

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE
UMA POPULAÇÃO DE TANGERINEIRAS HÍBRIDAS DE 'CLEMENTINA FINA'
(*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) e 'MONTENEGRINA' (*Citrus deliciosa* Ten.)

Roberto Luis Weiler
Engenheiro Agrônomo/UFRGS

Dissertação apresentada como um dos
requisitos à obtenção do Grau de
Mestre em Fitotecnia
Área de Concentração Horticultura

Porto Alegre (RS), Brasil
Março de 2006

Folha das assinaturas

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Dr. Sergio Francisco Schwarz e à Dr.^a Maria Teresa Schifino-Wittmann, pesquisadores dedicados e que não mediram esforços para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul por possibilitar a realização desta pós-graduação e ao órgão de apoio financeiro CAPES pelo suporte financeiro.

Aos professores, colegas, e funcionários do Departamento de Horticultura e Silvicultura, pela colaboração.

Ao Laboratório de Biotecnologia do Centro APTA Citros Dr. Sylvio Moreira – IAC (Cordeirópolis, SP), em especial ao Dr. Marcos Antônio Machado e a Dr.^a Marines Bastianel. Ao Laboratório de Citogenética do Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Aos bolsistas de Iniciação Científica Carol, João Paulo e Juliana, e aos colegas de mestrado, Eduardo e Flávia.

Ao coleguismo de André (Negão), Bernadete (Dete), Claiton (Zanini) e Igor, com os quais estudei desde a graduação até o mestrado.

Aos componentes da banca Dr.^a Fernanda Bered, Dr. José Fernandes Barbosa Neto e ao Dr. Paulo Vitor Dutra de Souza.

A minha namorada Salete Luciana de Oliveira pela compreensão e companheirismo, aos meus irmãos Celson, André e Fábio, pela parceria e aos meus pais Lírio e Elaine pelos valores, princípios e conhecimento a mim passados.

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, CITOGENÉTICA E MOLECULAR
DE UMA POPULAÇÃO DE TANGERINEIRAS HÍBRIDAS DE
'CLEMENTINA FINA' (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) e 'MONTENEGRINA'
(*Citrus deliciosa* Ten.)¹**

Autor: Roberto Luis Weiler

Orientador: Sergio Francisco Schwarz

Co-Orientadora: Maria Teresa Schifino- Wittmann

RESUMO

A produção citrícola se encontra dispersa por todos os continentes e no Brasil, os citros são a produção frutícola de maior volume de produção. A produção de citros de mesa, como as tangerinas, possibilita ao produtor obter maior valor pelo seu produto. O mercado consumidor é ávido por novas variedades e para tanto, um programa de melhoramento deve estar sempre em busca de genótipos que atendam ao mercado consumidor, bem como a cadeia produtiva. Na Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, está localizada uma população de tangerineiras híbridas oriundas do cruzamento da tangerineira 'Clementina Fina' (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) e 'Montenegrina' (*Citrus deliciosa* Ten.) a qual foi caracterizada neste estudo, avaliando-se características morfológicas de acordo com os descritores propostos pelo International Board for Plant Genetic Resources, além da identificação da época de maturação, viabilidade de pólen, número cromossômico e caracterização molecular, utilizando marcadores do tipo microssatélites. Através da análise morfológica foi possível distinguir todas as 96 plantas avaliadas, porém não foi possível agrupar a F1 em grupos distintos de cada um dos genitores. A época de maturação de frutos das plantas se concentra entre a primeira quinzena de abril até a primeira quinzena de agosto. Todas as plantas analisadas apresentaram um alto grau de viabilidade de pólen, variando entre 79,04 e 98,08 %. Todas as plantas avaliadas são diplóides com um número cromossômico de $2n=18$. Utilizando 12 pares de *primers* de microssatélites foi possível diferenciar 90 acessos do estudo, e agrupar a F1 em indivíduos mais próximos do genitor feminino e do genitor masculino. O PIC (Conteúdo de Informação de Polimorfismo) dos *primers* variou de 0,27 a 0,65. Não foi possível estabelecer uma relação entre a caracterização utilizando marcadores morfológicos e a caracterização utilizando marcadores moleculares.

¹Dissertação, em Fitotecnia Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (67p.) Março, 2006.

**MORPHOLOGICAL, CYTOGENETIC AND MOLECULAR
CHARACTERIZATION OF A POPULATION OF HYBRID TANGERINES OF
'CLEMANTINA FINA' (*Citrus clementina* Hort. ex Tan) AND
'MONTENEGRINA' (*Citrus deliciosa* Ten.)¹**

Author: Roberto Luis Weiler
Adviser: Sergio Francisco Schwarz
Co-Adviser: Maria Teresa Schifino- Wittmann

ABSTRACT

Citrus production is widespread all over the world and in Brazil it represents the major volume of fruit production. Production of fresh fruit, as tangerines, allow the farmer to obtain a better value for the product. The consuming market is keen for new varieties and a breeding program should be always searching for genotypes that satisfy the market as well as the productive chain. At the Agronomic Experimental Station of Federal University of Rio Grande do Sul there is a population of hybrid tangerines, as result of crosses between 'Clementina Fina' (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) and 'Montenegrina' (*Citrus deliciosa* Ten.). In this study, this population was characterized using the morphological descriptors proposed by the International Board for Plant Genetic, besides other characteristics such as ripening period, pollen viability, chromosome number and a molecular characterization with SSR markers. It was possible to distinguish all the 96 evaluated plants by the morphological descriptors, but it was not possible to separate the F1 in groups distinct from the parents. Ripening occurred between mid April and mid August. All the analyzed plants had a high pollen viability, ranging from 79.04% to 98.08%. All plants are diploid, with $2n = 18$. By using 12 pairs of primers it was possible to differentiate 90 of the analyzed accessions and group F1 individuals closer to the female and male parents. The PIC (polymorphism information content) ranged from 0.27 and 0.65. It was not possible to establish a relation between the morphological and the molecular characterizations.

¹Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (67p.) March, 2006.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Melhoramento.....	7
2.2. Marcadores Morfológicos.....	9
2.3. Citogenética	11
2.4. Marcadores Moleculares.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. População Analisada.....	18
3.2. Análise Morfológicas.....	19
3.3. Análise Citogenéticas.....	25
3.4. Análise Moleculares.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1. Análise Morfológica.....	30
4.2. Análise Citogenética.....	36
4.3. Análise Molecular.....	40
4.4. Análise Morfológica x Molecular.....	50
5. CONCLUSÕES.....	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
7. APÊNDICES.....	59

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Relação das 52 plantas híbridas de ‘Clementina Fina’ e ‘Montenegrina’ com as suas respectivas porcentagens de viabilidade de grãos de pólen em 2004.....	38
2. Relação das seqüências iniciadoras (<i>primers</i>) com respectivas repetições amplificadas.....	40
3. Relação das seqüências iniciadoras e respectivos números de fragmentos amplificados.....	41
4. Valores do Conteúdo de Informação de Polimorfismo (PIC), por loco.....	47
5. Perfil Molecular para Discriminação de 96 acessos.....	48

RELAÇÃO DE QUADROS

	Página
1. Descritores morfológicos de folhas e plantas cítricas, utilizados para diferenciação da população de híbridos e seus genitores (IPGRI, 1988).....	20
2. Descritores morfológicos de frutos de plantas cítricas, utilizados para diferenciação da população de híbridos e seus genitores (IPGRI, 1988).....	24
3. Época de maturação de 66 plantas oriundas do cruzamento de ‘Clementina Fina’ e ‘Montenegrina’ EEA/UFRGS, Eldorado do Sul/RS, 2005.....	34

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Pomar de híbridos, vista geral (A) e detalhe da variabilidade morfológica entre plantas (B). EEA/UFRGS, Eldorado do Sul/RS, 2005.....	19
2. Exemplo de alguns descritores utilizados na caracterização morfológica.....	22
3. Folhas de quatro híbridos (A) E 06, (B) E 07, (C) E 09 e (D) E31. EEA/UFRGS, Eldorado do Sul/RS, 2005.....	31
4. Dendograma com 96 acessos, gerado através do programa NTSYS, utilizando marcadores morfológicos.....	33
5. Grão de pólen “gigante” comparado com grão de pólen normal, corados com carmim propiônico.....	37
6. Grão de pólen viável e grão de pólen não viável, corados com carmim propiônico.....	37
7. Célula somática do tapeto da planta F17 da população de tangerineiras híbridas, apresentando número cromossômico $2n=18$	39
8. Diacinese da planta E19 da população de tangerineiras híbridas, apresentando 9 bivalentes, corados com carmim propiônico	39

9. Amplificação de oligonucleotídeos iniciadores “Primers”, com as tangerineiras ‘Clementina Fina’ e ‘Montenegrina’.....	41
10. Gel de agarose a 3%, revelando teste de cinco <i>primers</i> com os genitores, destaque na amplificação com <i>primer</i> 18, um dos selecionados para serem utilizados em toda população.....	42
11. Gel de agarose a 3%, revelando 12 híbridos amplificados com primer 18.....	43
12. Dendograma com 96 acessos, gerado através do programa NTSYS.....	44

1. INTRODUÇÃO

A produção de frutas cítricas se encontra dispersa por todos os continentes do mundo, estando a maior produção localizada entre 20° e 40° de latitude, incluindo nessa faixa grande parte do Brasil.

A citricultura é o principal cultivo frutícola mundial com uma produção de cerca de 104 milhões de toneladas em 2004, sendo o Brasil responsável por cerca de 19% desta produção com aproximadamente 20 milhões de toneladas (FAO, 2005).

Aproximadamente 90% da produção brasileira, ou seja, cerca de 17 milhões de toneladas das frutas é de laranjas, a grande maioria dessas, de laranjas para produção de suco (Centro de Citricultura, 2001). As exportações brasileiras de suco de laranja concentrado congelado, e de suco natural, ultrapassaram um total de 1,3 milhões de toneladas no ano de 2002, somando um total de faturamento de mais de um bilhão de dólares americanos (FAO, 2005).

As tangerineiras são responsáveis por cerca de 10% (2,0 milhões de toneladas) do total de produção de citros no país, e o Rio Grande do Sul possuía, em 2003, uma área cultivada com tangerineiras de 13.063 hectares, onde foram produzidas 171.781 toneladas da fruta, sendo o terceiro maior produtor do Brasil (IBGE, 2005).

O comércio de frutas *in natura* apresenta uma maior rentabilidade, devido ao valor conseguido na comercialização. No Rio Grande do Sul e Santa Catarina as plantas cítricas encontram as melhores condições edafoclimáticas do país para produção de

frutas de maior qualidade, com excepcional qualidade em termos de cor (ótima pigmentação) e qualidades físico-químicas (equilíbrio sólidos solúveis totais/acidez) (Koller, 1994).

