

Diversidade genética e *Fingerprint* molecular de porta-enxertos de citros via marcadores IRAP



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Mandioca e Fruticultura
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
142**

**Diversidade genética e *Fingerprint* molecular de
porta-enxertos de citros via marcadores IRAP**

*Luiz Carlos de Souza Junior
Laiane de Cruz Pena
Andresa Priscila de Souza Ramos
Saulo Alves Santos de Oliveira
Abelmon da Silva Gesteira
Walter dos Santos Soares Filho
Claudia Fortes Ferreira*

***Embrapa Mandioca e Fruticultura
Cruz das Almas, BA
2022***

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Mandioca e Fruticultura

Rua Embrapa, s/nº, Caixa Postal 07
44380-000, Cruz das Almas, Bahia
Fone: 75 3312-8048
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Mandioca e Fruticultura

Presidente
Eduardo Chumbinho de Andrade

Secretária-executiva
Maria da Conceição Pereira da Silva

Membros
*Ana Lúcia Borges, Áurea Apolinário de
Albuquerque Gerum, Cinara Fernanda Garcia
Morales, Harllen Sandro Alves Silva, Herminio
Souza Rocha, Jailson Lopes Cruz, José
Eduardo Borges de Carvalho, Paulo Ernesto
Meissner Filho, Tatiana Gôes Junghans*

Supervisão editorial
Eduardo Chumbinho de Andrade

Revisão de texto
Alessandra Angelo

Normalização bibliográfica
Lucidalva Ribeiro Gonçalves Pinheiro

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Anapaula Rosário Lopes

Foto da capa
*Orlando Sampaio Passos
Luiz Carlos de Souza Junior*

1ª edição
Publicação digital (2022): PDF

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Mandioca e Fruticultura

Diversidade genética e Fingerprint molecular de porta-enxertos de citros via
marcadores IRAP. Luiz Carlos de Souza Junior... [et. al.]. – Cruz das
Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2022.

36 p. il. ; 22 cm. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/ Embrapa
Mandioca e Fruticultura, 142).

ISSN 1809-5003.

1. Fruta cítrica 2. Marcador genético 3. Genética molecular I. Souza Junior, Luiz
Carlos de Souza II. Pena, Laiane de Cruz III. Ramos, Andresa Priscila de Souza
IV. Oliveira, Saulo Alves Santos de V. Gesteira, Abelson da Silva VI. Soares Filho,
Walter dos Santos VII. Ferreira, Claudia Fortes VIII Título. IX. Série.

CDD 634.304

Lucidalva Ribeiro Gonçalves Pinheiro (CRB5 – 11/61)

© Embrapa, 2022

Sumário

Resumo5

Abstract7

Introdução.....9

Material e Métodos 11

Resultados e Discussão25

Conclusões.....35

Referências35

Diversidade genética e *Fingerprint* molecular de porta-enxertos de citros via marcadores IRAP

Luiz Carlos de Souza Junior¹

Laiane de Cruz Pena²

Andresa Priscila de Souza Ramos³

Saulo Alves Santos de Oliveira³

Abelmon da Silva Gesteira³

Walter dos Santos Soares Filho³

Claudia Fortes Ferreira³

Resumo – Em 2020, a citricultura movimentou um volume de 22 bilhões de dólares no mercado mundial, com 60% representado pela laranja doce (FAO, 2022). A produção mundial de suco de laranja em 2020/21 ficou em torno de 1,6 milhão de toneladas, com a produção brasileira alcançando 1 milhão de toneladas, consolidando o Brasil como o maior produtor mundial e responsável por 62,5% do total de suco de laranja produzido. No entanto, a citricultura brasileira está sujeita a vários fatores de risco, bióticos e abióticos devido à estreita base genética do gênero *Citrus*, o que torna a identificação de fontes de resistência/tolerância a estes riscos um processo difícil. Desse modo, torna-se importante a busca pela ampliação da diversificação de variedades de porta-enxertos nos pomares brasileiros. Uma das ferramentas para se obter esse conhecimento é a caracterização molecular que também permite a identificação de espécies, híbridos ou variedades cítricas por meio de *fingerprints* moleculares. Esse perfil eletroforético pode ser utilizado para assegurar os direitos dos viveiristas/melhoristas em caso de contestação de idoneidade/identidade, principalmente em culturas que se propagam vegetativamente. Também proporciona uma caracterização mais aprofundada de acessos de um banco de germoplasma. O principal objetivo do presente trabalho foi avaliar a diversidade genética de 12 porta-enxertos de citros lançados pelo Programa de Melhoramento Genético de Citros (PMGC) da Embrapa Mandioca e Fruticultura e estabelecer os perfis moleculares destes a

¹ Ciências Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia.

² Faculdade Maria Milza, Cruz das Almas, BA.

³ Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.

partir de combinações de primers de marcadores IRAP (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*). Para a formação dos perfis eletroforéticos dos *fingerprints* moleculares, foram utilizadas duas metodologias: i) uma com base no software GENES, por meio do comando *fingerprint*; e a outra ii) utilizando o software “R” com os pacotes *vegan* e *poppr* (Cruz, 2016; R Development, 2016). Foram gerados 124 bandas, ou fragmentos, a partir da combinação de 11 primers IRAP. Com base no software GENES, 14 marcas em 124, foram selecionadas para identificar os 12 PEs, com as principais marcas oriundas das combinações, Sukkula + Nikita (M21, M22), 3’LTR + LTR6149 (M37, M48), CO795 + CO945 (M56, M57, M61), CO795 + Stowaway (M66, M67, M70, M72), 9900 + CO699 (M78, M82) e 5’LTR + 3’LTR (M90). Já o software “R”, pacotes *vegan* e *poppr*, identificou que as primeiras 13-14 bandas do IRAP 5’LTR + Nikita (M1 a M13 ou M14), já podem ser consideradas suficientes para se obter um perfil eletroforético polimórfico entre os 12 PEs. As distâncias genéticas entre os acessos variaram de 0.52 a 0.96, com correlação cofenética de 0.9323. Os PEs foram agrupados em sete grupos, com o genótipo BRS Stuchi, enquadrado em um único grupo, separando-se dos demais. Criou-se o MIP (*Molecular Identification Profile*) para cada PE e todos são identificados via códigos de resposta rápida (QR) de forma a agilizar as informações pertinentes e específicas para cada um. Esses resultados serão importantes para, além de assegurar os direitos dos viveiristas/melhoristas, também agregar informações desses PEs junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Termos para indexação: citricultura; marcadores de DNA; identidade genética, perfil molecular.

Diversidade genética e *Fingerprint* molecular de porta-enxertos de citros via marcadores IRAP

Abstract – In 2020, the citriculture was responsible for generating USD\$ 22 billions worldwide with 60% represented by sweet oranges (FAO, 2022). World production of orange juice in 2020/21 was approximately 1.6 million tons with Brazilian production reaching 1 million tons, placing Brazil as the largest producer and responsible for 62.5% of total juice produced in the world. However, Brazilian citriculture is affected by many biotic and abiotic factors due to the straight genetic base of the genus *Citrus*, which hinders the process of identifying resistant/tolerant sources. Therefore, broadening the diversification of rootstock varieties in Brazilian orchards is of outmost importance. One of the tools to expand this knowledge is the use of molecular characterization, which also enables the identification of species, hybrids or citrus varieties by molecular fingerprints. This electrophoretic profile can be used to secure rights of nursery owners/breeders in case of purity/identity especially of vegetatively propagated plants. It also provides a more robust characterization of accessions in germplasm collections. Hence, the objective of the present work was to evaluate the genetic diversity of 12 citrus rootstocks released by Embrapa Mandioca e Fruticultura and establish the molecular profiles from combinations of IRAP (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*) primers. The following methodologies were used to create the electrophoretic profiles: *i*) the GENES software (Cruz, 2016), by the fingerprint command; and *ii*) the “R” software using the *vegan* and *poppr* packages (R Development Core Team, 2016). Were generated 124 fragments, or bands, from the combination of 11 IRAP primers. Based on the GENES software, 14 marks out of 124 were selected to identify the 12 PEs, whereas fragments were obtained from the combinations, Sukkula + Nikita (M21, M22), 3’LTR + LTR6149 (M37, M48), CO795 + CO945 (M56, M57, M61), CO795 + Stowaway (M66, M67, M70, M72), 9900 + CO699 (M78, M82) and 5’LTR + 3’LTR (M90). For the “R” software, the packages identified the first 13-14 fragments of the IRAP 5’LTR + Nikita (M1 a M13 or M14) combination as being sufficient to obtain a polymorphic electrophoretic profile among the 12 rootstocks. The genetic distances varied from 0.52 to 0.96, with cophenetic correlation of 0.9323. The rootstocks were grouped into seven groups with BRS Stuchi separated from the others. Molecular Identification

Profiles (MIPs) were created for each rootstock, and all were identified by quick response (QR) codes to provide specific information pertaining to each one. These results will be important to not only guarantee the rights of nursery owners/breeders in cases of identify, but also to provide more information regarding these rootstocks to the Ministry of Agriculture – MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento).

