

## SELEÇÃO DE MARCADORES ESPECÍFICOS PARA CARACTERIZAÇÃO DE VARIEDADES DO GRUPO DAS TANGERINAS E HÍBRIDOS

Ana Lúcia Dezotti<sup>1,2</sup>

Tatiany Aparecida Teixeira Soratto<sup>2</sup>

Marinês Bastianel<sup>2</sup>

Valdenice Moreira Novelli<sup>2</sup>

Mariângela Cristofani–Yaly<sup>2</sup>

### RESUMO

A citricultura de mesa é uma excelente oportunidade para a permanência de pequenos e médios produtores na atividade, com destaque para as tangerinas, principal grupo de citros para o mercado de mesa. Entretanto, poucas variedades são produzidas comercialmente e, embora apresentem estreita base genética, uma grande variabilidade fenotípica tem sido observada no grupo das tangerinas e seus híbridos. Assim, o objetivo desse trabalho foi investigar e selecionar marcadores moleculares do tipo microssatélites para a identificação precoce de variedades, caracterização e certificação de cultivares. Dessa forma, 180 acessos de tangerinas e híbridos, pré-selecionados no Banco de Germoplasma, foram utilizados, incluindo mexericas (*C. deliciosa*), satsumas (*C. unshiu*), clementinas (*C. clementina*), tangerinas comuns (*C. reticulata*), tangelos (*C. reticulata* x *C. paradisi*) e tangores (*C. reticulata* x *C. sinensis*). O DNA total dos indivíduos foi extraído e foram avaliados 300 pares de *primers* obtidos a partir sequências ESTs – CitEST (Citrus EST) e genômicas. Foram selecionados 25 pares de *primers*, que amplificaram fragmentos de DNA polimórficos e 36 acessos apresentaram marcadores específicos. O maior número de marcadores polimórficos foi identificado para o grupo dos tangelos (43,7%), seguido pelos tangores (40,6%), pelas clementinas (34,3%), pelas mexericas (15,6%) e pelas tangerinas comuns (3,12%).

**Palavras Chaves:** Microssatélites; *Citrus*; certificação genética

<sup>1</sup> Graduanda em Ciências Biológicas na Fundação Hermínio Ometto – UNIARARAS, Araras SP. E-mail: [analudezotti@hotmail.com](mailto:analudezotti@hotmail.com)

<sup>2</sup> Centro de Citricultura Sylvio Moreira, Instituto Agrônomo - IAC, Cordeirópolis, SP  
Recebido em: 25/01/2017 Aceito para publicação em: 14/06/2017

## SELECTION OF SPECIFIC MARKERS FOR THE CHARACTERIZATION OF VARIETIES OF THE GROUP OF TANGERINES AND HYBRIDS

### ABSTRACT

The citriculture is an excellent opportunity for small and medium producers to remain in the activity, especially mandarins, the main citrus group for the table market. However, few varieties are commercially produced and although they have a narrow genetic base, a great phenotypic variability has been observed among the group of tangerines and their hybrids. Thus, the objective of this work was to investigate and identify molecular markers of the microsatellite type for the early identification of varieties, characterization and certification of cultivars. Thus, 180 accessions of pre-selected mandarins and hybrids were used, including willow leaf mandarin (*C. deliciosa*), satsumas (*C. unshiu*), clementines (*C. clementina*), common tangerines (*C. reticulata*), tangelos (*C. reticulata* x *C. paradisi*) e tangos (*C. reticulata* x *C. sinensis*). Total DNA from the individuals was extracted and 300 pairs of primers obtained from ESTs - CitEST and genomic sequences were evaluated. Twenty-five pairs of primers were selected, amplifying polymorphic DNA fragments, and only 36 accessions showed specific markers. The highest number of polymorphic markers was identified for the tangelos group (43.7%), followed by tangors (40.6%), clementines (34.3%), willow leaf mandarin (15.6%) and common mandarin (3.12%).

**Keywords:** Microsatellites; *Citrus*; Genetic certification

### INTRODUÇÃO

As tangerinas ocupam o segundo lugar em importância mundial entre as frutas cítricas, com uma produção ao redor de 24 milhões de toneladas, e o Brasil destaca-se como o quinto maior produtor mundial com 970 mil toneladas da fruta (FAOESTAT, 2017), atrás apenas da China, Espanha, Marrocos e Turquia. A área produtora no país é de 49,9 mil hectares da fruta, distribuídos principalmente nas regiões Sudeste e Sul do País, principalmente nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Rio Grande do Sul, que juntas totalizaram 86% da produção

nacional de tangerinas em 2014 (IBGE, 2016), destinadas basicamente ao consumo de fruta fresca.

O grupo das tangerinas apresenta uma grande diversidade de espécies, dentre elas quatro grupos são fundamentais, as mexericas (*C. deliciosa*), as clementinas (*C. clementina*), as satsumas (*C. unshiu*) e as tangerinas comuns (*C. reticulata*), além de alguns híbridos destas, todos bastante apreciados pelos consumidores de frutas frescas pela facilidade de descascamento e separação de gomos, sabor agradável, dentre outras características (PIO et al., 2005; BASTIANEL et al., 2014), portanto, podem ser considerados excelentes frutos para a citricultura de mesa.

Embora amplamente cultivadas, no Brasil ainda são poucas as variedades disponíveis no mercado, destacando-se as tangerinas Ponkan e Cravo (*C. reticulata*), o tangor Murcott (*C. reticulata* x *C. sinensis*) e as mexericas Rio e Montenegrina (*C. deliciosa*) (PIO et al., 2005). A seleção de novas variedades é fundamental para manutenção da atividade, que tem como características a intensiva ocupação de mão de obra e maior valor agregado por unidade de área cultivada, constituindo importante atividade para pequenos e médios produtores de citros. A citricultura de mesa ajuda na fixação dos agricultores qualificados e experientes no campo, mas compete com diversas outras frutas no mercado, sendo imprescindível ampliar o número de variedades.

Em citros, características inerentes à própria biologia reprodutiva, tais como grande compatibilidade sexual entre espécies, apomixia, poliembrionia e longos períodos de juvenilidade são fatores que dificultam os programas de caracterização de germoplasma e melhoramento das espécies (HERRERO et al., 1996 a,b). Alguns trabalhos demonstraram que, embora exista uma ampla diversidade de características fenotípicas, para algumas variedades como as de laranja doce e alguns porta-enxertos esta diversidade contrasta com o baixo polimorfismo ao nível molecular (FEDERICI et al., 1998; TARGON et al., 2000; NOVELLI et al., 2006).

Dentre as classes de marcadores moleculares, os microssatélites, também chamados de SSR (*Simple Sequence Repeats* – Repetições de Sequências Simples) são marcadores que em geral possuem o mais elevado conteúdo de informações de polimorfismo (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1995), natureza codominante, maior número de alelos por loco e alta heterozigosidade (LITT e LUTY, 1989; WEBER e MAY, 1989; TAUTZ, 1989). Dadas estas características, são

comumente utilizados como ferramenta de seleção e certificação genética para várias culturas.

