplasma.

Abstract

Brazil is the world's largest producer of acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) where the Northeast region stands out, with production of over 60% of the national total. Faced with the need to identify the most promising genetic materials, the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE) implanted in a July/1998 an Active Germplasm Bank (BAG) located at the Experimental Station Cane sugar of Carpina (EEAC) / UFRPE, which currently has 42 access. These were analyzed using RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). The fifteen *primers* used showed good amplification, identifying 182 markers. Among these markers, 166 showed polymorphism (91.2%) and 16 were monomorphic. The acerola presents great genetic variability, clearly seen in commercial orchards, as a result of extensive seed propagation, which causes non uniform and unproductive orchards. These markers were analyzed using the UPGMA clustering method. The genetic similarity coefficients ranged from 0.56 (005APE and 040CMF access) to 0.90 (028-CMF and 030-CMF and 026-CMF and 027-CMF). The genotypes were classified into two groups, two subgroups and five smaller groups, gathering hits that share chemical, morphological and production, noting that individuals with higher production of fruits had the lowest levels of vitamin C. It was observed an inverse relationship between the production of vitamin C and productivity, because in general, higher yielding genotypes had lower levels of ascorbic acid, while those that produce fruits rich in vitamin C, have low production of fruit. The analysis of the results revealed, by genetic diversity of the access, that BAG has considerable

genetic variability, which may be a source of very important genes in the study of genetic improvement of acerola, enabling proper planning of crosses to be performed, optimizing the genetic combinations higher in the statement of genotypes well adapted to regional environmental conditions.

Index terms: *Malpighia emarginata* DC, acerola, genetic variability, Active Germplasm Bank.

Introdução

A acerola (*Malpighia emarginata* DC.), ou cereja da Antilhas, é nativa da América Central, incluindo as Antilhas e norte da América do Sul (Colômbia e Venezuela). Desenvolve-se bem em clima tropical e subtropical, com temperaturas médias anuais variando entre 25 a 27°C e precipitações entre 1200 e 1800 mm anuais bem distribuídos. Adapta-se aos mais variados tipos de solo, preferindo os profundos, argilo-arenosos de boa fertilidade e drenagem satisfatória (COUCEIRO, 1985). Seus frutos possuem quantidades consideráveis de vitamina A, B₁, B₂ e B₆, além de cálcio, fósforo, ferro e sódio (GONZAGA NETO, 1995). É uma planta que frutifica 3 a 4 vezes por ano em condições de clima tropical, com boa distribuição de chuvas (SIMÃO, 1971; COUCEIRO, 1985). De acordo com Manica et al (2003), os países produtores de acerola são: Barbados, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Cuba, Estados Unidos, Guiana Francesa, Filipinas, Haiti, ilhas do Mar do Caribe, México, Peru, Suriname, Venezuela, Vietnã e alguns países da África. Os Estados Unidos, Japão, Holanda, Alemanha e França, destacam-se como maiores importadores de acerola.

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas e o décimo quinto maior exportador, com 918 mil toneladas de frutas exportadas em 2007 (PORTAL DO AGRONEGÓCIO, 2010). Dentre as frutas produzidas no Brasil, a acerola, vem ganhando cada vez mais espaço no mercado, destacando-se como o maior produtor, exportador e consumidor da fruta (JUNQUEIRA *et al.*, 2004). O cultivo da aceroleira no Brasil teve início na década de 50 com a chegada das primeiras sementes trazidas das Antilhas e dos Estados Unidos. Nos anos 80 esta cultura ganhou um grande impulso devido à descoberta do elevado teor de vitamina C contido em seus frutos, podendo chegar a 5g/100g de polpa o que corresponde a até 80 vezes a quantidade encontrada em limões e laranjas (JUNQUEIRA *et al.*, 2002 ; MUSSER, 2001).

O Brasil apresenta condições ideais para o cultivo da acerola, sendo que uma das grandes vantagens do cultivo dessa frutífera é o elevado número de safras/ano, sendo geralmente quatro por ano, podendo chegar a sete safras no caso de cultivos irrigados (JUNQUEIRA *et al.*, 2004). A aceroleira é cultivada em diversos Estados brasileiros destacando-se Pernambuco, Bahia, Ceará, Sergipe, Alagoas, Paraíba, Rio Grande do Norte na Região Nordeste, Pará na

Região Norte, Paraná na Região Sul e São Paulo na Região Sudeste. A cultura se desenvolve bem em regiões semi-áridas desde que sob regime de irrigação a exemplo do Submédio São Francisco, região de grande destaque nesta atividade agrícola (JUNQUEIRA *et al.*, 2002; KONRAD, 2002). A utilização de novos cultivares, as crescentes aplicações de nutrientes juntamente com a prática da irrigação têm sido responsáveis por um grande aumento na produtividade dos pomares comerciais.

Em termos alimentares, a acerola desperta interesse pela gama de subprodutos industrializados como geléias, compotas, pastas, licores, sorvetes, entre outros, que podem ser produzidos conservando parte da riqueza vitamínica. Socialmente tem um papel destacado na nutrição e saúde da população brasileira, por ser uma excelente fonte natural, principalmente de vitamina C, considerando que as classes menos favorecidas, possuem uma dieta pobre e desequilibrada (FERREIRA *et al.*, 1987).

No Brasil, existem poucas variedades recomendadas à disposição dos produtores, o que tem sido apontado como um fator limitante para a cultura, devido à grande desuniformidade das lavouras, formadas na maioria das vezes por materiais de origem desconhecida (SALLA *et al.*, 2002). No que diz respeito à diversidade genética, Konrad (2002) e Musser (2001) relatam que a espécie tem demonstrado possuir grande diversidade de fenótipos e uma ampla variabilidade genética.

No ano de 1998, a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) implantou no município de Carpina, na Zona da Mata de Pernambuco, um Banco Ativo de Germoplasma (BAG) constituído por 42 acessos, os quais foram coletados em diferentes regiões produtoras do Brasil e no exterior, objetivando a indicação de genótipos promissores para o Estado de Pernambuco (MUSSER, 2001).

De acordo com Teixeira e Azevedo (1994), a aceroleira suporta períodos de acentuadas deficiências hídricas, desde que atendidas as necessidades térmicas da planta, apresentando uma boa produção numa faixa de 1.200 a 2.000 mm anuais de chuva. Manica *et al.* (2003) afirmam que a presença de umidade no solo associada à temperatura elevada evita que a planta entre em repouso, vegetando e florescendo normalmente, ampliando o período produtivo, recomendando assim a possibilidade do uso da irrigação em

períodos secos. Segundo Lima (2006), busca-se hoje, a formação de pomares com produção acima de 100 kg/planta/ano, frutos com 8-10 g cada, com polpa avermelhada e teor de vitamina C superior a 2000 mg/100g de suco. Entretanto, a produtividade média nacional chega apenas a de 40 kg/planta/ano (RITZINGER e RITZINGER, 2004).

A utilização de marcadores moleculares tem despontado como uma ferramenta que pode ser usada no melhoramento genético de plantas visando o mapeamento de genes, diagnósticos de doenças, estudos taxonômicos e evolutivos e na criação de um padrão genético próprio de cada cultivar (*fingerprinting*) (WÜNSCH e HORMAZA, 2007).

De acordo com Dodgson *et al.* (1997), os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) baseiam-se na utilização de seqüências curtas de oligonucleotídeos, também conhecidas como *primers*, em reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), visando a geração de um padrão de fragmentos amplificados de qualquer amostra de DNA. Frequentemente um ou mais destes fragmentos são polimórficos, muitas vezes devido à mudança de apenas uma base no sítio de anelamento do *primer*, e podem ser mapeados geneticamente. O RAPD é uma técnica rápida, simples, eficiente e de baixo custo podendo ser utilizada para análise de diversidade genética e caracterização de germoplasma, como no caso da aceroleira (MUSSER, 2001; SALLA *et al.*, 2002), bananeira (SOUZA, 2008) e maracujazeiro (BELLON *et al.*, 2007; JUNQUEIRA *et al.*, 2007).

O presente estudo teve como objetivo acessar a diversidade genética dos 42 acessos pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de acerola da UFRPE por meio de marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

Material e Métodos

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Genética-Bioquímica e Sequenciamento de DNA do Departamento de Biologia e no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Agronomia, ambos na UFRPE, utilizando 42 acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Acerola da UFRPE (Tabela 1), instalado na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina (EECAC), situada no município de Carpina/PE. Todos os acessos foram propagados por estacas semi-lenhosas a partir de plantas matrizes.

A extração de DNA, de folhas jovens de plantas foi efetuada com base na metodologia proposta por Doyle & Doyle (1990), com algumas modificações. Cerca de 1,0g de folha de cada indivíduo foi macerada em presença de nitrogênio líquido, transferida para tubos ependorff(1,5mL) e a ela adicionados 800mL de tampão de extração (CTBA 5%; NaCl 5M; EDTA 0,5M; Tris-HCl 1,0M, pH 8,0; PVP; β -mercaptanol; H₂O). As amostras foram submetidas a banho-maria a 65°C, por 40 minutos. Em seguida, por duas vezes, foram lavadas com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e centrifugadas por 5 minutos, a 14.000 rpm. Ao sobrenadante foi adicionado álcool-isopropílico na proporção de 2/3 do volume inicial, para a precipitação dos ácidos nucleicos. Após duas horas, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm. O precipitado foi seco a temperatura ambiente e ressuspense em 300mL de tampão TE(Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM; pH 8,0), contendo RNase (40mg/mL) a 37°C por 30 minutos. O DNA foi então reprecipitado, adicionando-se NaCl 5M, na proporção de 1:10 (NaCl:DNA ressuspense), mais 2/3 do volume de isopropanol. As amostras foram incubadas a – 20°C por 3 horas e, em seguida, centrifugada a 14.000 rpm, por 10 minutos. Ao precipitado de DNA, seco a temperatura ambiente, foi adicionado tampão TE, para ressuspendê-lo. A quantificação foi avaliada, visualmente, pela eletroforese de 10uL da solução de DNA ressuspense de cada amostra, em um gel de agarose a 0,8%, a 100 volts, por 30 minutos de corrida.