Keywords: citriculture; DNA molecular markers; genetic identity, molecular profile.

Introdução

De origem asiática, as plantas cítricas foram introduzidas no Brasil pelas primeiras expedições colonizadoras da região durante o século XIV. Com melhores condições para vegetar e produzir do que nas próprias regiões de origem, as citrinas se expandiram para todo o país (Lopes et al. 2011). A citricultura brasileira, que detém a liderança mundial em produção de laranja doce, tem se destacado pela promoção do crescimento socioeconômico das regiões brasileiras produtoras, contribuindo com a balança comercial nacional e principalmente, como geradora direta e indireta de empregos na área rural (IBGE, 2020).

No Brasil, os principais estados produtores de citros são, São Paulo, Minas Gerais, Bahia e Paraná, com São Paulo responsável por mais de 80% da produção. Em 2020, este estado produziu aproximadamente 13 milhões de toneladas de laranjas em 370 mil ha plantados (IBGE, 2022). Além de laranja, o Brasil se destaca na produção da lima ácida Tahiti e tangerinas, como a Ponkan e o tangor Murcott. No entanto, a citricultura brasileira está sujeita a vários fatores tanto bióticos como abióticos, que podem afetar a produção nacional.

Dentre os fatores bióticos, destacam-se o huanglongbing (HLB), também conhecido por *greening*, a tristeza e a gomose, dentre outros. Já o principal fator abiótico prejudicial à cultura é o déficit hídrico. Aliado a esses problemas, o alto custo de condução e a baixa variabilidade dos porta-enxertos disponíveis, também limitam o pleno desenvolvimento da cultura no país. Desse modo, torna-se importante buscar pela ampliação da diversidade genética de variedades de porta-enxertos dos pomares brasileiros (Oliveira et al., 2008).

O conhecimento da variabilidade genética e fenotípica de espécies vegetais e de como elas se distribuem, proporciona o uso racional e sustentável dos recursos genéticos. No entanto, as avaliações das características morfológicas tradicionais baseadas apenas no fenótipo são, muitas das vezes, ineficientes em detectar diferenças significativas podendo ser altamente inconsistentes devido às variações ambientais, bem como são extremamente dependentes do conhecimento prévio do avaliador sobre os genótipos a serem comparados. Desse modo, as ferramentas consideradas como mais adequadas para a caracterização dos genótipos a serem estudados ou comparados, são

aquelas com base em características moleculares. As técnicas que utilizam marcadores moleculares estão disponíveis e constituem uma das ferramentas mais interessantes e confiáveis para se caracterizar acessos de um banco de germoplasma (Kordrostami; Rahimi, 2015).

Marcadores de DNA possibilitam identificar um padrão único de combinação de marcas, como uma “impressão digital” (*fingerprint* molecular), para cada variedade. As comparações de *fingerprint* moleculares de espécies, híbridos ou variedades em estudos têm como finalidade principal formar um perfil eletroforético, podendo ser utilizados para assegurar os direitos dos viveiristas/melhoristas em caso de contestação de idoneidade/identidade, e se tornam muito importantes, principalmente em culturas que se propagam vegetativamente (Laurentin, 2009; Torre et al., 2006).

Os marcadores moleculares apresentam várias vantagens em comparação aos marcadores morfológicos por fornecer um número quase que ilimitado de polimorfismos distribuídos aleatoriamente ao longo de todo o genoma e por serem independentes dos efeitos ambientais e do estágio fisiológico e fenológico da planta. Estes também permitem a identificação precisa dos genótipos em estádios iniciais do desenvolvimento, detectando variações nas sequências de nucleotídeos em locais específicos do genoma (Ferreira; Grattapaglia, 1998).

Os marcadores IRAP (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*) são baseados em retrotransposons. Estes marcadores examinam a variação dos locais de inserção dos retrotransposons, e a amplificação é feita na sequência de DNA entre as regiões de longas repetições terminais (LTRs) de dois retrotransposons (Kalendar et al., 2011; Ghonaim et al., 2020). A maioria dos métodos baseados em marcadores de retrotransposons são adequados para o *fingreprinting* devido a duas propriedades vantajosas: i) existência de regiões com grandes volumes de inserções, devido à atividade transposicional; e ii) contém domínios conservados nos quais primers de PCR podem ser desenhados (Kalendar et al., 2011; Kalendar, 2006).

Sendo assim, o presente trabalho foi desenvolvido para avaliar a diversidade genética entre 12 PEs de citros disponibilizados pelo Programa de Melhoramento Genético de Citros (PMGC) da Embrapa e reproduzir os perfis eletroforéticos dos principais porta-enxertos pertencentes ao PMGC de forma a preservar os direitos dos melhoristas em casos de contestação de sua

idade genética, e agregar informações junto ao registro no Ministério da Agricultura, Agropecuária de Abastecimento (MAPA).

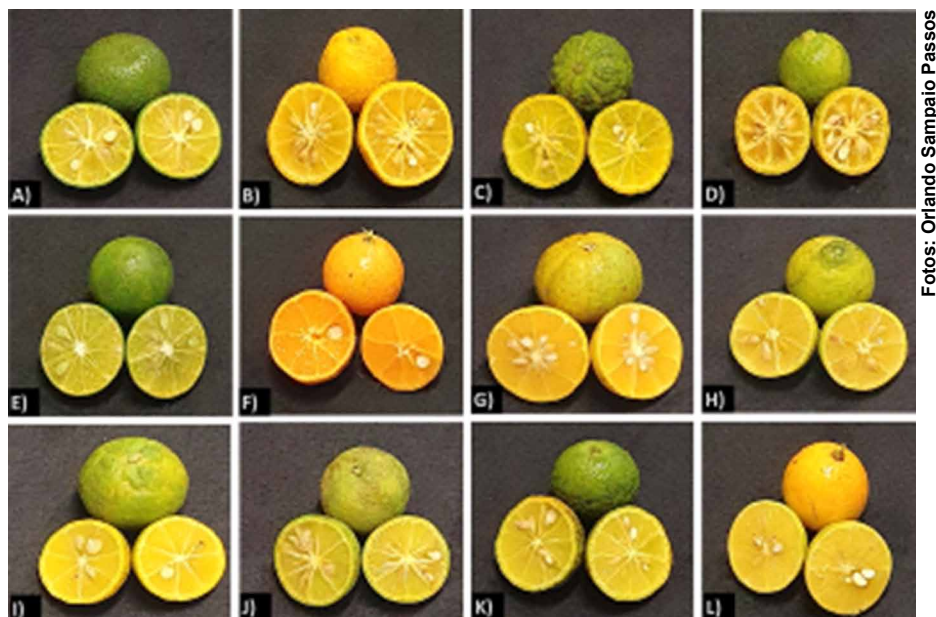


Figura 1. Imagens de frutos dos porta-enxertos do estudo (G1-G12). (A) BRS Victoria (G1); (B) BRS Hleão (G2); (C) BRS OS Passos (G3); (D) BRS Stuchi (G4); (E) BRS Tabuleiro (G5); (F) BRS Bravo (G6); (G) BRS Cunha Sobrinho (G7); (H) BRS O Semmpionato (G8); (I) BRS Donadio (G9); (J) BRS Matta (G10); (K) BRS SJ Furr (G11); (L) BRS S Moreira (G12).

Material e Métodos

Material genético

Foram utilizados 12 porta-enxertos considerados os principais lançados recentemente pelo PMGC da Embrapa para uso dos citricultores do país. Os frutos e características agrônômicas, fisiológicas estão demonstrados na Figura 1 (A-L) e Tabela 1.

Tabela 1. Denominação e características de produção, fitossanitárias e fisiológicas dos porta-enxertos de citros utilizados para o estudo de *fingerprint* molecular.

Nome	Cruzamento/ denominação	Aspectos de Produção*	Aspectos fitossanitários*	Aspectos fisiológicos*
HTR-051 BRS Victoria (G1)	Porta-enxerto obtido de cruzamento entre limoeiro 'Cravo' e 'Trifoliata', tratando-se, portanto, de um citrimonia. Foi registrado no RNC/ MAPA. Sua proteção no MAPA foi requerida.	Porte normal a semiananizante. Com copa de 'Valência', Norte de São Paulo, sequeiro, 14 anos, apresentou 100% de sobrevivência de plantas. Este é um indicativo de sua rusticidade, de sua adaptação a ambientes sujeitos a fortes déficits hídricos e altas temperaturas. Determina eficiência produtiva (produção de frutos por metro cúbico de copa) semelhante à do limoeiro 'Cravo', porém com qualidade de frutos superior. Frutos com 2 sementes, em média, e taxa de pollembria da ordem de 80%.	Tolerante à Tristeza, Morte Súbita e Declínio. Resistência à Gomose, em condições de campo.	Tolerância à seca pouco inferior à determinada pelo limoeiro 'Cravo'. Pode ser utilizado em sequeiro, porém deve ser mais dirigido a pomares onde o volume e distribuição de chuvas é mais adequado à citricultura. Em áreas irrigadas seu consumo de água deve ser inferior ao de porta-enxertos mais exigentes em água, como o citrumelo 'Swingle'. É compatível com a laranja 'Valência'. Nos Tabuleiros Costeiros da Bahia e de Sergipe, sequeiro, tem se mostrado adequado para as laranjeiras 'Pera', 'Pineapple', 'Piemonte' e 'Tahiti'.