A principal cultivar de tangerina comercializada no Rio Grande do Sul é a 'Montenegrina', a qual apresenta boa qualidade de fruto e maturação tardia, assegurando grande aceitação no mercado interno. Porém, devido ao seu excessivo número de sementes, não atende aos padrões de exigência do mercado internacional, sendo necessários maiores investimentos em programas de melhoramento genético desta característica.

As perspectivas para o incremento da citricultura no Rio Grande do Sul são boas, pois existem grandes áreas com clima e solos favoráveis, ainda os custos de produção são baixos, havendo um amplo parque industrial de sucos e um sólido mercado interno de frutas de mesa, além de um grande mercado nacional potencial para o consumo de tangerinas.

Para o estabelecimento de um programa de melhoramento consistente é importante que se conheça os recursos genéticos disponíveis. Na Estação Experimental Agrônômica da UFRGS está estabelecida uma coleção de plantas cítricas, populações de tangerineiras híbridas, a qual se devidamente caracterizada, poderá auxiliar a evitar duplicidade de materiais e no conhecimento da qualidade das frutas produzidas. Para uma caracterização completa, é importante a análise do comportamento citogenético, suas características moleculares e suas características morfológicas.

O Departamento de Horticultura e Silvicultura da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (DHS – UFRGS) desenvolve um programa de melhoramento genético de tangerineiras, que visa, principalmente, a obtenção de novas cultivares que apresentem boas características de fruto para consumo *in natura*,

semelhantes à tangerineira ‘Montenegrina’, com período de safra distinto desta, com aceitação tanto no mercado interno como no mercado externo, com amplo período de safra e com pouca ou nenhuma semente.

O presente trabalho teve como objetivo geral contribuir com o programa de melhoramento já existente, e por objetivo específico determinar as características morfológicas, citogenéticas e moleculares de uma população de tangerineiras híbridas de ‘Clementina Fina’ (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.), genitor feminino e ‘Montenegrina’ (*Citrus deliciosa* Ten.), genitor masculino. Identificando, desta forma, genótipos com potencial de cultivo no Rio Grande do Sul e que possam ser utilizados como genitores em futuros cruzamentos neste mesmo programa de melhoramento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A disseminação mundial de citros tem sido associada às grandes explorações e aos conflitos da história, incluindo as conquistas de Alexandre, o Grande, a dispersão do muçulmanismo e as explorações de Colombo, que trouxeram para o novo mundo as plantas cítricas (Koehler, 2001). A citricultura foi introduzida no Brasil nos primórdios do descobrimento, pelos primeiros colonizadores, no atual estado da Bahia (Koller, 1994). No Rio Grande do Sul a introdução da citricultura ocorreu primeiramente no Vale do Rio Taquari e depois no Vale do rio Caí, por imigrantes açorianos e seus descendentes que haviam se instalado em Taquari e Triunfo por volta do século XVIII (Dornelles, 1969, citado por EMATER, 2002).

Os citros são plantas dicotiledôneas pertencentes à família Rutaceae, subfamília Aurantioideae, tribo Citreae e subtribo Citrinae, esta contendo 13 gêneros, incluindo *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus*, os quais têm importância econômica no Brasil. Swingle, em 1943, dividiu o gênero *Citrus* em 16 espécies, incluindo as tangerineiras ‘Montenegrina’ e ‘Clementina Fina’ em uma mesma espécie: *C. reticulata* Blanco. Em outra classificação, feita por Tanaka, em 1961, as tangerineiras foram classificadas em várias espécies, a ‘Montenegrina’ pertencendo à espécie *C. deliciosa* Ten. e a ‘Clementina Fina’ a espécie *C. clementina* Hort. ex Tan. (Bruckner, 2002). A classificação de Tanaka é a mais utilizada atualmente.

Acredita-se que as espécies do gênero *Citrus* são nativas das regiões tropicais e subtropicais da Ásia e do Arquipélago Malaio, mais especificamente do sudeste da Ásia, desde a Arábia oriental até o leste das Filipinas, e do sul do Himalaia até a Indonésia e norte da Austrália. Evidências recentes sugerem que a Província de Yunnan, no centro-sul da China, teria grande importância devido à diversidade das espécies ali encontradas e ao sistema de rios que poderiam ter facilitado a dispersão para o sul (Davis & Albrigo, 1994; Moreira & Moreira, 1991).

As tangerineiras e seus híbridos apresentam, geralmente, grande resistência ao frio quando comparadas com as outras espécies e variedades cítricas cultivadas comercialmente. Entretanto seus frutos sofrem maiores danos com geadas do que a maioria das laranjeiras e pomeleiros (Pio, 1992). A maioria das variedades de tangerineiras apresenta um curto período de safra e também são bastante delicadas ou sensíveis ao manuseio durante a colheita, armazenamento e transporte. A casca dos seus frutos é frágil e sensível às injúrias, com tendência a tornar-se fofa, enquanto internamente a polpa torna-se menos suculenta, havendo ainda diminuição de acidez (Pio, 1992).

No Rio Grande do Sul a área plantada com tangerineiras é de cerca de 13 mil hectares. A cultivar ‘Montenegrina’, também conhecida como bergamota ‘Montenegrina’, tem significativa fatia do mercado. A sua maturação tardia, de agosto a outubro (Sartori et al., 1998), sua boa qualidade organoléptica e firmeza de fruta assegura grande valorização no mercado (Miozzo et al., 1992). A tangerineira ‘Montenegrina’ foi descoberta em 1940, no município de Montenegro, RS, surgida por mutação espontânea (Kautzmann, 1982).

As variedades mais recomendadas para o Estado são ‘Clementina’, ‘Lee’, ‘Mexerica do Rio’ (Caí), ‘Ponkan’, ‘Murcott’ e ‘Montenegrina’ (Koller, 1994). Em

levantamento da fruticultura comercial do Rio Grande do Sul no período de 2003 - 2004 são destacadas como as principais cultivares em âmbito estadual as tangerineiras ‘Okitsu’, ‘Caí’, ‘Ponkan’, ‘Pareci’, ‘Montenegrina’ e ‘Murcott’, sendo a primeira a mais precoce e a última a mais tardia (EMATER, 2004).

Apesar da oferta no mercado de outras tangerinas no período de março a julho, há espaço (interesse econômico) para se obter cultivares com a qualidade e o sabor semelhantes à cv. Montenegrina, mas com época de maturação distinta desta.

A citricultura no Rio Grande do Sul é uma atividade basicamente de pequenas propriedades rurais e conseqüentemente de pequenos pomares, com média de dois hectares cada (Koller, 1994). Sendo assim, é indiscutível a importância sócio-econômica da citricultura, inclusive da produção de tangerinas, servindo de alternativa de produção e exercendo importante papel de fixação do homem no campo. De acordo com dados da EMATER (2002), no ano de 1999 foram contabilizados no Rio Grande do Sul 18.837 produtores de laranjas, 5.298 de tangerinas e 683 de limões.

O clima e a estrutura fundiária do Rio Grande do Sul são favoráveis à produção de frutos de mesa de alta qualidade, no entanto a produção de citros para o Estado é insuficiente para atender o mercado interno (EMATER, 2002). Na década de 20 e 30 o Estado chegou a exportar frutos para o Uruguai e Inglaterra, entretanto houve uma diminuição do cultivo causada pela paralização das exportações devido à 2ª guerra mundial e à moléstia “tristeza” (Koller, 1994).

Calcula-se que cerca de 50% dos citros comercializados no Rio Grande do Sul têm sido importados de outros estados do Brasil, do Uruguai e até da Espanha. Grande parte dos frutos cítricos importados entram no Estado nos períodos onde a oferta é insuficiente para abastecer o mercado interno, como ocorre com algumas tangerinas e

laranjas que são comercializadas nos primeiros e últimos meses do ano (Bastianel, 1999).

2.1 - Melhoramento

A disponibilidade restrita de material genético selecionado é uma das principais limitações ao desenvolvimento da cultura de citros de mesa. Nos últimos anos, borbulhas das cultivares apirênicas de laranjeiras ‘Lane Late’, ‘Navelate’, ‘Navelina’ e ‘Salustiana’ (*Citrus sinensis* (L.) Osb.), das tangerineiras ‘Clemenules’ e ‘Marisol’ (*C. clementina* Hort. ex Tan.) e ‘Okitsu’ (*C. unshiu* Marc.) e dos híbridos ‘Nova’ [*C. clementina* x (*C. paradisi* Macf. x *C. tangerina* Hort. ex Tan.)] e ‘Ortanique’ (tangor natural provavelmente entre *C. sinensis* (L.) Osb. e *C. reticulata* Blanco) foram introduzidas no país pela Embrapa - Centro de Pesquisa Agropecuário de Clima Temperado (CPACT), via programa de certificação uruguaio. Esses materiais produzem frutos sem sementes, apresentam grande aceitação no mercado internacional, e são comercializados em vários países (Radmann & Oliveira, 2003).

Para a obtenção de novas variedades deve haver diversidade, sendo que uma das possibilidades para aumentar a variabilidade existente é através de cruzamentos entre dois materiais elite. A primeira publicação sobre hibridação interespecífica no melhoramento de citros foi em 1717, onde Thomas Fair Child fez um cruzamento entre limoeiro ‘Cravo Poeta’ e o limoeiro ‘Cravo Comum’ (Allard, 1960).

No período de 1908 a 1942, os estudos para o melhoramento de citros restringiram-se à Flórida e à Califórnia, nos Estados Unidos da América. Após este período o interesse pela cultura aumentou e as pesquisas se difundiram para outros continentes (Ramos, 1990). Os trabalhos feitos por Swingle e Webber, na Flórida,

visaram a produção de variedades resistentes às doenças e com tolerância ao frio. Foram feitas tentativas de cruzamentos entre laranjeiras (*C. sinensis* (L.) Osb.) e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. para transferir resistência ao frio para a laranjeira, conseguindo-se alguns híbridos, como os citrangeiros ‘Troyer’ e ‘Carrizo’ que foram utilizados como porta-enxertos. Também foram obtidos dois cultivares, os tangeleiros ‘Sampson’ e ‘Thornyon’, através do cruzamento entre pomeleiros (*C. paradisi* Macf.) e tangerineiras (*C. reticulata* Blanco) (Cameron & Frost, 1968).

