

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

Rômulo Maciel Moraes Filho^{1,*}, Horace José Jimenez², Angélica Virgínia Valois Montarroyos², Rosimar dos Santos Musser², Mairon Moura da Silva², Edson Ferreira Silva² & Luíza Suely Semen Martins²

RESUMO

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

Termos para indexação: estudo de diversidade, *fingerprinting*, laranja.

SUMMARY

Genetic variability in genotypes of the germplasm collection of citrus from the Instituto Agrônomo of Pernambuco Brejão-PE, by using ISSR molecular markers

Brazil is the largest orange producer and accounts for 50% of the world production. In 2009 Brazil produced over 18 million tons, in a planted area of 990,000 hectares. Despite recent advances in the national citrus industry, there is little diversification of cultivars and varieties, which include basically Pera, Natal, Valencia and Hamlin. In the Northeast, the predominance of Pera varieties is even more intense and represents most of the production. Garanhuns/PE and its

¹ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Departamento de Genética - Bloco B Monte Alegre. Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900, Ribeirão Preto-SP

* Autor para correspondência - E-mail: romulommfilho@yahoo.com.br

² Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

neighbor cities (Agreste Meridional) show potential for citrus production expansion, mainly due to the altitude. The objective of this work was to access the genetic variability among citrus plants that were introduced and recommended to the Northeast region by Embrapa Mandioca e Fruticultura, by using by ISSR markers. The ISSR-PCR method allowed the visualization of 167 loci with the use of 15 primers. A hundred sixty-two (97%) loci exhibited polymorphism and five (3%) were monomorphic. According to the analysis of the dendrogram and the genetic similarity matrix, it was possible to group the 15 varieties of sweet orange in a single group with 27% diversity among them and 40% over the five other genotypes, consisting of three lemons, a tangerine and a grapefruit. The high degree of polymorphism observed between the group of oranges and the other five accessions suggests a large genetic variability within the genus, which may be particularly useful in breeding programs aiming to develop new rootstocks adapted to many different environmental conditions as well as the identification of promising varieties in terms of production.

Index terms: genetic diversity, fingerprinting, orange.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de laranjas, em 2009 produziu mais de 18 milhões de toneladas e a produção estimada para 2010 foi acima de 19 milhões de toneladas, com uma área plantada de pouco mais de 984 mil hectares (IBGE, 2010). Apesar dos avanços da citricultura nacional, existe pouca diversidade de variedades em cultivo sendo mais grave a situação na região Nordeste onde as laranjas do tipo Pêra são responsáveis pela grande maioria da produção (95%), não havendo também muito investimento em variedades apropriados para mesa devido ao fortalecimento da indústria de suco (Passos et al., 2004).

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

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

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

Marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) são marcadores baseados em microssatélites capazes de diferenciar indivíduos altamente aparentados (Borém & Caixeta, 2009). O ISSR-PCR utiliza um único *primer* com em torno de 16 e 25 pares de base. Este *primer* consiste em mono, di, tri, tetra ou penta nucleotídeos repetidos *in tandem* e com dois a quatro nucleotídeos arbitrários degenerados na extremidade 3' ou 5' (Shahsavari et al., 2007). Por estas características, os marcadores ISSR combinam vantagens de metodologias como AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e SSR (Simple Sequence Repeat) com a universalidade dos marcadores RAPD. Como desvantagem, estes marcadores compartilham a característica de dominância dos marcadores RAPD e AFLP (Shahsavari et al., 2007; Borém & Caixeta, 2009). Em citros marcadores ISSR têm sido usados para caracterização de germoplasma (Shahsavari et al., 2007) e análise de diversidade (Kumar et al., 2009).

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

MATERIAL E MÉTODOS

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

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

Condições da PCR: As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 25 µl, contendo 30ng de DNA, 75 mM Tris-HCl (pH 8,8), 20 mM (NH₄)₂SO₄, 50-65 nM MgCl₂, 150 µM de cada um dos desoxinucleotídios (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 1 µM

de *primer* (Tabela 2) e uma unidade da enzima *Taq* DNA polimerase. As amplificações foram feitas seguindo as seguintes programações: desnaturação inicial a 95° por 15 minutos, seguidos de 30 a 35 ciclos de desnaturação a 94° por 30 segundos, temperatura de anelamento específica de cada *primer* por 45 segundos e extensão a 72° por 2 minutos, e extensão final a 72° por 7 minutos ao fim dos ciclos de amplificação. Em seguida, os produtos de PCR foram separados em gel de agarose a 2% corados com *syber gold* e visualizados em transluminador UV. A Tabela 2 contém a relação de *primers*, temperatura de anelamento e número de ciclos de amplificação.