Tabela 1. Continuação.

Nome	Cruzamento/ denominação	Aspectos de Produção*	Aspectos fitossanitários*	Aspectos fisiológicos*
HTR-208 BRS Hileão (G2)	Porta-enxerto obtido pelo cruzamento da tangerineira ‘Sunki’ comum com o ‘Trifoliata Benecke’, tratando-se, portanto, de um citrandarin. Foi registrado no RNC/ MAPA. Sua proteção no MAPA foi requerida.	Porte normal. Com copa de ‘Valência’, Norte de São Paulo, sequeiro, 14 anos, apresentou sobrevivência de plantas da ordem de 80%; a morte de plantas deveu-se à sua suscetibilidade ao declínio. Frutos com 28 sementes, em média, e taxa de poliembrionia da ordem de 100%.	Tolerante à Tristeza e à Morte Súbita. Declínio após 11 anos de plantio. Resistente à Gomose em condições de campo.	Alta tolerância à seca, superior à determinada pelo limoeiro ‘Cravo’, sendo, portanto, uma alternativa para os Tabuleiros Costeiros nordestinos. Pode ser utilizado em condições de sequeiro, porém, devido à alta produtividade de frutos que induz à copa, sobrecarregando-a, e suscetibilidade ao declínio, seu emprego em ambientes mais amenos, com melhor distribuição de chuvas, poderá retardar o surgimento de declínio. Em áreas irrigadas permitirá o uso de menor quantidade de água. Avaliado com outras variedades copa, além da Valência, tem se mostrado bom para laranja Pera (Tabuleiros Costeiros, observações iniciais). Alta exigência nutricional (maior necessidade de fósforo e de cálcio).

Tabela 1. Continuação.

Nome	Cruzamento/ denominação	Aspectos de Produção*	Aspectos fitossanitários*	Aspectos fisiológicos*
HTR-053 BRS OS Passos (G3)	Porta-enxerto obtido pelo cruzamento da laranjeira 'Pera' com citrange 'Yuma', tratando-se, portanto, de um citrangor. Foi registrado no RNC/ MAPA. Sua proteção no MAPA foi requerida.	Porte normal a semiananizante. Com copa de 'Valência', Norte de São Paulo, sequeiro, 14 anos, apresentou 100% de sobrevivência de plantas. Este é um indicativo de sua rusticidade, de sua adaptação a ambientes sujeitos a fortes déficits hídricos e altas temperaturas. Determina produção e qualidade de frutos superiores às induzidas pelo limoeiro 'Cravo'. Frutos com 7 sementes, em média, e taxa de polimerização da ordem de 95%.	Tolerante à Tristeza, Morte Súbita e Declínio. Resistente à Gomose em condições de campo.	Boa tolerância à seca, semelhante à determinada pelo limoeiro 'Cravo', sendo, portanto, uma alternativa para o Cinturão Citrícola do Estado de São Paulo, Triângulo e Sudoeste mineiros. Pode ser utilizado em condições de sequeiro. Em áreas irrigadas permitirá o uso de menor quantidade de água. Em combinação com a laranjeira 'Pera' apresentou incompatibilidade. É compatível com a laranjeira 'Valência'. Tem se mostrado adequado para laranjeira 'Natal' e 'Valência Americana' (avaliações iniciais). Precisa ser avaliado com outras variedades copa.

Tabela 1. Continuação.

Nome	Cruzamento/ denominação	Aspectos de Produção*	Aspectos fitossanitários*	Aspectos fisiológicos*
TSKC x (LCR x TR) – 017 BRS Stuchi (G4)	Porta-enxerto obtido pelo cruzamento da tangerineira 'Sunki' comum (TSKC) com um híbrido de limoeiro 'Cravo' (LCR) com 'Trifoliata' (TR), tratando-se, portanto, de um citrimoniandarin. Foi registrado no RNC/ MAPA. Sua proteção no MAPA também foi requerida.	Porte normal à semiananizante. Com copa de 'Valência', Norte de São Paulo, sequeiro, 14 anos, apresentou 100% de sobrevivência de plantas. Este é um indicativo de sua rusticidade, de sua adaptação a ambientes sujeitos a fortes déficits hídricos e altas temperaturas. Determina boa produção de frutos, sendo a qualidade destes superior à induzida pelo limoeiro 'Cravo'. Frutos com 20 sementes, em média, e taxa de poliembrionia da ordem de 85%.	Tolerante à Tristeza, Morte Súbita e Declínio. Resistente à Gomose em condições de campo.	Boa tolerância à seca, semelhante à determinada pelo limoeiro 'Cravo', sendo, portanto, uma alternativa para os Tabuleiros Costeiros nordestinos. Pode ser utilizado em condições de sequeiro. Em áreas irrigadas permitirá o uso de menor quantidade de água. Precisa ser avaliada com outras variedades copa, além da Valência. É tolerante à salinidade. O diâmetro do caule do porta-enxerto é superior ao diâmetro do caule da variedade copa (Valência).
TSKC x (LCR x TR) – 040 BRS Tabuleiro (G5)	Porta-enxerto obtido pelo cruzamento da tangerineira 'Sunki' comum (TSKC) com um híbrido de limoeiro 'Cravo' (LCR) com 'Trifoliata' (TR), tratando-se, portanto, de um citrimoniandarin. Foi registrado no RNC/ MAPA. Sua proteção no MAPA também foi requerida.	Porte semiananizante. Com copa de 'Valência', Norte de São Paulo, sequeiro, 14 anos, apresentou 100% de sobrevivência de plantas. Este é um indicativo de sua rusticidade, de sua adaptação a ambientes sujeitos a fortes déficits hídricos e altas temperaturas. Frutos com 18 sementes, em média, e taxa de poliembrionia da ordem de 100%.	Tolerante à Tristeza, Morte Súbita e Declínio. Resistência à Gomose, em condições de campo.	Alta tolerância à seca, pouco superior à determinada pelo limoeiro 'Cravo', sendo, portanto, uma alternativa para os Tabuleiros Costeiros nordestinos. Pode ser utilizado em condições de sequeiro. Tem mostrado adequação aos Tabuleiros Costeiros da Bahia e de Sergipe, tendo como variedades copa as laranjeira Pera e Westin. Em áreas irrigadas permitirá o uso de menor quantidade de água. É tolerante à salinidade.

Tabela 1. Continuação.

Nome	Cruzamento/ denominação	Aspectos de Produção*	Aspectos fitossanitários*	Aspectos fisiológicos*
TSKC x (LCR x TR) – 059 BRS Bravo (G6)	Porta-enxerto obtido pelo cruzamento da tangerineira ‘Sunki’ comum (TSKC) com um híbrido de limoeiro ‘Cravo’ (LCR) com ‘Trifoliata’ (TR), tratando-se, portanto, de um citrimoniandarin. Foi registrado no RNC/ MAPA. Sua proteção no MAPA foi requerida.	Porte semiananizante. Com copa de ‘Valência’, Norte de São Paulo, sequeiro, 14 anos, apresentou 100% de sobrevivência de plantas. Este é um indicativo de sua rusticidade, de sua adaptação a ambientes sujeitos a fortes déficits hídricos e altas temperaturas. Determina produção e qualidade de frutos superiores às induzidas pelo limoeiro ‘Cravo’. Frutos com 12 sementes, em média, e taxa de pollembria da ordem de 50%.	Tolerante à Tristeza, Morte Súbita e Declínio. Resistente à Gomose em condições de campo.	Boa tolerância à seca, pouco superior à determinada pelo limoeiro ‘Cravo’, sendo, portanto, uma alternativa para o Cinturão Citrícola do Estado de São Paulo, Triângulo e Sudoeste mineiros. Pode ser utilizado em condições de sequeiro. Em áreas irrigadas permitirá o uso de menor quantidade de água. É tolerante à salinidade. Tem se mostrado adequado para outras variedades copa, além da Valência, como Pera, Natal, Folha Murcha, Valência Americana, Westin, Tahiti e Ponkan. Há mais de oito anos vem sustentando o Banco Ativo de Germoplasma de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, que contém cerca de 800 acessos, sem manifestações de incompatibilidade.

Tabela 1. Continuação.