Em citros, o uso destes marcadores demonstrou a possibilidade de obter informações avançadas ao nível intra e interespecífico para a caracterização e a identificação de variedades, auxiliando os programas de melhoramento e a certificação genética de acessos em diferentes grupos (KOEHLER-SANTOS et al., 2003; NOVELLI et al., 2006, PALMIERI et al., 2007; CRISTOFANI-YALY et al., 2011).

Conforme mencionado, existem diversos estudos com resultados de sucesso envolvendo citros e marcadores moleculares. No entanto, para o grupo das tangerinas, ainda há necessidade do estabelecimento de marcadores que possam ser utilizados de maneira rápida e eficiente na identificação e certificação de acessos. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi investigar e selecionar marcadores moleculares do tipo microssatélites para a identificação precoce de variedades, caracterização e certificação genética.

## **METODOLOGIA**

### **Coleta e preparo de amostras**

Foram coletados 180 acessos de tangerinas e híbridos, pré-selecionados pelo programa de melhoramento do Centro de Citricultura Sylvio Moreira-IAC (CCSM-IAC), pertencentes aos grupos das mexericas (*C. deliciosa*), satsumas (*C. unshiu*), clementinas (*C. clementina*), tangerinas comuns (*C. reticulata*), tangelos (*C. reticulata* x *C. paradisi*) e tangores (*C. reticulata* x *C. sinensis*) (Tabela 1). Dentro de cada grupo, foram incluídos alguns acessos de origem híbrida, por apresentarem características similares de frutos. Todo material encontra-se estabelecido em telado protegido de vetores e em campo, nas dependências do Centro de Citricultura Sylvio Moreira (CCSM-IAC), em Cordeirópolis, SP.

**Tabela 1.** Relação de acessos selecionados, com potencial comercial e que serão avaliados para marcadores específicos. TM=Tangor Murcott, LV=laranja Valência, LP=laranja Pera, TP=tangerina Ponkan, TC=tangerina Cravo e MC=Mexerica Rio.

Acesso	Variedade	Acesso	Variedade	Acesso	Variedade
<b>TANGERINAS COMUNS</b>		<b>TANGERINAS COMUNS CONT.</b>		<b>CLEMENTINAS</b>	
44	Ponkan Tuxpan IAC 170	230	Beauty of Glen Retreat SRA 261 EECB 230	880	Fortune
45	Swatow IAC 171	232	A Peau SRA 267 EECB 232	893	Clementina Caçula 3 IAC 1330
47	Oneco IAC 173	345	Ellendale CCC-441 EECB 345	894	Clementina Caçula 4 IAC 1318
49	Cravo IAC 182	5.1	Fremont 5-1	898	Clementina x Honey IAC 1388
206	Motevideo IAC 438	5.2	Fremont 5-2	994	Clementina 16MPD21 - Est 12932
210	Robinson IAC 442	5.3	Fremont 5-3	1055	Clementina x Mexerica IAC 934
257	Ponkan Chiaradia IAC 1484	9.1	Fremont 9-1	1262	Clementina 2KR Montreal
832	Híbrido tangerina IAC 1717	9.2	Fremont 9-2	1269	Clementina de Nules VCR
856	Sunwuiakon IAC 576	9.3	Fremont 9-3	1271	Clementina Bruno SRA 531
875	Africa do Sul IAC 557	2459	TM x LV 15	1283	Clementina Tomateira
878	Batangas IAC 504	2460	TC x LP 24	1344	Clementina Caffin SRA 385 (B)
879	Batangas IAC 505	3442	TC x LP 48	1427	Híbrido Clementina 11 MPF
883	Cape Nartjee IAC 522	2428	TC x LP 87	1428	Oroval
884	Cape Nartjee IAC 523	2291	TM x LP 175	1429	Oronules
885	Carvalhais IAC 546	2066	TM x LP 203	1433	Clemenules SPA 17
919	Empress IAC 565	2241	TM x LP 217	1434	Clementina Marisol I
922	Fallglo IAC 1427	2228	TM x LP 222	1436	Clementina Arrufatina
937	Junqueira IAC 721	3104	TM x LP 258	1441	Clementina Nules
941	King x Dancy IAC 1378	2169	TM x LP 264	1447	Clementina Marisol
944	Ladu IAC 539	2234	TM x LP 358	1527	Clemengold
966	Ponkan IAC 224	2589	TM x TC 2	<b>SATSUMAS</b>	
967	Ponkan IAC 226	2586	TM x TC 4	986	Satsuma Wase
968	Ponkan IAC 222	2581	TM x TC 5	1252	Satsuma Miyagawa SRA 444
969	Ponkan IAC 225	2584	TM x TC 7	1430	Satsuma Haschimoto – 4
970	Ponkan casca verde IAC 1722	2655	TM x TP 3	1431	Satsuma Okitsu SPA 29
974	Ponkan casca verde IAC 722	2705	TM x TP 8	1437	Satsuma Ovari
979	Rosehaugh Nartjee IAC 555	2659	TM x TP 9	<b>MEXERICAS</b>	
993	Span Precoce IAC 595	2671	TM x TP 11	233	Tardia IAC 582
1000	Sunwuiakon IAC 562	2652	TM x TP 12	234	Rio IAC 584
1002	Sylhat IAC 512	2667	TM x TP 13	838	Avana IAC 594
1007	Szinkon x Ladu Iac 548	<b>TANGORES</b>		840	Corsega IAC 586
1008	Szinkon x Tizon IAC 568	914	Ellendale early IAC 1314	842	Paiva IAC 588
1009	Szuwinkon IAC 571	954	Murcott Precoce IAC 1578	845	Imperial IAC 1331
1010	Szwinkon x Szinkon Tizon IAC 560	1034	Murcott J IAC 1502	846	Ipanema IAC 208
1018	Warnuco IAC 547	1044	Tankan IAC 502	847	Irradiação IAC 1631
1038	Muscia IAC 607	1435	Híbrido Ortanique SPA 16	848	Israel IAC 599
1236	Fewtrll SRA 418 (B)	1523	Ortanique IAC 554	849	Mildura IAC 1312
1243	OTA 14 (Clem. Oraval x Lar. Tarroco)	1683	Thomas IAC 519	850	Mogi das Cruzes IAC 606
1257	Lebom SRA 425	1722	Dekopon IAC 2009	851	Nobilis IAC 199
1293	Encore SRA 190	1729	Dweet IAC 1721	852	Paulista IAC 567
1312	Carvalhais de Vidigueira	1739	Clementina x Murcott	853	Pernambucana IAC 580
1327	Burgess SRA 412	1769	Murcott IAC 221	854	Siracusa IAC 590
1356	Red Skin SRA 428	2202	TM x LP 33	857	Tardia IAC 591
1381	Ponkan Nanine	3259	TM x LP 61	858	Tardia IAC 592
1423	Span Precoce IAC	2267	TM x LP 124	859	Mexerica x Clementina IAC 1545
1449	W. Murcott	2273	TM x LP 157	874	117477 IAC 540
1586	Kinnow IAC 176	3217	TM x LP 246	877	Avana Apireno IAC 1739
1602	Ponkan IAC 445	2297	TM x LP 253	1380	Montenegrina EEA
1632	Ladu X Skinkon IAC 552	2230	TM x LP 265	1424	Pará IAC 193
1639	Ponkan IAC 172	2237	TM x LP 281	1426	Pernambucana IAC 578
1658	Loose Jacket IAC 515	2223	TM x LP 321	1533	114412 IAC 585
1661	Wilking IAC 177	3120	TM x LP 353	1555	Tardia da Sicilia IAC 589
1692	De Wildt IAC 545	3188	TM x LP 370	1702	Rio IAC 194
1755	Fremont IAC 543	<b>TANGELOS</b>		1578	Tardia IAC 196
12	Satsuma x Natal EECB 12	209	Lee IAC 441	1778	Rainha EEA
30	1/43 EECB 30	868	Page IAC 1525	2508	MC x LP 7
43	1/28 EECB 43	959	Osceola IAC 503	2507	MC x LP 38
220	Zanzibar SRA 422 EECB 220	1052	Clemenville Alcazar IAC 931	2531	MC x LP 140
221	Rodeking SRA 431 EECB 221	1432	Híbrido Nova SPA 03	2514	MC x LP 319
223	Wallent SRA 438 EECB 223	1440	Nova	2506	MC x LP 355
227	Ponkan Yoshida SRA 585 EECB 227			2504	MC x LP 355
				2516	MC x LP 367
				2526	MC x LP 386