No Brasil, os trabalhos de melhoramento tiveram início por volta de 1935 na Estação Experimental do Instituto Agrônomo de Campinas, em Limeira (atualmente Cordeirópolis, SP), com trabalhos do Engenheiro Agrônomo Sylvio Moreira, realizando testes comparativos entre diferentes porta-enxertos e produção de clones nucelares (Ramos, 1990). No Rio Grande do Sul, na então Estação Experimental Fitotécnica de Taquari (hoje CPFT – FEPAGRO), com cruzamentos realizados a partir de 1956, foram obtidos mais de uma centena de citranges, que vêm sendo avaliados e testados desde 1970, sendo que atualmente alguns destes são indicados como bons porta-enxertos para a citricultura gaúcha, como o ‘C13’, ‘C37’ e ‘C41’.

A caracterização de cultivares é uma etapa essencial em programas de certificação, melhoramento e conservação de germoplasma, por permitir o monitoramento da qualidade genética (International Board for Plant Genetic Resources, 1988). Pode ser realizado com base em diferenças na morfologia das plantas, nas moléculas de proteínas e de DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1998), em características citogenéticas, agrônômicas, etc. A escolha do método de caracterização a ser utilizado dependerá das condições técnicas existentes e dos objetivos.

2.2 - Marcadores Morfológicos

Apesar de serem muito utilizados comercialmente, os citros apresentam uma taxonomia muito complexa, principalmente com relação ao número de espécies que constituem o gênero *Citrus* e gêneros relacionados. A dificuldade de se obter um sistema de nomenclatura para o gênero *Citrus* deve-se, principalmente, à facilidade de hibridação interespecífica e intergenérica, resultando em híbridos férteis ou parcialmente férteis; à frequência com que ocorre poliembrionia neste grupo e à ocorrência da apomixia em muitas espécies (Scora, 1975; Davies & Albrigo, 1994). É possível que a grande diversidade observada entre as plantas cítricas cultivadas seja oriunda de mutações e de alterações cromossômicas estruturais ancestrais, preservadas através da embrião nucelar. Outro fator que torna a taxonomia dos citros muito complexa é o fato de que características importantes para seu estudo, como tamanho, forma, cor e sabor dos frutos, assim como porte da planta, são bastante influenciados por fatores ambientais, particularmente pela luz e temperatura (Cameron & Frost, 1968).

As espécies de tangerineiras relacionadas como variedades-copa comercialmente importantes são: *C. reticulata* Blanco, *C. unshiu* Marc., *C. deliciosa* Ten., *C. clementina* Hort. ex Tan. e *C. tangerina* Hort. ex Tan. Dentre as demais espécies algumas têm importância local e, outras, como porta-enxerto, como por exemplo *C. sunki* Hort. ex Tan., *C. reshni* Hort. ex Tan. e *C. depressa* Hay. que tem sido utilizada em cruzamentos, devido a sua tolerância ao ferro, induzida em solos com pH elevado (Castle & Gmitter, 1999 citado por Mourão Filho, et al., 2002).

As várias espécies que compõem o grupo das tangerinas apresentam características hortícolas bastante variáveis. Entretanto, mostram pontos em comum, como frutos de casca solta, produção alternante, requerem tratamentos culturais especiais, são

mais tolerantes a doenças e pragas, tendo uma ampla faixa de adaptação climática e pouca capacidade de armazenamento de frutos na planta. As características mais marcantes são as necessidades de polinização cruzada, produção de frutos sem sementes, adaptação a certos tipos específicos de clima e ocorrência de monoembrionia e poliembrionia (Mourão Filho, et al., 2002).

Muitos autores investigaram e caracterizaram morfológicamente diferentes acessos de plantas cítricas, aumentando o número de genótipos possíveis de serem utilizados em programas de melhoramento ou ainda de serem lançados como variedades (Koehler-Santos et al., 2003).

As plantas cítricas têm ampla distribuição geográfica, adaptando-se a diferentes condições climáticas, o que determina comportamentos diferenciados das plantas e variações entre locais e anos, nas características fenológicas (Tonietto & Tonietto, 2005).

Caracteres como a estrutura da planta, flores, frutos e folhas são utilizados por diversos autores para descrever e caracterizar variedades distintas de tangerineiras e híbridos (Domingues et al., 1999). A caracterização morfológica consiste na adoção de descritores botânicos herdáveis, facilmente visíveis e mensuráveis, que, a princípio, são expressos em todos os ambientes (International Board for Plant Genetic Resources, 1988). Esse tipo de análise é mais simples e de menor custo, embora apresente limitações relacionadas aos caracteres que apresentam herança aditiva, os quais são altamente influenciados pelo ambiente, e às cultivares com grande semelhança fenotípica (Oliveira et al., 2000). Mesmo assim essa técnica é utilizada internacionalmente, conseguindo, em certos casos, discriminar até mesmo materiais vegetais, que não são possíveis de discriminação através de marcadores bioquímicos ou moleculares.

Num programa de melhoramento de citros é essencial a investigação dos recursos genéticos disponíveis (espécies e variedades) de modo a atender as exigências do mercado, no que se refere às características de tamanho e qualidades físico-químicas dos frutos, facilidade na retirada da casca, diminuição ou ausência total do número de sementes, expansão da época de colheita dos frutos, com preferência para colheitas precoces ou tardias, resistência à pragas, moléstias e frio.

2.3 - Citogenética

O material genético (DNA) está presente na sua grande maioria no núcleo e está arranjado em cromossomos que podem ser visíveis em etapas específicas da mitose e da meiose, e é responsável pela transmissão das características herdáveis (Sybenga, 1993). A citogenética compreende o estudo relativo ao cromossomo isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, no que diz respeito à morfologia, organização, função e replicação bem como sua variação e sua evolução (Guerra, 1988). A citogenética assume papel importante em programas de melhoramento genético de plantas, pois através dos estudos citogenéticos é possível determinar o número cromossômico, nível de ploidia, comportamento cromossômico na meiose e na mitose, fertilidade do grão de pólen, auxiliando na identificação de materiais que possam ser utilizados em cruzamentos dirigidos (Sybenga, 1993; 1998).

Os primeiros estudos do início do século XX relatavam o número cromossômico básico igual a oito ($x=8$) para citros (Krug & Bacchi, 1943). Somente mais tarde com advento de melhor aparelhagem e técnicas mais apuradas foi possível verificar que estas observações anteriores não eram corretas, provavelmente em função do tamanho diminuto dos cromossomos.

As plantas cítricas pertencentes à família Rutaceae, subfamília Aurantioideae, geralmente são diplóides, com $2n=2x=18$ cromossomos, mas também ocorrem triplóides, $2n=3x=27$ cromossomos, e tetraplóides, $2n=4x=36$ cromossomos (Raghuvanshi, 1962; Koller, 1994; Guerra et al., 1997; Oliveira et al., 2003). Desta família, o gênero *Citrus* é o mais importante economicamente, com uma alta diversidade de espécies, cultivares e clones. A variabilidade genética em *Citrus* é relacionada, além do alto número de unidades taxonômicas (espécies e híbridos), à ocorrência freqüente de mutações somáticas que resultam em variações, a partir das brotações onde ocorreram (Coletta Filho et al., 1998). Os estudos com grão de pólen podem contribuir, por exemplo, para a taxonomia (Rodrigues et al., 1998), mas são especialmente importantes para determinação de fertilidade masculina (Agarwal, 1989; Santos et al., 2002).

Estudos citogenéticos realizados em três cultivares de laranja doce (*C. sinensis* (L.) Osb.), com o objetivo de estabelecer o nível de ploidia e estudar o comportamento meiótico para verificar as possíveis causas da variação no número de sementes, mostraram que todas eram diplóides com $2n=18$ (Sellito-Boaventura & Pio, 1989).

A duplicação cromossômica espontânea é um fenômeno relativamente comum em células somáticas e gaméticas de *Citrus* e gêneros relacionados, o que pode causar mudanças no nível de ploidia para toda a progênie, seja pela reprodução sexual normal, seja pela embrionia nucelar (Iwamasa & Nito, 1988).

As características das plantas cítricas tetraplóides, originadas por fusão de protoplastos ou resultando da embriogênese nucelar, não são de interesse econômico, considerando que os frutos são maiores que o padrão requisitado pelo mercado, a planta é menor e a produção é inferior. No entanto materiais tetraplóides têm grande

importância para trabalhos de melhoramento genético, uma vez que poderão ser utilizados em cruzamentos como genitores femininos com indivíduos diplóides para produzir materiais triplóides, os quais não possuem semente (Lee, 1988; Cavalcante, 1999).

Na maioria das cultivares de citros podem ser encontrados múltiplos embriões na semente de um indivíduo, o que é chamado de poliembrião (Gurgel, 1952). Plantas cítricas monoembriônicas formam, como o nome já diz, um só embrião, em geral zigótico (sexual). Como exemplo podem ser citados a tangerineira ‘Clementina’ (*C. clementina* Hort. ex Tan.), o tangoreiro ‘Temple’ (*C. sinensis* (L.) Osb. x *C. reticulata* Blanco) e a grande maioria das toranjeiras [*C. grandis* (L.) Osb.] (Davies & Albrigo, 1994). Nas plantas poliembriônicas, além do embrião zigótico, ocorre um número variado de outros embriões que são resultado da embrião adventícia (apomixia esporofítica), sendo, portanto, clones da planta mãe.

O estudo dos grãos de pólen de citros podem contribuir para a taxonomia (Rodrigues et al., 1998), bem como para determinação da fertilidade masculina de cultivares. Estes estudos são de grande interesse e indispensáveis ao melhoramento genético. A viabilidade dos grãos de pólen apesar de ser determinada geneticamente, pode ser também influenciada pelas variações de temperatura e umidade que induzem mudanças significativas na resposta do grão de pólen.

Niedz et al. (1992) estudaram a viabilidade de grãos de pólen da tangerineira *C. tachibana* (Mak.) Tan. e demonstraram a manutenção da viabilidade de grãos de pólen estocados por até um ano à temperatura de -20°C.

2.4 - Marcadores Moleculares

O estudo com marcadores moleculares permite avaliar a variabilidade genética de uma população ao nível do DNA, permitindo também, associar as plantas em grupos por similaridade, refletindo as semelhanças, ou diferenças, entre os genótipos a partir de uma amostra direta do genoma (Graner et al., 1994). Os marcadores de DNA não são influenciados pelo ambiente e podem ser detectados em todas as fases de crescimento da planta. Tendo em vista a grande diversidade observada em plantas cítricas cultivadas, seja oriunda de mutações ou de alterações cromossômicas estruturais ancestrais preservadas através de embriões nucelar (Bastianel, 2001), é importante uma análise conjunta das características morfológicas e moleculares, essa com marcadores específicos de DNA.

Em citros, marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados em um grande número de espécies para fins de caracterização de germoplasma, estudos taxonômicos, mapeamentos e identificação de mutantes (Ruiz et al., 2000; Bastianel et al., 2001).