Nome	Cruzamento/ denominação	Aspectos de Produção*	Aspectos fitossanitários*	Aspectos fisiológicos*
TSKC x (CTSW-041 BRS Cunha Sobrinho (G7)	Porta-enxerto obtido pelo cruzamento da tangerineira 'Sunki' comum (TSKC) com citrumelo 'Swingle' (CTSW), tratando-se, portanto, de um citrumelardarin. Foi registrado no RNC/ MAPA. Sua proteção no MAPA foi requerida.	Porte normal à semiananizante. Com copa de 'Valência', Norte de São Paulo, sequeiro, 14 anos, apresentou 100% de sobrevivência de plantas. Este é um indicativo de sua rusticidade, de sua adaptação a ambientes sujeitos a fortes déficits hídricos e altas temperaturas. Determina produção e qualidade de frutos superiores às induzidas pelo limoeiro 'Cravo'. Frutos com 21 sementes, em média, e taxa de polimbrionia da ordem de 90%.	Tolerante à Tristeza, Morte Súbita e Declínio. Resistente à Gomose em condições de campo.	Alta tolerância à seca, semelhante à determinada pelo limoeiro 'Cravo', sendo, portanto, uma alternativa para o Cinturão Citrícola do Estado de São Paulo, Triângulo e Sudoeste mineiros. Pode ser utilizado em condições de sequeiro. Em áreas irrigadas permitirá o uso de menor quantidade de água. É tolerante à salinidade. Tem se mostrado adequado para outras variedades copa, além da Valência, como Pera, Natal, Valência Americana e Westin.
TSKFL x CTSW - 004 BRS O Sempionato (G8)	Porta-enxerto obtido pelo cruzamento da tangerineira 'Sunki' da Flórida' (TSKFL) com citrumelo 'Swingle' (CTSW), tratando-se, portanto, de um citrumelardarin. Foi registrado no RNC/ MAPA. Sua proteção no MAPA foi requerida.	Porte normal. Com copa de 'Valência', Norte de São Paulo, sequeiro, 14 anos, apresentou sobrevivência de plantas superior a 85%. Determina produção e qualidade de frutos superiores às induzidas pelo limoeiro 'Cravo'. Frutos com 22 sementes, em média, e taxa de polimbrionia da ordem de 80%.	Tolerante à Tristeza, Morte Súbita e Declínio. Resistente à Gomose em condições de campo.	Tolerância à seca pouco inferior à do limoeiro 'Cravo'. Pode ser utilizado em sequeiro, porém deve ser mais dirigido a pomares onde o volume e distribuição de chuvas é mais adequado à citricultura. Em áreas irrigadas seu consumo de água deve ser inferior ao de porta-enxertos mais exigentes em água, como o citrumelo 'Swingle'. Precisa ser avaliado com outras variedades copa, além da Valência.

Tabela 1. Continuação.

Nome	Cruzamento/ denominação	Aspectos de Produção	Aspectos fitossanitários	Aspectos fisiológicos
TSKC x TRFD – 003 BRS Donadio (G9)	Porta-enxerto obtido pelo cruzamento da tangerineira 'Sunki' comum (TSKC) com o 'Trifoliata Flying Dragon' (TRFD), tratando-se, portanto, de um citrandarin. Foi registrado no RNC/ MAPA. Sua proteção no MAPA foi requerida.	Porte ananicante à semiananicante. Com copa de 'Valência', Norte de São Paulo, sequeiro, 14 anos, apresentou 100% de sobrevivência de plantas. Este é um indicativo de sua rusticidade, de sua adaptação a ambientes sujeitos a fortes déficits hídricos e altas temperaturas. Determina eficiência produtiva (produção de frutos por metro cúbico de copa) e qualidade de frutos superiores às induzidas pelo limoeiro 'Cravo'. Frutos com 12 sementes, em média, e taxa de poliembrionia da ordem de 99%.	Tolerante à Tristeza, Morte Súbita e Declínio. Resistente à Gomose em condições de campo.	Boa tolerância à seca, semelhante à determinada pelo limoeiro 'Cravo', sendo, portanto, uma alternativa para o Cinturão Citrícola do Estado de São Paulo, Triângulo e Sudoeste mineiros. Pode ser utilizado em condições de sequeiro. Em áreas irrigadas permitirá o uso de menor quantidade de água. É compatível com a laranjeira 'Valência'. Tem se mostrado adequado para laranjeira 'Pera', 'Natal', 'Folha Murcha', 'Valência Americana', 'IAPAR 73' e 'Tahiti' (avaliações iniciais).
TSKC x TRFD - 006 BRS Matta (G10)	Porta-enxerto obtido pelo cruzamento da tangerineira 'Sunki' comum (TSKC) com o 'Trifoliata Flying Dragon' (TRFD), tratando-se, portanto, de um citrandarin. Foi registrado no RNC/ MAPA. Sua proteção no MAPA foi requerida.	Porte ananicante. Com copa de 'Valência', Norte de São Paulo, sequeiro, 14 anos, apresentou 70% de sobrevivência de plantas; a mortalidade de plantas deveu-se à sua alta sensibilidade ao déficit hídrico; todavia inferior à relacionada ao trifoliata 'Flying Dragon', segundo observações com copa de 'Tahiti' no Instituto Federal Baiano - Campus de Bom Jesus da Lapa.	Tolerante à Tristeza, Morte Súbita e Declínio. Resistente à Gomose em condições de campo.	Porta-enxerto obtido pelo cruzamento da tangerineira 'Sunki' comum (TSKC) com o 'Trifoliata Flying Dragon' (TRFD), tratando-se, portanto, de um citrandarin.

Tabela 1. Continuação.

Nome	Cruzamento/ denominação	Aspectos de Produção*	Aspectos fitossanitários*	Aspectos fisiológicos*
TSKC x TRFD - 007 BRS SJ Furr (G11)	Porta-enxerto obtido pelo cruzamento da tangerineira 'Sunki' comum (TSKC) com o 'Trifoliata Flying Dragon' (TRFD), tratando-se, portanto, de um citrandarin. Foi registrado no RNC/ MAPA. Sua proteção no MAPA foi requerida.	Porte ananicante. Com copa de 'Valência', Norte de São Paulo, sequeiro, 14 anos, apresentou 100% de sobrevivência de plantas. Este é um indicativo de sua rusticidade, de sua adaptação a ambientes sujeitos a fortes déficits hídricos e altas temperaturas. Determina eficiência produtiva (produção de frutos por metro cúbico de copa) e qualidade de frutos muito superiores às induzidas pelo limoeiro 'Cravo'. Frutos com 12 sementes, em média, e taxa de pollembria da ordem de 100%.	Tolerante à Tristeza, Morte Súbita e Declínio. Resistente à Gomose em condições de campo.	Porta-enxerto obtido pelo cruzamento da tangerineira 'Sunki' comum (TSKC) com o 'Trifoliata Flying Dragon' (TRFD), tratando-se, portanto, de um citrandarin.

Tabela 1. Continuação.

Nome	Cruzamento/ denominação	Aspectos de Produção*	Aspectos fitossanitários*	Aspectos fisiológicos*
LCR x CTSW- 009 BRS S Moreira (G12)	Porta-enxerto obtido pelo cruzamento do limoeiro 'Cravo' (LCR) com o citrumelo 'Swingle' (CTSW), tratando-se, portanto, de um citrumelimonía. Foi registrado no RNC/ MAPA. Sua proteção no MAPA foi requerida.	Porte normal, com expressivo vigor de copa. Com copa de 'Valência', Norte de São Paulo, sequeiro, 14 anos, apresentou 100% de sobrevivência de plantas. Este é um indicativo de sua rusticidade, de sua adaptação a ambientes sujeitos a fortes déficits hídricos e altas temperaturas. Determina alta produção de frutos por planta, sendo a qualidade destes semelhante à induzida pelo limoeiro 'Cravo'. Frutos com 09 sementes, em média, e taxa de pollembria da ordem de 100%.	Tolerante à Tristeza, Morte Súbita e Declínio. Resistente à Gomose em condições de campo.	Porta-enxerto obtido pelo cruzamento do limoeiro 'Cravo' (LCR) com o citrumelo 'Swingle' (CTSW), tratando-se, portanto, de um citrumelimonía.

*Costa et al. (2020; 2021).

O trabalho foi realizado no laboratório de Biologia Molecular, pertencente ao Núcleo de Biologia Avançada (NBA) da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Todos os genótipos analisados pertencem ao Banco de Germoplasma de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Após a coleta das folhas, as amostras foram armazenadas em ultrafreezer a uma temperatura de -80°C , até a extração de DNA.

Extração e quantificação de DNA total

Foram coletadas folhas jovens de cada material vegetal e o DNA extraído de acordo com a metodologia de CTAB (Doyle; Doyle, 1990), modificada por (Ferreira et al., 2019). Posteriormente, foi realizada a quantificação e a verificação da qualidade do DNA em gel de agarose a 1% corado com gel red em 80 V por 1h. Para determinar a quantidade do DNA obtido, foram utilizados marcadores de DNA lambda de peso molecular conhecido (50 e 100 ng). Ilustração da folha jovem de citros e cadinho de maceração, bem como gel de eletroforese da extração de DNA encontram-se na Figura 2 (A-B).



Figura 2. (A) Folhas jovens de PE de citros para ser macerada para extração de DNA; (B) Quantificação do material genético extraído de folhas jovens de 12 acessos de citros. 50 ng, 150 ng e 300 ng – DNA padrão de massa molecular conhecida. As amostras de 1-12 se referem aos porta-enxertos apresentados na Tabela 1. Seta = DNA total extraído das amostras.