### **Extração do DNA**

O DNA foi extraído a partir da metodologia descrita por Murray e Thompson (1980), com adaptações de Machado et al. (1996), utilizando-se 2 g de folhas frescas, de cada uma das 180 amostras, que foram lavadas e trituradas em almofariz com nitrogênio líquido para a obtenção de um pó fino.

Posteriormente, foram adicionados 700 µL de tampão de extração (5% CTAB; 1M Tris-HCL pH 7,5; 0,5M EDTA; 5M NaCl; 140 mM beta-mercaptoetanol), sendo incubado a 60°C por 20 minutos. Logo após o resfriamento, foi adicionado ao extrato o mesmo volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), agitando por 3 minutos, e em seguida, centrifugados por 8 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, cerca de 550 µL, homogeneizando com o mesmo volume de clorofórmio/álcool isoamílico, além de 55 µL de CTAB 10% (10% CTAB e 5M NaCl), novamente centrifugando por 8 minutos à 12.000g.

O sobrenadante foi transferido novamente para um novo tubo, cerca de 450 µL, e a ele foi adicionado igual volume de tampão de precipitação (1% CTAB; 1M Tris-HCl; pH 7,5; 0,5M EDTA), misturando-se gentilmente, permanecendo por 30 minutos em repouso e, posteriormente, centrifugado por 8 minutos a 10.000 rpm. Após, o sobrenadante foi descartado e o sedimentado (*pellet*) formado, dissolvido em 400 µL de TE alto sal (1M Tris-HCl; pH 7,5; 0,5 M EDTA; 5 M NaCl) à 65°C até total dissolução.

Em seguida, após resfriamento, o DNA foi precipitado com 800 µL de etanol absoluto e colocado à -80°C por 20 minutos. Posteriormente, foi centrifugado por 10 minutos a 12.000 rpm à 4°C. Logo, o sobrenadante foi descartado e houve a precipitação com 700 µL de etanol 70% gelado, sendo centrifugado por 7 minutos em 12.000 rpm à 4°C. Novamente o sobrenadante foi descartado, precipitando o DNA com 700 µL de etanol absoluto, centrifugando por 5 minutos em 12.000 rpm à 4°C. Depois, o sobrenadante foi descartado e os tubos colocados em estufa à 37°C por 1 hora. O DNA foi dissolvido em 80 µL de H<sub>2</sub>O MilliQ contendo 10µg/µL de RNase para a eliminação completa de RNA.

### **Seleção de marcadores SSR**

Para identificar os pares de *primes* informativos a todos os acessos estudados, foi realizada uma triagem com sete amostras dentre as 180 propostas no trabalho, sendo uma de cada grupo de variedades (Tabela 2). Tais amostras foram: tangerina

Fremont IAC 543, tangor Murcott IAC 221; tangelo Lee IAC 441, clementina Clemengold; Satsuma Wase, mexerica Tardia de Sicília IAC 589 e o híbrido TM x LP 258 (tangor Murcott x laranja Pera).

**Tabela 2.** Acessos pertencentes a grupos diferentes de tangerinas, utilizados para seleção de *primers* SSR. TM = tangor Murcott, LP=laranja Pera

<b>Tabela Acessos</b>	<b>Grupo</b>
Fremont IAC 543	Tangerinas comuns ( <i>C. reticulata</i> )
TM x LP 258	Tangerinas comuns ( <i>C. reticulata</i> )
Murcott IAC 221	Tangor ( <i>C. reticulata</i> x <i>C. sinensis</i> )
Lee IAC 441	Tangelo ( <i>C. reticulata</i> x <i>C. paradisi</i> )
Clemengold	Clementina ( <i>C. clementina</i> ),
Satsuma Wase	Satsuma ( <i>C. unshiu</i> )
Tardia de Sicília IAC 589	Mexerica ( <i>C. deliciosa</i> )

### **Marcadores Microssatélites – SSR (Simple Sequence Repeats)**

Foram disponibilizados para utilização 290 pares de *primers* SSR, desenvolvidos a partir de informações de sequências expressas ESTs de citros – CitEST (Palmieri et al., 2007), além das sequências genômicas (Novelli et al., 2006).

As reações de amplificação (PCR) foram conduzidas usando 100 ng de DNA em um volume total de 15 µL contendo 0,3 µL de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 1,5 µL de tampão de reação (*Buffer* 10X contendo MgCl<sub>2</sub>), 0,3 µL de Taq-polimerase (5U/µl), 1,2 µL de dNTP, 1,5 µL do DNA e água estéril completando o volume final. A amplificação foi realizada em termocicladores Vereti 96 Well Thermal Cycler, e para os *primers* SSR ESTs, foi utilizado programa para 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos, havendo neste período, o declínio de 0,3°C a cada ciclo e 72°C por 30 segundos, e 3 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e 72°C por 7 minutos. Já para os *primers* genômicos, as condições de amplificação foram de 32 ciclos com 94°C por 5 segundos, 94°C por 1 minuto, 55°C por 30 segundos, 72° por 1 minuto e 72°C por 4 minutos.

Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 3% com SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen). Ao final, para a visualização do gel, foi utilizado fotodocumentador para as análises de polimorfismos.