Com o avanço das técnicas dos marcadores moleculares a classificação sistemática se tornou mais objetiva, não permanecendo somente fundamentada na morfologia externa dos indivíduos, mas também na constituição gênica dos mesmos. O uso de marcadores moleculares tornou possível a construção de mapas genéticos para um grande número de espécies de plantas anuais e perenes, permitindo a seleção precoce de características que somente irão se expressar no estágio adulto das plantas (Grattapaglia & Sederoff, 1994).

Técnicas baseadas em restrição e hibridização de seqüências de DNA, como a “Restriction Fragment Length Polymorphism” (RFLP), têm sido empregadas em estudos

genéticos de inúmeras espécies. Em citros, a técnica RFLP foi utilizada em estudos genéticos evolutivos, caracterização de germoplasma (Federici *et al.*, 1998) e na construção de mapas de ligação do genoma juntamente com locos isoenzimáticos (Luro *et al.*, 1994).

Outros marcadores foram desenvolvidos com o advento da reação de polimerase em cadeia (PCR). A PCR permite a ampliação de regiões específicas do DNA mediante uso de pequenas seqüências de oligonucleotídeos iniciadores (*primer*) e da enzima DNA polimerase. PCR com *primers* derivados de genes com seqüências conhecidas foi utilizada para detectar polimorfismo em diversas espécies.

Uma das técnicas mais informativas na detecção de polimorfismo é o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNAs), com o uso de *primers* com seqüências de nucleotídeos arbitrária na reação de PCR é possível uma rápida e relativamente barata análise, tendo o inconveniente de ser uma técnica de difícil repetibilidade entre diferentes laboratórios (Milach, 1998). Em citros, os marcadores RAPDs foram eficientes nos estudos da diversidade genética, na análise filogenética, na identificação de plantas híbridas e nucelares em cruzamentos dirigidos, e para identificar mistura em lotes de sementes em viveiros (Bastianel *et al.*, 1998; Targon *et al.*, 1998; Coletta Filho *et al.*, 2000; Nocolosi *et al.*, 2000).

No início dos anos 80 através de diversos estudos determinou-se que o genoma dos eucariotos é constituído de 20 a 50% de DNA repetitivo, sendo o DNA altamente repetitivo mais concentrado em regiões de heterocromatina. As seqüências de DNA repetitivo mais complexas foram denominados minissatélites e outras mais simples de SSR (Simple Sequence Repeats) ou microsatélites (Tautz & Renz, 1984).

Microsatélites são seqüências de DNA moderadamente repetitivas com 1 a 13 nucleotídeos de comprimento, dispostos em “tandem” (lado a lado), onde na maioria são

repetições mono, tri, tetra e, principalmente, dinucleotídeos (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Em citros, este marcador tem sido utilizado em estudos de investigação em cultivares de laranja doce *C. sinensis* (L.) Osb., na seleção de híbridos zigóticos obtidos em cruzamentos interespecíficos e intraespecíficos, na análise filogenética de citros e gêneros relacionados, e na construção de mapas genômicos (Thomas et al. 1998; Novelli et al., 2000; Oliveira & Machado, 2000).

Os microssatélites apresentam herança mendeliana codominante e seu tamanho médio fica na ordem de 100 pb. Na reação de amplificação de SSR regiões contendo seqüências simples repetidas são amplificadas individualmente através de PCR utilizando-se um par de *primer* específicos (de 20 a 30 bases) complementares a seqüências únicas que flanqueiam o microssatélite. Segmentos amplificados a partir destes sítios muitas vezes apresentam um polimorfismo extensivo resultante da presença de diferentes números de elementos simples repetidos. Assim, cada região de microssatélites constitui um loco genético altamente variável, multialélico, de grande conteúdo informativo. Cada segmento amplificado de tamanho diferente (geralmente de várias dezenas até algumas centenas de pares de base) representa um alelo diferente do mesmo loco (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Por possuírem uma expressão codominante e multialélica, os marcadores microssatélites são os que possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo dentre os marcadores moleculares. A princípio toda e qualquer população segregante pode ser utilizada como população referência para estudo de ligação e mapeamento genético. Além disso estes marcadores são eficientes para caracterizar e discriminar populações muito relacionadas, determinando as relações genéticas entre elas (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Ruiz et al. (2000), utilizaram microssatélites para rápida identificação de plântulas de origem zigótica, dentro de um programa de melhoramento de citros. Oliveira et al. (2002), utilizaram os microssatélites associados a marcadores morfológicos para diferenciar plantas híbridas de plantas nucelares, num cruzamento entre o tangoreiro ‘Murcott’ [*C. reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osb.] e laranjeira ‘Pera’ (*C. sinensis* (L.) Osb.), sendo que a associação dos dois marcadores, morfológico e molecular, tornou a determinação mais barata e mais rápida do que a utilização somente de marcadores moleculares.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - População Analisada

As plantas utilizadas no estudo estão localizadas num pomar na Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA/UFRGS), localizada no município de Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul, à latitude 30°29'S e longitude 51°06'W.

O clima é do tipo CFa, ou seja, temperado sem estação seca definida (Köppen, 1948). As temperaturas médias anuais mínimas e máximas da região são 14°C e 24,2°C, respectivamente, com uma temperatura média anual de 19,6°C. A precipitação pluviométrica média anual é de 1398mm e a umidade relativa do ar média anual de 79% (Mota et al., 1971).

Na primavera de 1993 foram realizados cruzamentos entre as tangerineiras cv. Clementina Fina (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) e cv. Montenegrina (*Citrus deliciosa* Ten.), através de polinização dirigida em plantas do banco de germoplasma. As sementes obtidas dos cruzamentos foram colhidas e cultivadas em 1994 através de semeadura *in vitro* no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Horticultura e Silvicultura da UFRGS. No ano de 1995 as respectivas mudas foram para o campo.

As plantas permaneceram de “pé franco”, ou seja, não foram enxertadas, para que o porta-enxerto não fosse responsável por imprimir as suas características e

mascarar as características dos híbridos, totalizando 94 plantas, nas quais, no ano de 2004 e 2005, foram analisadas características morfológicas, citogenéticas e moleculares.

O espaçamento adotado entre linhas foi de seis metros e entre plantas de dois metros. A população está localizada num ambiente homogêneo quanto ao solo, temperatura, umidade, luminosidade e tratamentos fitossanitários (Figura 1), por esta razão os fatores ambientais foram desconsiderados nas análises.



Figura 1 – Pomar de híbridos, vista geral (A) e detalhe da variabilidade morfológica entre plantas (B). EEA/UFRGS, Eldorado do Sul/RS, 2005.

3.2 – Análise Morfológica

Para avaliação das características de morfologia foram seguidos os descritores para citros propostos pelo International Board for Plant Genetic Resources (1998).

As plantas foram analisadas quanto ao formato, altura, densidade de ramos, diâmetro do tronco, comprimento e formato dos espinhos (Quadro 1).

As folhas foram analisadas quanto ao tipo, cor, comprimento de pecíolo em relação ao limbo, pecíolo alado, forma do pecíolo, forma do limbo, formato da margem, comprimento total (limbo mais pecíolo) e largura (Quadro 1).

As características avaliadas nos frutos foram forma, formato da base, formato do ápice, superfície da casca, aderência do epicarpo ao mesocarpo, visibilidade das

glândulas de óleo, cor do mesocarpo (albedo), aderência de gomos, número de sementes, número de gomos por fruto, peso, altura e diâmetro.

Quadro 1 – Descritores morfológicos de folhas e plantas cítricas, utilizados para diferenciação da população de híbridos e seus genitores (IPGRI, 1988).

Caraterísticas Morfológica (Plantas e Folhas)	
I - Formato da planta	X - Pecíolo alado
1 - elipsoidal	1 - ausente
2 - esferóide	2 - estreito
3 - achatado	3 - largo
II - Altura de planta	XI - Formato do pecíolo alado
III - Densidade de ramos	1 - forma de coração
1 - esparços	2 - triangular (delta)
2 - densos	3 - oval
IV - Diâmetro de tronco	XII - Forma da folha
V - Comprimento do espinho (10 espinhos)	1 - elipse
VI - Formato do espinho	2 - ovóide
1 - curvado	3 - circular
2 - reto	4 - lanceolada
VII - Tipo de folha	XIII - Forma da margem da folha
1 - simples	1 - dentada
2 - trifoliata	2 - lisa
VIII - Cor das folhas	3 - ondulada
1 - verde clara	XIV - Comprimento da folha (folha + pecíolo)
2 - verde	XV - Largura da folha (ponto mais largo)
3 - verde escura	
IX - Comprimento do pecíolo em relação ao da folha	
1 - apéciolado	
2 - pouco pecíolo	
3 - mais comprimento que a lâmina foliar	

Para avaliação das plantas foi realizada uma visualização direta no campo observando o formato, que foi classificado em elipsóide, esferóide ou achatado; foi

medida a altura com auxílio de uma régua graduada de cinco em cinco centímetros; foi verificada a densidade dos ramos podendo ser avaliado como densos ou esparsos; com auxílio de uma trena foi medido o diâmetro do tronco cerca de 20 centímetros acima do solo; e foram coletados 10 espinhos de cada planta e destes com auxílio de um paquímetro foi feita a medição de comprimento e observando seu formato, foram classificados em curvado ou reto.

Para análise de folhas foram coletadas dez folhas adultas, sadias e que se encontravam na parte externa da copa (para que não fossem coletas folhas sombreadas com o seu tamanho alterado), onde estas foram classificadas quanto ao tipo, em simples ou trifolioladas; quanto a cor, podendo ser de verde claro até verde escuro.

Com auxílio de paquímetro foram feitas as medições de comprimento do pecíolo em relação à folha podendo ocorrer caso de, apiciolado, pouco pecíolo ou com pecíolo mais comprido que a lâmina foliar; comprimento da folha mais o pecíolo e largura da folha (feita no ponto mais largo da lâmina foliar); quanto a presença do pecíolo alado podendo ser classificado em ausente, estreito ou largo; quanto a forma do pecíolo em triangular, oval ou com formato de coração; quanto a lâmina foliar, era avaliada na forma, podendo ser classificada em elipsóide, ovóide ou lanceolada, e quanto a margem em ondulada, lisa e dentada (Figura 2).

Primeiramente o fruto foi avaliado sem o dilaceramento, onde foi possível observar forma e classificá-los em esferóides ou achatados; quanto ao formato da base, em achatada, convexa ou mamiliforme; quanto ao formato do ápice, em retilíneo ou com depressão; quanto à superfície da casca, em lisa, rugosa ou levemente rugosa; quanto à aderência do epicarpo ao mesocarpo (que indica a facilidade de descascar a tangerina) em mínima, moderada e firme; e quanto à visibilidade das glândulas de óleo, em não visível, visível e muito visível com saliência.