Amplificação via IRAP

Foram utilizados 11 *primers* IRAP em oito combinações (Tabela 3) na amplificação do DNA dos 12 PE de citros. Uma ilustração de um marcador IRAP encontra-se na Figura 3.

Tabela 3. Relação dos primers Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism utilizados no estudo de *fingerprint* de 12 Porta-enxertos (PEs) de citros.

Primers IRAP	Sequência do primer (5' - 3')	Temperatura de anelamento (°C)
LTR 6149	GCACACACACACACACA	40°C
LTR 6150	GAGAGAGAGAGAGAGA	40°C
5' LTR2	GAGAGAGAGAGAGAGAT	52,6°C
3' LTR	CYGTGTGTGTG GTGTGT	40°C
Nikita	CRCACCACCACCACCAC	40°C
CO795	CYCACC CCACCACCAC	52°C
CO945	CAGCAGCAGCAGCAGRC	52°C
Sukkula	CACCACCACCACCACYC	40°C
Stowaway	TGTTGTTGTTG TGTRC	52°C
9900	TATTATTATTATTATRC	52°C
CO699	TAGTAGTAGTAGTAGRC	52°C

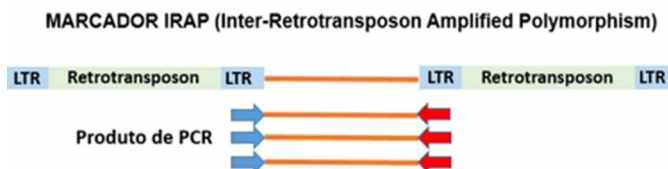


Figura 3. Ilustração da localização das regiões LTR (*Long Terminal Repeats*), do retrotransposon e o produto de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) – amplificação (fragmento gerado entre as setas azuis e vermelhas).

Fonte: Adaptado de Basirnia et al. (2016).

As reações de amplificação dos marcadores IRAP foram preparadas para um volume final de 15 μ L, contendo os seguintes reagentes: tampão de enzima 1x [KCl 25 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3)], 50 mM de $MgCl_2$, 2,5 mM de dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 2,0 mM de cada primer, 2,5 ng de DNA genômico e 1U de Taq DNA polimerase comercial (Invitrogen).

As amplificações foram conduzidas em termociclador da marca Applied Biosystems modelo Veriti® 96-Wells com o seguinte programa de amplificação: uma etapa inicial de 94 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos de 94 °C por 30 s, temperatura de anelamento x° (a depender do primer) (Tabela 3) por 60 s, 72 °C por 45s, com extensão final de 72 °C por 5 min e 14 °C ∞ . Os produtos da amplificação foram corados com GelRed® e separados por eletroforese em gel de agarose a 2%, a uma voltagem de 80 v durante aproximadamente 3 h. As corridas foram fotodocumentadas com uso do sistema de captura de imagens Loccus L-PIX EX 25x30. Um exemplo do perfil eletroforético de géis de marcadores IRAP para as combinações de primers 5'LTR + Nikita e 9900 e CO699, encontra-se na Figura 4.

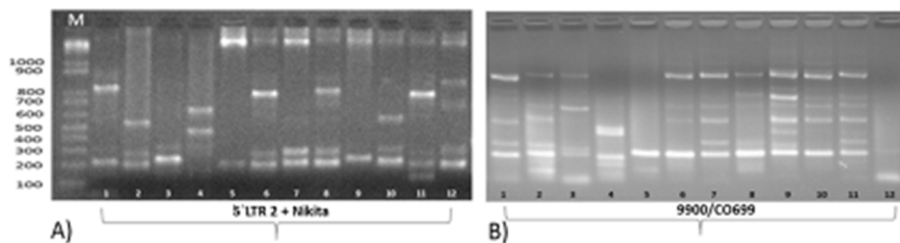


Figura 4. (A) Perfil eletroforético dos 12 porta-enxertos de citros (G1-G12) para a combinação de primers 5'LTR + Nikita; (B) Perfil eletroforético dos 12 porta-enxertos de citros (1-12) para a combinação de primers 9900/CO699. M = Marcador ladder 1 kb (Invitrogen®).

Análise Molecular

Os marcadores IRAP são marcadores dominantes, altamente polimórficos e permitem avaliar a similaridade/dissimilaridade entre os indivíduos (Kalendar et al., 2011; Ghonaim et al. 2020). Sendo assim, os fragmentos dos géis foram computados como zero (0) = ausência e um (1) como presença das bandas. Primeiramente, foi gerado um dedrograma, cuja matriz de distância genética permite avaliar as diferenças entre os indivíduos. Para o cálculo da matriz, fez-se uso dos parâmetros de distância usando o índice do complemento ($1 - c$)

de Jaccard ($a/a+b+c$), onde a = (coincidência tipo 1-1), b = (discordância tipo 1-0) e c = (discordância tipo 0-1). Para o cálculo do agrupamento, o método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), foi empregado. O software Statistica (Statistica, 2002) gerou o dendrograma e o ponto de corte foi delienado de acordo com os critérios definidos por Mingoti (2005).

Para a formação dos perfis eletroforéticos, duas abordagens foram escolhidas. Uma baseada na análise completa, seguindo o comando *fingerprint* com base na metodologia de “exclusão de bandas” do software Genes (Cruz, 2016) e outra, que a partir de um conjunto de dados, mostra quais primeiras bandas, a partir da primeira combinação de primers, são suficientes para que haja a discriminação entre os genótipos utilizando o software R e os pacotes *vegan* e *poppr* (R Development, 2016). Este tipo de análise também é interessante por disponibilizar o menor conjunto ou número mínimo de primers capazes de diferenciar o grupo de genótipos.

Visando a geração dos códigos de resposta rápida (QR code) para os genótipos avaliados, os dados de *frigerprinting* foram armazenados em repositório na nuvem (Google Drive), e o endereço desse repositório (link) utilizado na construção do QR code, está disponível por meio do uso da ferramenta online gratuita “qrcodemonkey” (www.qrcode-monkey.com).

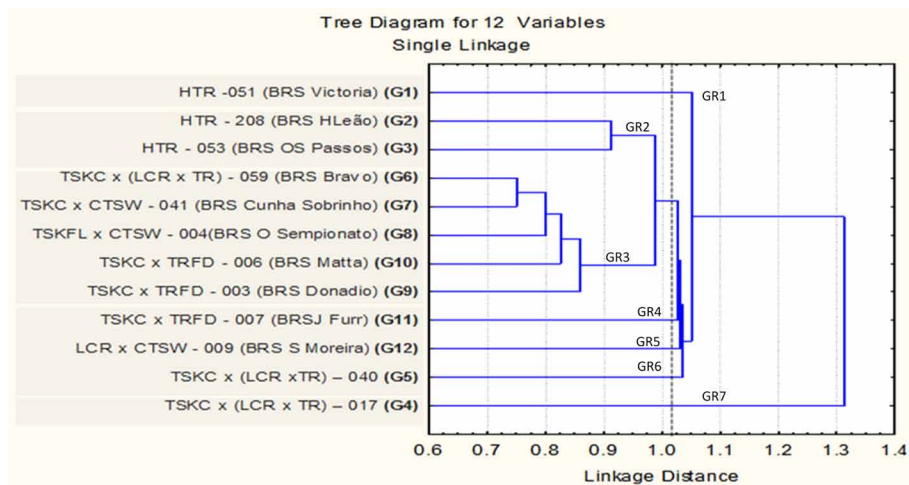


Figura 5. Dendrograma construído a partir de 124 bandas polimórficas provenientes de oito combinações de primers IRAP. Foram formados cinco grupos - Cinza: G(1-7) a partir do agrupamento por UPGMA e o ponto de corte definido pelos critérios de Mingoti (2005).

* Os dados com a identificação completa dos genótipos encontram-se na Tabela 1.

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
G1	0.00											
G2	0.73	0.00										
G3	0.72	0.64	0.00									
G4	0.91	0.89	0.88	0.00								
G5	0.79	0.72	0.74	0.90	0.00							
G6	0.86	0.74	0.71	0.96	0.77	0.00						
G7	0.77	0.67	0.74	0.93	0.72	0.52	0.00					
G8	0.71	0.67	0.70	0.92	0.73	0.63	0.56	0.00				
G9	0.84	0.76	0.73	0.92	0.79	0.65	0.61	0.59	0.00			
G10	0.80	0.71	0.67	0.96	0.78	0.59	0.60	0.57	0.63	0.00		
G11	0.76	0.78	0.80	0.90	0.83	0.75	0.75	0.76	0.70	0.69	0.00	
G12	0.83	0.84	0.81	0.88	0.74	0.85	0.82	0.84	0.77	0.76	0.71	0.00

Figura 6. Matriz de dissimilaridade genética entre 12 PE de citros baseada no coeficiente de Jaccard. Maior distância entre os acessos foi 0.96 (azul) e menor, 0.52 (verde).