As reações de amplificação seguiram metodologia proposta por Willians, *et al.* (1990), com algumas modificações. Cada reação, com um volume final de 25mL, continha DNA (30ng); desoxirribonucleotídeos (dATP, dGTP, dGTP, dTTP) (0,2mM); MgCl₂ (2,5mM); Tris-HCl (10mM), pH 8,3; KCl (50mM); um

oligonucleotídeo *primer* (0,4 μ M) e 1,5 unidade de Taq-polimerase. Foram utilizados os oligonucleotídeos *primers*, confeccionados pela Gibco BRL (Tabela 2). As amplificações foram realizadas em termociclador M. J. Research, Inc. (USA) PCR, modelo PTC – 100, utilizando um programa composto por um ciclo inicial de desnaturação de 94°C, por 62 segundos, e 40 ciclos de uma etapa de desnaturação a 94°C, por 15 segundos, uma etapa de anelamento do *primer* ao DNA molde a 35°C, por 30 segundos, e uma etapa de extensão a 72°C, por um minuto. Os produtos das amplificações foram separados por eletroforese, a 100 volts em gel de agarose a 1,5%, com 10mg/mL de brometo de etídio, em tampão de corrida TBE (Tris base 890mM; ácido bórico 890mM; Na₂ - EDTA 20mM. 2H₂O). Os géis foram fotografados, sob luz ultravioleta, com câmera Polaroid.

A análise dos produtos de amplificação foram tabulados conforme a presença (1) ou ausência (0) de bandas de DNA nos géis, e as similaridades entre os genótipos foram estimadas usando-se o coeficiente de Nei & Li (1979), através do programa NTSYS – pc (Numerical Taxonomy and Multivariater Analysis System, versão 1.70, Exeter software, NY, USA). A árvore filogenética foi gerada usando-se a opção UPGMA (Unweighted Pair – Group Method, Arithmetic Average) no programa NTSYS – pc.

Resultados e discussão

O padrão eletroforético obtido com os *primers* de RAPD permitiu a visualização de 4.322 fragmentos de amplificação distribuídos em 182 loci. O número médio de loci por *primer* foi de 12,13 variando de 6 (D0142A01) a 17 (D0142A09) (Tabela 2). Do total de loci observados, 166 (91,2%) exibiram polimorfismo e 16 (8,8%) foram monomórficos. Este elevado número de loci polimórficos está de acordo com a variabilidade detectada por Musser (2001) que analisou 12 dos acessos avaliados neste trabalho. Ainda no trabalho citado, o referido autor em estudo sobre o enraizamento de estacas semilenhosas, observou grande variação no potencial de enraizamento com mínimo de 4,35% (020-CMF) e 7,59% (004-RPE) e máximo de 88,23% (035-CMF) e 92,47% (002-SPE), o que poderia ser explicado devido a variabilidade encontrada pela metodologia RAPD.

A análise do dendrograma (Figura 1) e da matriz de similaridade genética (Tabela 3) permitiu identificar dois grupos distintos entre os 42 acessos de acerola. O grupo 1 formado pelos acessos 003 APE e 005APE, com coeficiente de similaridade (CS) de 0,74, ambos oriundos de Pernambuco com frutos grandes e de coloração vermelha (Tabela 1). O acesso 005-APE, segundo Musser et al. (2004), apresenta altos níveis de antocianinas ($47,4 \pm 3,1$ mg/100g de polpa) e flavonóis ($18,5 \pm 0,8$ mg de quercetina/100g de polpa).

O grupo 2, divide-se em dois subgrupos, um formado pelo acesso 025CMF, oriundo do Estado da Bahia com frutos médios de altos teores de ácido ascórbico e coloração da casca e polpa vermelha (Tabela 1). No segundo subgrupo, formado pelos demais 39 acessos, pode-se observar mais cinco agrupamentos, que passar-se-ão a classificar-se como: AGP1, AGP2, AGP3, AGP4 e AGP5. O primeiro (AGP1), menor, com CS variando 0,74 a 0,87, formado por 020-CMF e 022-CMF, oriundos da Bahia com frutos de polpa vermelha com alto teor de ácido ascórbico e 043UFRPE oriundo de Pernambuco com frutos de coloração da casca vermelho alaranjado e sabor agridoce (Tabela 1).

O agrupamento AGP2 formado pelos acessos 029-CMF; 033-CMF, 034-CMF; 035-CMF; 036-CMF, 037-CMF, 038-CMF, 039-CMF, 040-CMF, 041-CMF, 044-APE e 045-APE e o AGP3 com os acessos 026-CMF, 027-CMF,

028-CMF, 030-CMF, 031-CMF, 032-CMF; 042-CMF e 049-CMF, onde encontram-se os quatro genótipos com maior grau de similaridade genética (028-CMF e 030-CMF e 026-CMF e 027-CMF, com CS = 0,90). Estes dois agrupamentos, formados por 20 acessos, mostram a maior diversidade de características agronômicas. Dentre os indivíduos deste grupo 14 destacam-se pelo elevado teor de vitamina C apresentado por seus frutos. Os genótipos 040-CMF e 041-CMF, oriundos da Bahia e do Havaí, respectivamente, mesmo considerando a distância geográfica, estão muito próximos geneticamente (CS = 0,86).

O agrupamento AGP4 comporta os acessos 011-BPA, 012-CPA, 013-CPA, 014-CPA, 015-CPA, 016-CMF, 018-CMF, 019-CMF, 021-CMF, 023-CMF e 024-CMF, originários dos Estados da Bahia ou do Pará, onde os acessos 012-CPA, 013-CPA e 014-CPA apresentam alta produtividade chegando a 30 kg/planta/ano aos 2 anos de idade, e alto teor de vitamina C, segundo Musser (2002). Comparando a distância genética entre os três referidos acessos, observa-se uma variação do CS de 0,78 a 0,85, colocando-os muito próximos em termos genéticos.

O quinto agrupamento (AGP5), formado por 002-SPE, 004-RPE, 006-TPA, 007-TPA e 008-CPA, procedentes dos Estados de Pernambuco ou do Pará, apresentam frutos grandes e vermelhos (Tabela 1). Os acessos 004-RPE, 008-CPA, 006-TPA e 007-TPA apresentam alta produtividade, sendo ainda o 006-TPA e 007-TPA precoces, com bom potencial de enraizamento por estaquia, e sendo da mesma origem, o que pode justificar o agrupamento desses dois acessos em um sub-grupo. O acesso 008-CPA é classificado como de produção tardia e se encontra agrupado com o acesso 004-RPE que além de possuir alta produtividade, também exhibe, segundo Musser et al. (2004), uma alta produção de vitamina C (1846 ± 135 mg/100g), características essas que são de grande interesse para a agroindústria. No entanto, ambos foram classificados por Musser (2001) como de difícil enraizamento por estacas semilenhosas. O acesso 002-SPE, não foi classificado como um acesso altamente produtivo, no entanto pode ser interessante para produtores de regiões semi-áridas devido a sua rusticidade, e também por apresentar um alto potencial de enraizamento via estaquia, requisitos que o destaca como um futuro candidato a porta-enxerto para esta cultura.

Correlacionando a análise do agrupamento (Figura 1) com as características agronômicas dos acessos (Tabela 1), os agrupamentos AGP2 e AGP3 reúnem os acessos com menor produtividade de frutos. No entanto, estes genótipos se destacam em relação às características químicas e físico-químicas. Para produção destinada à comercialização *in natura* recomenda-se o uso de acessos do agrupamento AGP5, (especialmente os acessos 004-TPA, 006-TPA e 007-TPA). Dentre estes acessos, apenas 004-TPA e 008-CPA não apresentam um bom potencial de enraizamento por estacas semilenhosas segundo Musser (2001). Para produção visando o consumo industrial, recomenda-se o uso de acessos dos agrupamentos AGP2, AGP3 e AGP4, além do acesso 004-TPA que foi classificado com altamente produtivo e ainda assim apresenta altos teores de vitamina C (Tabela 1).

Os acessos 021-CMF e 049-APE, apesar de não pertencerem ao mesmo grupo, apresentaram os maiores frutos e, conseqüentemente, maior peso, mas são plantas de baixa produtividade. Observa-se uma relação inversa entre a produção de vitamina C e a produtividade, fato também constatado por Gomes et al. (2000) em *M. ermaginata*. O agrupamento AGP5 é formado por genótipos mais produtivos, mas com menores índices de ácido ascórbico, enquanto os demais grupos produzem frutos mais ricos em vitamina C, mas tem baixa produção de fruto.

Levando em conta que os programas de melhoramento de aceroleira visam, principalmente, obter variedades produtivas precoces, com frutos de elevados teores de vitamina C, boas características físico-químicas (cor, textura, tamanho, rendimento em polpa, °Brix, acidez, etc.), pouca ou nenhuma pilosidade nas folhas, resistência a pragas e doenças e com formação de copa adequada ao manejo, as ferramentas que utilizam marcadores moleculares vêm servindo de suporte para seleção de genótipos promissores com as características desejadas. Como as coleções de germoplasmas detêm os genes de interesse agronômicos, a caracterização do padrão genético dos acessos darão suporte as futuras estratégias de melhoramento da cultura.