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia ISSR permitiu a visualização de um total de 167 locos com a utilização de 15 *primers* (Tabela 3). Destes 162 (97%) exibiram polimorfismo e 5 (3%) foram monomórficos. Foram observados uma média de 11,1 fragmentos por *primer* variando entre 5 (#862) a 17 (#813) (Figura 1). Estes resultados se aproximam bastante dos obtidos por Kumar et al. (2009) na caracterização de espécies do gênero *Citrus* utilizando 15 *primers* ISSR, os quais produziram um total de 204 locos, sendo 179 polimórficos com uma média de 12 locos por *primer* e 87% de polimorfismo. Shamsavar et al. (2007) utilizaram 6 *primers* ISSR para análise de diversidade em *Citrus* e observaram 234 locos sendo destes 209 polimórficos (90%), sendo que o número de loci por *primer* variou de 27 a 52, com média de 39 locos/*primer*. Estes valores são muito superiores em relação tanto aos resultados obtidos no presente estudo, quanto dos obtidos por Kumar et al. (2009), o que pode ser explicado tanto pela diferença dos genótipos avaliados, como pelo sistema de eletroforese utilizado, visto que no estudo de Shamsavar et al. (2007) os fragmentos amplificados foram separados em géis de poliacrilamida que apresentam resolução superior aos de agarose.

Tabela 1. Características morfoagronômicas de 20 acessos da coleção de Germoplasma de *Citrus* do IPA - Brejão/PE.

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

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

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

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

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

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

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

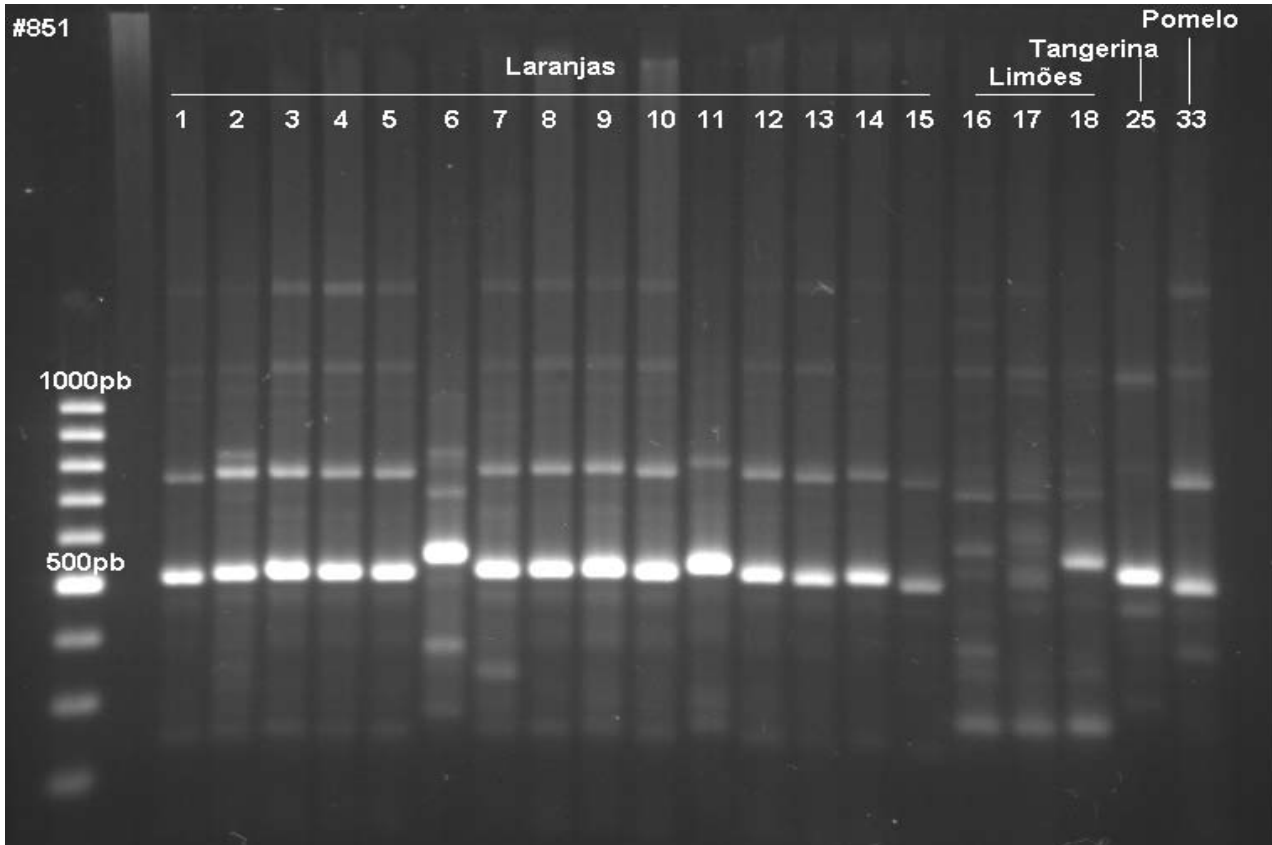


Figura 1. Padrão de bandas PCR-ISSR para os 20 genótipos do gênero *Citrus*, utilizando-se o *primer* #851.

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

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

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

De acordo com Herrero et al. (1996) e Bretó et al. (2001), as laranjas doces têm uma base genética muito estreita, fato comprovado por Novelli et al. (2006), que avaliando a utilização de marcadores SSRs na caracterização de laranja doce, sugerem que isso ocorre devido as variedades desse grupo de *Citrus* terem surgidos por mutação gênica. Vários artigos relatam as dificuldades na obtenção de marcadores para a caracterização de laranjas doces. Orford et al. (1995), utilizando marcadores minisatellite, e Novelli et al. (2000), utilizando isoenzimas e marcadores RAPD, não identificaram diferenças entre variedades de laranjas doces.

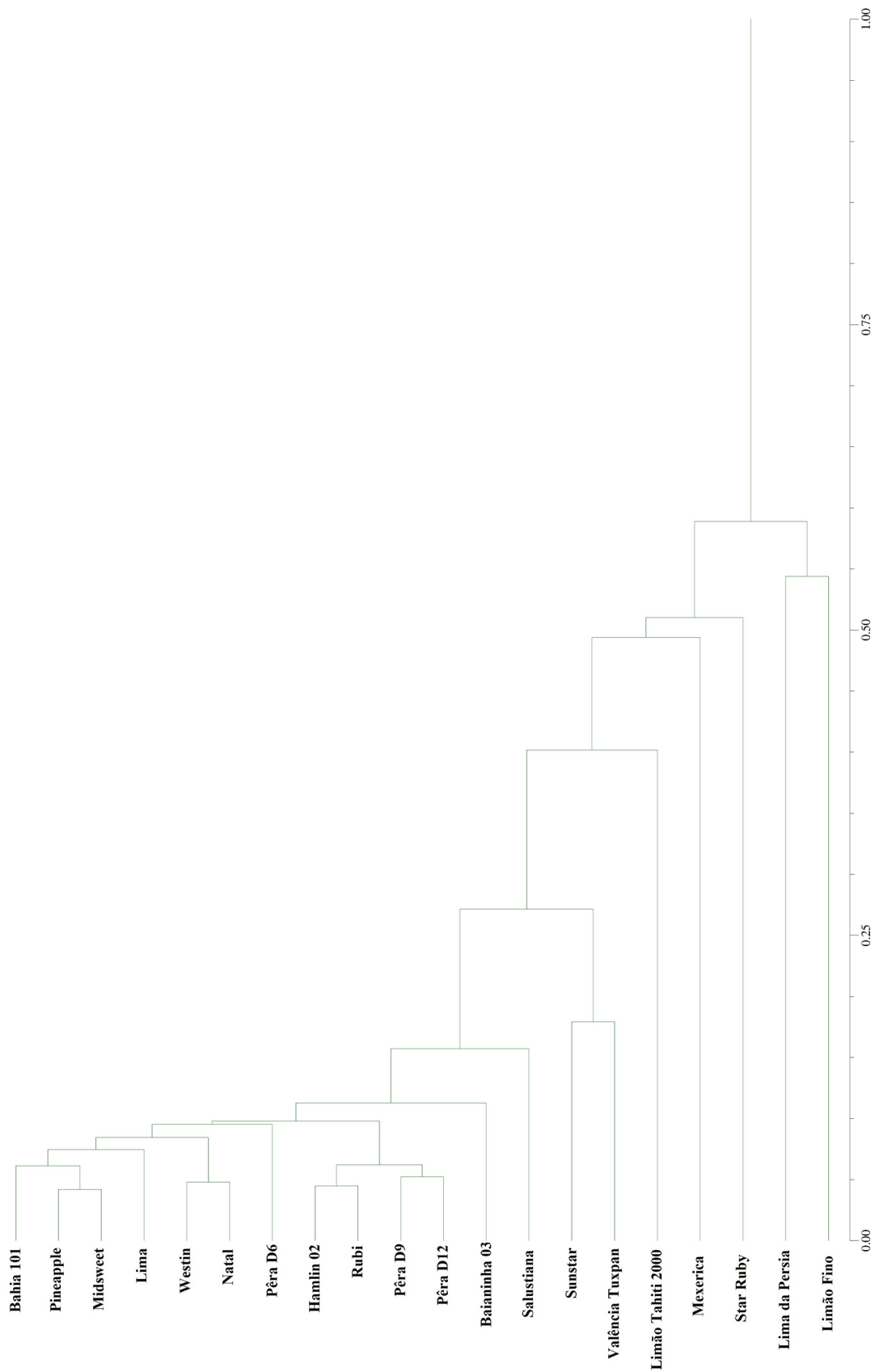


Figura 2. Agrupamento de 20 variedades do gênero *Citrus* da coleção da Estação Experimental de Brejão/PE, pertencente ao Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA), obtida por meio do programa NTSYS – PC, usando a UPGMA.

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

Acesso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	25	33
1 Bahia 101	0,00																			
2 Baianinha 03	0,09	0,00																		
3 Hamlin 02	0,14	0,09	0,00																	
4 Lima	0,07	0,09	0,09	0,00																
5 Rubi	0,11	0,12	0,04	0,07	0,00															
6 Sunstar	0,29	0,26	0,33	0,34	0,36	0,00														
7 Pineapple	0,08	0,11	0,10	0,08	0,06	0,33	0,00													
8 Pêra D6	0,11	0,14	0,08	0,12	0,06	0,38	0,06	0,00												
9 Pêra D9	0,09	0,15	0,14	0,13	0,12	0,37	0,06	0,07	0,00											
10 Pêra D12	0,12	0,15	0,07	0,08	0,05	0,41	0,07	0,05	0,12	0,00										
11 Valência Tuxplan	0,13	0,23	0,23	0,21	0,20	0,18	0,19	0,19	0,17	0,22	0,00									
12 Westin	0,11	0,12	0,15	0,10	0,12	0,38	0,08	0,13	0,14	0,10	0,18	0,00								
13 Midsweet	0,05	0,09	0,12	0,07	0,10	0,33	0,04	0,08	0,07	0,08	0,18	0,09	0,00							
14 Natal	0,09	0,10	0,08	0,05	0,06	0,36	0,08	0,07	0,05	0,06	0,19	0,05	0,07	0,00						
15 Salustiana	0,15	0,19	0,22	0,18	0,19	0,39	0,11	0,15	0,19	0,17	0,21	0,16	0,13	0,14	0,00					
16 Lima da Persia	0,51	0,51	0,52	0,52	0,50	0,65	0,52	0,53	0,13	0,58	0,66	0,52	0,55	0,49	0,55	0,00				
17 Limão Tahiti 2000	0,36	0,42	0,43	0,41	0,37	0,54	0,36	0,41	0,08	0,44	0,38	0,35	0,40	0,35	0,40	0,49	0,00			
18 Limão Fino	0,58	0,58	0,60	0,62	0,62	0,67	0,58	0,66	0,10	0,66	0,69	0,59	0,64	0,55	0,64	0,54	0,56	0,00		
25 Mexerica	0,44	0,41	0,44	0,43	0,44	0,68	0,49	0,53	0,57	0,52	0,58	0,47	0,46	0,48	0,46	0,60	0,54	0,49	0,00	
33 Star Ruby	0,50	0,55	0,54	0,45	0,49	0,72	0,49	0,49	0,40	0,46	0,55	0,49	0,44	0,41	0,44	0,66	0,60	0,84	0,58	0,00

Fang & Roose (1997), utilizando marcadores ISSR, detectaram baixo polimorfismo. Ainda de acordo com os autores citados, a baixa diversidade intraespecífica de algumas espécies do gênero *Citrus* é considerada como o resultado de muitos fatores, destacando-se mutação e propagação vegetativa.

Considerando-se a dissimilaridade entre o pomelo e os demais genótipos, observou-se uma amplitude de 0,41 a 0,84 (Tabela 4), tornando-o assim um promissor fornecedor de alelos novos para as culturas de laranja, limão, lima e tangerina. Como boa parte do trópico semi-árido reúne condições climáticas favoráveis ao cultivo do pomeleiro, essa cultura poderá deixar de ser explorada em pequenos pomares e entrar na exploração em escala comercial, a exemplo do estado de São Paulo, que responde, praticamente, pela totalidade da produção comercial brasileira (Stuchi et al., 2003).

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

CONCLUSÕES

O polimorfismo gerado com os marcadores moleculares ISSR mostrou uma baixa variabilidade genética entre as 15 variedades de laranjas doces estudadas.

Os Marcadores ISSR foram eficientes para caracterizar variedades do gênero *Citrus* e diferenciar genótipos de laranjas doces entre si e entre genótipos de limas, tangerinas e pomelos.

Considerando-se a dissimilaridade entre o pomelo e os demais genótipos, observou-se uma variação de 0,41 a 0,84 tornando-o assim um promissor fornecedor de alelos novos para as culturas de laranja, limão, lima e tangerina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Borém A & Caixeta ET (2009) Marcadores moleculares. 2ª. Ed. UFV – Viçosa. 532p.

Bretó MP, Ruiz C, Pina JA & Asíns MJ (2001) The diversification of *Citrus clementina* Hort. ex Tan., a vegetatively propagated crop species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 21:285-93.

Coelho Y (2002) Frutas cítricas importadas no mercado de Salvador, Bahia. *Bahia Agrícola*, Salvador, 5(2):29-33.

Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (2003) Sistema de Produção de Citros para o Nordeste, versão eletrônica, Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Citros/CitrosNordeste/variedades.htm>> acesso em 5 de Maio de 2011.

Fang DQ & Roose ML (1997) Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics* 95:408-17.

Food and Agriculture Organization (FAO) Orange Production, 2007 Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>> acesso em 8 de Maio de 2010.

Giacometti DC (1991) Taxonomia das espécies cultivadas de citros baseada em filogenética. In: Rodriguez O, Viégas F, Pompeu Junior J, Amaro AA. (eds.). *Citricultura Brasileira*. 2. ed. Campinas, SP: Fundação Cargill, 1:99-115.

Herrero R, Asíns MJ, Carbonell EA & Navarro L (1996) Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. I. Intraspecies and intragenus genetic variability. *Theoretical and Applied Genetics* 92:599-609.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Disponível em: <www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/default.asp?z=t&o=25&i=P> acesso em 5 de abril de 2010.

Kumar LS, Jena SN & Nair KN (2009) ISSR polymorphism in Indian wild orange (*Citrus indica* Tanaka, Rutaceae) and related wild species in North-east India. *Scientia Horticulturae* 123:350–359.

Mattos Junior D, Negri JD, Figueiredo JO & Pompeu Junior J (2005) CITROS: principais informações e recomendações de cultivo. Texto preparado para a versão eletrônica do Boletim Técnico 200 (IAC). Disponível em <<http://www.iac.sp.gov.br/Tecnologias/Citros/Citros.htm>> acesso em 5 de abril de 2011.

Murray MG & Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, Londres, 8(19):4321-4325.

Nei M & Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington. 76:5269–5273.

Novelli VM, Machado MA & Lopes CR (2000) Isoenzymatic polymorphism in *Citrus* spp and *P. trifoliata* (L.) Raf. (Rutaceae). *Genetics and Molecular Biology* 23:163-8.

Novelli VM, Cristofani M, Souza AA, Machado MA (2006) Development and characterization of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Genetics and Molecular Biology* 29 (1): 90-96.

Orford SJ, Steele Scott N & Timmis JN (1995) A hypervariable middle repetitive DNA sequence from citrus. *Theoretical and Applied Genetics* 91:1248-52.

Passos OS, Almeida CO & Peixoto LS (2005) Potencialidade da Chapada Diamantina para citricultura. *Bahia Agrícola*. 7(1).

Passos OS et al. (2004) Certificação e Diversificação da Citricultura do Nordeste Brasileiro. Comunicado técnico 101. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA.

Shahsavari AR, Izadpanah K, Tafazoli E & Sayed Tabatabaei BE (2007) Characterization of *Citrus* germplasm including unknown variants by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Scientia Horticulturae* 112:310–314.

Stuchi ES, Donadio LC & Sempionato OR (2003) Evaluation of 10 rootstocks for ‘Marsh’ seedless grapefruit in São Paulo, Brazil. In: *International Society of Citriculture Congress, 9, 2003*. Orlando. *Proceedings*. 1:586

Wünsch A & Hormaza JI (2007) Characterization of variability and genetic similarity of European pear using microsatellite loci developed in apple. *Scientia Horticulturae*, 113:37-43.

Recebido: 30/08/2010 – Aceito: 17/05/2011
(RL 373-10)