Resultados e Discussão

Análise de dissimilaridade genética

Foram avaliadas 124 bandas polimórficas a partir da combinação de oito primers IRAP. O dendograma e a matriz de distância genética, encontram-se nas Figuras 5 e 6, respectivamente.

A matriz de distância demonstra que há variabilidade genética entre os PEs, que variou de 0.52 a 0.96. Os PEs mais diferentes geneticamente, foram o G4 x G6 BRS Stuchi e os mais próximos, o G6 x G7, (BRS Bravo e BRS Cunha Sobrinho). Isso se justifica, uma vez que os PEs G4 e G6 tem como parentais os mesmos genótipos altamente heterozigóticos. Já a proximidade dos PEs G6 e G7 pode ser devido à presença da tangerineira Sunki Comum, altamente homozigótica.

O G1 está representado pelo PE 'BRS Vitória', considerado o único "citrimonia" de todo os 12 PEs. O G(2) foi representado pelos PEs 'BRS Hleão' e 'BRS OS Passos', que têm a tangerineira Sunki Comum como um dos parentais. Já o G(3) tem os PEs que têm Sunki Comum como parental comum para a maioria dos PEs e a Sunki da Florida somente no BRS O Semppionato, onde os PEs, BRS SJ Furr, BRS Matta e BRS Donadio, têm o Trifoliata Flying Dragon também como um dos parentais em comum.

O G(4) é formado pelo PE BRS SJ Furr, uma combinação da tangerineira Sunki Comum x Flying Dragon, o que justifica também a sua proximidade com o PE BRS Matta, pertencente ao G(3), por apresentarem a mesma constituição genética (Sunki comum x Flying Dragon).

O G(5) é representado pelo PE 'BRS S Moreira', o único da classe "citrumelimonía" dos 12 PEs e o G(6) pelo BRS Tabuleiro e G(7), BRS Stuchi, formados pelos mesmos parentais, tangerineira Sunki Comum, Limoeiro 'Cravo' e Trifoliata, esses últimos dois, altamente heterozigóticos.

Portanto, o uso de parentais altamente heterozigóticos nos cruzamentos, gerou uma variabilidade representativa dos novos PEs sendo lançados pela Embrapa, atingindo o objetivo de diversificar a base genética dos principais PEs usados nos plantios brasileiros.

***Fingerprint* via marcadores IRAP**

A análise de *fingerprint* utilizando o programa Genes (Cruz, 2016), e a metodologia por "exclusão", selecionou 14 marcas em 124, para identificar os 12 PEs. As principais combinações e suas marcas encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3. Combinações de primers IRAP que geraram as bandas selecionadas como as 14 principais para discriminar os 12 PEs de citros.

Combinação de primers IRAP	Marca
Sukkula + Nikita	M21, M22
3'LTR + LTR6149	M37, M48
CO795 + CO945	M56, M57, M61
CO795 + Stowaway	M66, M67, M70, M72
9950 + 6999	M78, M82
5'LTR + 3'LTR	M90

M = marca que variou de 1 a 124.

A combinação que mais gerou bandas polimórficas entre os PEs foi CO795 + Stowaway, com 4 bandas polimórficas (M66, M67, M70, M72), seguida da combinação CO795 + CO945, com três (M56, M57, M61). Os perfis eletroforéticos das combinações CO795 + Stowaway e CO795 + CO945, encontram-se na Figura 7 (A-B).

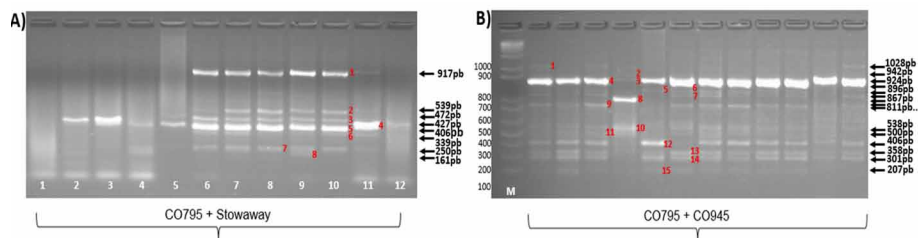


Figura 7. (A) Perfil eletroforético da combinação de primerse CO795 + Stowaway com oito bandas polimórficas; e (B) Perfil eletroforético da combinação de primers CO795 + CO945, com 15 bandas polimórficas. Setas na lateral representam os pares de base (pb) de cada banda e M = marcador ladder 1 kb (Invitrogen®).

Já com base na análise da curva de acúmulo de bandas, realizada com auxílio dos pacotes *vegan* e *poppr* em ambiente “R”, foi possível identificar que as primeiras 13-14 bandas da combinação ‘IRAP 5’LTR + Nikita’ (M1 a M13 ou M14), já podem ser consideradas suficientes para se obter um perfil eletroforético polimórfico entre os 12 PEs neste conjunto de amostras. O resultado da análise por acúmulo de bandas está representado na Figura 8 e o perfil eletroforético da combinação de primers 5’LTR + Nikita, na Figura 9.



Figura 8. Análise por acúmulo de bandas geradas com auxílio dos pacotes *vegan* e *poppr* no software “R”. A seta e os números 13 e 14 representam o número de bandas onde a curva começa a se estabilizar, sendo que as bandas que pertencem à combinação de primers 5’LTR + Nikita (M1 a M13 ou M14), já podem ser consideradas suficientes para se obter um perfil eletroforético polimórfico entre os 12 PEs.

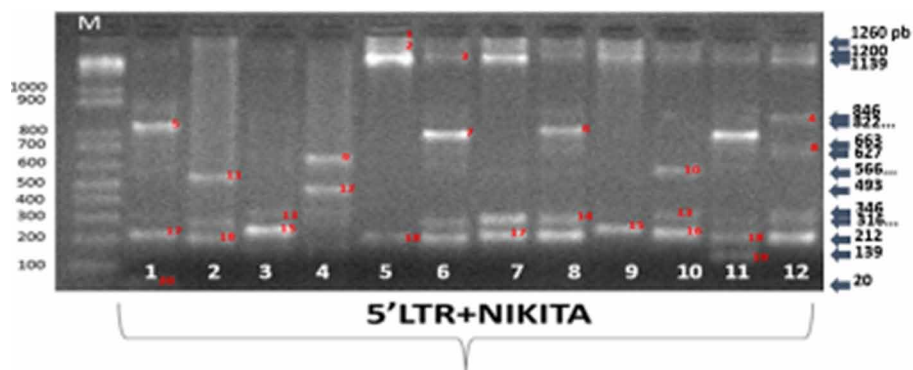


Figura 9. Perfil eletroforético de amostras de PE (1-12) com a combinação de primers IRAP 5'LTR + Nikkita. Numeração em vermelho corresponde às bandas polimórficas e pretas os correspondentes pares de base (pb). M = marcador ladder de 1 kb (Invitrogen®).

Com base nos resultados dos perfis eletroforéticos e das análises de *fingerprinting* e de acúmulo de bandas, procedeu-se então à genotipagem e construção dos MIPs (*Molecular Identification Profiles*) (Torre et al., 2006). Marcadores baseados em retrotransposons são amplamente utilizados na literatura para criar *fingerprints* genéticos de várias espécies de plantas (Torre, 2006; Kalendar et al., 2011; Santos et al., 2013; Abedinpour et al., 2014; Ghonaim et al., 2020).

Santos et al. (2013) avaliaram um conjunto de 25 genótipos provenientes da Persian acid lime (PAL) usando 17 primers de marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) e sete marcadores IRAP, obtendo 30 bandas polimórficas, capazes de separar os 25 genótipos em dois grupos distintos.

Abedinpour et al. (2014) estudaram 29 genótipos de citros utilizando cinco primers IRAP com um total de 49 bandas polimórficas. A distância de similaridade genética variou de 0.34-0.90, separando os clusters em cinco grupos distintos.

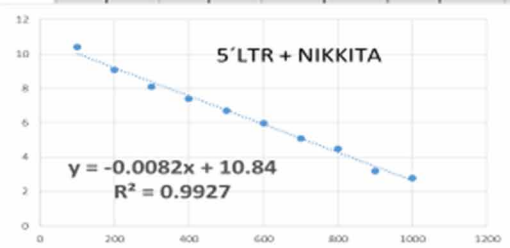
A estrutura genética de 20 genótipos de citrus sp. foi avaliada por meio de 26 marcadores SSR (Simple Sequence Repeats), 20 marcadores REMAP (Retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism) e 14 IRAPs. Os marcadores dominantes IRAP foram capazes de separar os genótipos em nível de grupo e espécie (Zayat et al., 2021).