Em análise da diversidade genética de genótipos de aceroleira, Salla et al. (2002) utilizaram 37 *primers* RAPD e obtiveram 164 loci, com uma média de 4,4 por *primer*, número bastante inferior ao observado na presente análise. Dos 164 loci obtidos por Salla et al. (2002), foi observado polimorfismo em 90,8%

(149) se aproximando bastante do percentual de polimorfismo obtido neste estudo (91,2%).

O alto grau de polimorfismo, detectado através da caracterização molecular dos acessos, demonstrou que a variabilidade genética do BAG da UFRPE pode disponibilizar material genético para futuros trabalhos de melhoramento nesta cultura. Considerando-se que o progresso genético através da seleção em populações segregantes é diretamente proporcional à variabilidade genética disponível e a frequência de genótipos superiores existentes nas populações, a variabilidade genética presente na coleção estudada viabilizará um planejamento adequado dos cruzamentos a serem realizados, otimizando as combinações genéticas superiores nas indicações de genótipos bem adaptados às condições ambientais da região.

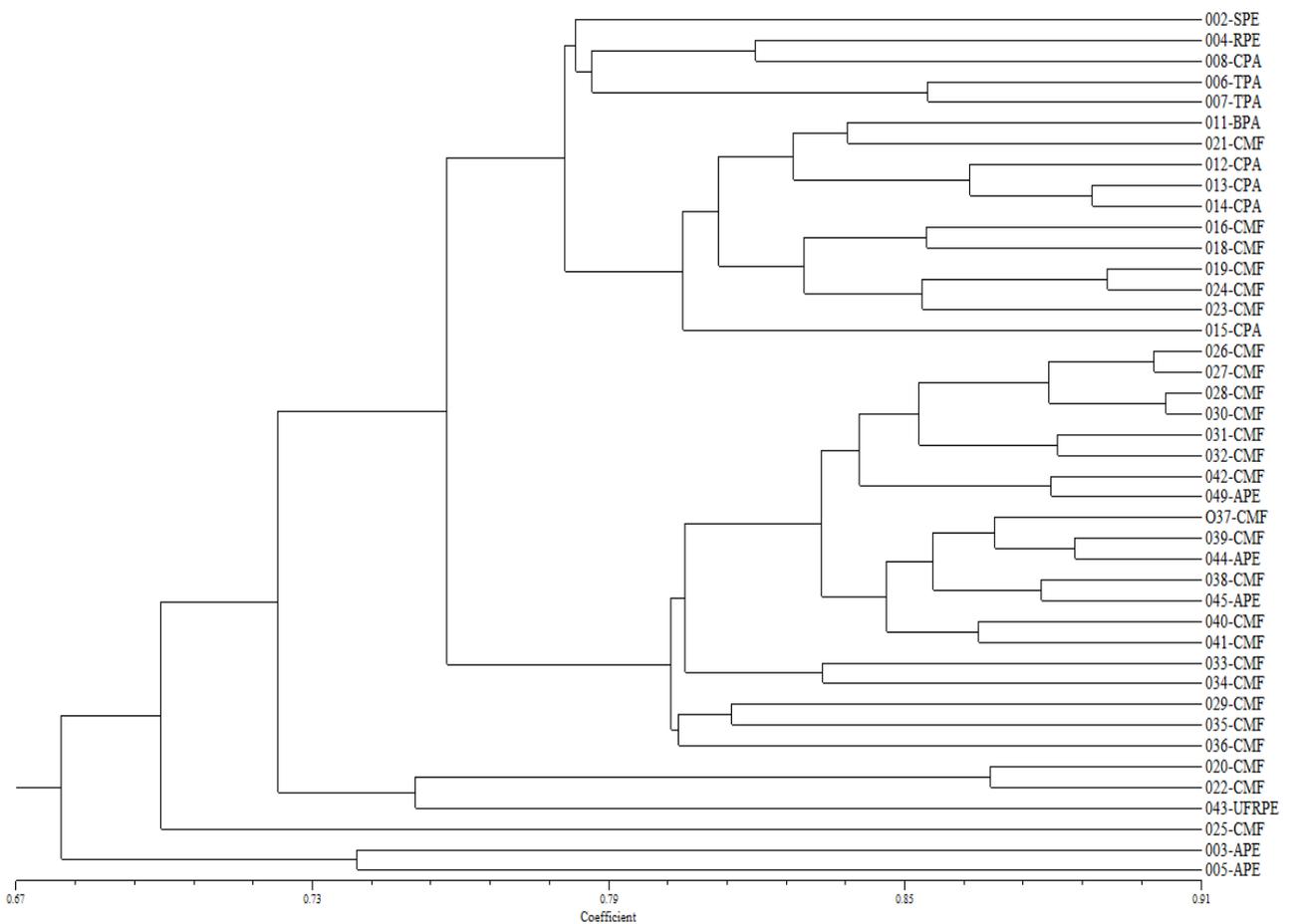


Figura 1 – Análise de agrupamento de 42 acessos de aceroleira do BAG da UFRPE, Carpina-PE, obtida por meio do programa NTSYS – PC, usando a UPGMA.

Conclusões

- 1- O polimorfismo gerado com os marcadores moleculares RAPD mostrou que, mesmo que existe alta variabilidade genética no BAG de acerola da UFRPE estando disponível portanto, ao uso para fins de melhoramento genético da cultura.

- 2- Os dados de diversidade e distância genética gerados com marcadores moleculares RAPD auxiliam o direcionamento de programas de implantação e manutenção de Bancos de Germoplasma evitando redundância nas coleções.

- 3- A formação de grupos e subgrupos com características comuns gerados pelos marcadores RAPD indicam genótipos do BAG/UFRPE com potencial agrônomico para uso em diversas finalidades ligadas à produção para consumo *in natura* e para a agroindústria.

Referências Bibliográficas

BELLON, G.; FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, K. P.; JUNQUEIRA, N. P. V.; SANTOS, E.C.; BRAGA, M.F.; GUIMARÃES, C. T. Variedade genética de acessos silvestres e comerciais de *Passiflora edulis* Sims. com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 1, p. 124-127, 2007.

COUCEIRO, E. M. **Curso de extensão sobre a cultura da acerola**. Recife, UFRPE, 1985. 45 p.

DODGSON, J.B.; CHENG, H.H.; OKIMOTO, R. DNA Marker Technology: A Revolution in Animal Genetics. **Poultry Science**, v. 76, p. 1108–1114, 1997.

DOYLE, I.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant from fresh tissue. **Foccus**, v.12, p.13-15.1990.

FERREIRA, F. R.; FERREIRA, S. A. do N.; CARBALHO, J. E. V. de. Espécies frutíferas pouco exploradas com potencial econômico e social para o Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, BA: Sociedade Brasileira de Fruticultura, v. 9. n. extra, p. 11 - 22, 1987.

GOMES, J. E.; PERECIN, D.; MARTINS, A. B. G.; FERRAUDO, A. S. Análise de agrupamentos e de componentes principais no processo seletivo em genótipos de aceroleira (*Malpighia emarginata* D. C.). **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 22, n. 1, p. 36-39. 2000.

GONZAGA NETO, L. Melhoramento genético da aceroleira. In: **Acerola no Brasil- produção e mercado**. São José, A .R., Alves, R.E. Ed. Vitória da Conquista-BA, DFZ/UESB, p.15-27, 1995.

JUNQUEIRA, K.P.; PIO, R.; VALE, M. R.; RAMOS, J. D. Cultura da aceroleira. Lavras - MG: Ufla, 2002 (Boletim de Extensão).

JUNQUEIRA, K. P.; PIO, R.; VALE, M. R. do; RAMOS, J.D. Cultura da acerola. UFLA, Lavras-MG. 27 p. 2004.

JUNQUEIRA, K.P.; FALEIRO, F.G.; RAMOS, R.D.; BELLON, G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. Variabilidade genética de acessos de maracujá-suspiro com base em marcadores moleculares. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 3, p. 571-575, 2007

KONRAD, M. **Efeitos de sistemas de irrigação localizada sobre a produção e qualidade da acerola (*Malpighia spp*) na região da Nova Alta Paulista**. Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” 2002. 119 f. (Dissertação de Mestrado)

MANICA, I.; ICUMA, I. M.; FIORAVANÇO, J. C.; PAIVA, J. R. de; PAIVA, M. C.; JUNQUEIRA, N. T. V. Acerola: tecnologia de produção, pós-colheita, congelamento, exportação, mercados. Porto Alegre, 2003. 397 p.

MUSSER, R. S. **Caracterização de acessos de aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.) do Banco Ativo de Germoplasma em Pernambuco**. Recife: UFRPE, 2001.147. (Tese de Doutorado).

MUSSER, R.S.; LEMOS, M.A.; LIMA, V.L.A.; MÉLO, E.A.; LEDERMAN, I.E.; SANTOS, V. F. Características físico-químicas de acerola do banco ativo de germoplasma em Pernambuco. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 556-561, 2004.

NEI, M.; LI, W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.76, p.5269–5273, 1979.

PORTAL DO AGRONEGÓCIO. Produção de frutas ganha força no Brasil. Disponível em: <http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?=5982>. Acesso em: 24 de abril de 2010.

RITZINGER, R.; RITZINGER, C. H. S. P. Acerola – aspectos gerais da cultura. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Cruz das Almas-BA. 2 p. 2004.

SALLA, M.F.S.; RUAS, C. de F.; RUAS, P.M.A.; CARPENTIERI-PÍPOLO, V. Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 015-022, 2002.

SIMÃO, S. Cereja das Antilhas. In: SIMÃO, S. **Manual de fruticultura**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1971. Cap. 15, p. 477 - 485.