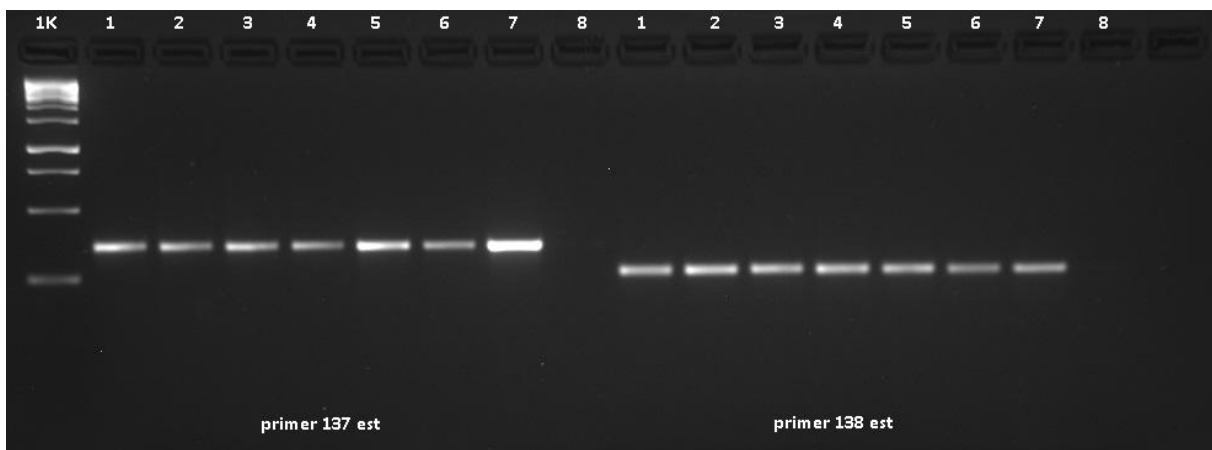
### **Análise dos dados**

Os produtos de amplificação foram avaliados quanto à presença (1) e à ausência (0) das bandas nos 180 genótipos para construir uma matriz de dados binários. A similaridade genética entre indivíduos foi calculada usando o coeficiente de similaridade de Jaccard (JACCARD, 1908). Os dendrogramas foram construídos pelo o método UPMGA (*Unweighted Pair Grouped Method Average*) e a eficiência dos algoritmos de agrupamento determinadas com base em coeficientes de correlação cofenética utilizando o programa NTSYS (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) v. 2.02 (ROHLF, 1998).

A informação genética foi avaliada utilizando os seguintes parâmetros: números de alelos por loco, heterozigosidade observada ( $H_o$ ), heterozigosidade esperada ( $H_{exp}$ ), índice de conteúdo polimórfico (PIC). Sendo os parâmetros calculados usando o software CERVUS 2.0 (MARSHALL et al. 1998).

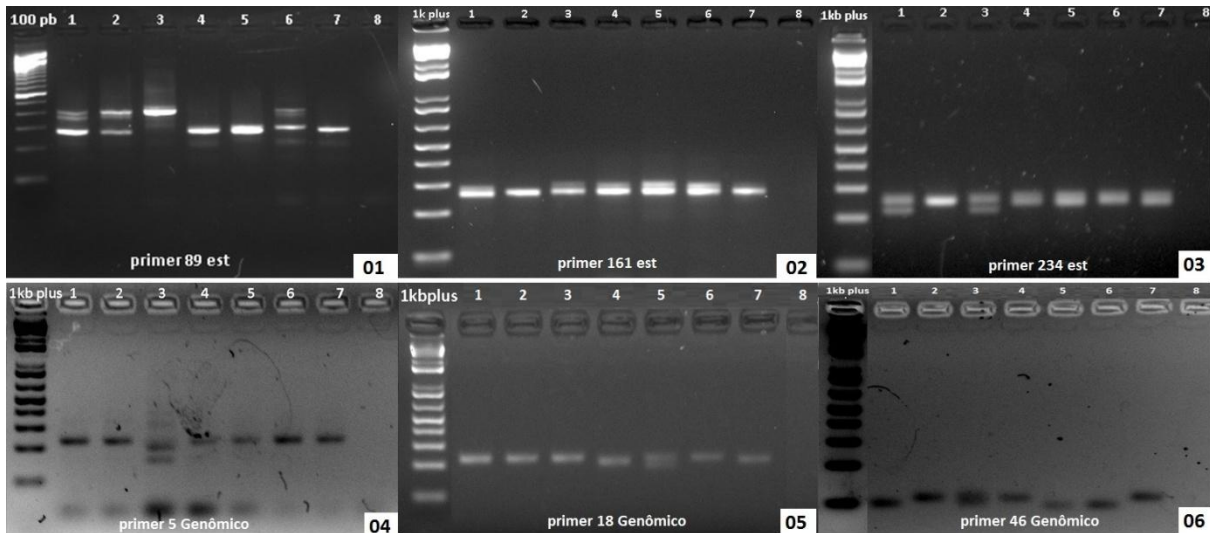
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O polimorfismo foi avaliado com sucesso em sete acessos de tangerinas e híbridos, sendo que, dentre os avaliados, 238 pares de *primers* ESTs e 52 pares de *primers* genômicos, foram excluídos os que não amplificaram ou que não apresentaram polimorfismo, como ilustrado na Figura 1. Foram selecionados vinte e cinco pares de *primers*, 20 ESTs e 5 genômicos, considerados polimórficos para os diferentes grupos (ANEXO 1, Figuras 2 e 3). O número de alelos variou de 2 a 3 por loco com média de 2,12 alelos por loco. O tamanho dos fragmentos dos diferentes alelos entre os locos variou de 50 a 700pb (ANEXO 1).



**Figura 1.** Amplificação dos locos CCSM-EST-237 e 238 para os quais não houve polimorfismo. Ladder 1Kb Plus, 1- Fremont IAC 543, 2- TM x LP 258, 3-Murcott IAC 221, 4-Lee IAC 441, 5- Clemengold, 6-Satsuma Wase, 7- Tardia de Sicília IAC 589, 8-branco (amostra sem DNA)