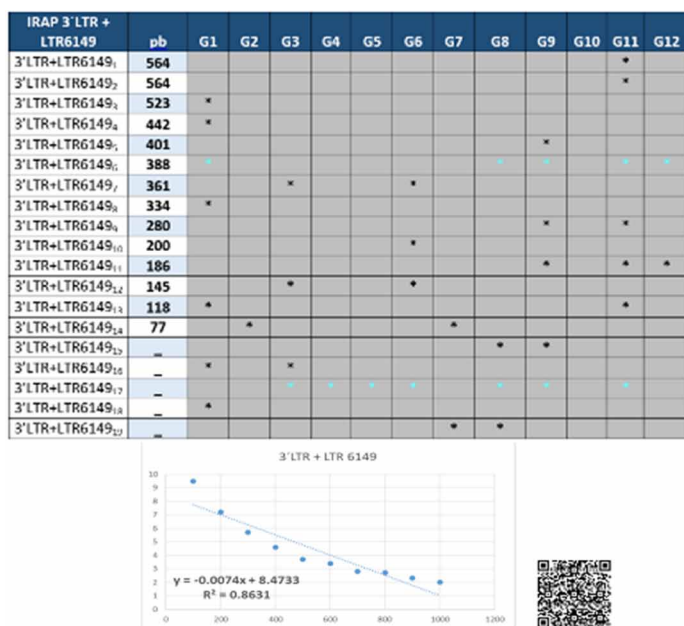
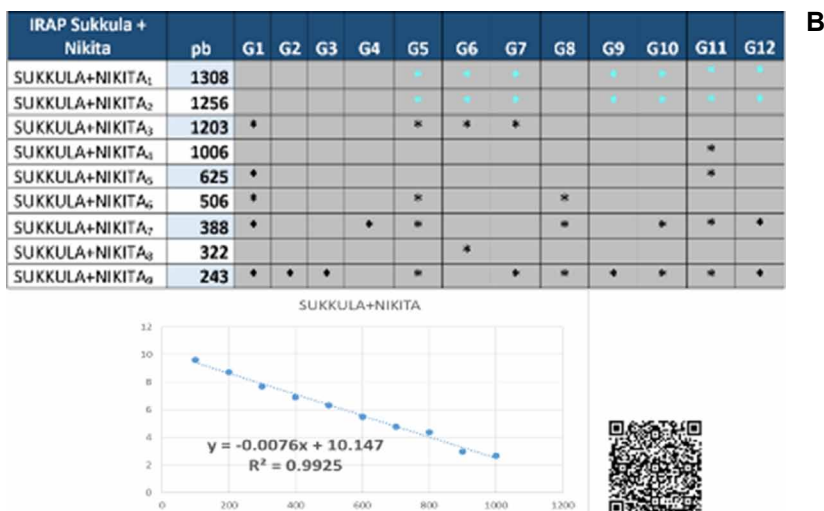
Os MIPs, perfis moleculares de identificação, curva de log e os QR codes, encontram-se apresentados a seguir na Figura 10 (a-h). Todos os PEs estão identificados por códigos de resposta rápida (QR code) de forma a agilizar as informações pertinentes e específicas a cada um.

MIPS – Molecular Identification Profiles

A

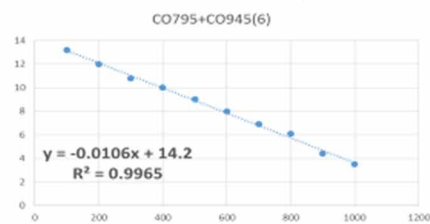
IRAP	pb	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
5'LTR+NIKITA ₁	1260					✓		✓	✓	✓			
5'LTR+NIKITA ₂	1200					✓		✓					✓
5'LTR+NIKITA ₃	1139					✓	✓	✓		✓			✓
5'LTR+NIKITA ₄	846												✓
5'LTR+NIKITA ₅	822	✓											
5'LTR+NIKITA ₆	785								✓				
5'LTR+NIKITA ₇	749								✓				
5'LTR+NIKITA ₈	663												✓
5'LTR+NIKKITA ₉	627				✓								
5'LTR+NIKKITA ₁₀	566										✓		
5'LTR+NIKITA ₁₁	529	✓											
5'LTR+NIKITA ₁₂	493				✓								✓
5'LTR+NIKITA ₁₃	346			✓							✓		
5'LTR+NIKITA ₁₄	310							✓	✓				
5'LTR+NIKITA ₁₅	261			✓						✓			
5'LTR+NIKITA ₁₆	249										✓		
5'LTR+NIKITA ₁₇	237	✓						✓	✓				
5'LTR+NIKITA ₁₈	212		✓				✓					✓	✓
5'LTR+NIKITA ₁₉	139											✓	
5'LTR+NIKITA ₂₀	20	✓											





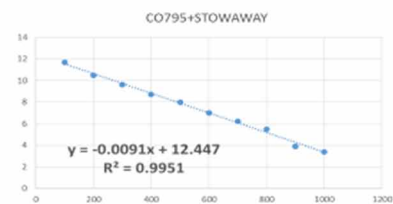
D

IRAP CO795 + CO945	pb	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
CO795+CO945 ₁	1028	*		*	*								*
CO795+CO945 ₂	942				*								
CO795+CO945 ₃	924				*							*	*
CO795+CO945 ₄	896	*	*	*		*	*	*	*	*	*		
CO795+CO945 ₅	867					*							
CO795+CO945 ₆	811						*	*	*	*	*		
CO795+CO945 ₇	783						*	*	*	*	*		*
CO795+CO945 ₈	755				*								
CO795+CO945 ₉	726	*	*	*			*	*	*	*	*	*	*
CO795+CO945 ₁₀	538	*	*	*	*		*	*	*	*			
CO795+CO945 ₁₁	500	*	*	*	*			*	*	*	*	*	*
CO795+CO945 ₁₂	406	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*
CO795+CO945 ₁₃	358	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*
CO795+CO945 ₁₄	301	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*
CO795+CO945 ₁₅	207		*	*		*	*	*	*	*	*		



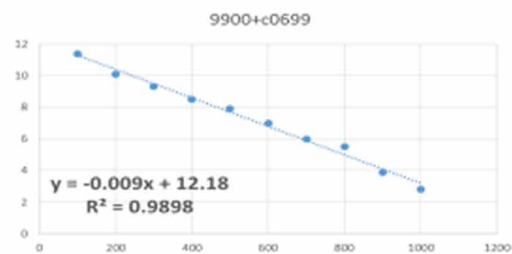
E

IRAP CO795 + Stowaway	pb	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
CO795+Stowaway ₁	917	-					*	*	*	*	*	*	
CO795+Stowaway ₂	539	-					*	*	*	*	*		
CO795+Stowaway ₃	472	-	*	*		*	*	*	*	*	*		
CO795+Stowaway ₄	427	-		*	*	*						*	*
CO795+Stowaway ₅	406	-					*	*	*	*	*	*	
CO795+Stowaway ₆	339	-					*	*			*	*	
CO795+Stowaway ₇	250	-			*		*	*	*	*	*		
CO795+Stowaway ₈	161	-			*					*			



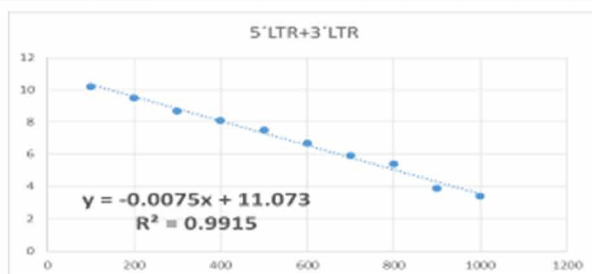
F

IRAP 9900 + C0699	pb	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
9900+c0699 ₁	908	*	*	*			*	*	*	*	*	*	
9900+c0699 ₂	797									*			
9900+c0699 ₃	742								*	*			
9900+c0699 ₄	642		*	*			*	*	*	*	*	*	
9900+c0699 ₅	531												
9900+c0699 ₆	520	*											
9900+c0699 ₇	453				*								
9900+c0699 ₈	397				*					*		*	
9900+c0699 ₉	331												
9900+c0699 ₁₀	320		*							*			
9900+c0699 ₁₁	220	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	
9900+c0699 ₁₂	197				*								
9900+c0699 ₁₃	142		*		*				*				
9900+c0699 ₁₄	87		*			*	*		*				
9900+c0699 ₁₅	76				*								*
9900+c0699 ₁₆	20	*		*									



G

IRAP	5'LTR+3'LTR	pb	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
5'LTR+3'LTR ₁	1003			*	*	*	*							*
5'LTR+3'LTR ₂	1049								*					
5'LTR+3'LTR ₃	1009										*			
5'LTR+3'LTR ₄	996							*						
5'LTR+3'LTR ₅	983								*		*			
5'LTR+3'LTR ₆	956								*					
5'LTR+3'LTR ₇	943										*			
5'LTR+3'LTR ₈	356							*			*			
5'LTR+3'LTR ₉	850							*	*					
5'LTR+3'LTR ₁₀	823										*			
5'LTR+3'LTR ₁₁	810								*					
5'LTR+3'LTR ₁₂	783							*	*					
5'LTR+3'LTR ₁₃	730												*	
5'LTR+3'LTR ₁₄	703										*			
5'LTR+3'LTR ₁₅	690		*			*			*					
5'LTR+3'LTR ₁₆	650					*	*							
5'LTR+3'LTR ₁₇	530										*			
5'LTR+3'LTR ₁₈	490											*	*	*
5'LTR+3'LTR ₁₉	450			*										
5'LTR+3'LTR ₂₀	423					*					*			
5'LTR+3'LTR ₂₁	408		*											
5'LTR+3'LTR ₂₂	356										*			*
5'LTR+3'LTR ₂₃	316													*
5'LTR+3'LTR ₂₄	290							*	*	*	*			