SOUZA, C.M.P.; VIANA, A.P.; FERREIRA, C.F.; SILVA, S.O.; CARVALHO, A.J.C.; BERBERT, P.A; SOUZA, E.F. Avaliação da dissimilaridade genética em genótipos de bananeira (*Musa ssp.*) via marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 2, p. 419-424, 2008.

TEIXEIRA, A. H. de C.; AZEVEDO, P. V. de. Potencial agroclimático do estado de Pernambuco para o cultivo da acerola. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**. v. 2, P. 105-113. Santa Maria. 1994.

WILLIAMS, J., KUBELIK, A., LIVAK, K., RAFALSKI, A.; TINGEY, S. DNA polymorphism amplified by arbitrary *primers* are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Londres, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WÜNSCH, A.; HORMAZA, J.I. Characterization of variability and genetic similarity of European pear using microsatellite loci developed in apple. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.113, p. 37-43. 2007.

Tabela 1. Procedência e características morfo-agronômicas dos 42 acessos de aceroleira do Banco Ativo de Germoplasma da UFRPE

Acesso (código)	Procedência	Características*
002-SPE	Pernambuco /Brasil	Rusticidade (adaptação à região semi-árida).
003-APE	Pernambuco /Brasil	Frutos grandes (>10 g.), coloração vermelha uniforme, frutos verdes com manchas avermelhadas, copa semi-erecta, frutifica no interior da copa.
004-RPE	Pernambuco /Brasil	Alta produtividade, altos teores de vitamina C, frutos grandes e vermelhos, com textura firme.
005-APE	Pernambuco /Brasil	Frutos grandes, vermelho púrpura, textura firme e com boa conservação pós-colheita.
006-TPA	Pará/Brasil	Alta produtividade e precocidade, frutos grandes e vermelhos com textura firme. Suco vermelho.
007-TPA	Pará/Brasil	Alta produtividade e precocidade, frutos grandes e vermelhos com textura firme. Copa aberta com folhas enrugadas.
008-CPA	Pará/Brasil	Frutos grandes, coloração vermelha, produção tardia, alta produção e copa semi-erecta
011-BPA	Pará/Brasil	Fruto vermelho púrpura e suco vermelho.
012-CPA	Pará/Brasil	Alta produtividade, fruto vermelho e tempo de safra menor.
013-CPA	Pará/Brasil	Alta produtividade e frutos vermelho escuro com pedúnculo firme.
014-CPA	Pará/Brasil	Alta produtividade, frutos vermelho, produção também em épocas de chuvas.
015-CPA	Pará/Brasil	Frutos vermelho-amarelado, racham-se com facilidade quando maduros, frutos grandes, copa compacta escondendo os frutos.
016-CMF	Bahia/Brasil	Altos teores de ácido ascórbico, coloração da casca e polpa vermelha, frutos grandes
018-CMF	Bahia/Brasil	Altos teores de ácido ascórbico, coloração da casca e polpa vermelha, frutos grandes
019-CMF	Bahia/Brasil	Altos teores de ácido ascórbico, coloração da casca e polpa vermelha, frutos médios
020-CMF	Bahia/Brasil	Altos teores de ácido ascórbico, coloração da casca e polpa vermelha, frutos grandes.
021-CMF	Bahia/Brasil	Altos teores de ácido ascórbico, coloração da casca e polpa vermelha, frutos extra grandes.
022-CMF	Bahia/Brasil	Altos teores de ácido ascórbico, coloração da casca e polpa vermelha, frutos médios
023-CMF	Bahia/Brasil	Altos teores de ácido ascórbico, coloração da casca e polpa vermelha, frutos médios
024-CMF	Bahia/Brasil	Altos teores de ácido ascórbico, coloração da casca e polpa vermelha, frutos médios
025-CMF	Bahia/Brasil	Altos teores de ácido ascórbico, coloração da casca e polpa vermelha, frutos médios
026-CMF	Bahia/Brasil	Altos teores de ácido ascórbico, coloração da casca e polpa vermelha, frutos médios

027-CMF	Bahia/Brasil	Altos teores de ácido ascórbico, coloração da casca e polpa vermelha, frutos grandes
028-CMF	Bahia/Brasil	Altos teores de ácido ascórbico, coloração da casca e polpa vermelha, frutos médios
029-CMF	Bahia/Brasil	Altos teores de ácido ascórbico, coloração da casca e polpa vermelha, frutos médios
030-CMF	Bahia/Brasil	Altos teores de ácido ascórbico, coloração da casca e polpa vermelha, frutos grandes
031-CMF	Bahia/Brasil	Altos teores de ácido ascórbico, coloração da casca e polpa vermelha, frutos grandes
032-CMF	Bahia/Brasil	Altos teores de ácido ascórbico, coloração da casca e polpa vermelha, frutos grandes
033-CMF	Bahia/Brasil	Altos teores de ácido ascórbico, coloração da casca e polpa vermelha, frutos médios
034-CMF	Bahia/Brasil	Altos teores de ácido ascórbico, coloração da casca e polpa vermelha, frutos médios
035-CMF	Bahia/Brasil	Altos teores de ácido ascórbico, coloração da casca e polpa vermelha, frutos médios
036-CMF	Bahia/Brasil	Altos teores de ácido ascórbico, coloração da casca e polpa vermelha, frutos pequenos
037-CMF	Bahia/Brasil	Altos teores de ácido ascórbico, coloração da casca e polpa vermelha, frutos médios
038-CMF	Bahia/Brasil	Altos teores de ácido ascórbico, coloração da casca e polpa vermelha, frutos médios
039-CMF	Bahia/Brasil	Altos teores de ácido ascórbico, coloração da casca e polpa vermelha, frutos pequenos
040-CMF	Bahia/Brasil	Parte do fruto com coloração branca e parte rosada
041-CMF	Havai/EUA	Sem informações
042-CMF	Bahia/Brasil	Coloração da casca e polpa vermelha
043-UFRPE	Pernambuco /Brasil	Frutos de coloração da casca vermelho alaranjado, sabor agridoce
044-APE	Pernambuco /Brasil	Frutos com casca de coloração vermelha, grandes
045-APE	Pernambuco /Brasil	Frutos com casca de coloração vermelha, polpa alaranjada, grandes, sulcados
049-APE	Pernambuco /Brasil	Frutos muito grandes, coloração alaranjada, muitas lenticelas na planta, planta vigorosa, copa em forma de guarda-chuva, flores quase branco, pouco pelo.

* Características observadas em campo e dados publicados por Musser *et al.*,(2004)

Tabela 2. Relação dos *primers* de RAPD, utilizados no estudo de diversidade dos acessos do BAG de acerola da UFRPE, e número de loci amplificados, polimórficos e monomórficos observados

<i>Primer</i>	Seqüências (Gibco BRL)	Nº de Loci	Loci Polimórficos	Loci Monomórficos
D0142A01	AGTCAGCCAC	6	2	4
D0142A02	GTGATCGCAG	11	10	1
D0142A03	CAATCGCCGT	16	15	1
D0142A04	TCGGCGATAG	12	12	0
D0142A05	CAGCACCCAC	11	8	3
D0142A06	TTCCGAACCC	11	11	0
D0142A07	GACCGCTTGT	14	13	1
D0142A08	AGGTGACCGT	12	11	1
D0142A09	CTGCTGGGAC	17	16	1
D0142A10	GTGTGCCCCA	14	13	1
D0142A11	TCAGGGAGGT	11	11	0
D0142A12	CACCAGGTGA	10	10	0
D0142B01	GAGCCCTCCA	14	11	3
D0142B02	AGCGTGTCTG	12	12	0
D0142B03	GTGACGTCAC	11	11	0
Total		182	166	16

Capítulo III

Variabilidade genética em genótipos da coleção de germoplasma de Citrus, do Instituto Agrônomo de Pernambuco Brejão-PE, por meio de marcadores moleculares ISSR

Trabalho a ser enviado para a **Revista Brasileira de Fruticultura**

Variabilidade genética em genótipos da coleção de germoplasma de Citrus, do Instituto Agronômico de Pernambuco Brejão-PE, por meio de marcadores moleculares ISSR

Moraes Filho, Rômulo Maciel de; Martins, Luíza Suely Semen²; Montarroyos, Angélica Virgínia Valois³; Silva, Mairon Moura da⁴; Musser, Rosimar dos Santos³; Peroba, José⁵.

¹Mestrando do Curso de Melhoramento Genético Vegetal/UFRPE; ²Professor do Depto. Biologia/UFRPE; ³Professor do Depto. De Agronomia/UFRPE; ⁴Professor da UFRPE/UAG; ⁵ Pesquisador do Instituto Agronômico de Pernambuco. (romulommfilho@yahoo.com.br).

Resumo

O Brasil é o maior produtor de laranja respondendo por 50% da produção mundial, tendo no ano de 2009 produzido mais de 18 milhões de toneladas, em uma área plantada de 990 hectares. Apesar dos recentes avanços da citricultura nacional existe pouca diversificação, sendo as variedades de laranjas Pêra, Natal, Valência e Hamlin as de com maior representação nacional. Na região Nordeste, onde a situação é ainda mais grave a laranja Pêra é responsável pela grande maioria da produção. O Município de Garanhuns/PE e os municípios vizinhos do Agreste Meridional apresentam potencial de expansão para o cultivo de *Citrus* de mesa devido, principalmente, à altitude. O objetivo deste trabalho foi atestar a variabilidade genética, por meio de marcadores moleculares ISSR, das variedades do gênero *Citrus* a serem introduzidas e recomendadas para a região Nordeste pela Embrapa Mandioca e Fruticultura. A metodologia ISSR-PCR permitiu a visualização de um total de 167 loci com a utilização de 15 *primers*. Destes 162 (97%) exibiram polimorfismo e 5 (3%) foram monomórficos. De acordo com a análise do dendrograma e da matriz de similaridade genética foi possível agrupar as 15 variedades de laranja doce em um único grupo com 27% de diversidade entre si e 40% em relação aos outros cinco genótipos, formados por três limões, uma tangerina e um pomelo. O alto grau de polimorfismo observado sugere uma grande variabilidade genética entre as 15 variedades o que é favorável para a diversificação de cultivares a serem indicadas futuramente para o Agreste Meridional de Pernambuco.

Abstract

Brazil is the biggest producer of orange and account for 50% of world production, and in 2009 produced more than 18 million tons, in a planted area of 990 hectares. Despite recent advances in national citrus industry there is a little diversification of cultivars and varieties like Pera, Natal, Valencia and Hamlin varieties have greater representation. In the Northeast the situation is more serious and Pêra varieties are responsible for the vast majority of production. Garanhuns/ PE and the neighboring cities of Agreste Meridional have expansion potential for the *Citrus* crop, mainly due to altitude. The objective of this work was to assess the genetic variability by the use of ISSR Markers between *Citrus* varieties that was introduced and recommended to the Northeast region by Embrapa Mandioca e Fruticultura. The ISSR-PCR method allowed the visualization of a total of 167 loci with the use of 15 *primers*. 162 (97%) loci exhibited polymorphism and five (3%) were monomorphic. According to the analysis of the dendrogram and the genetic similarity matrix was possible to group the 15 varieties of sweet orange in a single group with 27% diversity between them and 40% over the five other genotypes, consisting of three lemons, a tangerine and a grapefruit. The high degree of polymorphism observed between the group of oranges and the other five accessions suggests a large genetic variability within the genus, which may be particularly useful in breeding programs aiming to develop new rootstocks adapted to many different environmental conditions as well as the identification of promising varieties in terms of production.

Index terms: *Citrus*, ISSR Markers, genetic variability.

Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de laranjas (FAO, 2007). Em 2009 o Brasil produziu mais de 18 milhões de toneladas de laranja e a produção estimada para o ano de 2010 está em torno 19.068.761t com uma área plantada de pouco mais de 984 mil hectares (IBGE, 2010). Apesar dos avanços da citricultura nacional, existe pouca diversidade de variedades em cultivo sendo mais grave a situação na região Nordeste onde as laranjas do tipo “Pêra” são responsáveis pela grande maioria da produção (95%), não havendo também muito investimento em cultivares apropriados para mesa devido ao fortalecimento da indústria de suco (PASSOS *et al.*, 2004).

A citricultura apresenta-se extremamente vulnerável como resultado das poucas cultivares, tanto para copas como para porta-enxerto, conseqüentemente, com poucas chances de escolha tanto para o produtor quanto para o consumidor brasileiro. A Região Nordeste é privilegiada para o cultivo de *Citrus* por estar mais próxima dos grandes mercados importadores (Europa e Estados Unidos), pela ausência de doenças não endêmicas, o que favorece o setor produtivo de alimentos que está relacionado, em grande parte, aos pequenos agricultores além da disponibilidade de informações técnicas geradas pela Embrapa, empresas estaduais de desenvolvimento agropecuário e universidades (PASSOS *et al.*, 2004). Segundo Passos *et al.*, (2005), o Município de Garanhuns e os municípios vizinhos do Agreste Meridional apresentam potencial de expansão para o cultivo de *Citrus* de mesa, principalmente devido à altitude (Acima de 750 metros).

O pomelo (*C. paradisi* Macfad.) é uma fruta cítrica muito apreciada e cultivada nos Estados Unidos, China, Cuba, Israel, África do Sul, México e Argentina (Coelho, 2002). Apesar de os pomelos serem frutas bastante saudáveis, o seu teor de acidez elevado e sabor doce e amargo faz com que no Brasil a sua exploração se restrinja a pequenos pomares.

O uso de marcadores moleculares tem tido cada vez mais destaque como uma ferramenta importante para o melhoramento genético de plantas visando o mapeamento de genes, *fingerprinting*, análise de diversidade genética, diagnósticos de doenças, estudos taxonômicos e evolutivos (WÜNSCH e HORMAZA, 2007).

Marcadores ISSR são marcadores baseados em microssatélites capazes de diferenciar indivíduos altamente aparentados (BORÉM e CAIXETA, 2009). O ISSR-PCR utiliza um único *primer* com em torno de 16 e 25 pares de base. Este *primer* consiste em um di, tri, tetra ou penta nucleotídeos repetidos *in tandem* e com de dois a quatro nucleotídeos arbitrários degenerados na extremidade 3' ou 5' (SHAHSAVAR *et al.*, 2007). Por estas características os Marcadores ISSR combinam vantagens de metodologias como AFLP e SSR com a universalidade dos marcadores RAPD. Como desvantagem, estes marcadores compartilham a característica de dominância dos marcadores RAPD e AFLP (SHAHSAVAR *et al.*, 2007; BORÉM e CAIXETA, 2009;). Marcadores ISSR têm sido usados para caracterização de germoplasma (SHAHSAVAR *et al.*, 2007) e análise de diversidade (KUMAR *et al.*, 2009) do gênero *Citrus*.

O objetivo do presente trabalho foi analisar a diversidade genética, por meio de marcadores moleculares ISSR, entre 20 genótipos do gênero *Citrus*, representados por laranjas, limões, limas ácidas, tangerinas e pomelos, para futura indicação de cultivo na região do Agreste Meridional de Pernambuco.

Material e métodos

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Agronomia da UFRPE, utilizando 20 acessos (Tabela 1) do da Coleção de Germoplasma de *Citrus*, instalado na Estação Experimental do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), situada no município de Brejão/PE.

Tabela 1. Características morfo-agronômicas de 20 acessos da coleção de Germoplasma de Citrus do IPA – Brejão/PE.

Nº	Variedades	Características
Laranjas		
1	Bahia 101	Maturação precoces, presença de umbigo, sem sementes, casca amarela, polpa suculenta, sabor ácido e adocicado. Alto teor de vitamina C. A Baianinha tem o fruto menor.
2	Baianinha 03	
3	Hamlin 02	Maturação precoce, fruto pequeno, casca fina e amarelada, baixo teor de suco, poucos açúcares e ligeiramente ácido. Indicado para produção de suco concentrado. Altamente produtiva.
4	Lima	Maturação precoce, casca fina, amarela esverdeada. Baixa acidez, doce e suculenta, indicada para consumo <i>in natura</i>
5	Rubi	Maturação precoce, Frutos esféricos, casca pouco espessa, cor laranja intensa, com suco bastante saboroso, servindo para o consumo ao natural ou industrializado. A planta é produtiva.
6	Sunstar	
7	Pineapple	Maturação meia-estação, Frutos com acidez, muitas sementes, produtividade alta.
8	Pêra D6	Maturação tardia, formato alongado casca lisa, fina, amarela. Polpa é suculenta, de sabor adocicado e levemente ácido. Indicado para consumo <i>in natura</i> .
9	Pêra D9	
10	Pêra D 12	
11	Valência Tuxpan	Frutos ovalados, casca grossa suco amarelo forte e adocicado. Indicados para consumo <i>in natura</i> e em suco.
12	Westin	Frutos esféricos, casca pouco espessa, cor laranja intensa, Suco bastante saboroso, servindo para o consumo ao natural ou industrializado. A planta é produtiva.
13	Midsweet	Maturação meia-estação, frutos com acidez, muitas sementes, produtividade alta.
14	Natal	Maturação tardia, frutos ovalados, casca grossa, suco de coloração amarelo forte e adocicado. São consumidas <i>in natura</i> e no preparo de sucos.
15	Salustiana	Maturação precoce, frutos com acidez, produtividade alta.
Limas e Limões		
16	Lima da Pérsia	Sem acidez, poucas sementes, maturação precoce, produtividade média.
17	Limão Tahiti 2000	Fruto ligeiramente ovalado, com casca verde intenso. Sem sementes.

18	Limão Fino	-
Tangerina		
25	Mexerica	Maturação em Meia estação, frutos medianos, muito aromáticos, casca fina e lisa, são fáceis de descascar e paladar bastante agradável.
Pomelo		
33	Star Ruby	-

*Características descritas por Mattos Junior *et al.*, 2005 e Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003

O DNA foi extraído de cerca de um grama de folha macerado em nitrogênio líquido, segundo metodologia de Murray e Thompson (1980) com modificações. Ao material macerado foi adicionado 600 µl de tampão de extração (2% CTAB; NaCl, 1,4 mM; EDTA, 0,02 M; 100 mM Tris HCl; 1% β-mercaptoetanol). As amostras foram submetidas a banho-maria, a 65°C por 30 minutos. Foi feita uma lavagem com clorofórmio-alcool isoamílico (24:1) por 5 minutos seguida de uma centrifugação a 7.000 rpm a 4° por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde foi adicionado 600 µl de isopropanol gelado. O conteúdo dos tubos foi misturado por inversão e estes submetidos à nova centrifugação a 7.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e os pellets foram ressuspensos em 600 µl de uma solução de etanol absoluto gelado e acetato de sódio 3M (1:0,1) e incubados em 20°C por uma hora. Uma nova centrifugação a 7000 rpm por 15 minutos foi procedida e os sobrenadantes descartados. Os pellets foram então submetidos à uma lavagem com etanol a 70%. Após secagem os pellets foram ressuspensos em 200 µl de tampão TE contendo RNase (50 mM Tris + 10 mM EDTA, pH 8,0) contendo RNase (10 ng/mL), a 37°C, por uma hora. A quantificação do DNA foi feita visivelmente em gel de agarose a 0,8% e as concentrações padronizadas em 15 ng/ul

As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 25 µl, contendo 30ng de DNA, 75mM Tris-HCl (pH 8,8), 20 mM (NH₄)₂SO₄, 50-65 nM MgCl₂, 150 µM de cada um dos desoxinucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 1 µM de *primer* (Tabela 2) e uma unidade da enzima *Taq* polimerase. As amplificações foram feitas seguindo as seguintes programações: Desnaturação inicial a 95° por 15 minutos, seguidos de 30 a 35 ciclos de desnaturação a 94° por 30 segundos, temperatura de anelamento específica de cada *primer* por 45 segundos e extensão a 72° por 2 minutos, e extensão final

a 72^o por 7 minutos ao fim dos ciclos de amplificação. Em seguida os produtos de PCR foram separados em gel de agarose a 2% corados com *syber gold* e visualizados em transluminador UV. A tabela 2 contém a relação de *primers*, temperatura de anelamento e número de ciclos de amplificação.

Tabela 2 – Sequências dos *primers* ISSR utilizados no estudo de diversidade de 20 acessos do gênero *Citrus*

PRIMER	SEQÜÊNCIA	TA °C	Nº Ciclos
#862	AGC AGC AGC AGC AGC AGC	55	30
#858	TGT GTG TGT GTG TGT GRT	50	35
#820	GTG TGT GTG TGT GTG TC	50	35
#860	TGT GTG TGT GTG TGT GRA	50	35
#2	GAGAGAGAGAGAGAGAT	50	35
#834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	50	35
#851	GTG TGT GTG TGT GTG TYG	50	35
#845	CTC TCT CTC TCT CTC TRG	50	35
#1	ACACACACACACACT	50	35
#864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG	50	35
#885	BHB GAG AGA GAG AGA GA	50	35
#897	CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G	50	30
#866	CTC CTC CTC CTC CTC CTC	50	35
#813	CTC TCT CTC TCT CTC TT	55	30
#886	VDV CTC TCT CTC TCT CT	55	30

N = (A,G,C,T), R = (A,G), Y = (C,T), B = (C,G,T), D = (A,G,T), H = (A,C,T), V = (A,C,G)

Os dados obtidos por meio da técnica PCR-ISSR foram tabulados conforme a presença (1) ou ausência (0) de bandas. As similaridades genéticas entre genótipos foram estimadas usando-se o coeficiente de Dice (equivalente ao índice de Nei e Li, 1979), os dendogramas foram construídos usando-se a opção UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Aritimetic Average*) no programa NTSYS - pc (*Numeral Taxonomy and Multivariater Analysis System*, versão 1.70, Exeter software, NY, USA).

Resultados e Discussão

A metodologia ISSR permitiu a visualização de um total de 167 loci com a utilização de 15 *primers* (Tabela 3). Destes 162 (97%) exibiram polimorfismo e 5 (3%) foram monomórficos. Foram observados uma média de 11,1

fragmentos por *primer* variando entre 5 (#862) à 17 (#813) (Figura 1). Números que se aproximam bastante dos obtidos por Kumar *et al.*, (2009), que obteve, utilizando de 15 *primers* ISSR em espécies do gênero *Citrus* um total de 204 loci sendo 179 polimórficos com uma média de 12 loci por *primer* e 87% de polimorfismo. Shahsavari *et al.*, (2006) utilizaram seis *primers* ISSR para análise de diversidade em *Citrus* e observaram 234 loci sendo destes 209 polimórficos (90%). O número loci por *primer* deste estudo variou de 27 a 52, com média de 39 loci/*primer*. Estes valores são muito superiores em relação tanto aos resultados obtidos no presente estudo quanto dos obtidos por Kumar *et al.*, (2009), o que é explicado pelo fato dos fragmentos amplificados terem sido separados em géis de poliacrilamida que apresentam resolução superior aos de agarose.

De acordo com a análise do dendrograma (Figura 2) e da matriz de similaridade genética (Tabela 4) foi possível agrupar os genótipos estudados em dois grandes grupos. Um formado por Limão Fino e Lima da Pérsia (bastante divergentes, com 54% de dissimilaridade entre si) e o outro grupo formado pelos demais que se subdivide em vários subgrupos. Os 15 genótipos de laranja doce formaram um único subgrupo com 40% de dissimilaridade em relação aos outros três genótipos. Estes, formados por Limão Tahiti, Mexerica e Pomelo, que ficaram separados do referido grande subgrupo.

O grupo principal é formado por variedades de laranja doce indicadas para o cultivo na região nordeste do Brasil. Estas variedades podem ser classificadas quanto à velocidade de maturação de seus frutos em Precoces: Bahia 101, Baianinha 03, Hamlin 02, Lima, Rubi, Salustiana e Pineapple, Meia estação: Sunstar, Westlin e Middlesweet e Tardia: Valencia Tuxpan, Pêra D6, Pêra D9, Pêra D12 e Natal (EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA, 2003).

O grupo das laranjas pode ser subdividido em dois subgrupos com 27% de dissimilaridade entre si. O subgrupo 1 reúne todos os genótipos de maturação precoce (Bahia 101, Baianinha 03, Hamlin 02, Lima, Rubi, Salustiana e Pineapple), Westlin e Middlesweet de maturação em meia estação e os genótipos Natal Pêra D6, Pêra D9 e Pêra D12 de maturação tardia. O Subgrupo 2, é formado pelos genótipos Sunstar e Valencia Tuxpan de maturação meia estação e tardia respectivamente.

Considerando-se a dissimilaridade entre o pomelo e os demais genótipos, observou-se uma variação de 0,41 a 0,84 (Figura 2), tornando-o assim um promissor fornecedor de alelos novos para as culturas de laranja, limão, limas e tangerina. Como boa parte do trópico semi-árido reúne condições climáticas favoráveis ao cultivo do pomeleiro, essa cultura poderá deixar de ser explorada em pequenos pomares e entrar na exploração em escala comercial a exemplo do Estado de São Paulo, que responde, praticamente, pela totalidade da produção comercial brasileira (STUCHI *et al.*, 2003).

Apesar de nesse estudo não se ter detectado grandes variabilidades genéticas entre as variedades da mesma espécie, no gênero *Citrus* a diversidade é bastante expressiva (GIACOMETTI, 1991), podendo ser de grande utilidade particularmente em programas de melhoramento genético dirigidos à obtenção de novos porta-enxertos adaptados às mais diversas condições ambientais, bem como na identificação de variedades promissoras em termos de produção.

Tabela 3: Relação dos fragmentos amplificados com o uso de 15 p ISSR utilizados no estudo de diversidade de *Citrus*

<i>Primer</i>	Loci		Loci Monomórficos
	Nº de Loci	Polimórficos	
#862	5	2	3
#858	10	8	2
#820	8	8	0
#860	16	16	0
#2	12	12	0
#834	8	8	0
#851	11	11	0
#845	11	11	0
#1	14	14	0
#864	11	11	0
#885	7	7	0
#897	10	10	0
#866	9	9	0
#813	17	17	0
#886	16	16	0
Total	167	162	5

Conclusões

- 1- O polimorfismo gerado com os marcadores moleculares ISSR mostrou uma baixa variabilidade genética entre as 15 variedades de laranja doce estudadas.
- 2- Os Marcadores ISSR foram eficientes para caracterizar variedades do gênero Citrus e diferenciar genótipos de laranja doce entre si e entre genótipos de limas, tangerinas e pomelos.
- 3- Considerando-se a dissimilaridade entre o pomelo e os demais genótipos, observou-se uma variação de 0,41 a 0,84 tornando-o assim um promissor fornecedor de alelos novos para as culturas de laranja, limão, limas e tangerina.

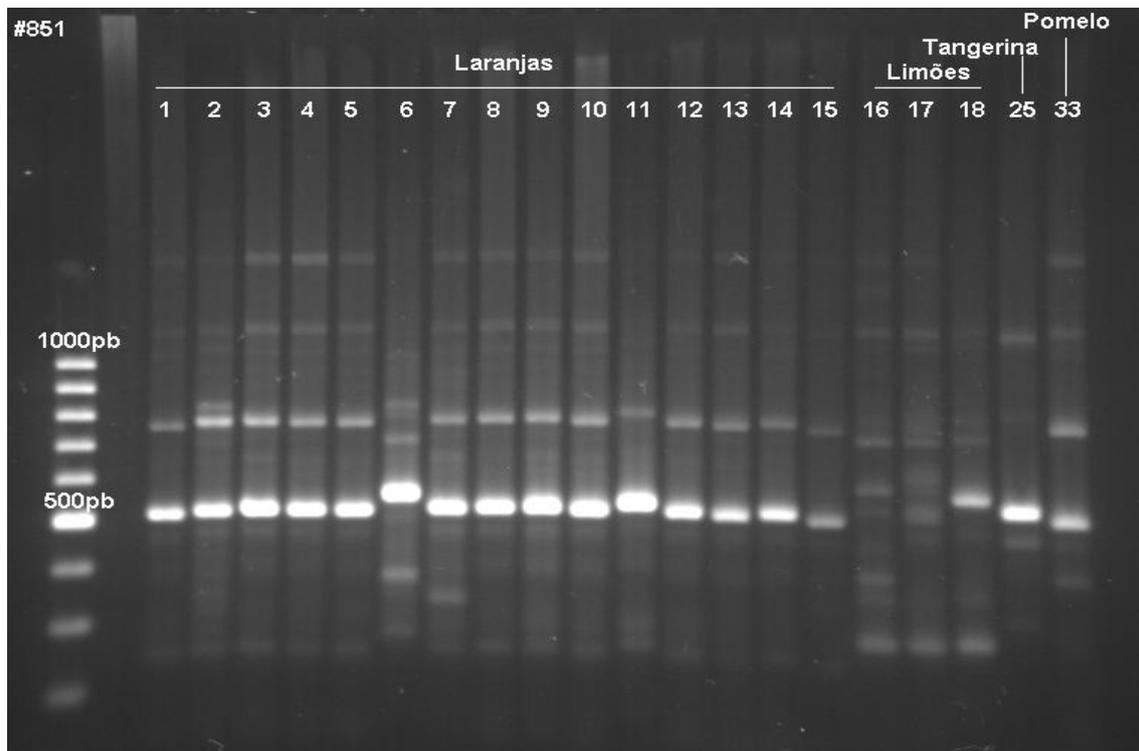


Figura 1 – Padrão de bandas PCR-ISSR para as 20 genótipos do gênero *Citrus*, utilizando-se o primer #851.

Tabela 4. Dissimilaridade genética observada entre 20 acessos do gênero *Citrus* da coleção da Estação Experimental de Brejão/PE, pertencente ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), obtida por meio do programa NTSYS – PC.

Acesso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	25	33	
1 Bahia 101	0,00																				
2 Baianinha 03	0,09	0,00																			
3 Hamlin 02	0,14	0,09	0,00																		
4 Lima	0,07	0,09	0,09	0,00																	
5 Rubi	0,11	0,12	0,04	0,07	0,00																
6 Sunstar	0,29	0,26	0,33	0,34	0,36	0,00															
7 Pineapple	0,08	0,11	0,10	0,08	0,06	0,33	0,00														
8 Pêra D6	0,11	0,14	0,08	0,12	0,06	0,38	0,06	0,00													
9 Pêra D9	0,09	0,15	0,14	0,13	0,12	0,37	0,06	0,07	0,00												
10 Pêra D 12	0,12	0,15	0,07	0,08	0,05	0,41	0,07	0,05	0,12	0,00											
11 Valência Tuxpan	0,13	0,23	0,23	0,21	0,20	0,18	0,19	0,19	0,17	0,22	0,00										
12 Westin	0,11	0,12	0,15	0,10	0,12	0,38	0,08	0,13	0,14	0,10	0,18	0,00									
13 Midsweet	0,05	0,09	0,12	0,07	0,10	0,33	0,04	0,08	0,07	0,08	0,18	0,09	0,00								
14 Natal	0,09	0,10	0,08	0,05	0,06	0,36	0,08	0,07	0,08	0,06	0,19	0,05	0,07	0,00							
15 Salustiana	0,15	0,19	0,22	0,18	0,19	0,39	0,11	0,15	0,10	0,17	0,21	0,16	0,13	0,14	0,00						
16 Lima da Pérsia	0,51	0,51	0,52	0,52	0,50	0,65	0,52	0,53	0,57	0,58	0,66	0,52	0,55	0,49	0,55	0,00					
17 Limão Tahiti 2000	0,36	0,42	0,43	0,41	0,37	0,54	0,36	0,41	0,40	0,44	0,38	0,35	0,40	0,35	0,40	0,49	0,00				
18 Limão Fino	0,58	0,58	0,60	0,62	0,62	0,67	0,58	0,66	0,68	0,66	0,69	0,59	0,64	0,55	0,64	0,54	0,56	0,00			
25 Mexerica	0,44	0,41	0,44	0,43	0,44	0,68	0,49	0,53	0,52	0,52	0,58	0,47	0,49	0,48	0,46	0,60	0,54	0,49	0,00		
33 Star Ruby	0,50	0,55	0,54	0,45	0,49	0,72	0,49	0,49	0,42	0,46	0,55	0,49	0,48	0,41	0,44	0,66	0,60	0,84	0,58	0,00	

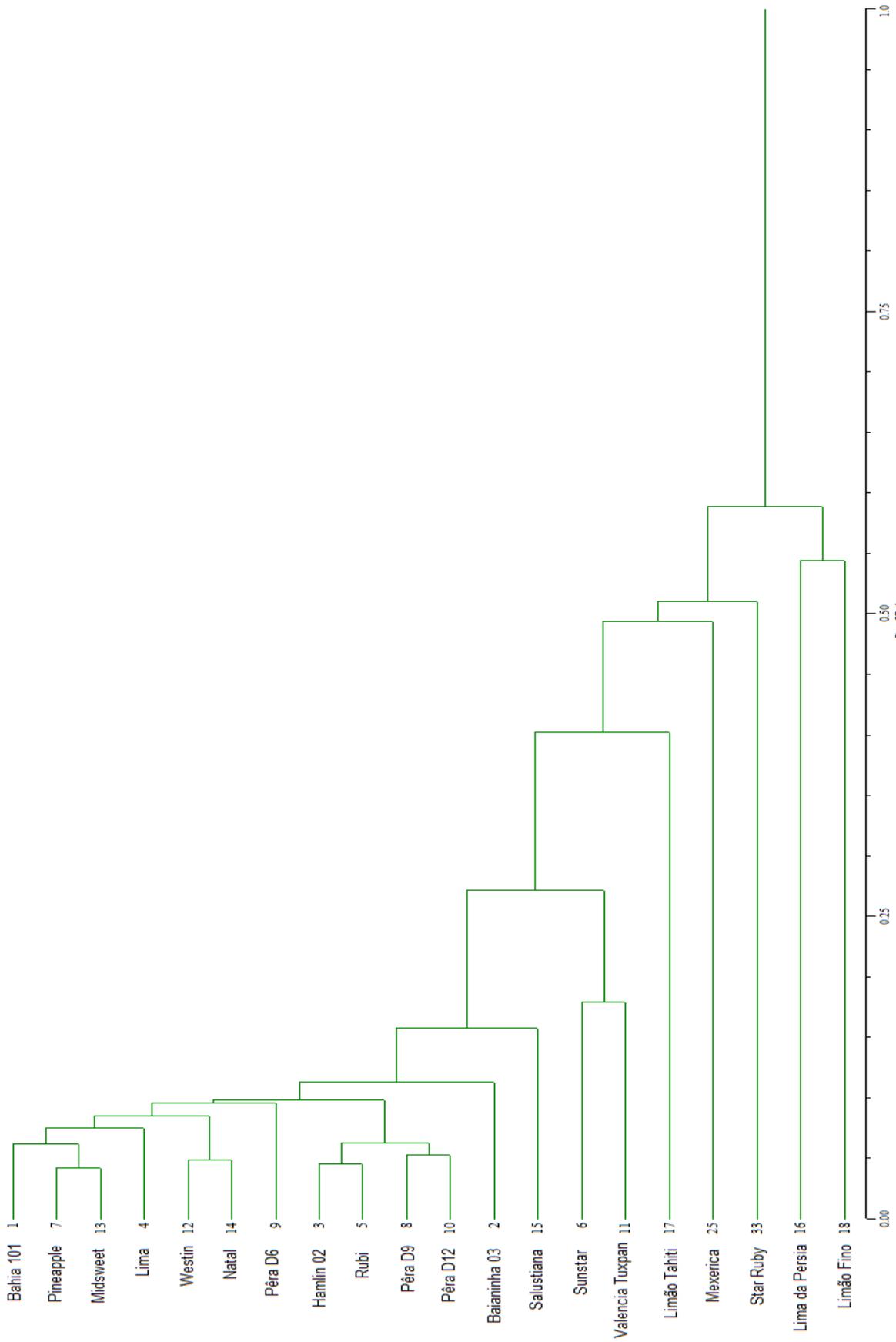


Figura 2 – Agrupamento de 20 variedades do gênero *Citrus* da coleção da Estação Experimental de Brejão/PE, pertencente ao Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA), obtida por meio do programa NTSYS – PC, usando a UPGMA.

Referências Bibliográficas

BOREM, A.; CAIXETA, E.T. Marcadores moleculares. 2ª. Ed. UFV – Viçosa. 2009, 532p.

COELHO, Y. Frutas cítricas importadas no mercado de Salvador, Bahia. **Bahia Agrícola**, Salvador, v.5, n.2, p.29-33.2002.

EMBRAPA MANDICOCA E FRUTICULTURA TROPICAL. Sistema de Produção de Citros para o Nordeste versão eletrônica, 2003
<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Citros/CitrosNordeste/variedades.htm>

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO) Orange Production, 2007
 Disponível em <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> acesso em Maio de 2010

GIACOMETTI, D.C. Taxonomia das espécies cultivadas de citros baseada em filogenética. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A.A. (eds.). Citricultura Brasileira. 2. ed. Campinas, SP: Fundação Cargill, v.1, p.99-115. 1991.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA (IBGE). Disponível em: www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/default.asp?z=t&o=25&i=P acesso abril 2010.

KUMAR, L. S.; JENA, S. N.; NAIR K.N. ISSR polymorphism in Indian wild orange (*Citrus indica* Tanaka, Rutaceae) and related wild species in North-east India. **Scientia Horticulturae** 350–359, 2009

MATTOS JUNIOR, D.; Negri J. D.; FIGUEIREDO, J. O.; POMPEU JUNIOR, J. CITROS: principais informações e recomendações de cultivo. Texto preparado para a versão eletrônica do **Boletim Técnico 200 (IAC)**, 2005 Disponível em <http://www.iac.sp.gov.br/Tecnologias/Citros/Citros.htm>

MURRAY, M.G.; Thompson, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Londres, v.8, n. 19, p.4321-4325, 1980.

NEI, M.; LI, W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.76, p.5269–5273, 1979.

PASSOS, O. S.; ALMEIDA, C.O.; PEIXOUTO, L. S. Potencialidade da Chapada Diamantina para citricultura. **Bahia Agrícola**. v.7, n.1. 2005.

PASSOS, O. S. *et al.*, Certificação e Diversificação da Citricultura do Nordeste Brasileiro. Comunicado técnico 101 **Embrapa Mandioca e Fruticultura**, Cruz das Almas-BA, 2004.

SHAHSAVAR A.R.; IZADPANA K.; TAFAZOLI, E.; SAYED TABATABAEI, B.E. Characterization of citrus germplasm including unknown variants by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam v.112, 310–314, 2007

WÜNSCH, A.; HORMAZA, J.I. Characterization of variability and genetic similarity of European pear using microsatellite loci developed in apple. **Scientia Horticulturae**, v.113, p. 37-43. 2007.

ANEXOS

1. Normas para submissão da Revista Brasileira de Fruticultura

Forma e preparação de manuscritos

1. A Revista Brasileira de Fruticultura (RBF) destina-se à publicação de artigos e comunicações técnico-científicos na área da fruticultura, referentes a resultados de pesquisas originais e inéditas, redigidas em **português, espanhol** ou **inglês**, e ou 1 ou 2 revisões por número, de autores convidados.
2. É imperativo que todos os autores assinem o ofício de encaminhamento mencionando que : “OS AUTORES DECLARAM QUE O REFERIDO TRABALHO NÃO FOI PUBLICADO ANTERIORMENTE, OU ENCAMINHADO PARA PUBLICAÇÃO À OUTRA REVISTA E CONCORDAM COM A SUBMISSÃO E TRANSFERÊNCIA DOS DIREITOS DE PUBLICAÇÃO DO REFERIDO ARTIGO PARA A REVISTA.”, deve indicar a natureza da publicação (ARTIGO OU COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA). De acordo com a natureza da publicação, o mesmo deverá ser redigido de acordo com as respectivas normas. Trabalhos submetidos como artigo não serão julgados ou publicados na forma de Comunicação Científica e vice-versa.
3. **Quando o número de autores por manuscrito exceder a 4 (quatro), o mesmo deverá vir acompanhado de justificativa descrevendo a efetiva participação e/ou contribuição de cada um dos autores para a consecução do trabalho submetido.**
4. Os trabalhos devem ser encaminhados (SEM DISQUETE) em quatro vias (3 vias sem o nome do(s) autor(es) para serem utilizadas pelos assessores e uma via completa para o arquivo, incluindo e-mail,), em papel tamanho A4 (210 x 297mm), numeradas, com margens de 2 cm, em espaço um e meio, letra Times New Roman, no tamanho 13 e escritos em uma única face do papel.
5. O texto deve ser escrito corrido, numerando linhas e parágrafos. Tabelas e figuras em folhas separadas, no final do artigo.
6. O Custo para publicação na RBF é de R\$ 250,00 (sócio) por trabalho de

12 páginas (R\$ 50,00 por página adicional) a ser pago da seguinte forma:

1. No encaminhamento inicial efetuar o pagamento de R\$ 100,00 e na aceitação do trabalho o restante da taxa:
 2. R\$ 150,00 para sócios (primeiro autor deverá ser sócio);
 3. R\$ 300,00 para não sócios.
 4. **Banco do Brasil, agência nº 0269-0 e Conta Corrente nº 8356-9 (enviar cópia do comprovante)**
 5. **OBS: Para trabalhos denegados ou encerrados, não será devolvido o pagamento inicial.**
 6. **Enviar os trabalhos para o editor-chefe da RBF, Prof. Carlos Ruggiero, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane,s/n – Unesp/FCAV -CEP 14884-900 – Jaboticabal-SP - email: rbf@fcav.unesp.br . home page: www.rbf.org.br .**
7. Uma vez publicados, os trabalhos poderão ser transcritos, parciais ou totalmente, mediante citação da RBF, do(s) autor(es) e do volume, número, paginação e ano. As opiniões e conceitos emitidos nos artigos são de exclusiva responsabilidade do(s) autor(es).
8. Os artigos deverão ser organizados em **Título, Nomes dos Autores completos (sem abreviações e separados por vírgula, e de dois autores, separadas por &), Resumo (incluindo Termos para Indexação), Title, Abstract (incluindo Index Terms), Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusão, Agradecimentos (opcional), Referências Bibliográficas, Tabelas e Figuras. O artigo deve ser** submetido à correção de Português e Inglês, por profissionais habilitados, antes de ser encaminhado à RBF.
9. As comunicações devem ter estrutura mais simples 8 páginas, com texto corrido, sem destacar os itens, exceto Referências.
10. No **Rodapé** da primeira página, deverão constar a qualificação profissional, o endereço e e-mail atualizados do(s) autor(es) e menções de suporte financeiro.
11. As **Legendas** das Figuras e Tabelas deverão ser auto-explicativas e concisas. As Figuras coloridas terão um custo adicional de R\$400,00

em folhas que as contenham. As legendas, símbolos, equações, tabelas, etc. deverão ter tamanho que permita perfeita legibilidade, mesmo numa redução de 50% na impressão final da revista; parte alguma da Figura deverá ser datilografada; a chave das convenções adotadas deverá ser incluída na área da Figura; a colocação de título na Figura deverá ser evitada, se este **puder** fazer parte da legenda; as fotografias deverão ser de boa qualidade, bem focalizadas e de bom contraste, e serão colocadas em envelopes; cada Figura será identificada na margem, a traço leve de lápis, pelo seu número e nome do autor; as Figuras não devem estar danificadas com grampos.

12. Nas Tabelas, devem-se evitar as linhas verticais e usar horizontais, apenas para a separação do cabeçalho e final das mesmas, evitando o uso de linhas duplas.
13. **Apenas a versão final do artigo deve ser acompanhada por cópia em cd**, usando-se preferencialmente os programas Word for Windows (texto) e Excel (gráficos).
14. As citações de autores no texto deverão ser feitas com letras minúsculas, tanto fora quanto dentro dos parênteses, separadas por “&”, quando dois autores. Quando mais de dois autores, citar o primeiro seguido de “et al”. (não use “itálico”).

REFERÊNCIAS:

NORMAS PARA REFERENCIA (ABNT NRB 6023, Ago. 2002)

As referencias no fim do texto deverão ser apresentadas em ordem alfabética nos seguintes formatos:

ARTIGO DE PERIODICO

AUTOR (es). Título do artigo. **Título do periódico**, local de publicação, v., n., p., ano.

ARTIGO DE PERIODICO EM MEIO ELETRONICO

AUTOR(es). Título do artigo. **Título do Periódico**, cidade, v., n., p., ano.

Disponível em: <endereço eletrônico>. Acesso em: dia mês (abreviado). ano

AUTOR(es). Título do artigo. **Título do Periódico**, local de publicação, v., n., p., ano. CD-ROM

LIVRO

AUTOR(es). **Titulo:** subtítulo. edição (abreviada). Local: Edidora, ano. p. (total ou parcial)

CAPITULO DE LIVRO

AUTOR. Titulo do capitulo. In: AUTOR do livro. **Titulo:** subtítulo. edição(abreviada). Local: Editora, ano. paginas do capítulo.

LIVRO EM MEIO ELETRONICO

AUTOR(es). **Titulo.** edição(abreviada). Local: Editora, ano. p. (total ou parcial). Disponível em<endereço eletrônico>. Acesso em: dia mês (abreviado). Ano

AUTOR (es). **Titulo.** Edição (abreviada). Local: Editora, ano. p. CD-ROM

EVENTOS

AUTOR. Titulo do trabalho. In: NOME DO EVENTO, numeração, ano, local de realização.

Titulo...Local de publicação: editora, ano de publicação. p.

EVENTOS EM MEIO ELETRONICO

AUTOR. Titulo do trabalho. In: NOME DO EVENTO, numeração, ano, local de realização. **Titulo...**Local de publicação: Editora, data de publicação. Disponível em:

<endereço eletrônico>. Acesso em: dia mês (abreviado) ano.

AUTOR. Titulo do trabalho. In: NOME DO EVENTO, numeração, ano, local de realização. **Título...**Local de publicação: Editora, ano de publicação. CD-ROM

DISSERTAÇÃO, TESES E TRABALHOS DE GRADUAÇÃO

AUTOR. Titulo. ano. Número de folhas ou volumes. Categoria da Tese (Grau e área de concentração)- Nome da faculdade, Universidade, ano.

NORMAS PARA TABELAS E FIGURAS:

Tabela - Microsoft Word 97 ou versão superior; Fonte: Times New Roman, tamanho 10; Parágrafo/Espaçamento simples; Largura da tabela em 10 ou 20,6 cm; Além de mandar a tabela no mesmo arquivo do trabalho, enviar cada tabela em arquivos separados; O título ou rodapé deverá ser digitado no MS Word.

Gráfico - Microsoft Excel/ Word 97 ou versão superior; Fonte: Times New Roman, tamanho 10; Parágrafo/Espaçamento simples; Largura da tabela em 10 ou 20,6 cm; Além de estar no corpo do trabalho, o gráfico deverá ser

enviado separadamente, como imagem (na extensão jpg, tif ou gif com 300 dpi de resolução), e como arquivo do Excel atentando para as especificações de largura e fonte; O título ou rodapé deverá ser digitado no MS Word.

Fotos - Todas as fotos deverão estar com 300 dpi de resolução em arquivo na extensão: jpg, jpeg, tif ou gif; Além de estarem no corpo do trabalho, as fotos devem estar em arquivos separados; O título ou rodapé deverá ser digitado no MS Word.

Figuras ou imagens geradas por outros programas – As imagens geradas por outros programas que não sejam do pacote Office Microsoft, devem estar com 300 dpi na extensão: jpg, tif ou gif; Largura de 10 ou 20,6 cm; O título ou rodapé deverá ser digitado no MS Word.