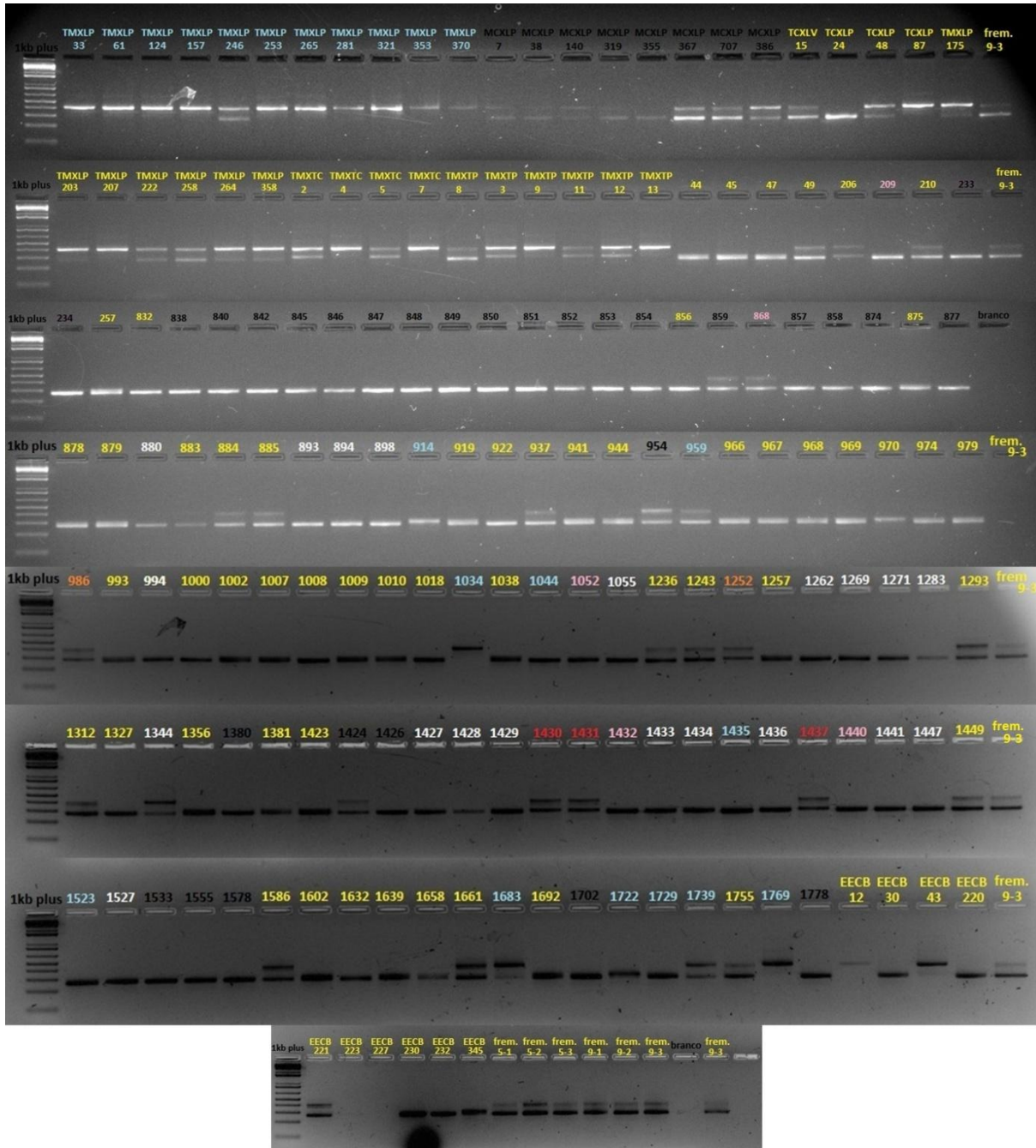


**Figura 2.** Amplificação dos locos (CCSM-EST-89; 161 e 234) e (CCSM – Genômico – 5; 18; 46) nos diferentes acessos nos grupos de tangerinas. Ladder 100 pb, 1-Fremont IAC 543, 2-TM x LP 258, 3-Murcott IAC 221, 4-Lee IAC 441, 5-Clemengold, 6-Satsuma Wase, 7-Tardia de Sicília IAC 589, 8-branco (amostra sem DNA).

Dentre os 25 loci SSR estudados, houve uma produção de 57 alelos em 180 acessos. O número médio de alelos foi de 2,1, sendo que os marcadores CCSM-EST-50, CCSM-EST-191 e CCSM-EST-234 apresentaram 3 alelos enquanto o restante apenas 2 alelos (ANEXO 1).

A heterozigosidade observada variou de 0,029 a 0,994, e a esperada variou de 0,029 a 0,501 (ANEXO 1). O loco CCSM-EST-144 apresentou o menor índice de polimorfismo (0,028) e o loco CCSM-EST-50 o maior índice (0,411), com uma média geral de 0,259 (ANEXO 1).

Apenas 36 acessos apresentaram marcadores específicos, com os quais puderam ser diferenciados (Tabela 3). O maior número de marcadores polimórficos foi identificado para o grupo dos tangelos (43,7%), seguido pelo grupo dos tangores (40,6%), pelas clementinas (34,3%) e mexericas (15,6%). Porém, o grupo das tangerinas comuns, apesar de conter grande quantidade de acessos, foi o que apresentou menor número de marcadores específicos (3,12%), além do grupo das satsumas, que não apresentou nenhum marcador específico. Por este motivo, não houve diferenciação genética nesta variedade. As satsumas apresentam características interessantes como grande facilidade de descasque e pouca ou ausência de sementes (BORGES, 2002), pois apresentam flores com poléns não férteis, contribuindo para o surgimento de frutos sem sementes (HODGSON, 1967; SAUNT, 1992; DAVIES e ALBRIGO, 1994).

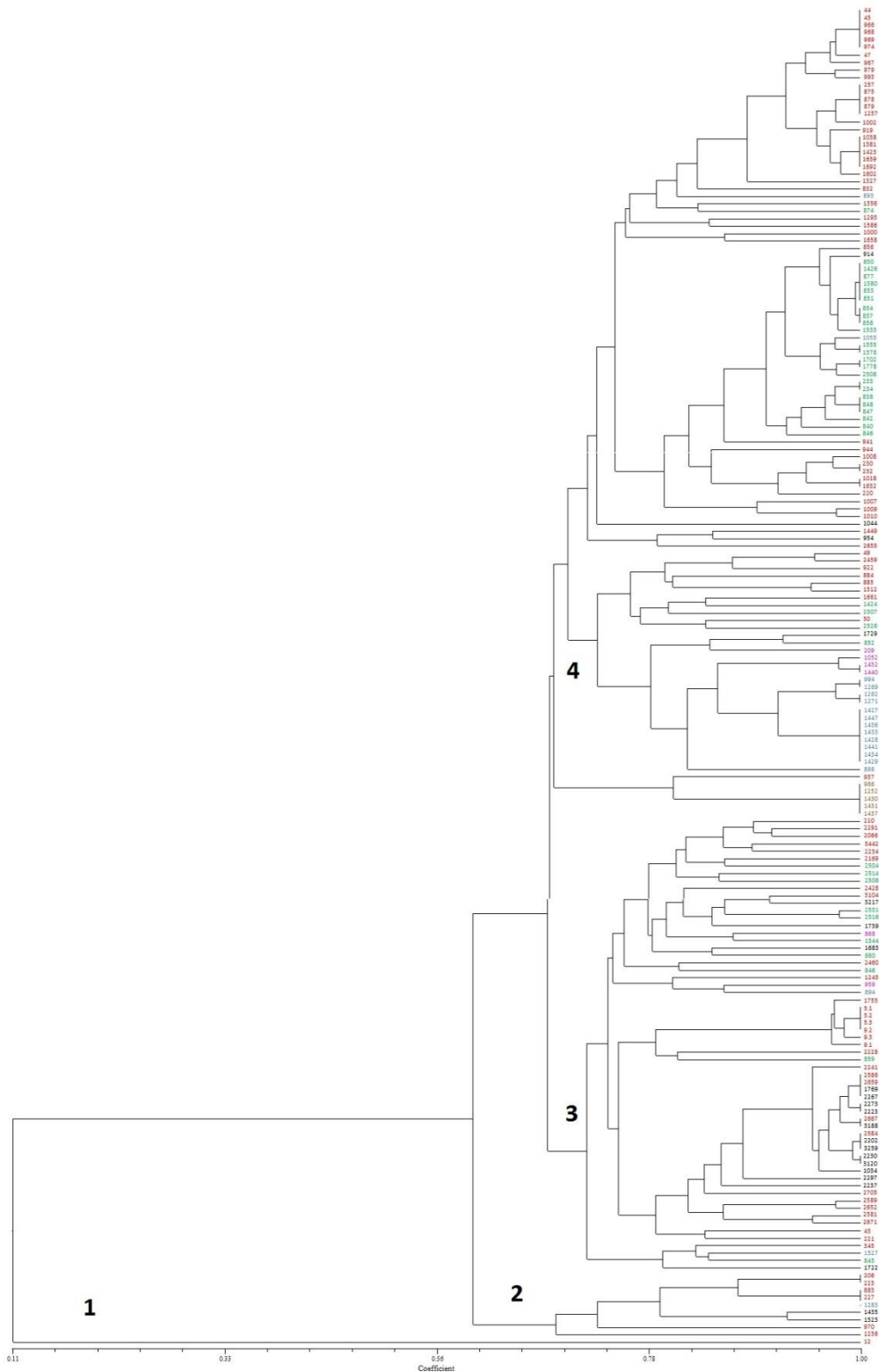


**Figura 3.** Amplificação do primer CCSM-EST – 89 na população total de tangerinas. Representação em cores para a diferenciação dos grupos. AMARELO – tangerinas comuns; PRETO – mexericas; AZUL - tangores; ROSA – tangelos; BRANCO – clementinas; VEMELHO – satsumas. Fremont 9-1 a 9-3 ao final como controle.

**Tabela 3.** Variedades e Locos polimórficos entre os grupos de tangerinas e híbridos. TM=tangor Murcott, LP=laranja Pera, e MC=mexerica Rio.

Variedades	ID locos	
	CCSM (Genômicos)	CCSM-ESTs
<b>GRUPO TANGELOS</b>		
Lee IAC 441	4	128, 143, 161, 191
Page IAC 1525	18	50, 68, 89, 128, 143, 159, 164
Osceola IAC 503	24	6, 64, 68, 89, 161, 191
Ellendale early IAC 1314	-	6, 50
Murcott Precoce IAC 1578	18	50, 143
Tankan IAC 502	18, 29	66, 143
Híbrido Ortanique SPA 16	-	6, 169
Ortanique IAC 554	-	6, 169
Thomas IAC 519	18	-
Dekopon IAC 2009	40	145
Dweet IAC 1721	29	50
Clementina x Murcott	-	128
TM x LP 246	-	6, 161, 169
TM x LP 253	-	143
TM x LP 281	-	159
<b>GRUPO CLEMENTINAS</b>		
Fortune	18	-
Clementina Caçula 3 IAC 1330	29	64
Clementina Caçula 4 IAC 1318	18, 24	50, 64, 128, 145
Clementina x Honey IAC 1388	-	60, 161
Clementina 16MPD21 - Est 12932	-	66
Clementina x Mexerica IAC 934	-	64, 66, 128
Clementina de Nules VCR	-	66
Clementina Caffin SRA 385 (B)	-	60, 161
Clemengold	-	6, 60, 145, 209
<b>GRUPO MEXERICAS</b>		
Corsega IAC 586	29	-
Imperial IAC 1331	29	145
Mexerica x Clementina IAC 1545	-	11, 169
117477 IAC 540	29, 40	-
Pará IAC 193	-	145
MC x LP 140	-	169
MC x LP 386	-	169
<b>TANGERINAS COMUNS</b>		
Junqueira IAC 721	40	-
Red Skin SRA 428	40	-
1/43 – EECB 30	40	-
1/28 – EECB 43	40	-
Rodeking SRA 431 – EECB 221	40	-

A partir da matriz gerada pelos índices de similaridade calculados dois a dois, foi construído o agrupamento pelo método UPGMA (Figura 4), fundamental para reunir os acessos, a partir de critérios de homogeneidade ou heterogeneidade, em grupos (ARRIEL, 2004). Diante disso, foi possível a formação de quatro grandes grupos para as tangerinas e seus híbridos.



**Figura 4.** Dendrograma da relação entre aos 180 acessos, baseado na análise de agrupamento UPGMA de matriz de similaridade dos 35 locos microssatélites, gerados pelo software NTSYS (Rohlf, 1993). VERMELHO – tangerinas comuns; VERDE – mexericas; PRETO - tangores; ROSA – tangelos; AZUL – clementinas; MARROM – satsumas

No grupo 4, houve predominância de tangerinas comuns, apresentando diferenças genéticas para cada acesso, como observado entre as tangerinas Oneco IAC 173 (acessos 47), Ponkan IAC 226 (967) e Sylhat IAC 512 (1002). No entanto, observou-se a formação de subgrupos com 100% de similaridade entre si, com base nos locos avaliados. Por exemplo, subgrupo 1 composto pelas tangerinas Ponkan Tuxpan (44), Swatow IAC 171 (45), os clones de Ponkan IAC 224, IAC 222, IAC 225 (966, 968, 969) e Ponkan Casca Verde IAC 722 (974); subgrupo 2 composto pelas variedades Ponkan Chiaradia (257), África do Sul IAC 557, Batangas IAC 504 e IAC 505 (878,879), Lebom SRA 425 (1257) e subgrupo 3, com as variedades Múscia IAC 607 (1038), Ponkan Nanini IAC (1381), Span precoce IAC (1423), Ponkan IAC 172 (IAC 1639) e De Wildt IAC 545 (1692). De fato, todos estes acessos pertencem ao grupo da Ponkan, com características fenotípicas muito similares entre si, podendo ser clones originados de pequenas mutações, só detectáveis com a avaliação de um número maior de marcadores ou marcadores mais específicos, ou ainda podem ser o mesmo cultivar introduzido com denominação diferente no banco de germoplasma. Ainda dentro deste grupo, observam-se dois subgrupos compostos por mexericas Avana IAC 594 (838), Irradiação IAC 1631, Israel IAC 599 e Siracusa IAC 590 (854), Tardia IAC 591 (857), Tardia IAC 532 (858). Além disso, outras mexericas tiveram grandes similaridades com as tangerinas comuns, como por exemplo Pará IAC 193 (1424), evidenciando a ideia de Machado et. al. (1996), na qual relatam que é possível que este grupo de mexericas tenham sido constituídos a partir híbridos verdadeiros de tangerinas comuns, ou seja, os arranjos genéticos se mostram compatíveis e semelhantes. Ainda, vale ressaltar que embora as mexericas tenham uma certa resistência a mancha marrom de alternária, o acesso 1424, se mostra suscetível a doença, com baixo nível sintomático quando avaliadas as brotações novas (BASTIANEL et al., 2014).

Três tangores estudados também foram agrupados no grupo 4, Murcott precoce IAC 1578 (954), Dweet IAC 1721 (1729) e Tankan IAC 502 (1044).

A grande maioria das clementinas (acessos 1427, 1447, 1436, 1433, 1428, 1441, 1434, 1429) apresentou 100% de similaridade, entretanto o acesso 898 por ser um cruzamento de Clementina e Honey, esta última conhecida como Murcott nos Estados Unidos (SAUNT, 1990), apresentou um distanciamento das variedades anteriores, com similaridade de 0,81.

Dentre os acessos de tangelos (209, 868, 959, 1052, 1432), a maioria apresentou relevantes diferenças genéticas e o grupo foi o que apresentou maior número de marcadores específicos, embora a maioria seja advinda do cruzamento de Clementina e tangelo Orlando, os quais são originados na Florida, no período de 50 a 70 (HODGSON, 1967; SAUNT, 1992).

O terceiro grupo é representado por todas as variedades analisadas, sendo ilustrados três subgrupos. No primeiro, os acessos TM x LP 264 (2169), MC x LP 355 apresentam similaridade de 0,85. Além disso, o híbrido TMLP 258 (3104) e TM x LP 246 (3217) apresentam alta similaridade entre si (0,90). Apesar desses materiais serem classificados em diferentes grupos hortícolas, devido às características fenotípicas distintas, todos são resultados de cruzamento tendo a laranja Pera como um parental comum, o que explica a semelhança genética entre os acessos comparados.

Quanto ao segundo subgrupo, representado pelas Fremonts (5.1, 5.2, 5.3, 9.2) apresentam 100% similares entre si, e alta similaridade entre os demais acessos 9.1 e 9.3 e a tangerina Fremont IAC 543 (1755). Estes acessos são originários de mutação induzida por radiação gama (R.R. Latado, dados não publicados) em tangerina Fremont e, portanto, era esperada uma alta similaridade entre os mesmos. No terceiro subgrupo, o tangor Murcott (acesso 1769) e seus híbridos (acessos 2267, 2586 e 2659) foram 100% similares. O tangor Murcott é uma variedade produzida em grande quantidade no Brasil e nos Estados Unidos, sendo a segunda mais cultivada no estado de São Paulo (PIO et al., 2005).

O quarto subgrupo foi formado pelos acessos: 345 (Ellendale EECB 345) 1527 (Clemengold), 845 (Imperial IAC 1331) e 722 (tangor Dekopon IAC 2009), pertencentes a diferentes grupos hortícolas, tangerina comum, clementina, mexerica e tangor, respectivamente.

Já no grupo 2, com a presença de tangerinas comuns, clementina, e tangores, o acesso 1236 (tangerina Fewtrll SRA 418) apresentou o menor índice de similaridade neste grupo quando comparado aos acessos de tangerinas (206, 223) e (883, 227). Ainda assim, estas tangerinas apresentaram similaridades (0,79) com os acessos de tangores (1435 e 1523). O híbrido de Satsuma com Natal EECB 12 (grupo 1), apresentou a menor similaridade (0,11), com os demais grupos.

## **CONCLUSÃO**

Diante da avaliação dos 180 indivíduos com 25 pares microssatélites, foi possível verificar a variabilidade genética na maioria dos acessos. Entretanto, a quantidade de marcadores não foi suficiente para discriminar todos os indivíduos. Assim, apenas 36 acessos apresentaram marcadores específicos, sendo que os pares de primers CCSM-EST-6, CCSM-EST-169, CCSM 29 e 40, se mostraram mais eficientes, podendo ser utilizado para diferenciar a maioria dos acessos. Assim, as variedades com menores números de representantes, apresentaram valores relevantes de polimorfismo, como o caso dos tangelos com 43,7%, seguidos pelos tangores 40,6%, clementinas 34,3% e mexericas 15,6%. Entretanto, o grupo das satsumas, com apenas cinco acessos, não apresentou diferença com os marcadores analisados. Além disso, o grupo das tangerinas comuns, apesar do grande número de acessos, foi o que apresentou menor número de marcadores específicos (3,12%).

## Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPESP pelo auxílio financeiro (processos 2011/21559-0 e 2011/18605-0). A.L.D é bolsista Fapesp (processo 2015/23839-1).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARRIEL, E. F.; PAULA, R. C.; BAKKE, O. A.; ARRIEL, N. H. C.. Divergência genética em *Cnidocolus phyllacanthus* (Mart.) Pax. et K. Hoffm., Revista de Oleaginosas e Fibras, v. 8, n. 2/3, p. 813-822, 2004.
- BASTIANEL, M.; SIMONETTI, L.M.; SCHINOR, E.H.; GIORGI NETO, R.O.; DE NEGRI, J; D.; GOMES, D.N.; AZEVEDO, F.A. Avaliação do banco de germoplasma de mexericas com relação às características físico-químicas e suscetibilidade à mancha marrom de alternária. Bragantia, v. 73, p. 23-31, 2014.
- BORGES, R. S. Estudo comparativo entre frutos de tangelo 'Nova' e tangor 'Ortanique' com o tangor 'Murcott' na região de Capão Bonito, Estado de São Paulo. Campinas, 2002. xii, 67 f.: il.
- CRISTOFANI-YALY, M.; NOVELLI, V.M.; BASTIANEL, M.; MACHADO, M.A. Transferability and level of heterozygosity of microsatellites markers in *Citrus* species. Plant Molecular Biology Reporter, 29(2): p.418-423, 2011.
- DAVIES, F.S., ALBRIGO, L.C. Citrus. Crop Production Science in Horticulture - 2. (Cab International Inglaterra). p.254, 1994.
- FAOSTAT. Top production: Tangerines, mandarins, clementines, satsumas 2016. Disponível em: <<http://faostat.fao.org> >. Acesso em setembro 2017.
- FEDERICI, C.T.; FANG, D.Q.; SCORA, R.W.; ROOSE, M.L. Phylogenetic relationships within the genus *Citrus*(Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. Theoretical and Applied Genetics, v.96, p.812-822, 1998.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Brasília, Embrapa, Cenargen, p.220, 1995.
- HERRERO, R.; ASINS, M.J.; CARBONELL, A.E.; NAVARRO, L. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. I. Intraspecies and intragenus genetic variability. Theoretical and Applied Genetics, v.92, p.599-609, 1996a.



- HERRERO, R.; ASINS, M.J.; PINA, J.A.; CARBONELL, A.E.; NAVARRO, L. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. II. Genetic relationships among genera and species. *Theoretical and Applied Genetics*, v.93, p.1327-1334, 1996b.
- HODGSON, R.W. Horticultural varieties of citrus. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (ed). *The citrus industry*. Berkeley: University of California, 1967. v.1, p.431-459
- IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2014. Produção Agrícola Municipal. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam>>. Acesso em maio de 2016.
- JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles*, 44: 223-270. 1908.
- KOEHLER-SANTOS P, DORNELLES A.L, FREITAS L.B. Characterization of mandarin citrus germplasm from southern Brazil by morphological and molecular analyses. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38(7): 797-806, 2003.
- LITT, M., LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, vol. 44, p. 398-401, 1989.
- MACHADO, M.A., H.D. COLLETA FILHO, M.L.N.P. TARGON, J. POMPEU JR. Genetic relationship of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. *Euphytica*, 92: 321-326, 1996.
- MARSHALL T.C, SLATE J, KRUIK L.E.B, PEMBERTON J.M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7:639–655, 1998.
- MURRAY, M.G.; W.F. THOMPSON. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Research*, Oxford, v.8, p.4321-4325, 1980.
- NOVELLI, V.M.; CRISTOFANI, M.; SOUZA, A.A.; MACHADO, M.A. Development and characterization of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Genetics and Molecular Biology*, 29: p.90-96, 2006.
- PALMIERI D.A.; NOVELLI, V.M.; BASTIANEL, M.; CRISTOFANI-YALY, M.; ASTÚA-MONGE, G.; CARLOS, E.F.; OLIVEIRA, A.C.; MACHADO, M.A. Frequency and

- distribution of microsatellites from ESTs of citrus. *CitrusEST*. Genetics and Molecular Biology, v.30, p.1009-1018, 2007.
- PIO, R.M.; FIGUEIREDO, J.O.; STUCHI, E.S.; CARDOSO, S.A.B. Variedades Copa. In: Mattos, Jr. D, De Negri, J.D., Pio R.M & Pompeu Jr. J. (Ed.). Citros. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, p. 37-60, 2005.
- ROHLF, F.J. NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.0 User Guide. Applied Biostatistics Inc., Setauket, New York. 1998, 37 pp.
- SAUNT, J. Variedades de cítricos del mundo: guia ilustrado. Valência: Sinclair Internacional, 1992. 128p.
- SAUNT, J. Citrus varieties of the world: an illustrated guide. Norwick: Sinclair International, 1990. 128p.
- TARGON, M. L. P. N; MACHADO, M.A., COLETTA FILHO, H. D., CRISTOFANI, M. Genetic polymorphism of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) varieties evaluated by random amplified polymorphic DNA. Acta Horticulturae 535: 51-53, 2000.
- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Research, 17(16), 6463-6471, 1989.
- TESTOLIN, R., MARRAZZO, T., CIPRIANI, G., QUARTA, R., VERDE, I., DETTORI, M. T., SANSVINI, S. Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. Genome, 43(3), 512-520, 2000
- WEBER, J. L., MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. American Journal of Human Genetics, 44(3), p.388, 1989.

1 **ANEXO 1.** Descrição e parâmetros de variabilidade de 25 locos microssatélites em 180 acessos de tangerinas e híbridos.

SSR	Repetição	Sequências do primer		Nº de alelos	Tamanho estimado (bp)	Heterozigosidade		PIC
		Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')			Observada (Ho)	Esperada (Hexp)	
CCSM4	(AG) <sub>n</sub>	ttctcctcatctcgactcc	ccgatcttacgacgtatcaa	2	50 a 150	0.269	0.234	0.206
CCSM18	(AG) <sub>n</sub>	aacagttgatgaagaggaag	gtgattgctggtgtcgtt	2	200 a 300	0.077	0.283	0.242
CCSM24	(GA) <sub>26</sub>	attgacagaagtctg	ccacttaatcactctcct	2	< 150	0.365	0.461	0.354
CCSM29	(TGA) <sub>15</sub> (TTA) <sub>9</sub>	cggtattgtgtccga	cacacttcacaatgttgac	2	100 a 200	0.241	0.310	0.261
CCSM40	(GCAACA) <sub>10</sub>	acaagagtcgcaacaatc	gacaacagtggaataacc	2	100 a 200	0.046	0.098	0.093
CCSM-EST-6	(AG) <sub>10</sub>	cgccatttgcttaggcttt	gaacctccagagttccctc	2	600 a 700	0.277	0.412	0.327
CCSM-EST-11	(TC) <sub>12</sub>	ttcatggcagcttgagtttc	agtcattggaagcctaaatgg	2	200 a 300	0.185	0.169	0.154
CCSM-EST-50	(ATAG) <sub>5</sub>	gttttgctgctttgtgtcg	caaaccttctaaagcccaa	3	100 a 200	0.190	0.498	0.411
CCSM-EST-60	(ATC) <sub>8</sub>	cttgaggaaacagcagagg	cgaattggaatcaagggcat	2	100 a 200	0.457	0.360	0.294
CCSM-EST-64	(GAA) <sub>10</sub> (n) <sub>21</sub> (GAA) <sub>7</sub>	atctgcagggacaaaaccag	tcatctcactcactcggca	2	200 a 300	0.347	0.287	0.245
CCSM-EST-66	(AT) <sub>16</sub>	atggcttccacagcatctcc	tgcatatcctgaagactttat	2	200 a 300	0.195	0.176	0.160
CCSM-EST-68	(GAA) <sub>8</sub>	tgccgttgagtttgattga	gactgtgttctgatgccga	2	< 150	0.000	0.475	0.361
CCSM-EST-71	(CAG) <sub>6</sub>	atgttcacatcagcagcag	ccccaaaaataaagctgcaa	2	300 a 500	0.994	0.501	0.375
CCSM-EST-89	(ATA) <sub>7</sub>	acttatctgcacccgacga	gaggtctcgaagtcacggag	2	200 a 400	0.309	0.398	0.318
CCSM-EST-128	(CAA) <sub>7</sub>	cagagcagaacgcaaaatca	ccactcgtcctcgtccttag	2	400 a 500	0.259	0.226	0.200
CCSM-EST-143	(CTCCGT) <sub>4</sub>	tcaagcaatctccagtgcag	gaaagcctgggagcttctt	2	< 100	0.233	0.433	0.339
CCSM-EST-144	(GTCACG) <sub>4</sub>	ttgtgagacacatggcgaat	cttcaagaatcgtgtgctcc	2	< 100	0.029	0.029	0.028
CCSM-EST-145	(ACCCTA) <sub>4</sub>	ctcgatcatcagccatcaga	caggatcggaatttgagga	2	80 a 100	0.246	0.216	0.192
CCSM-EST-159	(TTCTTG) <sub>4</sub>	tgggtcattgatgtgtgtct	cacagatgcagaaggggatt	2	< 100	0.663	0.444	0.345
CCSM-EST-161	(TTTTTA) <sub>4</sub>	gaggaggacgaatgaaagca	gaacagaagagctggccaat	2	200 a 300	0.102	0.097	0.092
CCSM-EST-164	(TC) <sub>11</sub>	gagaagcccgtctgcactta	acgagagcggaaacaagaga	2	< 150	0.693	0.478	0.363
CCSM-EST-165	(AG) <sub>15</sub> CCAT(GGC) <sub>7</sub>	ctctgatattcccaaagccg	aagcacgttatcgggatctg	2	200 a 300	0.273	0.236	0.208
CCSM-EST-169	(ATGATC) <sub>4</sub>	acgtcgtctagatcctgtgct	catacaccacacaccgtcca	2	200 a 300	0.244	0.215	0.191
CCSM-EST-175	(TTC) <sub>7</sub>	cctcctcctcctcctcagat	gggaattggaacagcgagta	2	250 a 350	0.000	0.011	0.011
CCSM-EST-191	(CAG) <sub>9</sub>	gaggagtgctatgcaaga	tcgagattcaattgctgcac	3	100 a 200	0.388	0.468	0.402
CCSM-EST-209	(AAT) <sub>12</sub>	gaagctcgccataatcaaa	gacgagaggtccagaaatcg	2	200 a 300	0.301	0.494	0.371
CCSM-EST-234	(GGC) <sub>7</sub>	aatcgtggtggaataacttc	ttcaatatcgcccaaaactc	3	200 a 300	0.286	0.359	0.305