H

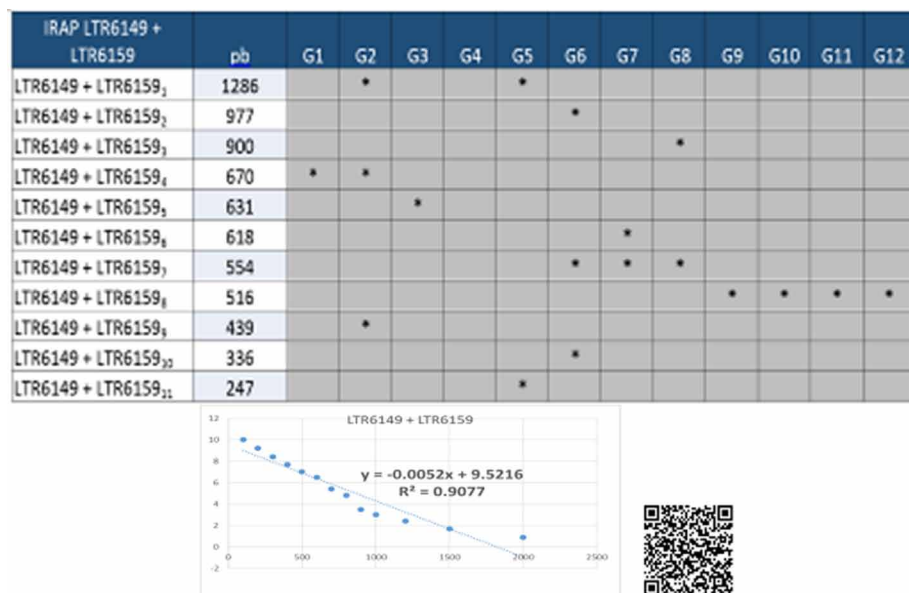


Figura 10. MIPs – Molecular Identification Profile / Perfis de Identificação Molecular para dos 12 PEs de citros (G1-G12). LTR = Long terminal repeats. Asteriscos verdes = 14 bandas selecionadas pelo software GENES. Asteriscos azul-claro, bandas selecionadas pelo software “R”. Curva de logaritmo: para identificação do tamanho correto do fragmento em pb = pares de base e QR codes correspondentes. Hífen = amostras não aplicadas via PCR.

Em nosso estudo, as 124 marcas polimórficas foram capazes de mostrar que existe variabilidade genética entre os 12 PEs de citros. Isso é importante, pois o avanço da citricultura brasileira precisa ter respaldo de uma base genética de PEs mais ampla de forma a melhor contornar os fatores bióticos e abióticos que mais afetam a cultura.

Os *fingerprints* apresentados poderão servir para agregar mais informações destes 12 PEs junto ao MAPA e em casos de contestação de idoneidade. O software medcalc (https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php) poderá ser usado para fornecer a estatística quanto a sensibilidade, especificidade, *likelihood ratio* (positivo ou negativo) e acurácia das bandas neste conjunto de genótipos.

Conclusão

Há variabilidade genética entre os 12 PEs de citros estudados.

Foi possível gerar o *fingerprint* genético de 12 porta-enxertos de citros por meio da combinação de oito primers IRAP e desta forma, agregar valor às informações agrônômicas.

Por meio das análises com base na genotipagem foi possível identificar 14 bandas polimórficas entre as combinações de primers utilizados e pelo menos um primer capaz de fornecer informações que possibilite a discriminação entre os PEs.

Acredita-se que esta análise de *fingerprint* fornecerá suporte aos melhoristas de citros, garantindo a identidade genética dos PEs avaliados e contribuindo para informações adicionais junto ao MAPA.

Referências

- ABEDINPOUR, H.; RANJBAR, G. A.; JELODAR, N. B.; GOLEIN, B. Evaluation of genetic diversity in citrus genotypes by IRAP molecular markers. **International journal of Farming and Allied Sciences**, v. 3, n. 2, p. 230-234, 2014.
- BASIRNIA, A.; DARVISHZADEH, R.; ABDOLLAHI MANDOULAKANI, B. Retrotransposon insertional polymorphism in sunflower (*Helianthus annuus* L.) lines revealed by IRAP and REMAP markers, **Plant Biosystems**, v. 150, n. 4, p. 641-652, 2016.
- COSTA, P. S.; RIBEIRO, L. O. R.; COELHO FILHO, M. A.; LEDO, C. A. S.; STUCHI, E. S.; GIRARDI, E. A.; GESTEIRA, A. S.; SOARES FILHO, W. S. Non-parametric indices for the selection of hybrid citrus and rootstocks grafted with 'Valencia' sweet orange. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 55, p. 1592, 2020.
- COSTA, P. D.; STUCHI, E. S.; GIRARDI, E. A.; MOREIRA, A. S.; GESTEIRA, A. S.; COELHO FILHO, M. A.; LEDO, C. A. S.; SILVA, A. L. V.; LEÃO, H. C.; PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. S. Less is more: A hard way to get potential dwarfing hybrid rootstocks for Valencia sweet orange. **Agriculture**, v. 11, n. 4, p. 324, 2021.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes**: aplicativo computacional em genética e estatística. Editora UFV, Viçosa, 442 p, 2016.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v.12, n.1, p.13-15, 1990.
- FAO. **Faostat Statistical Database**. [Rome] :FAO January, 2022, Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>. Acesso em: 05 jan. 2022.
- FERREIRA, C. F.; GUTIERREZ, D. L.; KREUZE, J. F.; ISKRA-CARUANA, M. L.; CHABANNES, M.; BARBOSA, A. C. O.; SANTOS, T. A.; SILVA, A. G. S.; SANTOS, R. M. F.; AMORIM, E. P.; OLIVEIRA, S. A. S. DE; JESUS, O. N. DE. Rapid plant dna and rna extraction protocol using a bench drill brief note. **Genetics And Molecular Research**, v. 18, n.3, 2019.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p.220. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).

GHONAIM, M.; KALENDAR, R.; BARAKAT, H.; ELSHERIF, N.; SHRY, N.; SCHULMAN, A. H. High-throughput retrotransposon-based genetic diversity of maize germplasm assessment and analysis. **Molecular Biology Reports**, v. 47, p. 1589-1603, 2020.

IBGE. **Sidra**: produção agrícola municipal, 2022. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457>. Acesso em: 05 jan. 2022.

KALENDAR, R.; SCHULMAN, A. H. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. **Nature Protocols**, v. 1, p. 2478-2484, 2006.

KALENDAR, R.; FLAVELL, A. J.; ELLIS, T.; SJAKSTE, T.; MOISY, C.; SCHULMAN, A. H. Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. **Heredity**, v. 106, p. 520-530, 2011.

KORDROSTAMI, M.; RAHIMI, M. **Molecular markers in plants: concepts and applications**. Genetics in the 3rd Millennium, v. 13. n. 2, 2015.

LAURENTIN, H. Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 56, n. 2, p. 277-292, 2009.

LOPES, J.M.S ; DÉO, T.F.G ; ANDRADE, B.J.M; GIROTO, M.; FELIPE, A.L.S.; JUNIOR, C.E.I.; BUENO, C.E.M.S. ; SILVA, T.F. ; LIMA, F.C.C. Importância econômica do citros no Brasil. Revista Científica Eletrônica de Agronomia, v.10, n.20, Dez., 2011. Disponível em: http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/RtmuqxyLi4i5jUH_2013-5-17-17-13-31.pdf. Acesso em: 05 jan. 2022

MINGOTI, S. A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada**. Belo Horizonte: UFMG, 2005. 295 p.

OLIVEIRA, R. P. DE; SOARES FILHO, W. DOS S.; PASSOS, O. P.; SCIVITTARO, W. B.; ROCHA, P. S. G. DA. **Porta-enxertos para citros**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008. 47 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 226).

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: **a language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2016.

STATISTICA for Windows. Computer program manual. Version 6. Tulsa: Statsoft, 2002.1, CD-ROME.

SANTOS, M. G.; PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. S.; GIRADI, E. A.; GESTEIRA, A. S.; FERREIRA, C. F. Variability analysis of 'Persian' acid lime tree selections using agronomic and molecular markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 4604-4614, 2013.

TORRE, M. C. P. Construction of a molecular identification profile of new varieties of *Nierembergia linariaefolia* by anchored microsatellites. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, n.3, p. 240-252, 2006.

ZAYAT, M.; HASSAN, A. H.; NISHAWAY, E.; ALI, M.; AMAR, H. Patterns of genetic structure and evidence of Egyptian Citrus rootstock based on informative SSR, LTR-IRAP and LTR-REMAP molecular markers. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, n. 29, p. 1-14, 2021.



Mandioca e Fruticultura



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL