

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO**

**CARACTERIZAÇÃO AGRONÔMICA E MOLECULAR DE SELEÇÕES DE
LIMEIRA ÁCIDA 'TAHITI' *Citrus latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka**

MAGNO GUIMARÃES SANTOS

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
MARÇO – 2012**

**CARACTERIZAÇÃO AGRONÔMICA E MOLECULAR DE SELEÇÕES DE
LIMEIRA ÁCIDA 'TAHITI' *Citrus latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka**

MAGNO GUIMARÃES SANTOS

Engenheiro Agrônomo
Universidade Estadual de Montes Claros, 2008

Dissertação submetida ao Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais

Orientador: Prof. Dra. Cláudia Fortes Ferreira

Co-Orientador: Prof. Dr. Abelmon da Silva Gesteira

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
MESTRADO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA – 2012

FICHA CATALOGRÁFICA

S237 Santos, Magno Guimarães.

Caracterização Agronômica e Molecular de Seleções de Limeira ácida 'Tahiti' *Citrus latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka / Magno Guimarães Santos – Cruz das Almas, BA, 2012.
63 fl. , il.

Orientadora: Dra. Cláudia Fortes Ferreira.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Melhoramento) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológica, 2012.

1. Citros-Cultivo 2. limão. I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias e Tecnológicas. II. Título.

CDD 641.343 04

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Lucidalva Ribeiro Gonçalves Pinheiro – CRB5/1161.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
MAGNO GUIMARÃES SANTOS**

Dr^a. Cláudia Fortes Ferreira
Embrapa Mandioca e Fruticultura - CNPMF
(Orientadora)

Dr. Carlos Ivan Aguilar Vildoso
Embrapa Mandioca e Fruticultura - CNPMF

Dr^a. Fernanda Amato Gaiotto
Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais em

Conferindo o Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais em.....

*A minha esposa Kênia
pelo amor incondicional
Dedico...*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por guiar minha consciência com sua voz insistente me levando aos caminhos do amor, da paz, respeito e sabedoria.

A minha esposa pela paciência, atenção durante todo período em que estive distante. Por estar sempre disposta a me escutar nos momentos de fraquezas. Por todo amor e dedicação incondicionais.

Aos meus pais, José e Ediléia pelo amor, apoio, conselhos, incentivo, ensinamentos e compreensão, em todos os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos, Tafarel e Elise por alegrarem minha vida com suas presenças.

A minha orientadora Dr. Cláudia Fortes Ferreira pela oportunidade, amizade e orientação.

A Dr. Orlando Sampaio Passos, pela orientação, paciência e por sempre estar disposto a me ajudar.

Aos pesquisadores da Embrapa: Dr. Walter, Dr. Abelmon, Dr. Eduardo Girardi, Dr. Carlos Ledo e Dr. Eduardo Stuchi pelo aprendizado e amizade constantes.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura pela infra-estrutura para a realização dos trabalhos e por me proporcionar a oportunidade de cursar este mestrado.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e ao curso de Mestrado pela oportunidade de realização do curso.

Aos colegas de laboratório Raimundo, Epaminondas, José Henrique, Lilian, Jacqueline, Dayse, Pedro; e aos colegas de campo Antônio Teixeira, Antônio Santana, Alcides, Getúlio, Liziane e Edson pelo apoio nos trabalhos.

A todos os colegas do RGV que me ajudaram e participaram desta fase e grande aprendizado.

Aos professores do Curso de RGV pela atenção e por estarem sempre dispostos a me orientar.

A todos aqueles que de alguma forma colaboraram com a concretização desse trabalho.

Muito Obrigado

SUMÁRIO

Página

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO.....1

Capítulo 1

COMPORTAMENTO AGRONÔMICO DE SELEÇÕES DE LIMEIRA ÁCIDA 'TAHITI' *Citrus latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka NO RECÔNCAVO BAIANO.....16

Capítulo 2

ANÁLISE DE VARIABILIDADE DE SELEÇÕES DE LIMEIRA ÁCIDA 'TAHITI' MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES ISSR E IRAP34

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....54

CARACTERIZAÇÃO AGRONÔMICA E MOLECULAR DE SELEÇÕES DE LIMEIRA ÁCIDA 'TAHITI' *Citrus latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka.

Autor: Magno Guimarães Santos
Orientadora: Cláudia Fortes Ferreira
Co-orientador: Abelmon da Silva Gesteira

Resumo: As estatísticas agrupam a produção de limões e limas ácidas. O Brasil, diferente do restante do mundo, tem sua produção concentrada em lima ácida 'Tahiti, produzindo apenas uma pequena parcela de limões verdadeiros e de limas ácidas 'Galego'. Na última década, a limeira ácida 'Tahiti' teve um crescente mercado de exportações, no entanto, os plantios desta cultura restringiram-se em apenas duas seleções, 'IAC – 5' e 'Quebra-galho', e em um porta-enxerto, o limoeiro 'Cravo'. Dadas a escassez de trabalhos comparativos neste grupo, este trabalho objetivou caracterizar e comparar seleções de limeira ácida 'Tahiti' por meio de caracteres de desenvolvimento vegetativo, produtivo e de qualidade físico-química dos frutos, associando os mesmos a análises moleculares. O trabalho foi dividido em dois capítulos. No primeiro, foram avaliadas nove seleções de limeira ácida 'Tahiti' enxertadas sobre citrumeleiro 'Swingle', em um delineamento em blocos casualizados, mediante caracteres agronômicos de desenvolvimento vegetativo, produtivo e qualidade físico-química de frutos. No capítulo 2 foram usados marcadores ISSR e IRAP, além de dados quantitativos de qualidade físico-química de frutos, para detectar variabilidade entre diversas seleções de limeira ácida 'Tahiti'. Os resultados indicaram que existem diferenças no comportamento agronômico entre as seleções de limeira ácida 'Tahiti', apontando as seleções 'Persian 58' e '5059' como as de melhor desempenho produtivo. Os marcadores ISSR e IRAP detectaram polimorfismo entre as limas ácidas, sendo que IRAP evidenciou maior percentual de polimorfismo em relação ao ISSR. Os dados moleculares revelaram a formação de dois grupos distintos dentro das seleções de limeira ácida 'Tahiti'. Um grupo composto por seleções com frutos com rara frequência de sementes, a exemplo do 'IAC – 5'; e outro por seleções com frequência constante de sementes, caso da seleção 'CNPMF 2000'.
Palavras-chave: *Citrus latifolia*, melhoramento genético, marcadores morfológicos, marcadores moleculares.

AGRONOMIC AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF 'TAHITI' ACID LIME *Citrus latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka SELECTIONS.

Author: Magno Guimarães Santos
Adviser: Cláudia Fortes Ferreira
Co-adviser: Abelmon da Silva Gesteira

Abstract: Statistically, lemons and acid limes are placed in the same group. Brazil, contrary to the rest of the world, concentrates its production in 'Tahiti' acid limes, producing only a small parcel of real lemons and of 'Galego' acid limes. In 2009, Brazil occupied fifth place in the worldwide production of lemons; only staying behind India, Mexico, China and Argentina. In the last decade, the export market increased for the 'Tahiti' acid lime; however, plantations were restricted only to the 'IAC-5' and 'Quebra-galho' selections, and in one rootstock, Rangpou. Therefore, the objective of the present work was to compare and characterize selections of the 'Tahiti' acid lime using plant development and yield characteristics, physico-chemical quality of fruits and by using molecular markers. The work was divided into two chapters. In the first chapter, nine selections of 'Tahiti' acid lime grafted on 'Swingle' citrumelo, in a randomized block design, using agronomic characteristics of plant development, yield and physico-chemical quality of fruit, were analyzed. In chapter 2, ISSR and IRAP markers and quantitative data of physico-chemical quality of fruits, were used to study the variability between the many 'Tahiti' acid lime selections. The results indicate differences in the agronomic behavior of the 'Tahiti' acid lime selections; whereas the 'Persian 58' and '5059' were the selections with best yield. The ISSR and IRAP markers detected polymorphism between the 'Tahiti' acid lime selections. The IRAP marker demonstrated greater percentage of polymorphism in comparison to the ISSR markers. Molecular data revealed two groups for the 'Tahiti' acid lime selections. A group of selections with rare frequency of fruits with seeds, such as the 'IAC - 5', and other selections with a constant frequency of seeds in case of selection 'CNPMF - 2000'.

Key-words: *Citrus latifolia*, genetic breeding, morphologic markers, molecular markers.

INTRODUÇÃO

A limeira ácida 'Tahiti' [*Citrus latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka], também chamada limoeiro 'Tahiti', pertence ao grupo de citros denominado limas ácidas. Esta lima ácida se difere da lima ácida 'Galego' [*C. aurantifolia* (Christm.) Swingle] por ser maior e não possuir sementes. Os citros, inclusive a limeira ácida 'Tahiti', são encontrados entre as latitudes de 35° norte e sul do equador (CAMERON e SOOST, 1986). No Brasil, essa espécie é encontrada em todas as regiões; tanto em plantios irrigados quanto em sequeiro.

A limeira ácida 'Tahiti' é de constituição triploide, $2n=27$ (BACHI, 1940), enquanto que as demais espécies pertencentes ao gênero *Citrus* são diploides, $2n=18$ (GUERRA et al., 1997). É uma planta vigorosa, com folhagem de coloração verde escura. Suas flores possuem cinco pétalas, com grande número de estames, porém, geralmente, sem presença pólen. Seus frutos têm desenvolvimento partenocárpico.

Segundo Passos et al. (2002), nas condições climáticas do recôncavo baiano, plantas adultas de limeira ácida 'Tahiti' enxertadas em limoeiro 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck) apresentam as seguintes características: porte elevado, altura em torno de 3,0 m, copa arredondada, e diâmetro de tronco (a 30 cm do solo) com cerca de 20 cm. As folhas são grandes e de tonalidade verde-claro. Os frutos são ovalados e podem alcançar comprimento de 6,0 a 7,0 cm e diâmetro de 5,0 a 6,0 cm. Os mesmos podem apresentar peso de até 160 gramas, com aproximadamente 50% de peso de suco, sabor ácido, sólidos solúveis - SS na faixa de 7,5 a 10,0 ° brix, acidez total entre 5,7 e 6,2%, relação SS/acidez total variando de 1,2 a 1,8. A casca é lisa, com coloração verde intenso uniforme e não possuem sementes. A floração ocorre no mês de setembro, apresentando outras temporãs variando em função das chuvas e suplementação de água via irrigação. As plantas produzem frutos durante o ano todo, com concentração de janeiro a

junho. A produtividade situa-se em torno de 40 t.ha⁻¹. A limeira ácida é suscetível ao viroide da exocorte, a *Phytophthora spp.* (causador da gomose) e ao Vírus da tristeza dos citros – CTV.

As frutas cítricas, laranja, tangerina e limão, têm ocupado posição de destaque no mercado agrícola. Sendo o limão o de maior expansão em exportações. As estatísticas disponíveis não fazem distinção entre os limões e as limas ácidas. Diferente da produção mundial que é de 70% de limões verdadeiros e o restante de limas ácidas, a produção brasileira é em sua maioria concentrada em lima ácida 'Tahiti' (IEA, 2008). Entre o ano 2003 e 2010 o faturamento com exportações de limão subiu aproximadamente de 17 para quase 51 milhões de dólares. A quantidade de limão exportada pelo Brasil neste período cresceu quase 2 vezes, saindo de 34.011 toneladas alcançando a marca de 63.060 toneladas (IBRAF, 2011). O principal destino da lima ácida é a União Européia, sendo os embarques mais intensos no primeiro trimestre do ano. Neste período, São Paulo e o litoral Nordeste estão em pico de safra e praticamente não existem concorrentes internacionais, haja vista que o México, um dos maiores exportadores de limão, está na entressafra (VITTI, 2009). A Holanda importou 61,18% da totalidade de lima ácida 'Tahiti' exportada pelo Brasil em 2009; seguida pelo Reino Unido (15,34%), Emirados Árabes Unidos (6,84%) e Espanha (4,27%) (IBRAF, 2011).

O Brasil com a produção aproximada de 972 mil toneladas ocupa o quinto lugar em nível mundial em produção de limões, ficando atrás apenas da Índia, México, China e Argentina (FAO, 2011). A Região Sudeste é a principal produtora, com aproximadamente 77,75% do total, sendo que o Estado de São Paulo é o principal produtor e exportador do Brasil. Em 2009, São Paulo foi responsável por 69,32% da produção brasileira de limão, seguido por Minas Gerais (5,45%), Bahia (5,26%), e Rio Grande do Norte (4,69 %) (IBGE, 2010).

Krug e Bacchi (1944) acreditavam que a limeira ácida 'Tahiti' surgiu como um triploide natural de limas diploides, mas também cogitavam que poderia ter surgido da união de um gameta não-reduzido com um gameta haploide. Baseando-se em análises de cariótipos de limoeiros e limeiras, Carvalho (2003) sugeriu que o surgimento da limeira ácida 'Tahiti' deu-se de duas prováveis maneiras: da junção de um gameta $2n$ de *C. medica*, com um gameta n de *C.*

limon; ou por outra, de um gameta $2n$ de uma limeira, *C. aurantifolia* ou *C. limettioides*, com um gameta reduzido de *C. limon*.

Em limeira ácida 'Tahiti' os microsporócitos e os megasporócitos degeneram-se num estágio inicial de desenvolvimento. Podendo alguns microsporócitos escapar a degeneração. Então, alguns univalentes, bivalentes e trivalentes são formados durante a microsporogênese. O que justificaria a esterilidade dessa limeira, e a formação de frutos com raríssimas sementes (Krug e Bacchi 1944; Frost e Soost 1968; Carvalho, 2003).

A hibridação controlada é o método de melhoramento mais utilizado na obtenção de novas variedades cítricas, mas devido à esterilidade da limeira ácida 'Tahiti' esta metodologia se torna inaplicável a esta espécie. A produção de plântulas de limeira ácida 'Tahiti' por polinização aberta é uma alternativa para obtenção de novos genótipos, pois mesmo em baixa frequência, ainda se consegue encontrar sementes em alguns frutos desta espécie. Neste método, sementes oriundas de lima ácida 'Tahiti' dão origem a plântulas, que ao iniciarem sua vida reprodutiva tem seus frutos avaliados, e caso suas características sejam semelhantes aos de uma lima ácida, as plantas são clonadas e comparadas com outras seleções em ensaios regionais.

Krug e Bacchi (1944) obtiveram sementes de polinização aberta, das quais três plântulas sobreviveram. No entanto, nenhuma delas possuía número de cromossomos igual a 27 em suas células somáticas. Eles concluíram que apenas as células gaméticas femininas com um número de cromossomos próximo a nove, dão origem a sacos embrionários viáveis nesta variedade triploide; uma vez que as anteras desta espécie não produzem pólen.

Em 1952, em Lake Place, na Florida, foram obtidas setenta e sete plantas sobreviventes de polinização aberta de limeira ácida 'Tahiti' que quando adultas foram classificadas de acordo com caracteres de fruto e folhas em 10 grupos, a citar: Cidra (*C. medica* L.), limão 'Verdadeiro' [*C. limon* (L.) Burm.F.], lima ácida 'Galego' (*C. aurantifolia* Swingle), pomelo (*C. paradisi* Macfad.), laranja doce (*C. sinensis* Osbeck), lima ácida 'Tahiti' [*C. latifolia* (Yu.Tanaka) Tanaka], tangerina (*C. reticulata* Blanco), laranja azeda (*C. aurantium* L.), lima doce (*C. limettioides* Tanaka) e limequat (*Fortunella* sp. x *C. aurantifolia*) (REECE e CHILDS, 1962).

Estes trabalhos mostram que apesar da existência da triploidia é comum obter algumas sementes, e dependendo da presença de pólen vizinhos, podem ser obtidas plântulas zigóticas com características diferentes da limeira ácida 'Tahiti'.

Soares Filho e Passos (1978) também conseguiram sementes de polinização aberta e a partir destas selecionaram duas plantas com características semelhantes à de limeira ácida 'Tahiti' que deram origem as seleções conhecidas como 'CNPMF – 01' e 'CNPMF – 02'.

De acordo com KRUG e BACCHI (1944), antigamente, conheciam-se apenas duas seleções de limeiras ácidas sem sementes e com importância econômica, 'Bearss' e 'Tahiti'. Estudos comparativos entre eles não encontraram diferenças apreciáveis nos caracteres da planta, sendo muito provável, portanto, que a seleção 'Bearss' seja um clone nucelar de limeira ácida 'Tahiti'.

Na década de 70, em Cordeirópolis – SP, foram avaliadas seis seleções de limeira ácida 'Tahiti' enxertadas em limoeiro 'Cravo', a saber: 'IAC – 1', 'IAC – 2', 'IAC – 3', 'IAC – 4', 'IAC – 5' e 'IAC – 6'. A seleção 'IAC – 5' mostrou maior produção nos meses de janeiro, julho e outubro. As plantas apresentaram maior vigor e ausência de sintomas de fissuras da casca, comportando-se como a melhor seleção nas condições do experimento (FIGUEIREDO et al., 1976). Todas as seleções deste experimento estavam infectadas com estirpes de exocorte, exceto a seleção IAC – 5, sugerindo que os sintomas de fissuras da casca, responsável por irregularidades de vigor e mortes de plantas, eram causados pelo vírus da exocorte (SALIBE e ROESSING, 1965). Anos mais tarde, Semancick e Weathers (1972) demonstraram que o agente responsável pela exocorte, antes atribuído a um vírus, na verdade era um viroide, denominado Viroide da Exocorte dos Citrus (Citrus exocortis viroid, CEVd).

Desde então, no Brasil, o cultivo de limeira ácida 'Tahiti' vem sendo baseada em apenas duas seleções, o 'IAC – 5' e o 'Quebra-galho', e em apenas um porta-enxerto, o limoeiro 'Cravo' (FIGUEIREDO et al., 1996). Essas combinações copa/porta-enxerto possuem vida útil reduzida, devido à grande susceptibilidade à *Phytophthora* spp., presente em praticamente todos os pomares, cuja ação é crescente devido aos cultivos sucessivos; e a contaminação por viroides, no caso do 'Quebra-galho'.

O 'IAC – 5' apresenta alta produtividade, maior precocidade, maior tolerância ao vírus da tristeza dos citros (CTV), ausência de caneluras na casca do tronco e ramos, e menor incidência de hipertrofia do cálice das flores e maior uniformidade do pomar (FIGUEIREDO, 1991). Porém, as plantas são muito altas, o que dificulta a colheita e o adensamento de plantio (STUCHI, 1993). Mas estas limitações podem ser superadas com o uso de porta-enxertos que imprimam menor porte a copa, um exemplo é o trifoliata 'Flying Dragon' [*P. trifoliata* (L.) Raf. var. *monstrosa* T. Ito] (STUCHI e SILVA, 2005).

Segundo Figueiredo (1991), a seleção 'Quebra-galho' é contaminada com o complexo de viroides dos citros (CVd), e também o exocorte (CeVd). Estes viroides causam uma redução do porte e uma grande variação entre árvores do pomar. Segundo Silva (2007) alguns produtores ainda preferem o 'Quebra-galho' ao 'IAC – 5' devido ao seu menor porte e maior produção na entressafra, além de melhor distribuição das safras ao longo do ano. A mesma autora selecionou plantas altamente produtivas e infectadas com exocorte, para servirem de matrizes fornecedoras de borbulhas de limeira ácida 'Tahiti'.

O Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Citros pertencente à Embrapa Mandioca e Fruticultura – CNPMF, dotado de grande variabilidade genética, possui cerca de 600 acessos de citros compreendendo diversas espécies e variedades de Citrus, além de gêneros relacionados a este, como: *Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus*, *Eremocitrus*, *Severinia*, entre outros (SOARES FILHO et al., 2003). Esta coleção de citros contém uma grande variabilidade de limoeiros, como exemplo: 'Verdadeiro' (*C. limon* L. Burm.f.), 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck), 'Rugoso' (*C. jambhiri* Lush.), 'Volkameriano' (*C. volkameriana* Pasq.), assim como limeira ácida 'Galego' (*C. aurantifolia* Swingle), limeira ácida 'Tahiti' [*C. latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka]. Conta, também, com diversos acessos de limeira ácida 'Tahiti' originados de diversos locais do Brasil e do mundo.

Os programas de melhoramento genético vegetal procuram selecionar ou criar recursos genéticos que possam ser utilizados para sustentabilidade da produção agrícola. Para uma eficiente utilização do germoplasma é necessário conhecê-lo tanto morfológicamente, via descrição de caracteres morfológicos, quanto em nível de genoma, utilizando técnicas moleculares, atividades estas denominadas caracterização.

A caracterização agrônômica é um fundamento para o conhecimento das variedades existentes, de maneira a promover à diversificação das variedades disponíveis para o cultivo. Cada aspecto deve ser avaliado, buscando a definição da variedade mais bem adaptada a cada ambiente (MOREIRA e PIO, 1991).

Diversos trabalhos de caracterização de citros objetivam descrever características físicas e químicas de frutos, sempre utilizando variedades adequadas ao consumo, tanto *in natura* como para a indústria (PIO, 1992; PIO, 1997; DOMINGUES et al., 1999; RADMANN e OLIVEIRA, 2003; BRUGNARA, 2006).

As análises moleculares têm atuado como uma ferramenta do melhoramento genético, permitindo estimar a divergência genética, seja em nível de sequência ou frequência alélica, calculada entre indivíduos, populações ou espécies (BEAUMONT et al., 1998). Além disso, os dados podem ser usados em análises de variabilidade genética, genética de populações, mapas de ligação, *fingerprint* de variedades, melhoramento assistido por marcadores, dentre outras (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores moleculares podem ser classificados basicamente em três grupos de acordo com a metodologia utilizada: isoenzimáticos, de hibridização e reação em cadeia de polimerase (*Polymerase Chain Reaction - PCR*). Este último corresponde a uma técnica de cópia e multiplicação *in vitro* de um fragmento de DNA mediada por uma enzima DNA polimerase, após ciclos repetitivos de temperatura de desnaturação do DNA, anelamento de um iniciador da região de interesse, e extensão da fita de DNA (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

O uso adequado dos marcadores moleculares depende de uma melhor compreensão de características, como: abundância no genoma, nível de polimorfismo detectado, a especificidade do locos, reprodutibilidade técnica, requisitos necessários e o investimento financeiro (SPOONER et al., 2005). A melhor compreensão da eficácia dos diferentes marcadores moleculares é um passo importante para caracterização e classificação do germoplasma vegetal (SCARIOT et al., 2007). Dentre os marcadores de amplificação estão: o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) e o IRAP (*Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism*). O polimorfismo destes marcadores corresponde à presença de

uma determinada marca em um indivíduo e ausência desta mesma marca em outro.

Na técnica ISSR dois microssatélites (seqüências simples de um a seis nucleotídeos repetidos em tandem – *Simple sequence repeat* – SSR) são utilizados como iniciadores (*primers*). Nesta técnica, a marca lida por meio da técnica de eletroforese corresponde ao fragmento de DNA amplificado entre dois *primers* iguais e em sentidos opostos, um em cada fita. Este marcador pode ser acrescentado no final 3' ou 5' de uma a quatro bases de purina ou pirimidina. Como exemplo, temos o *primer* (CA)₈RY, em que R é uma purina e Y uma pirimidina, e tem com alvo oito repetições CA (ZIETKIEWICZ et al., 1994).

Uma das principais vantagens deste marcador é que sua construção não depende do sequenciamento como é o caso do SSR. Tendo assim a capacidade de gerar um grande número locos de diferentes comprimentos, além de poder ser utilizado para analisar praticamente qualquer organismo, mesmo aqueles para os quais se dispõe de pouca ou nenhuma informação genética prévia (ARCADE et al., 2000; GUPTA et al., 1994).

Os IRAPs são marcadores que se baseiam na amplificação da zona que se encontra entre dois Retrotransposons LTR (seqüências terminais longas) próximos e em localização oposta no genoma. Os Retrotransposons são elementos genéticos que se movem no interior de uma mesma célula via um intermediário de mRNA, seguida de transcrição reversa e inserção da cópia de cDNA em um novo sítio no genoma, causando mutações de inserções, alterações na estrutura e função dos genes. Os retrotransposons são divididos em duas classes: LTR e não-LTR. As LTRs que limitam um retrotransposon contêm fins que são altamente conservados, em uma determinada família de retroelementos. Geralmente, um *primer* é desenhado para corresponder a um segmento conservado da LTR (KALENDAR et al., 1999). Estes marcadores são potenciais devido à abundância no genoma e sua capacidade para criar novas cópias e inserir ao longo dele aumentando assim o seu tamanho (KUMAR e BENNETZEN, 1999).

Os marcadores moleculares ISSR e IRAP têm sido usados em análises moleculares de diversas espécies incluindo as pertencentes ao gênero *Citrus*.

Marcadores IRAP, juntamente com ISSR e REMAP (*Retrotransposon – ISSR Amplified Polymorphism*) foram usados em uma análise de evolução de Triticale. Esses marcadores conseguiram detectar perdas e rearranjos nesse alopoliploide ao compará-lo com seus genitores: trigo e centeio (BENTO et al., 2008). Marcadores IRAP mostraram alto polimorfismo e conseqüentemente alto poder de discriminação entre espécies de *Musa* (TEO et al., 2005), de arroz (BRANCO et al., 2007) e de populações de *Adonis vernalis* (BORONNIKOVA e KALENDAR, 2010). Trabalhos têm sido direcionados para identificação de retrotransposons no genoma de várias espécies, entre elas *Fagus sylvatica* (EMILIANI et al., 2008), *Hordeum vulgare* (LEIGH et al. 2003), *Arachis* (FONSECA et al., 2006), *C. aurantium* e *Poncirus trifoliata* (BERNET E ASINS, 2003), *C. sinensis* (CABANAS, 2005).

Gulsen e Roose, (2001) utilizaram marcadores ISSR para analisar divergência entre 57 acessos de limões. Eles verificaram que 68,0% eram praticamente idênticos, sugerindo que estes acessos teriam sido originados de mutações, a partir de um único ancestral.

Moraes Filho et al (2011) detectaram polimorfismo em variedades de laranja doce e limoeiro. Além disso, a análise com marcadores ISSR demonstrou ser uma técnica poderosa para discriminar adesões de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. (UZUN et al., 2010b) e de pomelos (UZUN et al., 2010a). Krueger e Roose (2003) mostraram que marcadores ISSR são úteis e rápidos na distinção de híbridos e clones nucleares em diferentes tipos de citros.

Marcadores ISSR conseguiram encontrar variantes em mudas micropagadas, sendo três em banana Robusta e três em Giant Governor (RAY et al., 2006). Mutantes induzidos por raios gama em banana 'Pacovan' foram identificados por meio de análise de ISSR. Foram selecionados 19 *primers* polimórficos. A dissimilaridade entre esses mutantes variou entre 0,26 e 0,64, (PESTANA et al., 2011). Com apenas quatro *primers* ISSR, Prevost e Wilkinson, (1999) conseguiram separar 34 variedades de batata, mostrando que ISSR é uma técnica rápida e eficiente para esta cultura. Em trabalhos de seleção assistida AMMIRAJU et al. (2001) identificaram três marcadores ISSR associados a sementes de pouca massa e quatro a sementes de grande massa em Trigo.

Os trabalhos supracitados mostram que estes marcadores têm amplo potencial de ser usados em análises de citros. Neste contexto, o trabalho exposto nos capítulos a seguir, objetivou caracterizar varias seleções de limeira ácida 'Tahiti' por meio de caracteres agronômicos de desenvolvimento vegetativo, produtivo e físico-químicos de frutos, e mediante marcadores moleculares ISSR e IRAP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMMIRAJU, J. S. S.; DHOLAKIA, B. B.; SANTRA, D. K.; SINGH, H.; LAGU, M. D.; TAMHANKAR, S. A.; DHALIWAL, H. S.; RAO, V. S.; GUPTA, V. S.; RANJEKAR, P. K. Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, 102: 726–732, 2001.
- ARCADE, A.; ANSELIN, F.; RAMPANT, P.F.; LESAGE, M. C.; PAQUES, L. E.; PRAT, D. Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch. **Theoretical and Applied Genetics**, 100: 299–307, 2000.
- BACHI, O. Observações citológicas em *Citrus*. I. – Número de cromossomos de algumas espécies e variedades. **Jornal de Agronomia**, v.3, n.4, p.249-258, 1940.
- BARKLEY, N. A.; ROOSE, M. L.; KRUEGER, R. R.; FEDERICI, C. T. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). **Theoretical and Applied Genetics**, 112: 1519–1531, 2006.
- BEAUMONT, M. A.; IBRAHIM, K. M.; BOURSOT, P.; BRUFORD, M.W. Measuring genetic distance. In A. Karp et al. (ed.) **Molecular tools for screening biodiversity**. Chapman and Hall, London. p. 315–325, 1998.
- BENTO, M.; PEREIRA, H. S.; ROCHETA, M.; GUSTAFSON, P.; VIEGAS, W.; SILVA, M. Polyploidization as a Retraction Force in Plant Genome Evolution: Sequence Rearrangements in Triticale. **PLoS ONE**, 3(1): e1402, 2008.
- BERNET, G. P.; ASINS, M. J. Identification and genomic distribution of gypsy like retrotransposons in *Citrus* and *Poncirus*. **Theoretical Applied and Genetics**. 108:121–130, 2003.
- BORONNIKOVA, S. V.; KALENDAR, R. N. Using IRAP markers for analysis of genetic variability in populations of resource and rare species of plants. **Russian Journal of Genetics**, 46: 36–42, 2010.
- BRANCO, C. J. S.; VIEIRA, E. A.; MALONE, G.; KOPP, M. M.; MALONE, E.; BERNARDES, A.; MISTURA, C. C.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, C.A. IRAP e REMAP avaliações de similaridade genética em arroz. **Journal of Applied Genetics**, 48(2): 107-113, 2007.

BRUGNARA, E.C. **Caracterização morfológica, citogenética e molecular de híbridos de tangerineira 'Montenegrina'**. 2006. 84p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

CABANAS, L. R. **Caracterización de nuevos retrotransposones de naranjo. Desarrollo de marcadores basados en retrotransposones para la evaluación de la biodiversidad de los cítricos**. 2006. Tesis (Doctor in Bioquímica e Biología Molecular) Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, 2005.

CAMERON, J. W.; SOOST, R.K. Citrus. In: SIMMONDS, N. W. (Ed.). **Evolution of crop plants**. Longman Scientific e Technical, Inglaterra. 1986. p.261-265.

CARVALHO, R de. Variabilidade cromossômica e relação entre espécies e cultivares de Citrus. 2003. 132p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas – Universidade de Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

DOMINGUES, E. T.; SOUZA, V. C.; SAKURAGUI, C. M.; POMPEU JÚNIOR, J.; PIO, R. M.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; SOUZA, J. P. Caracterização morfológica de tangerinas do Banco Ativo de Germoplasma de Citros do Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.56, n.1, p.197-206, 1999.

EMILIANI, G.; PAFFETTI, D.; GIANNINI, R. Identification and molecular characterization of LTR and LINE retrotransposable elements in *Fagus sylvatica* L. **iForest**, 2: 119-126, 2009.

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

FIGUEIREDO, J. O.; RODRIGUEZ, O.; POMPEU JUNIOR,, J. Melhoramento do limoeiro-taiti por seleção de clones. **Bragantia**, v.35, n.11, p.115-122, 1976.

FIGUEIREDO, J. O. Variedades copas. In: RODRIGUEZ, O.; POMPEU JR., J.; VIEGAS, F. P. (Eds.). **Citricultura brasileira**, Campinas: Fundação Cargill, v.1, p.228-257, 1991.

FIGUEIREDO, J. O.; DANADIO, L. C.; POMPEU JÚNIOR, J.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; PIO, R. M.; VAZ FILHO, D.; STUCHI, E. S.; SEMPIONATO, O. R.; DOMINGUES, E. T. Comportamento de 11 porta-enxertos para o limão-Taiti na

região de Bebedouro, SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas ,v.15, n.3, p. 345-351, 1996.

FONSECA; F. C. DE A. NIELEN, S.; LEAL-BERTIOLI, S. C. DE M.; GUIMARÃES, P. M.; BERTIOLI, D. J. Retrotransposons LTR em espécies de *Arachis*: caracterização, número de cópias, e análises filogenéticas nos genomas do amendoim e suas espécies parentais *A. ipaënsis* e *A. Duranensis*. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 21p. 2006.

Food and Agriculture Organization – FAO. **FAOSTAT – 2011**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 15/01/2012.

FROST, H. B.; SOOST, R. K. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In: REUTHER, W.; PATCHELOR, L. D; WEBBER, H.J. (eds.). *The Citrus Industry*, Berkley: University of California Press. 2: 290-324. 1968.

GUERRA, M.; PEDROSA, A.; SILVA, A. E. B.; CORNÉLIO, M. T. M.; SANTOS, K. G. B.; SOARES FILHO, W. dos S. Chromosome number and secondary constriction variation in 51 acessions of a *Citrus* Germplasm Bank. **Brazilian Journal of Genetics**. **20**, p.489-496, 1997.

GULSEN, O; ROOSE, M. L. Lemons: Diversity and Relationships with Selected Citrus Genotypes as Measured with Nuclear Genome Markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 126(3): 309–317, 2001.

GUPTA, M.; CHYI, Y-S.; ROMERO-SEVERSON, J.; OWEN, J. L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, 89:998–1006, 1994.

Instituto Brasileiro de Frutas – IBRAF. **Exportações de frutas frescas**. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est_frutas.asp>. Acesso em: 10/02/2012.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. **Produção Agrícola Municipal – 2009**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 05/01/2010.

Instituto de Economia Agrícola – IEA. O Mercado de Lima Ácida Tahiti. In: **Análises e indicadores do Agronegócio**. São Paulo, v.3, n.12, 2008. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br>> Acesso em: 23 de outubro de 2009.

- KALENDAR, R., GROB, T., REGINA, M., SUONIEMI, A. & SCHULMAN, A.H. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. **Theoretical and Applied Genetics**. 98, 704–711, 1999.
- KRUG, C. A.; BACCHI, O. OBSERVAÇÕES CITOLÓGICAS EM CITRUS II – Variedades triploides. **Bragantia**. Campinas: IAC, v.4, 1944.
- KRUEGER, R. R.; ROOSE, M. L. Use of Molecular Markers in the Management of Citrus Germplasm Resources. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 128: 827–837, 2003.
- KUMAR, A. BENNETZEN, J.L. Plant Retrotransposons. **Annual Review of Genetics**, 33: 479-532, 1999.
- LEIGH, F.; KALENDAR, R.; LEA, V.; LEE, D.; DONINI, P. A. H. Comparison of the utility of barley retrotransposon families for genetic analysis by molecular marker techniques Schulman. **Molecular Genetics and Genomics**, 269: 464–474, 2003.
- MORAES FILHO, R. M.; JIMENEZ, H. J.; MONTARROYOS, A. V. V.; MUSSER, R. DOS S.; SILVA, M. M. da.; SILVA, E. F.; MARTINS, L. S. S. Variabilidade genética em genótipos da coleção de germoplasma de *Citrus*, do Instituto Agrônomo de Pernambuco Brejão-PE, por meio de marcadores moleculares ISSR. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.32, n.2, p.67-76, 2011.
- MOREIRA, C. S.; PIO, R. M. Melhoramento de citros. In: Rodriguez, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A. A. (EDS) **Citricultura Brasileira**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, p.116-152, 1991.
- PASSOS, O. P.; PINTO, A.; SOARES FILHO, W. dos. S. Lima ácida ‘Tahiti’ – uma alternativa para o nordeste brasileiro. **Documentos 101**. Embrapa, 2002.
- PESTANA, R. K. N.; AMORIM, E. P.; FERREIRA, C. F.; • AMORIM, V. B. DE O.; OLIVEIRA, L. S.; LEDO, C. A. da S. Agronomic and molecular characterization of gamma ray induced banana (*Musa* sp.) mutants using a multivariate statistical algorithm. **Euphytica**, 178:151–158, 2011.
- PIO, R. M. **Caracterização e avaliação de frutos de oito variedades do grupo das tangerineiras**. 1992. 77p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1992.
- PIO, R. M. **Estudo de variedades do grupo das tangerineiras: caracterização e avaliação dos frutos**. 1997. 79p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

- PREVOST, A.; WILKINSON, M. J. A new system of comparing PCR *primers* applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, 98: 107-112, 1999.
- 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.
- RAY, T.; DUTTA, I.; SAHA,P.; DAS, S.; ROY, S. C. Genetic stability of three economically important micropropagated banana (*Musa spp.*) cultivars of lower Indo-Gangetic plains, as assessed by RAPD and ISSR markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 85: 11–21, 2006.
- REECE, P. C.; CHILDS, J. F. L. Character differences among seedlings of the persian lime. **Florida State Horticultural Society**, p.110-116. 1962.
- SOARES FILHO, W. dos S.; PASSOS, O. S. Melhoramento do limão ‘Tahiti’ (*Citrus latifolia*, Tanaka) obtenção de clones nucelares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 1, n. 1, p.43-50, 1978.
- SALIBE, A. A.; ROESSING, C. Melhoramento do limão Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka). **Ciência e Cultura**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 189, 1965.
- SCARIOT, V.; DE KEYSER, E.; HANDA, T.; DE RIEK, J. Comparative study of the discriminating capacity and effectiveness of AFLP, STMS and EST markers in assessing genetic relationships among evergreen azales. **Plant Breed.** 126, 207–212, 2007.
- SEMANCIK, J. S.; WEATHERS, L. G. Exocortis disease: an infectious free nucleic acid plant virus with unusual properties. **Virology**, Orlando, v. 47, p. 456-466, 1972.
- SILVA, S. R. da. **Caracterização fitossanitária e seleção de limeiras ácidas ‘Tahiti’ clone quebra-galho candidatas a matrizes.** 2007, 170p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Faculdade de ciências agrárias e veterinárias, Universidade do Estado de São Paulo, Jaboticabal, 2007.
- SOARES FILHO, W. dos S.; VILARINHOS, A. D.; ALVES, A. A. C.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; OLIVEIRA, A. A. R.; SOUZA, A. da S.; LEDO, C. A. da S.; CRUZ, J. L.; SOUZA, L. D.; CASTRO NETO, M. T. de; GUERRA FILHO, M. dos S.; MEISSNER FILHO, P. E. Citrus breeding program at Embrapa Cassava &

- Fruits: development of hybrids. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. 39 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Documentos, 107.
- SPOONER, D.; TREUREN, V. R.; DE VICENTE, M. C. Molecular markers for genebank management. **IPGRI Technical Bulletin nº 10**. 2005.
- STUCHI, E.S. **El control del tamaño de los árboles en plantaciones comerciales de cítricos**.1993. 45p. Tesis (Master en Citricultura) – Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, 1993.
- STUCHI, E.S.; SILVA, S.R. Plantio adensado da limeira ácida Tahiti. Cruz das Almas, BA, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2005, 2p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Citros em Foco, 29).
- TEO, C. H.; TAN, S. H.; HO, C. L.; FARIDAH, Q. Z.; OTHMAN, Y. R.; HESLOP-HARRISON, J. S.; KALENDAR, R.; SCHULMAN, A. Genome Constitution and Classification Using Retrotransposon-Based Markers in the Orphan Crop Banana. **Journal of Plant Biology**, 48(1): 96-105, 2005.
- TSUMURA, Y.; OHBA, K.; STRAUSS, S. H. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglasfir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). **Theoretical and Applied Genetics**, 92: 40–45, 1996.
- UZUN, A.; GULSEN, O.; LU, T. Y.; AKA-KACAR, Y.; TUZCU, O. Distinguishing Grapefruit and Pummelo Accessions using ISSR Markers. **Czech J. Genet. Plant Breed.**, 46(4): 170–177, 2010.
- UZUN, A.; GULSEN, O.; SEDAY, U.; YESILOGLU, T.; AKA-KACAR, Y.; TUZCU, O. Investigation of genetic relationships among trifoliata oranges and their hybrid relatives based on ISSR markers. **Romanian Biotechnological Letters**, v.16, nº4, 2010.
- VITTI, A. **Análise da competitividade das exportações brasileiras de frutas selecionadas no mercado internacional**. 2009. 109p. Dissertação (Mestrado em Economia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, 20: 176-183, 1994.

CAPÍTULO 1

COMPORTAMENTO AGRONÔMICO DE SELEÇÕES DE LIMEIRA ÁCIDA 'TAHITI' *Citrus latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka NO RECÔNCAVO BAIANO

COMPORTAMENTO AGRONÔMICO DE SELEÇÕES DE LIMEIRA ÁCIDA 'TAHITI' *Citrus latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka NO RECÔNCAVO BAIANO.

Autor: Magno Guimarães Santos
Orientadora: Cláudia Fortes Ferreira
Co-orientador: Abelmon da Silva Gesteira

RESUMO: Poucas pesquisas relacionadas à limeira ácida 'Tahiti' têm sido realizadas no nordeste. As áreas de plantio desta limeira nesta região têm crescido em detrimento da redução das áreas de plantio do estado de São Paulo, principalmente devido a presença de *Huanglonbing*, doença bacteriana que pode causar inviabilidade dos pomares de praticamente todos os citros comerciais e também ao potencial de exportação de frutas frescas. Este trabalho objetivou avaliar potenciais seleções limeira ácida 'Tahiti' nas condições edafoclimáticas do recôncavo baiano. As seleções 'CNPMF – 2000', 'CNPMF – 2001', 'CNPMF – 01', 'CNPMF – 02', 'IAC – 5', 'IAC – 5.1', 'Bearss Lime', 'Persian 58', '5059', foram conduzidas em delineamento experimental em blocos casualizados, com 5 repetições e 2 plantas por parcela. No sétimo ano de idade foram avaliados caracteres de desenvolvimento vegetativo, produtivo e de qualidade físico-química dos frutos. Todas as seleções tiveram desenvolvimento vegetativo semelhante. A seleção 'Persian 58', a mais vigorosa do experimento, produziu uma média de 37,3 t.ha⁻¹. A seleção '5059' produziu menos frutos por planta, mas como o seu número estimado de plantas por hectare foi menor que o de 'Persian 58', as duas apresentaram uma mesma quantidade de frutos por área. Além disso, apresentaram as maiores produtividades por planta e por área do experimento. A seleção 'CNPMF–2001' produziu frutos com melhor qualidade físico-química.

Palavras-chaves: *Citrus latifolia*, eficiência produtiva, desenvolvimento vegetativo.

**AGROMIC BEHAVIOR OF 'TAHITI' ACID LIME *Citrus latifolia* (Yu. Tanaka)
Tanaka SELECTIONS IN THE RECONCAVO REGION OF BAHIA.**

Author: Magno Guimarães Santos
Adviser: Cláudia Fortes Ferreira
Co-adviser: Abelmon da Silva Gesteira

ABSTRACT: There is very little information regarding 'Tahiti' acid lime in the Northeast region. Plantation areas with this lime has increased due to the reduction in plantations in the State of São Paulo, especially due to the presence of occurrence of Huanglonbing; a bacterial disease which may lead to the infeasibility of orchards of practically all commercial citrus and also to the fresh fruit export market. The objective of this work is to evaluate 'Tahiti' acid lime selections under edaphoclimatic conditions of the reconcavo region of Bahia. The 'CNPMF-2000', 'CNPMF-2001', 'CNPMF-01', 'CNPMF-02', 'IAC-5', 'IAC-5.1', 'Bearss Lime', 'Persian 58' and '5059' selections were conducted in an experiment with randomized block design with 5 replicates and 2 plants per plot. At seven years of age, characteristics of plant development, yield and of physico-chemical quality of fruits, were evaluated. All selections showed similar plant development. The 'Persian 58' selection, the most vigorous of the experiment, presented yield of 37,3 t.ha⁻¹. The '5059' selection produced less fruits per plant, but since its estimated number of plants per hectare was smaller than that for the 'Persian 58' selection, both presented the same number of fruits per area. Furthermore, presented greater yield per plant and per experiment. The 'CNPMF-2001' selection produced fruits with better physico-chemical qualities.

Key-words: Citrus latifolia, yield efficiency, plant development.

INTRODUÇÃO

A lima ácida 'Tahiti' [*Citrus latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka] é conhecida e comercializada no mercado brasileiro como limão; razão pela qual também é chamada de limão 'Tahiti'. Figura entre as frutas cítricas de maior crescimento em exportação nos últimos anos (IBRAF, 2011). O Brasil, com a produção aproximada de 972 mil toneladas, ocupa o quinto lugar em nível mundial em produção de limões/limas ácidas (FAO, 2011). Apesar de o Brasil ser o maior produtor mundial de laranja e exportador de suco dessa fruta, o destaque na citricultura exportadora nacional *in natura*, é a lima ácida 'Tahiti'(IBRAF, 2011). O espaço conquistado no mercado externo é devido, principalmente, ao maior consumo de caipirinha e ao uso da fruta para adornar pratos e bebidas, em substituição aos limões 'Verdadeiros'.

Embora sejam conhecidas diversas seleções de limeira ácida 'Tahiti', no Brasil, seu cultivo é baseado, praticamente, em duas seleções, o 'IAC 5' e o 'Quebra-galho', e em apenas um porta-enxerto, o limoeiro 'Cravo' [*C. limonia* Osbeck]. Essas combinações copa/porta-enxerto podem reduzir a expectativa de vida do pomar, devida à gomose de *Phytophthora* spp.(Figueiredo et al., 1996).

A limeira ácida 'Tahiti', por tratar-se de cultivo relativamente recente, não obstante sua crescente expressão econômica; ainda carece de pesquisas dirigidas ao estudo de seleções de copa e porta-enxertos em comparação com os grupos das laranjeiras doces [*C. sinensis* (L.) Osbeck] e tangerineiras (diversas espécies), principalmente no estado da Bahia. A maioria dos trabalhos que foram publicados a respeito desta limeira ácida foram conduzidos no estado de São Paulo.

Atualmente, o Citrumeleiro 'Swingle' tem sido usado em substituição ao limoeiro Cravo'[*C. limonia* Osbeck], como opção de porta-enxerto para limeira ácida 'Tahiti'. A importância do uso do porta-enxerto Citrumeleiro 'Swingle', recai sobre o fato do mesmo propiciar resistência à gomose de *Phytophthora* spp. De acordo com Feischtenberger et al. (1997) a susceptibilidade do porta-enxerto Citrumeleiro 'Swingle' à gomose *Phytophthora* spp. é considerada muita baixa. Em um experimento instalado em São Paulo, Figueiredo et al.

(2002) não conseguiram avaliar a combinação limeira ácida 'Tahiti' sobre limoeiro 'Cravo', pois todas as plantas morreram por infecção de *Phytophthora* spp.; enquanto que as enxertadas em Citrumeleiro 'Swingle' continuaram vivas.

No intuito de alavancar novas alternativas para o cultivo de limeira ácida 'Tahiti', este trabalho objetivou avaliar diferentes seleções de copa, enxertadas sobre o porta-enxerto citrumeleiro 'Swingle' [*C. paradisi* Macfad. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], com base em caracteres de desenvolvimento vegetativo e produtivo, nas condições climáticas de Cruz das Almas, recôncavo da Bahia.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado em outubro de 2004 na sede da Embrapa Mandioca e Fruticultura, no município de Cruz das Almas, recôncavo da Bahia, em uma altitude de 225 metros, sob as coordenadas geográficas 12°40'39" S e 39°06'23" O. O clima da região, segundo a classificação de Köppen, é uma transição entre as zonas Am e Aw, enquanto que pela classificação de Thornthwaite é do tipo C, seco e subúmido. As normais climáticas da região são: precipitação pluvial de 1.224 mm, temperatura de 25°C e umidade relativa do ar de 75% e tem nos meses de junho a agosto o período mais chuvoso e nos meses de novembro a março o período mais seco do ano. O solo é do tipo latossolo amarelo distrófico A moderado, textura franco argilo-arenosa.

Matriz Experimental

Nove seleções de limeira ácida 'Tahiti' (Tabela 1), enxertadas em citrumeleiro 'Swingle', foram plantadas no espaçamento 5,5 m x 4,0 m e conduzidas sem irrigação em delineamento experimental em blocos casualizados, com 9 tratamentos (seleções de 'Tahiti'), 5 repetições e 2 plantas por parcela. As plantas foram adubadas e o pH do solo corrigido de acordo com as necessidades definidas a partir de análise de solo. O controle de plantas invasoras foi realizado com roçadeira mecanizada. Foram feitas podas de galhos secos e ramos 'ladroes'. Não foram realizadas pulverizações para controle de fungos e insetos.

Desenvolvimento vegetativo

O desenvolvimento vegetativo das plantas foi avaliado no início do segundo semestre de 2011. O diâmetro e a altura das copas das plantas foram medidos com régua métrica graduada em centímetros. A altura foi tomada do solo ao plano mediano do topo da planta. O diâmetro foi medido no sentido da linha de plantio e no sentido perpendicular a esta para cálculo do diâmetro médio. O índice de conformação da copa (IC) foi obtido pela razão da altura sobre o diâmetro. Foi calculada a área útil de cada planta de acordo com Equação 1. O volume da copa foi calculado pela Equação 2 (Mendel, 1956).

$$\text{Equação 1: } A = l1 * (l2 + 2,5)$$

$$\text{Equação 2: } Vc = \frac{2}{3} \cdot \pi \cdot \left(\frac{(l1+l2)}{4}\right)^2 \cdot h$$

em que A é a área útil da planta em m^2 , Vc é o volume de copa em m^3 , h é a altura da planta em metros, $l1$ é o diâmetro no sentido da linha de plantio e $l2$ é o diâmetro no sentido da entrelinha de plantio em metros. O valor 2,5 apresentado na Equação 1 foi definido mediante pesquisa junto a produtores da região, equivalendo à largura suficiente para trator e implementos realizarem os tratos culturais mecânicos, correspondendo, portanto, ao espaço vazio da entrelinha. O número de plantas por hectare foi calculado segundo a equação 3.

$$\text{Equação 3: } Np = \left(\frac{10000}{A}\right)$$

Produtividade

A produção (P) referiu-se ao número e peso total de frutos por parcela em 2011. Os frutos colhidos foram contados e pesados por planta, calculando-se a média por parcela. A produção por hectare ($t \cdot ha^{-1}$) foi estimada de acordo com a Equação 4, onde p (kg) é o peso por planta e A (m^2) a área ocupada por planta. A eficiência produtiva Ep foi calculada por planta, dividindo-se a produção pelo volume de copa ($kg \cdot m^{-3}$), de acordo com a Equação 5.

$$\text{Equação 4: } P = p * \left(\frac{10000}{A}\right)$$

$$\text{Equação 5: } Ep = \frac{P}{Vc}$$

Caracterização Físico-química de frutos

Em cada parcela foi coletada uma amostra de 10 frutos, ou seja 5 frutos por planta, escolhidos aleatoriamente ao redor da copa, com coloração e

firmeza nos padrões ideais de colheita (frutos com coloração verde intenso e casca firme). Foram avaliadas as características físico-químicas, determinando-se: a) comprimento e diâmetro do fruto, medido com régua tipo calha graduada em centímetros (cm); b) peso dos frutos, estabelecida por balança digital, em gramas (g); c) rendimento do suco, avaliado com base na relação peso do suco/peso dos frutos, em porcentagem (%); d) espessura da casca, mensurada com paquímetro graduado em milímetros (m); e) número de sementes por fruto; f) teor de sólidos solúveis (SS), determinado por refratometria, mediante emprego de refratômetro de leitura direta, sendo os valores expressos em porcentagem em peso (°Brix); g) acidez titulável (AT), obtida mediante diluição de 0,5 g de suco (de cada amostra) em 40 mL de água destilada e com auxílio de uma bureta digital foi realizada a titulação da solução com NaOH a 0,1 N e indicador fenolftaleína (expressa em gramas de ácido cítrico/100g de suco); h) *ratio*, índice de maturação, calculado pela razão SS/AT.

Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância segundo o modelo de blocos inteiramente casualizados:

$$Y_{ij} = m + b_j + t_i + e_{ij}$$

Y_{ij} : valor observado na parcela que recebeu o tratamento i no bloco j ;

m : média geral;

b_j : efeito do bloco j ;

t_i : efeito do tratamento i (seleções);

e_{ij} : efeito do erro experimental associado à parcela que recebeu o tratamento i no bloco j .

As médias individuais foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desenvolvimento vegetativo

As seleções de limeira ácida 'Tahiti' não mostraram diferenças significativas para os caracteres de desenvolvimento vegetativo; com exceção da variável volume de copa (Tabela 2).

A seleção 'Persian 58' apresentou maiores médias de altura e diâmetro de copa, 3,20 m e 4,55 m, respectivamente. Conseqüentemente, esta seleção apresentou maior volume de copa (34,8 m³), diferindo-se estatisticamente das demais.

Atualmente, *Huanglongbing* (HLB, ex-greening) é a doença mais devastadora para citricultura, pois reduz tragicamente a produção e atinge todas as espécies de citros. Uma das medidas mitigadoras preconizadas para o controle desta doença é a eliminação de plantas sintomáticas. Sendo assim, o adensamento ou aumento do número de plantas por hectare poderá minimizar a perda de produtividade por área (TERSI, 2010). Neste experimento o menor volume de copa foi o da seleção 'CNPMF – 2000' (25,0 m³). A menor altura de planta foi encontrada em 'CNPMF – 2001' (2,8 m). O índice de conformação foi menor que 1,0 para todas as seleções, revelando que neste experimento todas as copas possuem diâmetro maior que a altura.

A diminuição do vigor para adensamento de plantio é uma das novas vertentes da citricultura. Além de benefícios, como incremento de produção nas primeiras safras, melhor cobertura do solo e menor perda de água por evaporação, facilitação das pulverizações mecânicas e das colheitas, e, em caso de catástrofes biológicas ou climáticas, maior chance de permanência de bom estado de plantas (PHILIPS, 1978).

Apesar do teste de F da análise de variância não ter detectado diferenças significativas entre o número de plantas por hectare, pôde-se verificar que a seleção com maior potencial de adensamento de plantio, tendo o citrumeleiro 'Swingle' como porta-enxerto, foi a 'CNPMF – 2000' (384 plantas por hectare). A seleção 'Persian 58' contrasta para esta característica (319 plantas por hectare). Estes resultados são reflexos da área útil ocupada pelas seleções avaliadas.

Trabalhos realizados com porta-enxertos têm mostrado sua influência sobre o desenvolvimento da copa. A esse respeito, o trifoliata 'Flying Dragon' [*P. trifoliata* (L.) Raf. var. *monstrosa* T. Ito] tem possibilitado reduções substanciais no porte da limeira ácida 'Tahiti' (STUCHI E SILVA, 2005).

Nas condições climáticas de Bebedouro - SP, sem uso de irrigação, plantas da seleção 'IAC - 5.1', com sete anos idade, combinadas com citrumeleiro 'Swingle' atingiram 37,1 m³ de copa (AVILÉS, 2009); superando os valores de 'Persian 58' e do próprio 'IAC - 5.1' (27,5 m³), obtidos no presente estudo. A seleção 'IAC - 5' desenvolveu uma copa com 29,9 m³. Figueiredo et al. (2001) avaliaram plantas de 'IAC - 5' sobre citrumeleiro 'Swingle', com dez anos de idade, sem presença de irrigação, e obtiveram resultados de volume de copa de 66,0 e 70,1 m³ nas cidades de Aguaí e Bebedouro - SP, respectivamente. Núñez (2010), utilizando a mesma combinação copa/porta-enxerto, nas mesmas condições hídricas, também na região de Bebedouro, porém com plantas tendo seis anos de idade, obteve um volume de copa de 33,7 m³ e altura de 3,5 m.

A seleção 'CNPMF - 01' em pesquisas no estado de São Paulo foi considerada como alternativa a 'IAC - 5' (STUCHI et al., 2002). No presente trabalho, essa seleção atingiu 3,04 m de altura, diâmetro de 4,2 m e 28,5 m³ de volume de copa, manifestando, portanto, boa capacidade de adensamento de plantio. Já em Bebedouro - SP a referida seleção apresentou valores de 4,0 m de altura, 5,0 m de diâmetro e 51,1 m³ de volume de copa quando enxertado sobre tangerineira 'Cleópatra' (*C. reshni* hort. ex Tanaka), no sétimo ano de idade, na condição de ausência de irrigação (STUCHI et al., 2002). Esta diferença de comportamento do 'CNPMF - 01' pode ser devido à combinação copa/porta-enxerto, como também às condições nutricionais, edáficas ou climáticas. Figueiredo et al (2001) em estudo de competição de porta-enxertos em combinação com a seleção 'IAC - 5' de limeira ácida 'Tahiti', verificou que as copas sobre citrumeleiro 'Swingle' foram mais volumosas (70,1 m³) que as enxertadas em tangerineira 'Cleópatra' (62,2 m³). Esses resultados indicam que até o sétimo ano de idade as plantas na região de Bebedouro - SP apresentam maior desenvolvimento que no recôncavo baiano. Dessa maneira o ideal seria

avaliar o desenvolvimento vegetativo de outros pomares de limeira ácida 'Tahiti' sobre citrumeleiro 'Swingle' da região para confirmar esta hipótese.

Produtividade

O teste f da análise de variância (ver Tabela 2) revelou que as seleções mostraram diferenças altamente significativas em todas as variáveis relacionadas à produção de frutos. Segundo o teste de Skott-Knott os agrupamentos de médias foram iguais para as três primeiras variáveis, ou seja, todas as seleções receberam as mesmas notas para os caracteres número de frutos, peso de frutos e produção por área.

As seleções 'Persian 58' e '5059' foram estatisticamente iguais e superiores as demais em todas as variáveis de produção de frutos. Porém, o 'Persian 58' apresentou maiores médias de número e peso de frutos por planta e produtividade por área: 1.217,8 frutos, 118,2 kg, 37,28 t.ha⁻¹, respectivamente. Enquanto que a seleção '5059' apresentou média de 1097,8 frutos, peso de 99,0 kg, produtividade de 37,14 t.ha⁻¹. É interessante ressaltar que, mesmo apresentando uma menor produtividade por planta, '5059' alcançou 'Persian 58' em produtividade por área; isto devido ao maior estande de plantas apresentado por '5059' que proporcionou um incremento na produtividade por hectare (**Tabela 1**).

Com relação à eficiência produtiva, as seleções 'Persian 58' e '5059' também se destacaram entre as demais. A primeira com 3,3 kg.m⁻³ e a segunda com 3,6 kg.m⁻³. As seleções 'CNPMF- 02' e 'Bearss lime' apresentaram médias de 2,7 kg.m⁻³ e 1,96 kg. m⁻³. As seleções 'IAC - 5.1' (1,5 kg.m⁻³) e 'CNPMF - 01' (1,9 kg.m⁻³) mostraram comportamento de produção intermediário no experimento. Avilés (2009), analisando a eficiência produtiva em plantas de limeira ácida 'Tahiti' com mesma idade, encontrou uma produtividade de 1,2 kg.m⁻³ para a seleção 'IAC - 5.1' enxertada em citrumeleiro 'Swingle', enquanto que sobre o trifoliata 'Flying Dragon' as plantas apresentaram uma produtividade média de 3,2 kg.m⁻³. Estes maiores valores de produtividade por volume de copa estão relacionados com a redução de copa proporcionada por este porta-enxerto. Na região de Bebedouro - SP, este porta-enxerto produziu uma média 46,6 t.ha⁻¹ no espaçamento de 4,0 x 1,0 m

com presença de irrigação (STUCHI e SILVA, 2005). Em Rio Branco - AC, a limeira ácida 'Tahiti' sobre tangerineira 'Sunki' (*C. sunki* Hort. ex Tan.) produziu uma média 2,5 kg.m⁻³ (LEDO et al., 2008). No norte do estado de São Paulo, plantas da seleção 'Quebra-Galho' chegaram a produzir 12,8 kg.m⁻³, aos onze anos de idade, sobre limoeiro 'Cravo'.

Apesar de produzirem copas relativamente baixas, as seleções 'CNPMF – 2000', 'CNPMF – 2001' e 'IAC – 5' manifestaram o pior desempenho produtivo neste experimento, com produtividades em toneladas por hectare de "2,62", "3,89"; "5,85", respectivamente.

Apesar de não quantificada, houve incidência do fungo *Colletrotrichum acutatum*, agente etiológico da doença conhecida por "Queda prematura dos frutos" ou "Podridão floral dos citros", em todas as plantas do experimento. A baixa produção de 'CNPMF – 2000', 'CNPMF – 2001' e 'IAC – 5' em relação às seleções '5059' e 'Persian 58' pode estar associada a uma maior tolerância destas últimas seleções ao patógeno, ou a uma maior capacidade florescimento, após ataques deste fungo. Esta doença está associada à alta umidade do ambiente, fato que pode ser justificado pelas condições ambientais da região do recôncavo baiano durante o período das principais floradas de limeira ácida 'Tahiti' resultando assim na elevação do índice de abortamento floral desta espécie.

Avaliando as seleções 'CNPMF – 2000', 'CNPMF – 2001', 'CNPMF – 01', 'IAC – 5', 'IAC – 5.1', sobre citrumeleiro 'Swingle', no quinto ano de idade, Bremer Neto et al. (2008), em experimento realizado em Bebedouro – SP, observou tendências de crescimento vegetativo e de produtividade semelhantes ao encontrado no presente trabalho.

Caracterização físico-química de frutos

Na Tabela 3, podem ser observadas diferenças estatísticas entre as seleções estudadas relativamente às variáveis: peso, espessura da casca, número de sementes por fruto.

As seleções 'CNPMF – 2001', 'CNPMF – 01', 'CNPMF – 02', 'IAC – 5', 'Bearss lime' e 'Persian 58' relacionaram-se aos maiores pesos de fruto. Cabe

destacar que 'Persian 58', apesar de ter apresentado maior número de frutos por planta, não manifestou redução no peso de seus frutos (105,7 gramas).

A seleção 'CNPMF – 2001' produziu frutos maiores, com maior peso e maior espessura de casca. Quanto ao comprimento e diâmetro, não foram observadas diferenças estatísticas.

Todos, com exceção do 'Bearss lime', produziram sementes. A presença de sementes é uma característica indesejável em frutos de mesa. As seleções, 'Persian 58', '5059', 'CNPMF – 01', produziram menos sementes por fruto. A 'CNPMF – 2000' apresentou frutos mais achatados e com mais sementes em relação as demais. Em média, a cada três frutos desta seleção, dois produziram sementes. O fato do experimento está localizado próximo de outras espécies cítricas pode explicar a frequência de sementes nas demais seleções, uma vez que esta limeira praticamente não produz polén. Sendo assim em plantios comerciais onde ocorre a monocultura desta limeira é pouco frequente a produção de frutos com sementes.

Não foram encontradas diferenças significativas para o rendimento de suco. A média geral para rendimento de suco do experimento foi 40,8%. Segundo os padrões de classificação de lima ácida 'Tahiti', os frutos para exportação devem apresentar no mínimo 40,0% de teor de suco, abaixo desse valor, os frutos são considerados imaturos (CEAGESP, 2000). De acordo com os atacadistas da Central de Abastecimento do Estado de São Paulo - CEAGESP, o mercado interno prefere lima ácida 'Tahiti' com casca lisa e muito suco, ao passo que o mercado externo, tem preferência por frutos com casca de coloração verde intensa (IEA, 2008).

Stuchi et al. (2009), avaliando o comprimento e diâmetro de frutos de 'IAC 5.1' em combinação com diferentes porta-enxertos, não detectaram diferenças estatísticas. Nesse mesmo trabalho, o citrumeleiro 'Swingle' induziu peso de fruto próximo ao encontrado na Tabela 3 (91,7 g).

Em Bebedouro - SP, frutos de 'IAC – 5' sobre citrumeleiro 'Swingle' apresentaram peso, comprimento e diâmetro de 91,0 g, 5,9 cm e 5,3 cm, respectivamente (FIGUEIREDO et al, 2002). Na mesma região, NÚÑES et al (2010) obteve para essa combinação copa/porta-enxerto frutos com 49,5 cm de diâmetro e 78,3 g de peso. Maiores rendimentos de suco foram encontrados

em outros trabalhos igualmente realizados em São Paulo; embora os frutos apresentassem menor peso (AVILÉS, 2009; NÚÑES et al, 2010; STUCHI, 2009).

Os resultados da Tabela 4 revelaram que as seleções 'CNPMF – 2001' e 'IAC – 5' produziram frutos menos ácidos que os demais; não diferindo estatisticamente entre si. O maior índice de maturação (*ratio*) foi encontrado na seleção 'CNPMF – 2001'. Os frutos das seleções de limeira ácida analisados apresentaram baixo índice de maturação quando comparados aos de outros trabalhos (FIGUEIREDO, 1991; MIRANDA e CAMPELO JUNIOR, 2010; NÚÑEZ, 2010).

CONCLUSÕES

Dentre os materiais avaliados no presente estudo, as seleções 'Persian 58' e '5059' da limeira ácida 'Tahiti' se destacam como as mais produtivas para as condições edafoclimáticas locais, apresentando potencial para o plantio na região do recôncavo baiano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVILÉS, T. E. C. **Avaliação Horticultural da laranjeira 'Folha Murcha', tangerineira 'Satsuma' e limeira ácida 'Tahiti' sobre doze porta-enxertos.** 2009. 129p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

BREMER NETO, H.; MOURAO FILHO, F. A. A.; STUCHI, E. S.; SILVA, S. R. da; AVILÉS, T. C.; ESPINOZA, N. Desenvolvimento e produção inicial de clones de limeira ácida 'Tahiti' em Bebedouro, SP. In: SBF/INCAPER, 2008, Vitória, ES. **Anais** do XX Congresso Brasileiro de Fruticultura. Vitória, ES : DCM/INCAPER, 2008.

CEAGESP. Centro de qualidade em horticultura. Programa brasileiro para melhoria dos padrões comerciais e embalagens de hortigranjeiros: classificação do limão (lima ácida) Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka). São Paulo, 2000. 5 p.

FAO, Food and Agriculture Organization. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=567&lang=es#ancor>>.

Acessado em: 23 de outubro de 2010.

FIGUEIREDO, J. O. Variedades copas. In: RODRIGUEZ, O.; POMPEU JR., J.; VIEGAS, F.P. (Eds.). **Citricultura brasileira**, Campinas: Fundação Cargill, 1991. v.1, p.228-257.

FIGUEIREDO, J. O.; DONADIO, L. C.; POMPEU JUNIOR, J.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; PIO, R. M.; VAZ FILHO, D.; STUCHI, E. S.; SEMPIONATO, O. R. e DOMINGUES, E. T. Comportamento de 11 porta-enxertos para 'Tahiti' na região de Bebedouro, SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.15, n.3, p.345-351, 1996.

FIGUEIREDO, J. O.; STUCHI, E. S.; LARANJEIRA, F. F.; DONADIO, L. C.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; SEMPIONATO, O. R. e MULLER, G. W. Porta-enxertos para lima ácida 'Tahiti' em duas regiões do Estado de São Paulo. **Laranja**, v.22, n.1, p.203-13, 2001.

FIGUEIREDO, J. O.; STUCHI, E. S.; DONADIO, L. C.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; LARANJEIRA, F. F.; PIO, R. M.; SEMPIONATO, O. R. Porta-enxertos para a lima ácida 'Tahiti' na região de Bebedouro, SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, p.155-159, 2002.

IBRAF, **Instituto Brasileiro de Frutas**. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br/estatisticas/Exporta%C3%A7%C3%A3o/Comparativo_das_Exporta%C3%A7%C3%B5es_Brasileiras_de_Frutas_frescas_2010-2009.pdf> Acessado em: 23 de outubro de 2011.

Instituto de Economia Agrícola – IEA. O Mercado de Lima Ácida Tahiti. In: **Análises e indicadores do Agronegócio**. São Paulo, v.3, n.12, 2008. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br>> Acessado em: 23 de outubro de 2011.

LEDO, A. da S.; OLIVEIRA, T. K. de. RITZINGER, R.; AZEVEDO, F. F. de. Produção de limas ácidas, tangerineira e híbridos sobre diferentes porta-enxertos no Estado do Acre. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 39, n. 02, p. 263-268, 2008.

MENDEL, K. Rootstock-scion relationships in Shamouti trees on light soil. **KTAVIM**, v.6, p.35-60, 1956.

MIRANDA, M. N.; CAMPELO JUNIOR, J. H. Desenvolvimento e qualidade da lima ácida Tahiti em Colorado do Oeste – RO. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 57, n.6, p. 787-794, 2010.

NÚÑEZ, E. E. **Porta-enxertos para limeira ácida ‘Tahiti’ cultivada com e sem irrigação**. 2010. 103p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

PHILIPS, R. L. Citrus tree spacing and size control. In: INT.. SOC. CITRICULTURE, 1978. **Proceedings...** p.319-324

SILVA, S. R. da.; STUCHI, E. S.; SEMPIONATO, O. R.; REIFF, E. T. Produção de frutos de ‘Tahiti’ “Quebra-galho” na região norte de São Paulo. . In: SBF/INCAPER, 2008, Vitória, ES. **Anais** do XX Congresso Brasileiro de Fruticultura. Vitória, ES : DCM/INCAPER, 2008.

STUCHI, E. S.; DONADIO, L. C.; SEMPIONATO, O. R. Produtividade e tamanho das plantas do clone CNPMF-01, premunizado contra a tristeza dos citros, da limeira-ácida ‘Tahiti’ em Bebedouro (SP). **Laranja**, Cordeirópolis, v.23, n.1, p.221-230, 2002.

STUCHI, E. S.; SILVA, S.R. **Plantio Adensado de limeira ácida ‘Tahiti’**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2005. 2p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Citros em Foco, 29).

STUCHI, E. S.; MARTINS, A. B. G.; LEMO, R. R.; AVILÉS, T. C. Fruit quality of ‘tahiti’ lime (*Citrus latifolia* Tanaka) grafted on twelve different rootstocks. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 31, n. 2, p. 454-460, Junho 2009.

TERSI, F. E. A. Convivendo com o Huanglongbing: visão do setor produtivo. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.31, n.1, p.75-84, 2010.

TIMMER, L. W.; ZITKO, S. E. Relationships of environmental factors and inoculum levels to the incidence of postbloom fruit drop of citrus. **Plant Disease**, St. Paul, v. 77, n. 5, p. 501-504, 1993.

VITTI, A. **Análise da competitividade das exportações brasileiras de frutas selecionadas no mercado internacional**. 2009. 109p. Dissertação (Mestrado em Economia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

Tabela 1. Identificação e origem das seleções de limeira ácida ‘Tahiti’ usadas no estudo.

SELEÇÕES	ORIGEM
‘CNPMF – 2000’	Embrapa Mandioca e Fruticultura – BA
‘CNPMF – 2001’	Embrapa Mandioca e Fruticultura – BA
‘CNPMF – 01’	Embrapa Mandioca e Fruticultura – BA
‘CNPMF – 02’	Embrapa Mandioca e Fruticultura – BA
‘IAC – 5’	Instituto Agronômico de Campinas – SP
‘IAC – 5.1’	Instituto Agronômico de Campinas – SP
‘Bearss Lime’	Universidade da Califórnia - Riverside – EUA
‘Persian 58’	Universidade da Califórnia - Riverside – EUA
‘5059’	Origem Desconhecida

Tabela 2 – Dados de volume de copa (**VC**), altura de planta (**H**), diâmetro médio de copa (**DC**), índice de conformação da copa (**IC**), área útil da copa (**A**), números de plantas por hectare (**NP**), número de frutos por planta (**NF**), peso de frutos por planta (**PESO**), produção por hectare (**PROD**) e eficiência produtiva (**EP**) de nove seleções de limeira ácida ‘Tahiti’ [*Citrus latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka], com sete anos de idade, enxertadas em citrumeleiro ‘Swingle’ [*C. paradisi* Macfad. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.]. Cruz das Almas - BA. Março de 2012.

SELEÇÕES	VC (m ³)	H (m)	DC (m)	IC	A (m ²)	NP	NF	PESO (kg)	PROD (t.ha ⁻¹)	EP (kg.m ⁻³)
CNPMF – 2000	24,97 a	2,90 a	4,04 a	0,72 a	26,30 a	384 a	67,60 d	6,50 d	2,62 d	0,27 d
CNPMF – 2001	27,15 a	2,76 a	4,34 a	0,64 a	29,17 a	343 a	146,40 d	11,48 d	3,89 d	0,43 d
CNPMF – 01	28,49 a	3,04 a	4,23 a	0,72 a	28,37 a	354 a	591,40 c	54,85 c	19,03 c	1,89 c
CNPMF – 02	26,15 a	2,94 a	4,10 a	0,72 a	26,66 a	380 a	795,00 b	71,72 b	26,56 b	2,72 b
IAC – 5	29,87 a	2,99 a	4,34 a	0,69 a	29,53 a	343 a	188,80 d	17,20 d	5,85 d	0,60 d
IAC – 5.1	27,53 a	3,11 a	4,10 a	0,76 a	26,74 a	376 a	489,00 c	41,75 c	15,50 c	1,49 c
BEARSS LIME	26,17 a	2,82 a	4,16 a	0,68 a	27,60 a	372 a	571,40 c	53,87 c	18,78 c	1,96 b
PERSIAN 58	34,85 b	3,20 a	4,55 a	0,70 a	31,52 a	319 a	1217,80 a	118,24 a	37,28 a	3,34 a
5059	27,05 a	3,04 a	4,12 a	0,74 a	26,75 a	379 a	1097,80 a	99,00 a	37,14 a	3,62 a
CV (%)	15,66	7,43	6,10	8,12	9,51	10,17	28,92	32,18	37,92	32,03
Teste F	0,05*	0,08 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,08 ^{ns}	0,06 ^{ns}	0,10 ^{ns}	0,00**	0,00**	0,00**	0,00**
Média Geral	28,02	2,98	4,21	0,71	28,07	361	573,91	52,73	16,89	1,81

Médias dos tratamentos nas colunas seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). CV – Coeficiente de variação, ^{ns} não significativo, * significativo a 5% de probabilidade, e ** significativo a 5% de probabilidade

Tabela 3 – Dados de peso (**PF**), comprimento (**CF**), diâmetro (**DF**), espessura da casca (**EC**), número de sementes (**NS**), rendimento de suco (**RS**), acidez titulável (**AT**), sólidos solúveis (**SS**) e *ratio* (**RT**) de frutos de nove seleções de limeira ácida ‘Tahiti’ [*Citrus latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka], com sete anos de idade, enxertadas em citrumeleiro ‘Swingle’ [*C. paradisi* Macfad. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.]. Cruz das Almas - BA. Março de 2011.

SELEÇÕES	PF (g)	CF (cm)	DF (cm)	EC (mm)	NS	RS(%)	SS ¹	AT ²	RT
CNPMF – 2000	91,28 b	5,72 a	5,44 a	3,74 a	0,71 b	42,00 a	7,58 a	6,53 a	1,16 b
CNPMF – 2001	115,80 a	6,45 a	5,72 a	4,35 a	0,59 b	39,50 a	7,65 a	6,09 b	1,25 a
CNPMF – 01	107,59 a	6,23 a	5,73 a	3,33 b	0,19 a	39,70 a	7,57 a	6,52 a	1,17 b
CNPMF– 02	105,95 a	6,00 a	5,51 a	3,35 b	0,22 b	39,50 a	7,28 a	6,52 a	1,12 b
IAC – 5	108,57 a	6,22 a	5,66 a	3,08 b	0,36 b	42,00 a	7,32 a	6,34 b	1,16 b
IAC – 5.1	91,77 b	5,81 a	5,58 a	3,57 b	0,43 b	40,00 a	7,68 a	6,84 a	1,12 b
BEARSS LIME	106,76 a	6,14 a	5,58 a	3,05 b	0,00 a	41,00 a	7,48 a	6,73 a	1,11 b
PERSIAN 58	105,74 a	6,42 a	5,60 a	3,04 b	0,06 a	40,00 a	7,36 a	6,64 a	1,11 b
5059	96,04 b	6,33 a	5,69 a	3,21 b	0,05 a	44,00 a	7,44 a	6,87 a	1,08 b
CV (%)	8,20	5,86	5,22	14,47	107,74	11,13	3,51	3,67	4,50
Teste F	0,00 **	0,11 ^{ns}	0,90 ^{ns}	0,03 *	0,01 **	0,22 ^{ns}	0,31 ^{ns}	0,00 **	0,01 **
Média Geral	103,40	6,16	5,61	3,34	0,25	40,80	7,47	6,60	1,13

Médias dos tratamentos nas colunas seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). CV – Coeficiente de variação, ² (g.100g⁻¹ - gramas de ácido por 100 gramas de suco), ¹ (° brix), * significativo a 5% de probabilidade, ** significativo a 1% de probabilidade.

CAPÍTULO 2

ANÁLISE DE VARIABILIDADE DE SELEÇÕES DE LIMEIRA ÁCIDA 'TAHITI' MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES ISSR E IRAP

ANÁLISE DE VARIABILIDADE DE SELEÇÕES DE LIMEIRA ÁCIDA 'TAHITI' MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES ISSR E IRAP.

Autor: Magno Guimarães Santos
Orientadora: Cláudia Fortes Ferreira
Co-orientador: Abelmon da Silva Gesteira

RESUMO: Marcadores ISSR e IRAP têm sido usados para detectar variabilidade em citros. Diversos trabalhos foram realizados para estimar a variabilidade entre variedades de limoeiro, mas não em limeiras ácidas. Sendo assim este trabalho objetivou detectar variabilidade entre seleções de limeiras ácidas 'Tahiti', por meio de marcadores moleculares tipo ISSR e IRAP, e mediante caracteres agronômicos de fruto. Foram analisados 28 genótipos de citros; 25 seleções originadas de limeiras ácidas 'Tahiti' e três espécies controle. Foi utilizada a distância Euclidiana Média para dados físico-químicos de fruto (peso, comprimento, diâmetro, cor da casca, espessura da casca, número de sementes, rendimento de suco, acidez titulável, sólidos solúveis e *ratio*) e a distância de Jaccard para dados obtidos dos marcadores moleculares (ISSR e IRAP). Foram realizados quatro agrupamentos: o primeiro baseado em dados físico-químicos, o segundo em ISSR, o terceiro em IRAP e o quarto em ISSR mais IRAP. O primeiro agrupamento separou os genótipos por espécie. A variável que mais contribuiu para divergência entre os acessos foi o número de sementes por fruto. O agrupamento de marcadores ISSR e IRAP, separaram as limas ácidas 'Tahiti' achatados, em um grupo, as demais limas ácidas e limões verdadeiros num segundo e as tangerinas em um terceiro grupo. Foram testados 24 *primers* ISSR, 17 foram polimórficos e geraram 125 bandas, 69 polimórficas. Para o marcador IRAP foram testados 8 *primers*, todos polimórficos. As análises de IRAP geraram 49 bandas polimórficas e 18 monomórficas. Estes marcadores conseguiram detectar polimorfismo entre limeiras ácidas, limoeiros e tangerineiras. As análises revelaram a formação de dois grupos dentro das limeiras ácidas 'Tahiti'.

Palavras-chaves: *Citrus latifolia*, diversidade genética, dissimilaridade.

ANALYSIS OF THE VARIABILITY OF 'TAHITI'ACID LIME SELECTIONS BY ISSR AND IRAP MOLECULAR MARKERS.

Author: Magno Guimarães Santos
Adviser: Cláudia Fortes Ferreira
Co-adviser: Abelmon da Silva Gesteira

ABSTRACT: ISSR and IRAP markers were used to detect the variability in citrus. Many works were carried out to estimate the variability between lemon varieties, but not acid limes. Therefore, the objective of the present work was to study the variability between 'Tahiti'acid lime selections using ISSR and IRAP markers and agronomic characteristics of fruits. Twenty-four were analyzed: 25 original 'Tahiti'acid lime selections and three controls. The Average Euclidian distance was used for the physico-chemical data of fruits (weight, length, diameter, peel color, peel thickness, number of seeds, juice yield, titratable acidity, soluble solids ratio) and Jaccard's index for all the molecular marker data (ISSR and IRAP). Four clusters were obtained: the first one based on all physico-chemical data, the second based on ISSR data, the third based on the IRAP data and the fourth based on the combined data (ISSR and IRAP). The first cluster separated the genotypes according to their species. The variable which most contributed to the diversity between the accessions was the number of seeds per fruit. The cluster formed by the ISSR and IRAP markers separated the flat 'Tahiti'acid limes in one group, the remaining acid limes and lemons in a second group and the tangerines in a third group. Twenty-four ISSR primers were tested, whereas 17 were polymorphic and presented 125 bands, of which 69 were polymorphic. For the IRAP marker, 8 primers were tested, all polymorphic. The IRAP analysis generated 49 polymorphic and 18 monomorphic bands. These markers were able to detect polymorphism between the acid limes, lemons and tangerines. Two groups were formed for the 'Tahiti'acid limes.

Key-words: *Citrus latifolia*, genetic diversity, dissimilarity

INTRODUÇÃO

A limeira ácida 'Tahiti' [*Citrus latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka] é um triploide natural ($2n = 3x = 27$) que, ao contrário das outras limeiras ácidas como, por exemplo, a 'Galego' [*C. aurantifolia* (Christm.) Swingle], raramente produz sementes. Os genótipos utilizados comercialmente são conhecidos como clones, não existindo variedades dentro desta espécie. Estes clones têm sido selecionados a partir das poucas sementes produzidas ou de gemas de plantas superiores em plantios comerciais. Entretanto, existem dúvidas sobre a identidade genética destes materiais, podendo os mesmos apresentar origem híbrida ou serem mutantes com características típicas de limeira ácida 'Tahiti', o que, por sua vez, poderia justificar as diferenças de produtividade e desenvolvimento vegetativo observadas nos plantios desta espécie. O uso de marcadores em nível de DNA torna-se uma abordagem atrativa, por possibilitar a localização de diferenças entre indivíduos ao longo da sequência do genoma, denominado detecção de polimorfismo.

Marcadores moleculares são poderosas ferramentas que têm sido utilizadas em citros com diferentes finalidades, como: identificação de híbridos (SCHÄFER et al, 2004), análises de diversidade genética (BARKLEY et al., 2006), construção de mapas de ligação (SANKAR e MOORE, 2001; GULSEN et al., 2010) identificação de cultivares (BISWAS et al., 2010). A melhor compreensão da eficácia dos diferentes marcadores moleculares é um passo importante para caracterização e classificação do germoplasma vegetal (SCARIOT et al., 2007).

Dentre os marcadores moleculares, destaca-se o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) que delimita fragmentos de DNA amplificados entre dois microssatélites em direções opostas. Trata-se de marcadores dominantes altamente reprodutíveis e polimórficos, os quais não necessitam de conhecimento prévio das sequências de DNA para desenho de seus *primers* (BORNET e BRANCHARD, 2001).

Marcadores IRAP (*Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism*) amplificam a região entre dois retrotransposons LTR (*Long Terminal Region*).

Possuem as mesmas características descritas para os marcadores ISSR, porém necessitam do conhecimento prévio do genoma para construção de seus *primers*. As regiões LTR são altamente conservadas dentro das famílias de retrotransposons, permitindo que estes sejam usados como marcadores em diversas espécies (KALENDAR, 1999). Eles são muito abundantes, pois podem compõe cerca 50% do genoma de um cromossomo vegetal (KUMAR e BENNETZEN, 1999).

Diante da ausência de trabalhos na literatura que estudem seleções de limeira ácida 'Tahiti' em nível molecular, este trabalho teve por objetivo analisar a variabilidade entre os genótipos originados de limeira ácida 'Tahiti' por meio de marcadores moleculares do tipo ISSR e IRAP, e relacioná-los com marcadores agrônômicos de frutos.

MATERIAL E METÓDOS

Vinte e oito genótipos do Banco de Germoplasma (BAG) de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura (ver tabela 1), localizada no município de Cruz das Almas – BA, Brasil, foram empregados neste trabalho. Todos os genótipos foram originados de sementes de limeira ácida 'Tahiti', com exceção das variedades tangerineira 'Sunki' (*C. sunki* Hort. ex Tanaka), limão 'Verdadeiro Fino' [*C. limon* (L.) Burm.f.] e limeira ácida 'Galego' (*C. aurantifolia* Swingle), que foram usadas como controle.

Caracterização agrônômica de frutos

Em cada planta foi coletada uma amostra de 10 frutos, escolhidos aleatoriamente ao redor da copa, com coloração e firmeza nos padrões ideais de colheita. Avaliaram-se suas características físico-químicas de importância agrônômica, determinando-se: a) comprimento e diâmetro do fruto, medido com régua tipo calha graduada em centímetros (cm); b) rendimento do suco, avaliado com base na relação peso do suco/peso dos frutos, em porcentagem (%); c) espessura da casca, mensurada com paquímetro graduado em milímetros (mm); d) número de sementes por fruto; e) teor de sólidos solúveis (SS), determinado por refratometria, mediante emprego de refratômetro de leitura direta, sendo os

valores expressos em porcentagem em peso ($^{\circ}$ Brix); f) acidez titulável (AT), obtida mediante diluição de aproximadamente 0,5 g de suco (de cada amostra) em 40 mL de água destilada, utilizando uma bureta digital e realizando a titulação da solução com NaOH a 0,1 N, expressa em gramas de ácido cítrico/100g de suco; g) *ratio*, índice de maturação calculado pela razão SS/AT; h) cor da casca (1- verde intenso, 2- verde, 3- verde claro, 4- amarelo e 5- alaranjado).

Caracterização com marcadores moleculares ISSR e IRAP

Extração de DNA e condições de PCR

O DNA genômico foi extraído de folhas jovens, utilizando-se o método CTAB (DOYLE e DOYLE, 1990). A avaliação da quantidade e qualidade do DNA foi efetuada mediante análise comparativa das amostras em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. As amostras foram diluídas em TE e padronizadas em 5 ng. μ L⁻¹.

Primers ISSR e IRAP

Foram utilizados 24 *primers* ISSR e 8 *primers* IRAP. As informações sobre os iniciadores podem ser obtidas na Tabela 2.

Amplificação do DNA

A mistura de reagentes (mix) para reação de amplificação de ISSRs e IRAPs foi preparada para um volume final de 15 μ L, contendo os seguintes reagentes: Tampão de enzima 1X [KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3)], 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 0,4 μ M de cada *primer*, 20 ng de DNA genômico e uma Unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen).

As amplificações foram conduzidas em termociclador da marca Applied Biosystems modelo Veriti® 96-Well com o seguinte programa de amplificação: uma etapa inicial de 94°C por 3 min., seguida de 35 ciclos de 94°C por 40 s, temperatura de anelamento variou de 48° a 60°C (a depender do *primer*) por 40s, 72°C por 1 min., com extensão final de 72°C por 5 min. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 3,0%, corado com brometo de etídio e fotodocumentados utilizando o sistema de captura de

imagens (Vilber Lourmat).

Análise dos dados

A matriz de dissimilaridade gerada foi baseada em médias de características quantitativas estimadas a partir da distância Euclidiana Média. A contribuição relativa de cada caractere para a diversidade entre os genótipos foi obtida pela metodologia proposta por (SINGH, 1981), utilizando o programa computacional GENES (CRUZ, 2006).

Os fragmentos oriundos das reações de ISSR e IRAP foram avaliados como ausência (0) e presença (1) de bandas. A partir destes dados, foram elaboradas três matrizes de dissimilaridade genética entre os genótipos, calculadas a partir do coeficiente de Jaccard (índice do complemento de Jaccard = $1-c$) por meio do Software GENES (CRUZ, 2006). Três matrizes foram construídas, sendo a primeira resultante dos dados de ISSR, a segunda de IRAP e a terceira da análise conjunta destes dois marcadores. O teste de agrupamento dos genótipos foi realizado pelo método UPGMA (*Unweighted pair-group Method with arythmetic mean*) empregando o software Statistica (STATISTICA, 2002). A correlação cofenética foi calculada para verificar correlação entre as matrizes de distância e agrupamento, por meio do teste de Mantel. Para verificar a consistência das bifurcações no dendrograma, a análise de *bootstrap* foi conduzida utilizando-se 1000 permutações, por meio do programa GENES (CRUZ, 2006). O critério adotado para formação de grupos dentro dos agrupamentos foi a média da matriz.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 apresenta o dendrograma construído por meio da matriz de distância Euclidiana Média com base em dados quantitativos (Tabela 1). Este dendrograma mostrou coeficiente de correlação cofenética de 0,99, indicando boa representação dos dados, haja vista que valores maiores que 0,56 são considerados adequados (VAZ PATTO et al., 2004). A média da matriz de dissimilaridade de dados quantitativos foi 1,10, sendo os acessos 'Chapada' e 'Casca Grossa' os mais próximos, com dissimilaridade 0,06. Por sua vez, a

tangerineiras e o limoeiro 'Verdadeiro Fino' foram os mais distantes, dissimilaridade de 3,35. Neste dendograma foram criados quatro grupos. O primeiro (G1) composto pelas limeiras ácidas 'Tahiti' 'CNPMF – 10', 'CNPMF – 11', 'CNPMF – 12', 'CNPMF – 13', 'CNPMF – 16', 'CNPMF – 17', 'CNPMF – 18', 'CNPMF – 19', 'CNPMF – 20' 'Bearss Lime', 'Chapada', 'Casca Grossa', 'Comprido', 'Lagoa Grande', 'Limeira', 'IAC – 5.1', 'IAC – 5.0', '5059', 'Persian 58', 'CNPMF – 01', 'CNPMF – 02', 'CNPMF – 03', 'CNPMF – 2000', 'CNPMF – 2001'; o segundo (G2) formado por limeira ácida 'Galego'; o terceiro (G3) formado por limoeiro 'Verdadeiro Fino' e o quarto (G4) formado por tangerineiras 'Sunki' e 'CNPMF – 08'. Quanto ao formato de fruto, as limeiras ácidas mostraram hesperídios com formato esferoide achatados, comprimento menor que diâmetro, ou esferoide oblongo, comprimento maior que diâmetro (Tabela 1).

Segundo o teste de Singh (1981) o caractere de maior contribuição para divergência entre os indivíduos foi o número médio de sementes por fruto (72,5%). O número de sementes também contribuiu significativamente para a diferenciação de clones de laranja doce cv. 'pera' (*C. sinensis* Osbeck) e de outras variedades desta espécie (DOMINGUEZ et al., 2004).

As limeiras ácidas 'Tahiti' não produziram mais que uma semente por fruto, com exceção de 'CNPMF – 16' e 'CNPMF – 20' que produziram mais de três, enquanto que a limeira ácida 'Galego' produziu em média seis sementes por fruto. O limoeiro 'Verdadeiro Fino' produziu 19 sementes por fruto, ao contrário do limoeiro 'Verdadeiro CNPMF – 03' que não apresentou semente nos frutos analisados (Tabela1).

Nas análises de ISSR, de 24 *primers* avaliados, 17 foram polimórficos. No total, foram obtidas 125 bandas, sendo 69 polimórficas e 56 monomórficas. Os *primers* com maior polimorfismo foram DiCA3'RG, TriATC3'RC e TriCAA3'RC; cada um com seis bandas polimórficas (Tabela 2).

Quanto agrupamento de ISSR (Figura 2), a correlação cofenética foi de 0,99. Em uma avaliação inicial, observa-se uma separação do grupo de limoeiros e limeiras ácidas do grupo das tangerineiras. A dissimilaridade média entre os 28 indivíduos analisados foi 0,16. Os acessos mais distantes foram 'CNPMF – 20' e Tangerineira 'Sunki' (0,44). Não foi encontrada dissimilaridade entre as seleções 'CNPMF – 10', 'CNPMF – 13', 'CNPMF – 16', 'CNPMF – 17', 'CNPMF – 18' e 'IAC

– 5’, ‘IAC - 5.1’, ‘Persian 58’, ‘CNPMF – 01’, ‘Lagoa Grande’, ‘Casca Grossa’, ‘CNPMF – 02’, ‘Comprido’, ‘5059’, ‘Bearss lime’, ‘CNPMF – 2001’. Com base nos resultados obtidos não foi possível diferenciá-los dos materiais acima citados empregando marcadores ISSR, sugerindo que os mesmos apresentam base genética estreita.

O dendograma formado com os dados dos marcadores ISSR revelou a formação de 3 grupos diferentes (Figura 2). No grupo G1 foram agrupados 10 genótipos (‘CNPMF – 10’, ‘CNPMF – 11’, ‘CNPMF – 12’, ‘CNPMF – 13’, ‘CNPMF – 16’, ‘CNPMF – 17’, ‘CNPMF – 18’, ‘CNPMF – 19’, ‘CNPMF – 20’, ‘CNPMF – 2000’) com média de dissimilaridade (0,03).

Dentro do G1 está a limeira ácida ‘Tahiti CNPMF – 2000’ que é uma seleção obtida de uma mutação de gema. A partir de suas sementes é que foram originadas as demais seleções integrantes do G1. De maneira geral, quando estão verdes, os frutos desse grupo, apresentam uma coloração verde mais intensa e brilhante em relação às demais seleções de limeiras ácidas ‘Tahiti comuns’. Além disso, os frutos desse grupo possuem diâmetro maior que o comprimento, ou seja, frutos esferóides achatados. Os seus frutos também possuem maior incidência de sementes, em relação às demais seleções de limeira ácida ‘Tahiti’ convencionalmente cultivadas, em média três sementes a cada dois frutos (Tabela1).

À exceção dos genótipos ‘CNPMF – 03’, limoeiro ‘Verdadeiro Fino’ e limeira ácida ‘Galego’, os demais integrantes do grupo G2 (‘IAC – 5’, ‘IAC - 5.1’, ‘Limeira’, ‘Persian 58’, ‘CNPMF – 01’, ‘Lagoa Grande’, ‘Casca Grossa’, ‘CNPMF – 02’, ‘Comprido’, ‘Chapada’, ‘5059’, ‘Bearss lime’, ‘CNPMF – 2001’) são marcados por frutos de padrão limeira ácida ‘Tahiti’, ou seja, frutos oblongos a arredondados, e com menor frequência de sementes, média de uma a cada três frutos (Tabela 1).

O terceiro grupo (G3) foi formado pelas microtangerineiras: ‘CNPMF – 08’ e ‘Sunki’. A tangerineira ‘Sunki’ geralmente é usada como porta-enxerto. Os frutos dessas tangerineiras possuem poucas sementes (quatro a seis - ver Tabela 1) e neste estudo foram usadas como espécie controle.

Na tabela 2 encontram-se os dados obtidos das análises de marcadores IRAP. Todos os *primers* testados mostraram polimorfismo, mas o IRAP 5 foi o que

apresentou maior número de bandas polimórficas (19), enquanto que o IRAP 3 mostrou apenas um loco polimórfico. Os *primers* geraram um total de 67 bandas, sendo 49 polimórficas e 18 monomórficas.

A correlação cofenética para este estudo foi de 0,90, o que também é considerado alto. O dendograma construído a partir dos dados dos marcadores IRAP agrupou os germoplasmas em 6 grupos (Figura 3) os genótipos, IAC – 5.1, CNPMF – 03' e limoeiro 'Verdadeiro Fino' que antes pertenciam ao grupo G2 do agrupamento ISSR, passaram a formar grupos individuais, G3, G4 e G5, respectivamente. Com um valor de dissimilaridade de 0,57, os indivíduos que mais divergiram entre si foram às tangerineiras e a limeira ácida 'Tahiti CNPMF – 2001'. Os acessos 'CNPMF – 01' e 'Lagoa Grande' não apresentaram dissimilaridade.

Na análise conjunta dos dados dos marcadores ISSR e IRAP (Figura 4), constatou-se que houve correlação cofenética de 0,98 entre os agrupamentos. A média da matriz conjunta foi de 0,19, valor esse próximo ao encontrado na análise com o marcador ISSR. Os três grupos formados no dendograma da figura 4 foram os mesmos formados pelos dados de ISSR. Semelhante ao agrupamento anterior, os acessos mais divergentes foram 'CNPMF – 2001' e as tangerineiras (0,47).

Os genótipos 'CNPMF – 01 e 'Lagoa Grande' não mostraram diferenças genéticas. Reforçando a estreita base entre esses acessos de limeira ácida 'Tahiti'. O fato de não ter sido detectado poderia ser justificado pela ineficiência (insuficiente número) dos *primers* utilizados. Não podemos descartar a possibilidade de ocorrência de divergências entre estes materiais, uma vez que há evidências de ocorrência de mutação somática em citros em uma taxa elevada que deram origem a indivíduos proximalmente relacionados (MACHADO et al., 2005), mas que os marcadores moleculares nem sempre conseguem detectar (BARKLEY et al. 2006).

Todos os genótipos analisados possuíam frutos do tipo limeira ácida, com exceção de 'limoeiro 'Verdadeiro Fino', Tangerineira 'Sunki', 'CNPMF – 08' e 'CNPMF – 03' (Tabela 1). Apesar de esses dois últimos serem provenientes de sementes de frutos de limeira ácida 'Tahiti', eles herdaram características muito diferentes da mãe. REECE e CHILDS (1962) também obtiveram híbridos desta

limeira com características de frutos semelhantes as dos parentais masculinos. Os frutos de 'CNPMF – 08' são idênticos às de tangerineira 'Sunki' sendo esta, portanto, seu provável parental masculino. Os três dendogramas mostraram que estes dois genótipos são altamente similares com distância de dissimilaridade em torno de 0,06. Praticamente, todos os *primers* mostraram bandas espécie-específicas para estes exemplares. O ramo do dendograma que faz ligação entre eles dois é altamente sustentado pelas análises de *bootstrap*, que em todos os dendogramas apresentou valores iguais a 100,0%.

O acesso 'CNPMF – 03' possui algumas características semelhantes à de uma planta de limoeiro 'Verdadeiro', ou seja, plantas vigorosas com presença de espinhos e frutos elipsoides. Os *primers* DiCA 3'RG, TriAAC 3'RC e TriACG 3'RC apresentaram bandas específicas para estes dois genótipos, apesar de não se agruparem. Na figura 4 a dissimilaridade entre estas duas variedades foi de 0,18, próxima da encontrada entre 'CNPMF – 03' e as limeiras ácidas 'Tahiti' (média de 0,17).

Ao compararmos os dados das figuras 1 e 4 foi observado que a distância entre os grupos de limeiras ácidas 'Tahiti' com frutos oblongos e com frutos achatados foi maior que a encontrada entre as limeiras ácidas 'Tahiti' com frutos oblongos e a 'Galego', e o limoeiro 'Verdadeiro Fino'.

Neste estudo, os marcadores IRAP detectaram maior variabilidade. Comparando os dados da tabela 2, observa-se que os marcadores ISSR apresentaram 55,2% de bandas polimórficas, uma média de 4,06 bandas polimórficas por *primer*, e os marcadores IRAP mostraram 73,1% de bandas polimórficas, uma média de 6,12 bandas polimórficas por *primer*. Além disso, a dissimilaridade média (0,27) da matriz IRAP foi maior que a de ISSR (0,16). Um trabalho realizado com marcadores moleculares, dentre eles ISSR e IRAP, corrobora com o resultado encontrado neste estudo. BRETÓ et al. (2001) analisou a variabilidade entre cultivares de tangerineiras 'Clementinas' (*C. clementina* Hort. ex Tan.) e verificou que IRAP foi quem detectou maior polimorfismo, 14,6%, enquanto que os demais apresentaram no máximo 2,4%, ressaltando a baixa variabilidade entre estas tangerineiras.

BERNET et al. (2004) usaram marcadores IRAP e conseguiram separar os limoeiros verdadeiros 'Fino', 'Verna' e 'Eureka' em um grupo distinto dos demais

limoeiros avaliados. Contudo, esta separação não foi suportada por meio de marcadores ISSR.

Já, BISWAS et al. (2010), conduzindo um trabalho com marcadores ISSR, IRAP, dentre outros, para estudar a diversidade genética em *Citrus* e gêneros relacionados, verificou que os marcadores ISSR e IRAP apresentaram a mesma média de bandas polimórficas por *primer* (4,67). Porém, ISSR detectou 84,9% de polimorfismo contra 82,4% de IRAP.

O uso de um tipo de marcador não exclui o uso de outro. Já que eles podem possuir regiões de anelamento diferentes, eles podem ser usados em situações diversas e detectar níveis de polimorfismo diferentes, a depender da espécie.

As matrizes criadas revelam que a dissimilaridade encontrada entre as limeiras ácidas e limões foi baixa. No agrupamento consenso (ISSR+IRAP) (Figura 4) o valor médio de dissimilaridade foi 0,13 entre limeira ácida 'Tahiti' e 'Galego', 0,18 entre limoeiro 'Verdadeiro Fino' e limeira ácida 'Tahiti', 0,24 entre limoeiro Verdadeiro 'Fino' e limeira ácida 'Galego'. Esta maior dissimilaridade entre os limoeiros e limeiras ácidas, também foi observada por SHAHSAVAR et al., (2007), que utilizando seis marcadores ISSR para estudar as relações filogenéticas entre espécies de citros, agruparam a limeira ácida 'Tahiti' com a 'Galego' (80% de similaridade) e detectaram menor similaridade, em torno 64%, entre o grupo de limões e limeira ácidas.

CONCLUSÕES

Com base nos dados agronômicos e moleculares, pôde-se concluir que há divergência entre as limeiras ácidas 'Tahiti, os limoeiros 'Verdadeiros' e as tangerineiras, sendo menor esta divergência entre as limeiras ácidas e os limoeiros. Os marcadores moleculares conseguiram separar as limeiras ácidas 'Tahiti em dois grupos distintos, um referente a limeiras ácidas 'Tahiti' de frutos achatados e outro a frutos oblongos, mas não foram suficientes para diferenciar todas as limeiras ácidas 'Tahiti' dentro dos grupos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARKLEY, N. A.; ROOSE, M. L.; KRUEGER, R. R.; FEDERICI, C. T. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). **Theoretical and Applied Genetics**, 112: 1519–1531, 2006.
- BERNET, G. P.; MESTRE, P. F.; PINA, J. A.; ASÍNS, M. J. Molecular discrimination of lemon cultivars. **Hortscience**, 39 (1): 165-169, 2004.
- BISWAS, M. K.; XU, Q.; DENG, X. Utility of RAPD, ISSR, IRAP and REMAP markers for the genetic analysis of Citrus spp. **Scientia Horticulturae**, 2010.
- BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**, 19: 209–215, 2001.
- BRETÓ, M. P.; RUIZ, C., PINA, J.A.; ASINS, M.J. The Diversification of Citrus clementina Hort. ex Tan., a Vegetatively Propagated Crop Species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.21, p.285–293, 2001.
- Cruz, C.D. **Programa Genes: Biometria**. Editora UFV. Viçosa (MG). 382p. 2006.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v.12, n.1, p.13-15, 1990.
- FANG, D. Q.; ROOSE, M. L.; KRUEGER, R. R.; FEDERICI, C. T. Fingerprinting trifoliate orange germplasm accessions with isozymes, RFLPs and inter-simple sequence repeat markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 95:211–219, 1997.
- GULSEN, O.; UZUN, A.; CANAN, I.; SEDAY, U.; CANIHOS, E. A new citrus linkage map based on SRAP, SSR, ISSR, POGP, RGA and RAPD markers. **Euphytica**, 173: 265-277, 2010.
- KALENDAR, R., GROB, T., REGINA, M.T., SUONIEMI, A., SCHULMAN, A.H. IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. **Theoretical and Applied Genetics**, 98:704–711, 1999.
- KUMAR, A. BENNETZEN, J.L. Plant Retrotransposons. **Annual Review of Genetics**, 33: 479-532, 1999.
- MACHADO, M. A.; CRISTOFANI, C.; AMARAL, A. M. do.; OLIVEIRA, A. C. de. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: MATTOS JUNIOR; D. de.;

- NEGRI; J. D. de.; PIO; R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Eds.) **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, 2005. p.221-277
- SALIBE, A. A. Clássicos: clones nucelares de citros no estado de São Paulo. **LARANJA**, Cordeirópolis, v.30, n.1-2, p.117-136, 2009.
- SANKAR, A. A.; MOORE, G. A. Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in Citrus and extension of the genetic linkage map. **Theoretical and Applied Genetics**, 102: 206–214, 2001.
- SCARIOT, V.; DE KEYSER, E.; HANDA, T.; DE RIEK, J. Comparative study of the discriminating capacity and effectiveness of AFLP, STMS and EST markers in assessing genetic relationships among evergreen azales. **Plant Breed**. 126, 207–212, 2007.
- SCHÄFER, G.; BASTIANEL, M.; DORNELLES, A. L. C. Identificação de plântulas zigóticas de trifoliata com o uso de marcadores moleculares RAPD. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.39, n.2, p.167-172, 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.
- Statistica (2002) STATISTICA for Windows v. 6.0: Computer Program Manual. Editora StatSoft Inc. Tulsa, UK (CD-Rom)
- VAZ PATTO, M. C.; SATOVIC, Z.; PÊGO, S.; FEVEREIRO, P. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germplasm using microsatellite markers. **Euphytica**, 137: 63-67, 2004.

Tabela 1. Médias de peso (**PF**), comprimento (**CF**), diâmetro (**DF**), cor da casca (**COR**) espessura da casca (**EC**), número de sementes (**NS**), rendimento de suco (**RS**), acidez titulável (**AT**), sólidos solúveis (**SS**) e *ratio* (**RT**) de frutos de genótipos de citros. Cruz das Almas, Bahia, 2012.

Tipo de Fruto	Genótipos	CF	DF	COR	EC	NS	RS	AT	SS	RT
lima ácida	Galego	4,50	4,70	4,00	1,80	5,80	0,45	6,87	6,80	1,01
limão 'Verdadeiro'	Fino	7,21	6,00	4,00	6,20	19,00	0,35	5,56	6,60	1,19
limão 'Verdadeiro'	CNPMF – 03	7,19	6,17	3,00	5,58	0,08	0,33	5,46	7,20	1,34
lima ácida 'Tahiti' ¹	CNPMF – 10	6,15	6,23	2,25	3,28	1,10	0,37	6,75	7,50	1,11
lima ácida 'Tahiti' ¹	CNPMF – 11	6,05	6,08	2,36	4,04	0,95	0,39	6,61	7,80	1,18
lima ácida 'Tahiti' ¹	CNPMF – 12	5,97	6,24	2,38	3,71	1,68	0,40	6,41	8,28	1,30
lima ácida 'Tahiti' ¹	CNPMF – 13	5,74	5,84	2,40	3,91	0,86	0,41	6,41	8,40	1,31
lima ácida 'Tahiti' ¹	CNPMF – 16	5,92	6,80	2,52	3,60	3,80	0,45	5,88	9,40	1,60
lima ácida 'Tahiti' ¹	CNPMF – 17	5,92	6,10	2,37	3,60	1,56	0,40	6,54	8,05	1,24
lima ácida 'Tahiti' ¹	CNPMF – 18	5,50	5,55	2,33	3,71	1,05	0,41	7,18	7,00	0,97
lima ácida 'Tahiti' ¹	CNPMF – 19	5,90	6,02	2,38	2,97	1,51	0,41	6,55	8,00	1,22
lima ácida 'Tahiti' ¹	CNPMF – 20	5,60	5,65	2,33	4,02	3,50	0,45	6,54	8,05	1,24
lima ácida 'Tahiti' ¹	CNPMF – 2000	5,73	5,44	2,36	3,74	0,71	0,42	6,53	7,58	1,16
	Média	5,85	5,99	2,37	3,66	1,67	0,41	6,54	8,01	1,23
lima ácida 'Tahiti'	5059	6,33	5,69	2,20	3,21	0,05	0,44	6,87	7,44	1,08
lima ácida 'Tahiti'	Bearss Lime	6,14	5,58	2,80	3,05	0,00	0,38	6,73	7,48	1,11
lima ácida 'Tahiti'	Casca Grossa	5,92	5,44	2,63	3,06	0,40	0,37	6,25	7,64	1,14
lima ácida 'Tahiti'	Chapada	5,89	5,43	2,61	3,06	0,95	0,37	6,21	7,66	1,12
lima ácida 'Tahiti'	CNPMF – 01	6,23	5,73	2,50	3,33	0,19	0,38	6,52	7,58	1,17
lima ácida 'Tahiti'	CNPMF – 02	6,00	5,51	2,20	3,35	0,22	0,37	6,52	7,28	1,12
lima ácida 'Tahiti'	CNPMF – 2001	6,46	5,72	2,36	4,35	0,59	0,36	6,09	7,65	1,25
lima ácida 'Tahiti'	Comprido	6,84	6,08	2,00	0,34	1,40	0,39	6,17	7,00	1,13
lima ácida 'Tahiti'	IAC – 5.0	6,22	5,66	2,80	3,08	0,36	0,38	6,34	7,32	1,16
lima ácida 'Tahiti'	IAC – 5.1	5,81	5,58	2,50	3,57	0,43	0,39	6,84	7,68	1,12
lima ácida 'Tahiti'	Lagoa grande	7,00	6,20	2,00	0,30	0,00	0,38	6,36	7,20	1,13
lima ácida 'Tahiti'	Limeira	6,92	6,40	2,20	3,60	0,20	0,46	5,97	7,20	1,20
lima ácida 'Tahiti'	Persian 58	6,42	5,60	2,20	3,04	0,06	0,39	6,64	7,36	1,11
	Média	6,32	5,74	2,39	2,87	0,37	0,39	6,42	7,42	1,14
Microtangerina	CNPMF – 08	2,90	3,30	5,00	2,60	6,00	0,19	3,50	9,70	2,77
Microtangerina	Sunki	3,08	3,90	5,00	2,80	4,00	0,18	3,32	10,30	3,10

¹ lima ácida 'Tahiti' com frutos achatados (genótipos cujo parental feminino é o 'CNPMF – 2000')

Tabela 2. Iniciadores ISSR e IRAP utilizados na amplificação de citros, com suas respectivas seqüências, temperaturas de anelamento (Ta), número de bandas monomórficas (NBM), número de bandas polimórficas (NBP) e número total de bandas (NTB).

Primer (ISSR)	Seqüência	Ta (°C)	NBM	NBP	NBT
DiCA3'RG	CACACACACACACACAR ¹ G	50	4	6	10
TriCAC3'RC	CACCACCACCACCACRC	52	2	0	2
TriTGT3'YC	TGTTGTTGTTGTTGTY ² C	48	2	4	6
TriTGT5'CR	CRTGTTGTTGTTGTTGT	56	2	4	6
TriAAC 3'RC	AACAACAACAACAACRC	51	2	5	7
TriAAG 3'RC	AAGAAGAAGAAGAAGRC	48	3	3	6
TriATC 3'RC	ATCATCATCATCATCRC	48	0	6	6
TriATG 3'RC	ATGATGATGATGATGRC	51	1	5	6
TriACG 3'RC	ACGACGACGACGACGRC	58	4	2	6
TriAGA 3'RC	AGAAGAAGAAGAAGARC	48	0	4	4
TriTAG 3'RC	TAGTAGTAGTAGTAGRC	48	0	2	2
TriTTC 3'RC	TTCTTCTTCTTCTTCRC	48	3	0	3
TriTTG 3'RC	TTGTTGTTGTTGTTGRC	48	2	4	6
TriTCT 3'RC	TCTTCTTCTTCTTCTRC	48	1	4	5
TriTCC 3'RC	TCCTCCTCCTCCTCCRC	48	5	0	5
TriTGA 3'RC	TGATGATGATGATGARC	48	3	0	3
TriCAA 3'RC	CAACAACAACAACAARC	48	3	6	9
TriCAT 3'RC	CATCATCATCATCATRC	48	2	0	2
TriCTT 3'RC	CTTCTTCTTCTTCTTRC	48	1	5	6
TriCTC 3'RC	CTCCTCCTCCTCCTCRC	48	4	1	5
TriCCG 3'RC	CCGCCGCCGCCGCCGRC	48	3	4	7
TriCGC 3'RC	CGCCGCCGCCGCCGRC	48	1	0	1
TriGAC 3'RC	GACGACGACGACGACRC	48	6	0	6
TriGTA 3'RC	GTAGTAGTAGTAGTARC	56	2	4	6
Total			56	69	125
		%	44,8	55,2	100,0

¹R= (A,G); ²Y= (C,T)

Primer (IRAP)	Seqüência	Ta (°C)	NBM	NBP	NBT
IRAP 2 (LCB)	GGACCTATTTGCCAATGCT	55	1	3	4
IRAP 3 (LGC)	CCAATTCCGGAAGGTTCTAGG	60	0	1	1
IRAP 5 (SSGB)	AGTACGTCATTGCCTGTCCG	60	0	19	19
IRAP 6 (SSCC)	ATCTCCCATTTCCGACCACT	57	4	3	7
SABRINA	GCAAGCTTCCGTTTCCGC	51	4	7	11
STOWAWAY	GCAAGCTTCCGTTTCCGC	54	1	7	8
SUKKULA	GATAGGTCGCATCTTGGGCGTGAC	60	1	5	6
NIKITA	CGCTCCAGCGGTACTGCC	52	7	4	11
Total			18	49	67
		%	26,9	73,1	100,0

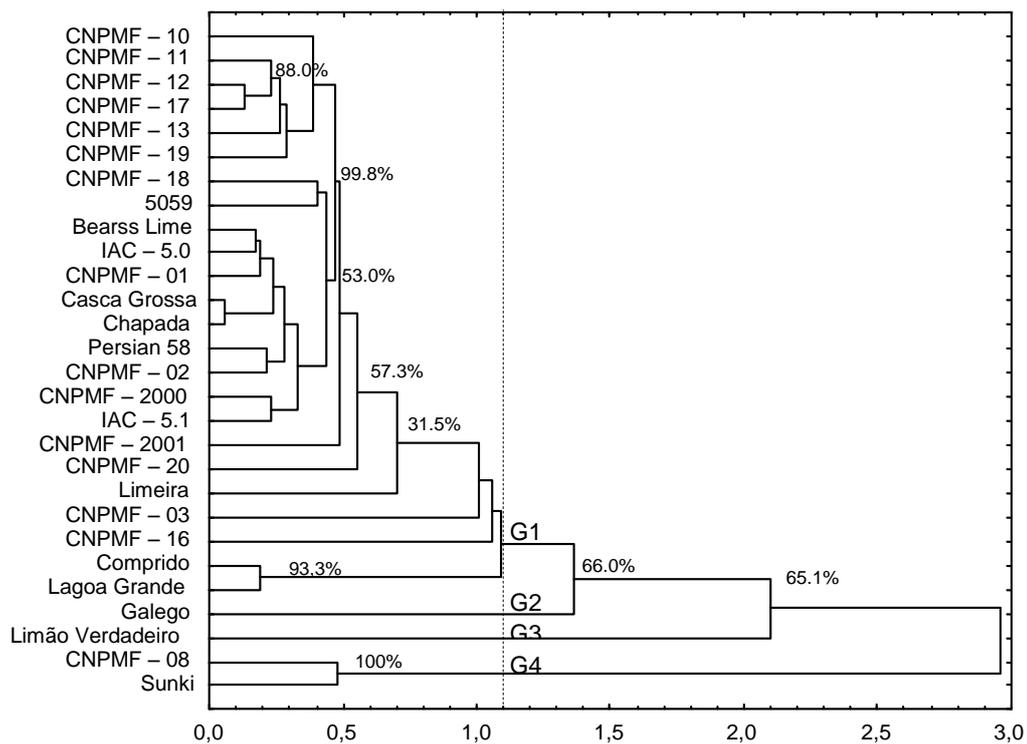


Figura 1. Dissimilaridade genética entre 20 genótipos de citros. Dendrograma construído a partir da matriz de dissimilaridade contendo 9 variáveis quantitativas de frutos, utilizando-se o método de agrupamento UPGMA. Números nas bifurcações significam a % de consistência das mesmas.

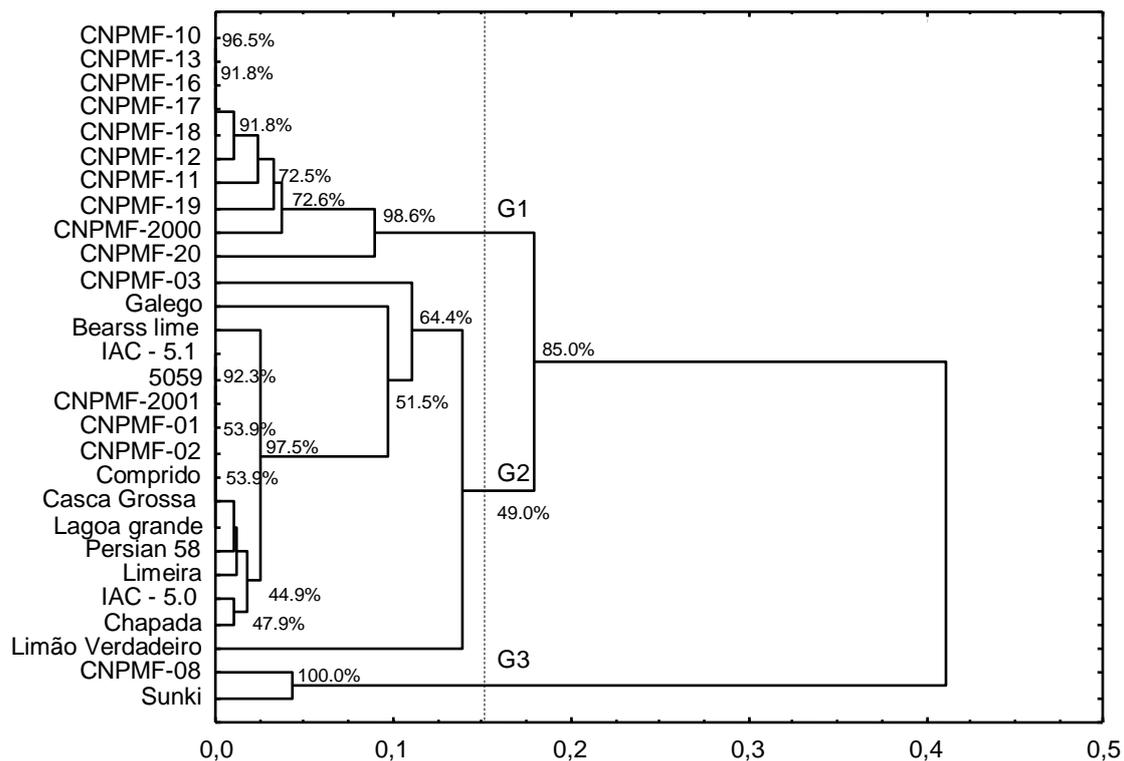


Figura 2. Dendrograma construído para 28 genótipos de citros a partir de 69 bandas polimórficas de 24 marcadores ISSR utilizando-se o método de agrupamento do UPGMA. Números nas bifurcações significam a % de consistência das mesmas.

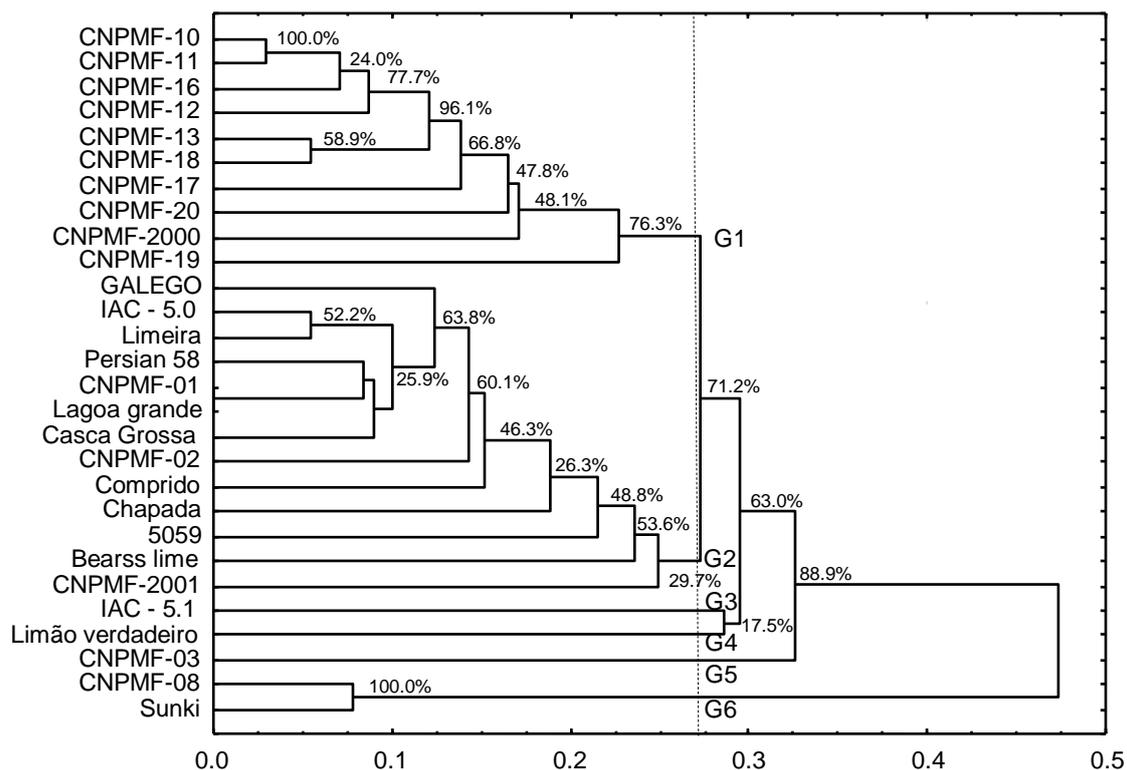


Figura 3. Dendrograma construído para 28 genótipos de citros a partir de 49 bandas polimórficas de 8 marcadores IRAP utilizando-se o método de agrupamento do UPGMA. Números nas bifurcações significam a % de consistência das mesmas.

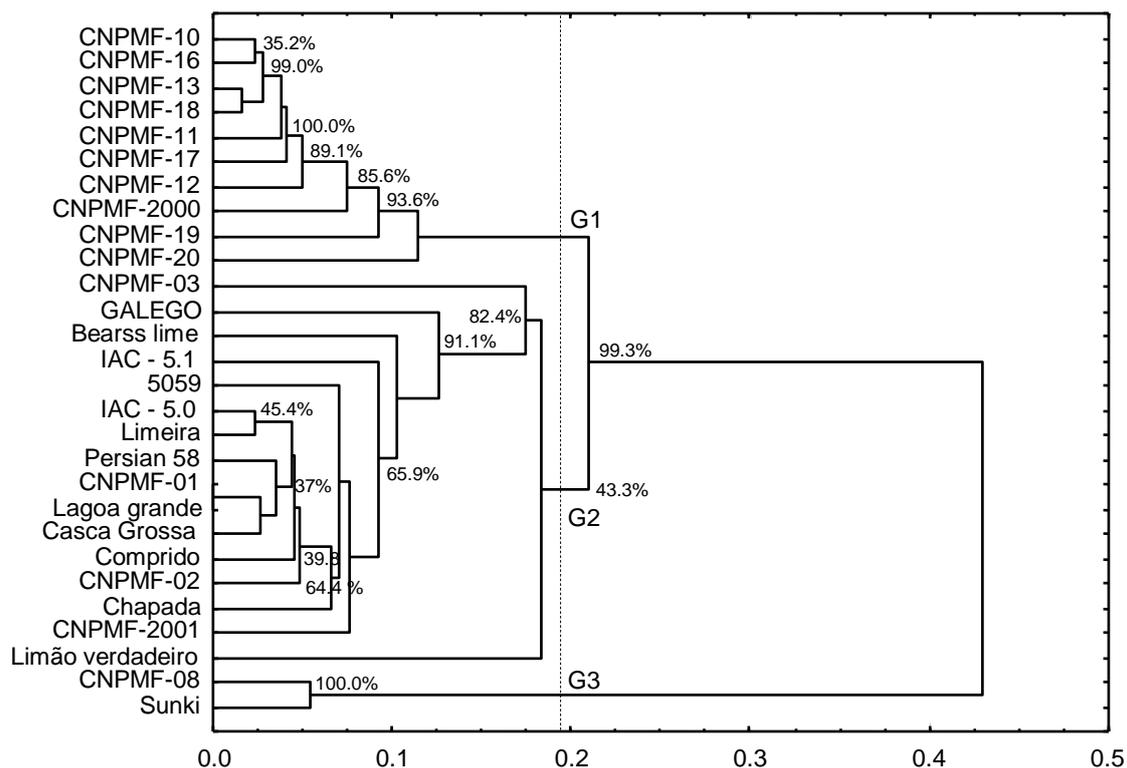


Figura 4. Dissimilaridade genética entre 28 genótipos de citros. Dendrograma construído a partir da matriz de dissimilaridade contendo 69 e 49 bandas polimórficas oriundas dos marcadores ISSR e IRAP, respectivamente, utilizando-se o método de agrupamento UPGMA. Números nas bifurcações significam a % de consistência das mesmas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A lima ácida 'Tahiti' é uma fruta de crescente expansão dentro do mercado de exportação de frutas frescas (VITTI, 2009). Este trabalho de avaliação de seleções traz resultados de grande valia para citricultura brasileira, mais especificamente, para a nordestina. Haja vista que até então, no Nordeste, não foi realizada nenhuma pesquisa com tantas seleções de limeira ácida 'Tahiti'. Visto que as mesmas são direcionadas principalmente as laranjas doces.

As seleções 'Persian 58' e '5059' mostraram que têm potencial para aumentar a média de produtividade da citricultura litorânea do Nordeste, mesmo diante da presença de *Colletrotrichum acutatum* nas floradas de inverno. No intuito de obter resultados mais conclusivos sobre o comportamento agrônomo das seleções estudadas, este trabalho de avaliação tem sido realizado também em outros estados da federação, a saber: Ceará, Distrito Federal, Pernambuco, São Paulo e Sergipe.

Os dados dos marcadores moleculares ISSR e IRAP separaram a limeira ácida 'Tahiti CNPMF – 2000' e seus relacionados, das demais seleções utilizadas neste estudo, como por exemplo 'IAC – 5'. Desta maneira sugere-se que 'CNPMF – 2000', seja considerada como uma variedade de limeira ácida 'Tahiti' e não uma seleção ou clone, pois apresenta características moleculares e agrônomicas que a distingue da limeira ácida 'Tahiti' comum.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VITTI, A. **Análise da competitividade das exportações brasileiras de frutas selecionadas no mercado internacional**. 2009. 109p. Dissertação (Mestrado em Economia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.