Para análise dos frutos foram coletados dez frutos por planta onde de cada um era comparado com o que é descrito no International Board for Plant Genetic Resources (1988) (Quadro 2 e Figura 2).

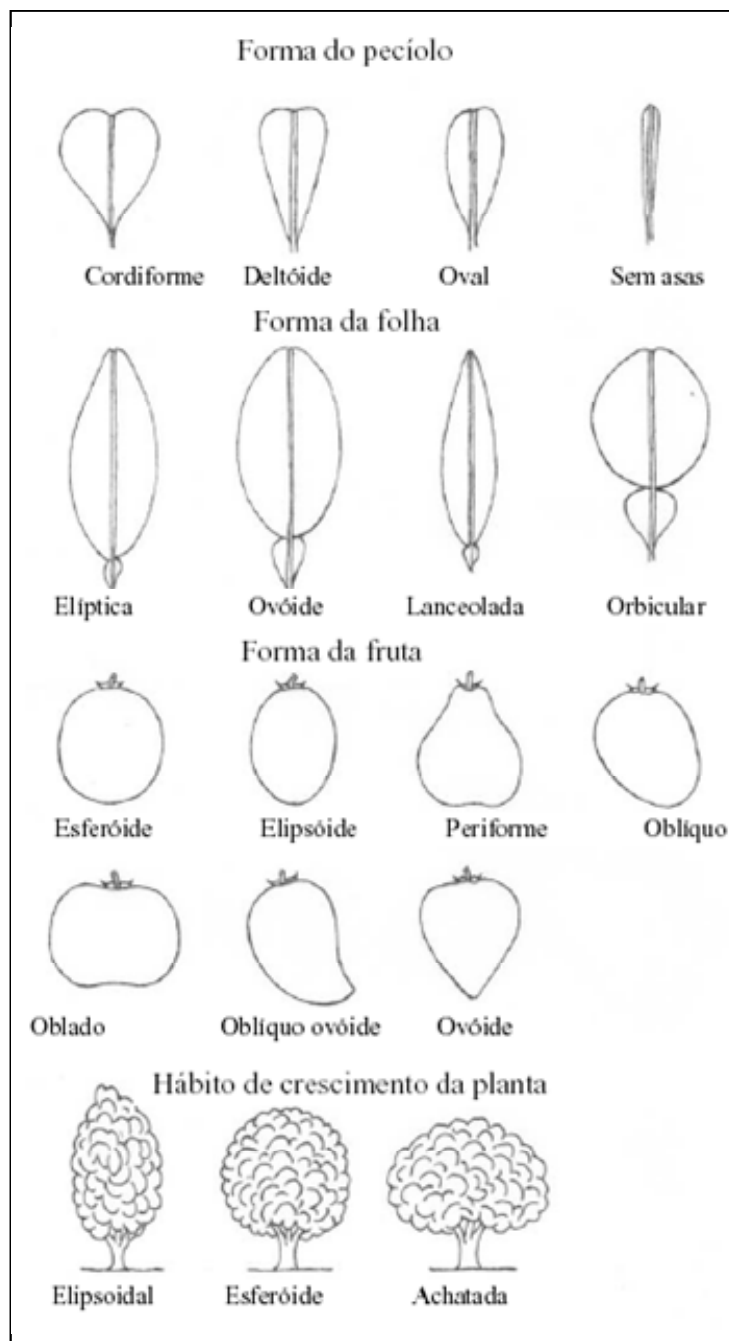


Figura 2 - Exemplo de alguns descritores utilizados na caracterização morfológica.

Quadro 2 – Descritores morfológicos de frutos de plantas cítricas, utilizados para diferenciação da população de híbridos e seus genitores (IPGRI, 1988).

Caracterização Morfológica (Frutos)	
XVI - Forma do fruto	XX - Aderência do epicarpo ao mesocarpo
1 esferóide	1 mínima
2 elipsóide	2 moderada
3 piriforme	3 firme
4 oblíquo	
5 achatado (oblado)	XXI - Glândulas de óleo
6 ovóide-oblíquo	1 não visíveis
7 ovóide	2 visíveis
8 outros	3 muito visíveis ou salientes
XVII - Forma da base	XXII - Cor do mesocarpo (albedo)
1 mamiliforme	1 branco
2 convexa	2 amarelo
3 achatada	3 outro
4 côncava	
5 côncava com colarinho	XXIII - Aderência de gomos
6 colarinho com pescoço	1 mínima
7 outra	2 moderada
	3 alta
XVIII - Forma do ápice	XXIV - Número de gomos por fruto
1 mamiliforme	
2 angular	XXV - Número de sementes
3 convexo	
4 retilíneo	XXVI - Peso dos frutos
5 com depressão	
6 outros	XXVII - Diâmetro dos frutos
IXX - Superfície da casca	XXVIII - Altura dos frutos
1 lisa	
2 rugosa	
3 aveludada	
4 manchada	
5 levemente rugosa	

Com auxílio de balança de precisão foi medida a massa do fruto, e com o auxílio de um paquímetro foram medidas a altura e o diâmetro. Após, o fruto foi descascado para observar a cor do mesocarpo (albedo) podendo ser classificado como branco ou amarelo; os gomos eram separados para quantificar a aderência podendo ser classificados em aderência mínima, moderada ou alta; fazendo-se a contagem de gomos por fruto. Finalmente, os gomos foram cortados para extração e contagem das sementes.

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o sistema de taxonomia numérica e multivariada 'Numerical Taxonomic and Multivariate Analysis System' (NTSYS) – versão 2.1. Crossa & Franco (2004), sugeriram pela primeira vez que a distância entre duas observações tendo elas medições qualitativas e quantitativas misturadas poderiam ser analisadas simultaneamente utilizando a metodologia proposta por Gower (1971). Através do programa 'Multiv' onde os dados são transformados para então serem transportados para o programa (NTSYS). Um dendograma foi construído pelo método de agrupamento através da média aritmética 'Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average' (UPGMA).

Também foi avaliada a época de maturação dos frutos das plantas que produziram nos anos de 2003 à 2005, onde foram considerados dentro do padrão de comercialização, os que tinham, no mínimo, 40% de suco do volume total, e apresentavam uma relação entre a quantidade de sólidos solúveis totais e a acidez titulável (SST/AT) entre 8 e 12 (Sartori et al., 1998). Os frutos foram coletados quinzenalmente a partir da data em que se aproximavam do seu tamanho máximo e iniciavam a mudança de cor da casca. As análises de suco foram feitas em até três dias após a data de colheita no Laboratório de Pós-colheita do Departamento de Horticultura e Silvicultura da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo que os frutos foram mantidos numa câmara de conservação a uma temperatura de cerca de 4°C.

O suco foi extraído com um espremedor elétrico com rotor e o seu volume foi medido com proveta graduada. A massa de suco foi determinada pela diferença entre a massa total de cada amostra de frutos e a massa do bagaço. A porcentagem de suco foi determinada relacionando a massa de suco extraído com a massa de cada amostra.

O teor de SST foi obtido pingando 2 a 3 gotas de suco, retiradas da amostra homogeneizada, em um refratômetro de mão, modelo 2WAJ (ABBE REFRACTOMETER). A leitura obtida foi expressa em percentagem (%) de sólidos solúveis totais no suco.

A acidez total titulável (ATT) foi avaliada por titulação com hidróxido de sódio (NaOH). Empregou-se uma amostra de 6 gramas, pesada em balança semi-analítica e diluída a 50 ml de água destilada, sob agitação constante até atingir pH 8,1. Utilizou-se um medidor de pH Digimed DM-20, provido de um termo-compensador.

O cálculo do teor de acidez foi feito aplicando a seguinte fórmula:

$$A = (V \times N \times 0,064 \times 100) / G$$

sendo:

A = acidez total em gramas % de ácido cítrico;

V = volume de hidróxido de sódio gasto na titulação, em ml;

N = normalidade do NaOH

0,064 = fator para expressar a acidez em ácido cítrico, em meq;

G = massa da amostra (6 gramas)

A relação SST/ATT foi obtida a partir das determinações anteriormente realizadas para sólidos solúveis totais (SST) e para acidez titulável total (ATT).

3.3 – Análise Citogenética

As análises citogenéticas foram realizadas no Laboratório de Citogenética do Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Foram coletados botões florais entre 2 e 5 mm, os menores para análise de número cromossômico em células-mães-de-pólen e os maiores para estimar a viabilidade de pólen (Rodrigues, 1998).

A fixação foi feita imergindo os botões florais imediatamente, no campo, em solução à base de três partes de álcool absoluto e uma parte de ácido acético glacial. Os frascos foram mantidos em temperatura ambiente por cerca de 24 horas, sendo o material transferido para álcool 70% e mantido sob refrigeração até o momento da análise.

Para preparação das lâminas, cada botão foi dissecado, com ajuda de pinça de relojoaria e agulha histológica. As pétalas foram separadas e as anteras retiradas, desprezando-se as demais partes do botão. Após, as anteras foram partidas e coradas com carmim propiônico, esmagando-se o material com espátula evitando o rompimento das estruturas e colocando-se a lamínula, vedando as laterais com luto, que consiste numa mistura de breu e cera de abelha na proporção de 1:1, e identificando-se as lâminas para posterior observação em microscópio ótico.

Para a análise de viabilidade dos grãos de pólen, foram utilizados os botões florais maiores (aproximadamente 5 mm). Para preparação das lâminas foram utilizados dois botões por lâmina e quatro lâminas por planta, sendo feita uma contagem mínima de 1000 grãos de pólen por planta, considerando-se como férteis os grãos cheios e corados, e como estéreis os enrugados e/ou incolores. Para este tipo de análise foi necessária uma padronização do estágio de desenvolvimento do pólen, para evitar diferenças devidas ao estágio de maturação do grão.

Para contagem de número cromossômico, objetivando a determinação da ploidia dos acessos, foram utilizados os botões menores (aproximadamente 2 mm), onde as lâminas foram preparadas de maneira semelhante às lâminas feitas para contagem dos

grãos de pólen, mas com maior maceração do material e pressão sobre a lamínula, à fim de permitir um bom espalhamento dos cromossomos. As fases que tiveram especial atenção para as configurações cromossômicas foram a metáfase I e disjunção em anáfase I e II. Em uma meiose espera-se observar pareamento dos cromossomos em bivalentes, portanto uma planta com 18 cromossomos apresentaria nove bivalentes nesta fase. Nas anáfases numa mesma meiose normal espera-se, em uma planta diplóide, dois conjuntos de nove cromossomos em cada pólo. Muitas vezes junto com as células em meiose é possível observar-se, nas anteras, células somáticas do tapeto, nos quais, em uma planta diplóide, seriam observados 18 cromossomos.

Avaliou-se a incidência de grãos de pólen maiores, chamados de macropólen, os quais poderiam ser indícios de gametas não reduzidos, ou seja, tratariam-se de grãos $2n$. Teoricamente plantas produtoras de gametas $2n$ poderiam posteriormente ser utilizadas em cruzamentos como genitores masculinos, visando a obtenção de plantas triplóides.

3.4 – Análise Molecular

A extração de DNA foi feita utilizando a metodologia descrita por Shillito & Saul (1988), com adaptações desenvolvidas pelo Laboratório de Biotecnologia do Centro APTA Citros Sylvio Moreira – IAC (Cordeirópolis, SP), utilizando-se sarcosyl 1% no tampão de extração, e na etapa final, sem extração com fenol, adicionando a enzima RNAase para digestão do RNA, sendo mantida a uma temperatura de 37°C por cerca de uma hora.

A quantificação de DNA foi feita em gel de agarose a 0,8%, deixando em eletroforese por cerca de um hora ou 4 cm de corrida no gel. A coloração foi realizada

com brometo de etídio e a concentração de DNA determinada por comparação com marcadores com concentração conhecida. O DNA foi mantido a uma concentração de 100 ng/ μ l e deixado em congelador a -20°C.

As reações de amplificação foram feitas utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) desenvolvidos no próprio Centro de Citricultura, por Novelli *et al.* (2000), a partir da biblioteca de DNA genômico da laranjeira doce cv. Pêra (*Citrus sinensis* [L.] Osb.), sendo as reações preparadas num volume de 25 μ l contendo 1,5 unidades da enzima Taq polimerase; 10mM de dNTP mix (dATP, dTTP, dCTP, dGTP); 2,5 μ l de tampão 10X (10 mM tris – HCl 9 pH 8,3), 50 mM de MgCl, 60 ng de cada “primer” (R e L), 100 ng de DNA genômico e H₂O autoclavada.

A reação de amplificação foi feita em termociclador MJ usando um programa com 30 ciclos de 94°C por 30 seg, 65-56°C por 30 seg (*touchdown* 0,3°C a cada ciclo) e 72°C por cinco seg. A visualização foi feita em gel de agarose a 3,0% preparado com tampão TAE (0,04M, tris acetato, 1mM de EDTA), corados com brometo de etídio (0,5 μ g/ml) e com migração no gel por cerca de 2 horas a 120 volts em cubas horizontais.

A visualização também foi feita em géis de poliacrilamida 8% corados com nitrato de prata. Os géis de poliacrilamida foram utilizados para amplificar os *primers* cujo os alelos se mostravam muito próximos (menos de 15 pb), ou quando a amplificação em gel de agarose mostrava dúvidas quanto a nitidez de bandas.

Mesmo que os *primers* tenham sido sintetizados a partir do genoma da laranjeira doce, neste estudo foram utilizados na amplificação em DNA de tangerineiras. Foram testados 84 *primers*, sendo que os testes foram feitos no genitor feminino (‘Clementina Fina’) e no genitor masculino (‘Montenegrina’), objetivando encontrar *primers* que amplificassem nos dois genitores, e com polimorfismo entre estes, selecionando

preferencialmente os que apresentavam homozigose em um genitor e heterozigose em outro.

O tamanho dos alelos em cada loco foi determinado por marcador de DNA (100 pb) e, os padrões obtidos pela amplificação, caracterizados em alelos pela presença e/ou ausência de bandas.

Os dados gerados a partir das imagens dos géis de agarose e poliacrilamida foram analisados utilizando-se o sistema de taxonomia numérica e multivariada 'Numerical Taxonomic and Multivariate Analysis System' (NTSYS) – versão 2.1, onde a matriz de similaridade foi gerada pelo coeficiente de 'Jaccard' (J). O dendograma foi construído pelo método de agrupamento através da média aritmética 'Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average' (UPGMA).

Foi calculado o Conteúdo de Informação de Polimorfismo (PIC), para cada loco, o que nos fornece uma estimativa do poder discriminativo do marcador. Para calcular o PIC, é preciso calcular a frequência alélica através de contagem direta no gel de revelação, aplicando-se a fórmula $PIC = 1 - \sum p_i^2$, onde p_i é a frequência do alelo i na população.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Análise Morfológica

Os resultados das análises morfológicas foram detalhados no Apêndice 1. Quanto ao formato da planta, 41% foram elipsoides, 54% esferóides e 5% achatadas; quanto a densidade de ramos, 8% das plantas apresentaram ramos esparços e 92% ramos densos, esta avaliação foi feita antes de ser realizada a poda de abertura das plantas. As alturas das plantas variaram de 1,30 à 4,10 m, nas plantas E07 e G01 respectivamente, e quanto à circunferência do tronco, as plantas apresentaram de 15,0 à 46,5 cm nas plantas F04 e F31 respectivamente.

O comprimento médio dos espinhos variou de 1,0 à 4,59 cm (plantas E29 e G35 respectivamente), sendo que as plantas E17, F04 e G14 não apresentaram espinhos, mesmo estas sendo de “pé franco”. As plantas genitoras não apresentavam espinhos por se tratarem de plantas enxertadas onde foram utilizadas borbulhas de plantas adultas. Em todas as plantas que apresentaram espinhos, os mesmos tinham formato retilíneo.

Analisando o tipo de folha, todas as plantas apresentaram folhas simples, o que é uma característica das tangerineiras. Para cor, 14% das plantas apresentaram folhas com coloração verde clara, 54% verde e 32% verde escura. Todas as plantas apresentaram um pecíolo curto em relação ao comprimento da folha, sendo ainda que nenhuma das plantas apresentou pecíolo alado (Figura 3).

Quanto ao formato, 76% das plantas apresentam folhas elipsóides, 9% ovóides, 2% circulares e 13% lanceoladas. Quanto a borda, 66% das plantas apresentaram folhas com as bordas dentadas, 7% lisas e 27% com as bordas onduladas. Quanto ao comprimento, as médias das folhas variaram de 4,57 até 14,48 cm (E16 e F35 respectivamente). Quanto a largura foram encontradas folhas com média de 1,61 até 4,39 cm, nas plantas E07 e G36 respectivamente.

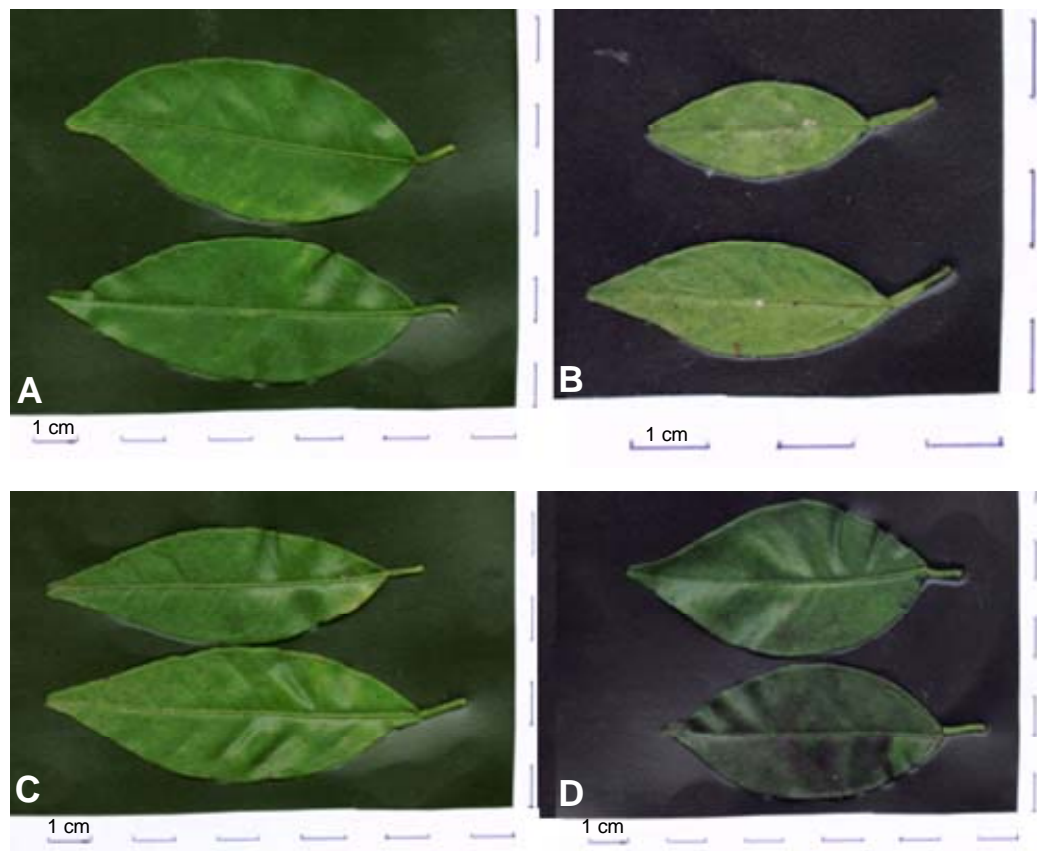


Figura 3 – Folhas de quatro híbridos (A) E 06, (B) E 07, (C) E 09 e (D) E31. EEA/UFRGS, Eldorado do Sul/RS, 2005.

Quanto aos frutos, 40% apresentaram formato esferóide e 60% achatado; 35% dos frutos apresentaram a base achatada, 35% convexa e 30% mamiliforme; 56% dos frutos analisados apresentaram ápices retilíneo e 44% convexo; 58% apresentaram casca lisa, 40% levemente rugosa e 2% rugosa; 45% dos frutos apresentaram aderência mínima do mesocarpo ao endocarpo, 38% moderada e 17% firme, implicando esta

variável na facilidade de descascar a tangerina; 45% dos frutos apresentaram glândulas de óleo da casca quase imperceptíveis, 42% visíveis e 13% salientes.

Todas as plantas avaliadas apresentaram o mesocarpo (albedo) da cor branca; 45% dos frutos apresentaram mínima aderência entre gomos, 50% aderência moderada e 5% alta; o número de gomos por fruto ficou, em média entre 8,4 e 12 para as plantas F43 e F39 respectivamente; o número de sementes ficou entre 1,0 e 33 sementes por fruto para as plantas E 21 e F38 respectivamente, destacando-se que as plantas não estão isoladas de outros pomares podendo ocorrer a polinização cruzada. O peso dos frutos ficou entre 42,6 e 165,8 g, para as plantas G22 e E14 respectivamente; o diâmetro dos frutos ficou entre 37,1 e 72,0 cm, para as plantas F15 e F20 respectivamente e a altura dos frutos ficou entre 28,2 e 62,3, para as plantas F15 e F30 respectivamente.

A partir de todos os dados morfológicos analisados, estes foram transformados através do programa Multiv utilizando o índice de Gower, para que finalmente pudessem ser utilizados pelo programa NTSYS para construção de um dendograma de similaridade (Figura 4). Neste agrupamento observa-se que as plantas E09, E19, E18, E28, G30, G36, G39 e F25 foram as que ficaram mais próximas morfológicamente ao genitor masculino 'Montenegrina', com uma similaridade de 36 a 45%. A planta E20 é a que mais se assemelha ao genitor feminino 'Clementina', mesmo assim somente com uma similaridade de cerca de 37%.

As plantas F06, G01 e G14 formaram um grupo que se distingue de todas as outras plantas, tendo uma similaridade com o restante do grupo maior de apenas 25%. Foi encontrada uma ampla variabilidade morfológica entre as plantas estudadas, sendo assim a similaridade média do grupo foi muito baixa, em torno de 35%. As plantas que mais se assemelham possuem uma similaridade de 77%. Portanto, é possível uma distinção de todas as plantas através de marcadores morfológicos.

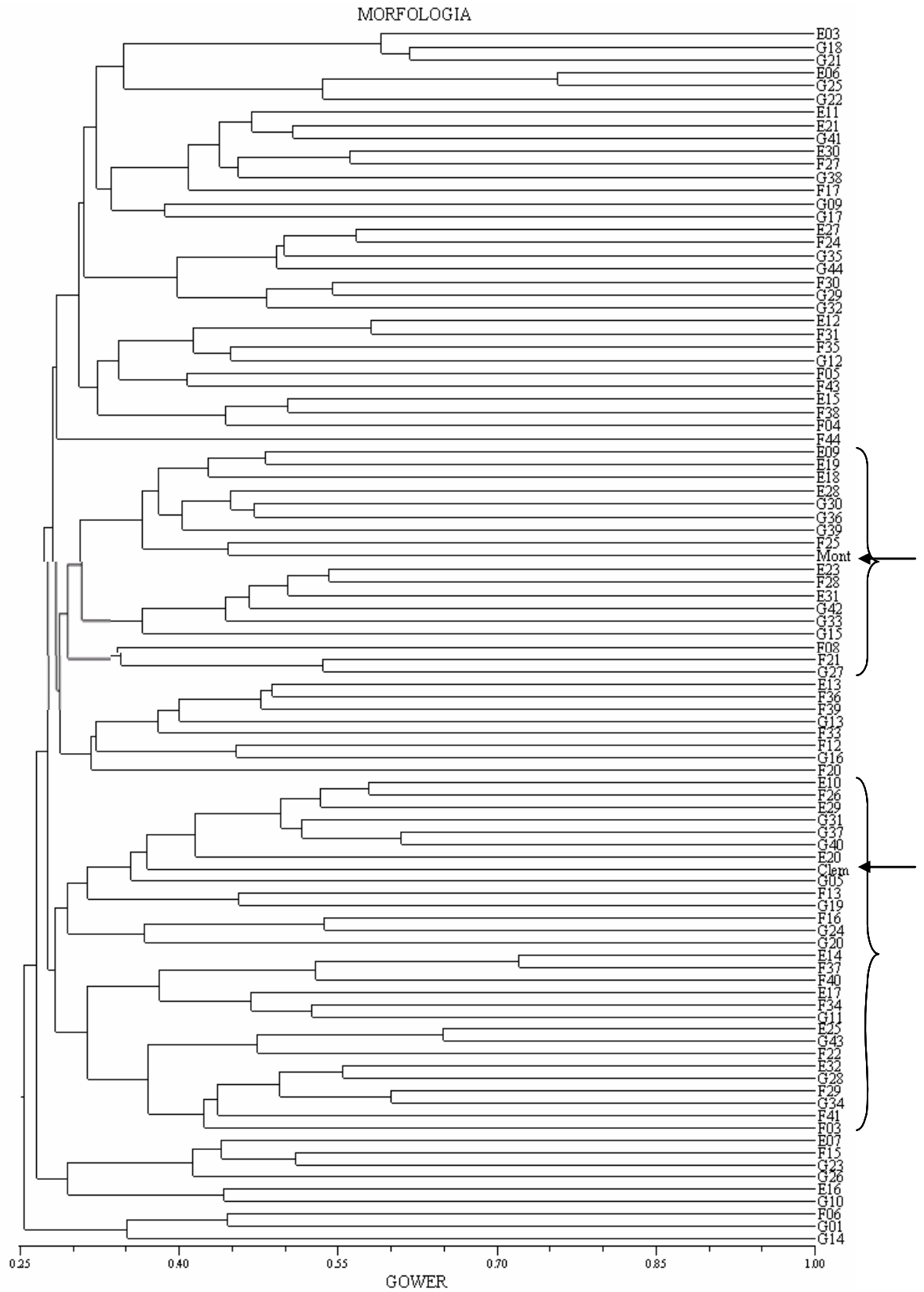


Figura 4 – Dendrograma com 96 plantas, gerado através do programa NTSYS, utilizando marcadores morfológicos.

Continuação Quadro 3.

Planta	avaliação	1ª abril	2ª abril	1ª maio	2ª maio	1ª junho	2ª junho	1ª julho	2ª julho	1ª agosto
F39*	2003-2004-2005									
F41	2003-2004									
F43	2003-2004									
F44	2003									
G01	2003-2004-2005									
G05	2004									
G09*	2005									
G11	2004-2005									
G12*	2005									
G13*	2005									
G15	2003-2004-2005									
G16	2004-2005									
G17*	2004									
G18	2003-2004-2005									
G19	2003-2004-2005									
G20*	2003-2004-2005									
G21	2003-2004-2005									
G22	2003-2004-2005									
G24*	2005									
G25*	2004-2005									
G26	2003-2004-2005									
G27	2003-2004-2005									
G29	2003-2005									
G30	2003-2004-2005									
G31	2003-2004-2005									
G32	2004									
G33	2003-2004-2005									
G34	2003-2004-2005									
G36	2004-2005									
G37*	2003-2004-2005									
G38*	2004-2005									
G39	2003-2004-2005									
G40	2004-2005									
G43	2003-2004									
G44	2004									

	Período com frutos aptos para colheita e comercialização (40% de suco e SST/AT entre 8 e 12).
	Período sem frutos aptos para colheita e comercialização.
	* Plantas com frutos que não atingiram índices de maturação próprios para a comercialização.

Observou-se que, a época de maturação dos 80 híbridos de ‘Clementina Fina’ e ‘Montenegrina’ apresentaram uma amplitude de datas de colheita entre a primeira quinzena de abril até a primeira quinzena de agosto, ou seja, cinco meses e meio, sendo que na maioria das plantas a época de maturação foi entre a primeira quinzena de maio e a segunda quinzena de junho. Porém plantas como a E06, G34 e G44 podem ser colhidas ainda na primeira quinzena de agosto.

As plantas E20, E23, E31, F05, F27, F37 e G16 foram as mais precoces, tendo início de seu período de maturação na primeira quinzena de abril. Dezoito plantas (E05, E11, E16, F09, F16, F17, F23, F36, F39, G09, G12, G13, G17, G20, G24, G25, G37 e G38) não atingiram os índices de maturação exigidos pelo comércio.

O genitor masculino 'Montenegrina' possui uma época de colheita entre agosto e outubro sendo que o genitor feminino 'Clementina Fina' possui época de colheita entre abril e maio (Sartori et al., 1998), portanto observa-se que o genitor feminino contribuiu mais para o caráter época de maturação, fato este interessante para o objetivo de obtenção de frutos aptos à comercialização em épocas distintas da tangerina 'Montenegrina'.

4.2 – Análise Citogenética

No apêndice 2 estão apresentados os resultados obtidos através da análise de viabilidade de pólen pelo teste de coloração com carmim propiônico nas 52 plantas que floresceram no ano de 2004. O número de grãos de pólen avaliados foi de 61.664. Foi observada a presença eventual de macropólen (grãos de pólen gigantes), que se apresentavam corados (Figura 5). Supõe-se que estes sejam grãos não reduzidos, ou seja, $2n$; podendo estes ser muito úteis na produção de plantas triplóides em cruzamentos (Cavalcante, 1999). A incidência destes grãos provavelmente não reduzidos foi muito baixa, inferior a 0,1%.

Todas as plantas analisadas apresentaram, em geral, alta viabilidade de pólen (Figura 6). Apenas uma (E11) apresentou de 70 a 80% de viabilidade, sete (E06; E21; E31; F08; G24; G30; e G37) apresentaram de 80 a 90%, e o restante das plantas, ou seja, 45, apresentaram mais de 90% de viabilidade (Tabela 1), indicando que todos os

híbridos analisados podem ser utilizados em futuros cruzamento como genitores masculinos.



Figura 5 - Grão de pólen “gigante” (A) comparado com grão de pólen normal (B), corados com carmim propiônico. (Escala = 10 μ m).

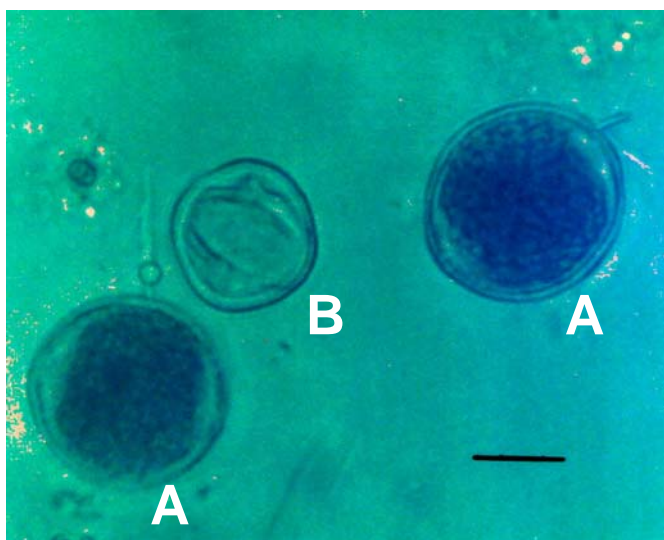


Figura 6 - Grãos de pólen viáveis (A) e grão de pólen não viável (B), corados com carmim propiônico. (Escala = 10 μ m).

Tabela 1 – Relação das 52 plantas híbridas de ‘Clementina Fina’ e ‘Montenegrina’ com as suas respectivas porcentagens de viabilidade de grãos de pólen em 2004.

Planta	% de grãos viáveis	Planta	% de grãos viáveis
E11	79,04	F39	94,94
G30	83,88	G40	95,13
E21	86,22	E14	95,17
F08	87,27	G19	95,20
E31	88,50	G18	95,38
G24	88,92	F30	95,45
E06	89,42	E20	95,52
G37	89,85	F12	95,52
E19	90,58	E15	95,59
F24	90,83	F31	95,66
F15	90,94	E23	95,90
F17	91,25	G15	95,97
G27	91,59	F39	96,11
F35	91,96	G34	96,15
E25	92,21	G21	96,32
G05	92,24	G16	96,37
G39	92,52	F25	96,40
G36	92,65	G25	96,52
G01	93,13	G22	96,60
G31	93,44	F28	96,76
G13	93,94	F27	96,90
E30	94,17	G20	96,97
G26	94,50	F16	97,05
F20	94,53	F05	97,82
F29	94,62	F22	98,01
E28	94,93	G12	98,08

Foram observados em um mesmo botão floral diversas fases da meiose, deste o início da meiose I até a fase de tétrades e de grãos de pólen. Se comparado entre plantas, o tamanho ótimo de botões para serem utilizados tinham entre 1,5 e 3 mm. Mesmo nos citros, tendo flores pentâmeras (Galleta, 1983), foram observados números diversos de anteras numa mesma flor, sendo o número sempre maior que 15.

Foram observadas, em muitos dos híbridos analisados, células somáticas do tapeto diplóides e tetraplóides (Figura 7), coincidindo estes resultados com os já

publicados por Cavalcante (1999). Todas as plantas analisadas apresentaram o mesmo nível de ploidia, ou seja, todas as plantas híbridas analisadas neste estudo são diplóides com número cromossômico $x=9$ ou $2n=18$ (Figura 8). Não foram observadas anomalias meióticas; eventualmente em algumas células foram observados cromossomos “retardatários” na fase de anáfase.

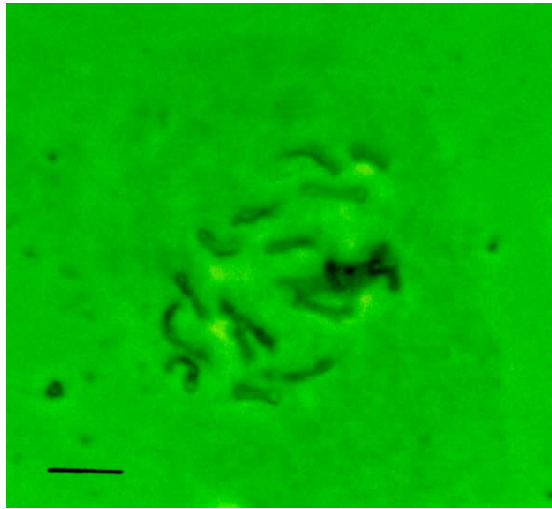


Figura 7 – Célula somática do tapeto da planta F17 da população de tangerineiras híbridas, apresentando número cromossômico $2n=18$. (Escala = $10\mu\text{m}$).

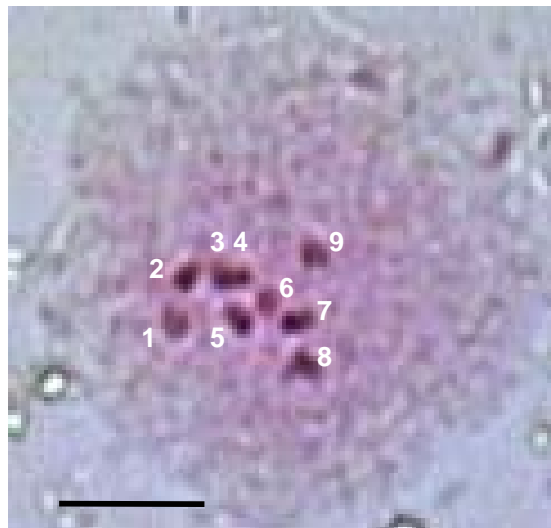


Figura 8 – Diacinese da planta E19 da população de tangerineiras híbridas, apresentando 9 bivalentes, corados com carmim propiônico. (Escala = $10\mu\text{m}$).

4.3 – Análise Molecular

De um total de 84 *primers* de microssatélites testados 43 amplificaram fragmentos num teste com os genitores feminino ('Clementina Fina') e masculino ('Montenegrina'). Porém, destes 43 *primers* amplificados somente 12 mostraram polimorfismo entre os genitores (Tabela 2 e Figura 9).

O baixo número de *primers* que amplificaram fragmentos com os genitores, possivelmente é reflexo do material a partir do qual foram sintetizados os *primers*, que é a biblioteca de DNA genômico da laranjeira doce cv. Pêra (*Citrus sinensis* [L.] Osb.). O baixo número de oligonucleotídeos iniciadores que mostraram polimorfismo se deve possivelmente à baixa diversidade genética existente entre as tangerineiras analisadas.

Tabela 2 – Relação dos *primers* com respectivas repetições amplificadas.

Primers	Repetição	Seqüências F (5' 3')	Seqüências R (5' 3')
CCSM3	(AG) _n	GCAATGCACCTTGTCATTAG	CATCACAGGCACTTATGCAG
CCSM4	(AG) _n	TTCTCCTCATCTTCGACTCC	CCGATCTTACGACGTATCAA
CCSM6	(AG) _n	ATCTGTGTGAGGACTGAA	CCTCTATTAATGTGCCTG
CCSM12	(AG) _n	GATTGAATCTTCTGTAGCTC	ATCATCATCTAGTGTCACTG
CCSM18	(AG) _n	AACAGTTGATGAAGAGGAAG	GTGATTGCTGGTGTGCGTT
CCSM28	(TGA) ₉	CTTGACATAATAGAGTGGAG	TCGTTTATGTACTCTCCATT
CCSM41	(GCAACA) ₁₀	ACAAGAGTCGCAACAATC	GACAACAGTGGCAATACC
CCSM46	(GCA) ₆ (CAA) ₈	ATACCTTATCAAGTAACACG	TCAGAATGAGTACTAGCTCC
CCSM101	(AG) ₁₂	TGTGATTACTGATTATTG	CTACTTGTATGTGCTCCT
CCSM147	(AG) ₁₈	AGACTCACGTAACCTACTTC	GCTATGTTATGATACGTCTG
CCSM150	(AG) ₁₁ N(AG) ₈	TCAGACAATGTGTTAGAGAG	TCGTTGCTACTTGTATC
CCSM170	(GA) ₂₁	AGTTGAGTACTGTGTGCGAA	CTAATGGCTGAGAGAGTTGC

As 12 combinações de *primers* utilizadas para análise de microssatélites em 94 acessos de tangerineiras geraram um total de 25 fragmentos amplificados, variando de 1 a 3 por loco, e com tamanho variando de 70 a 320 pares de bases (Tabela 3).

Analisando os dados por presença (1) e ausência (0) de alelos por loco, em cada acesso, foi gerada uma tabela (Apêndice 3), que foi utilizada para análise de agrupamentos.

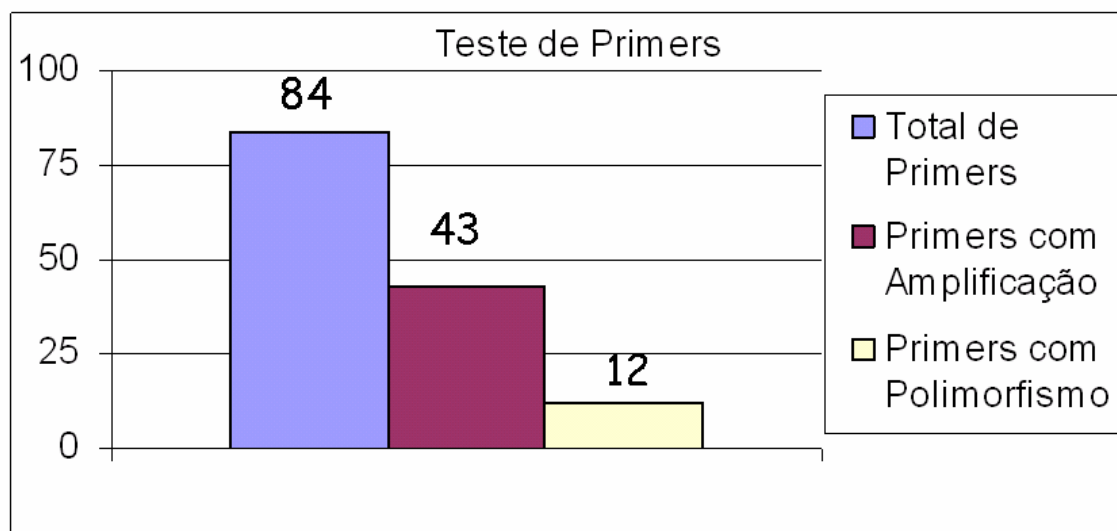


Figura 9 – Amplificação de oligonucleotídeos iniciadores “Primers”, com as tangerineiras ‘Clementina Fina’ e ‘Montenegrina’.

Tabela 3 – Relação dos *primers* e respectivos números de fragmentos amplificados.

Seqüências Iniciadoras (Primers)	Nº de Alelos Amplificados	Tamanho dos Fragmentos (pb)
3	3	215 - 270
4	2	210 - 230
6	2	230 - 270
12	2	300 - 320
18	2	205 - 220
28	3	70 - 95
41	1	70
46	2	100 - 115
101	2	110 - 120
147	2	110 - 145
150	2	130 - 170
170	2	170 - 195
Total = 25		

Mesmo que a diversidade morfológica seja ampla entre os pais, isso não reflete diretamente na diversidade avaliada pelos SSR. A diversidade genética dos citros é grande, porém a base genética das espécies economicamente importantes é estreita. O

critério de seleção dos *primers* foi amplificar alelos nos dois genitores e que preferencialmente num genitor mostrasse heterozigose para um ou outro alelo e homozigose para um dos alelos no outro genitor (Figura 10).

Para a maioria dos *primers* os alelos puderam ser separados em géis de agarose de 3% (Figura 11), porém em casos em que isso não era possível foram utilizados géis de poliacrilamida a 8%. O gel de agarose comum consegue separar fragmentos com mais de 15 pares de base de diferença, já no caso do gel de poliacrilamida é possível separar fragmentos com até um par de bases de diferença. Porém o gel de agarose é muito mais simples e barato de ser elaborado, sendo uma opção mesmo para revelar reações de microssatélites.

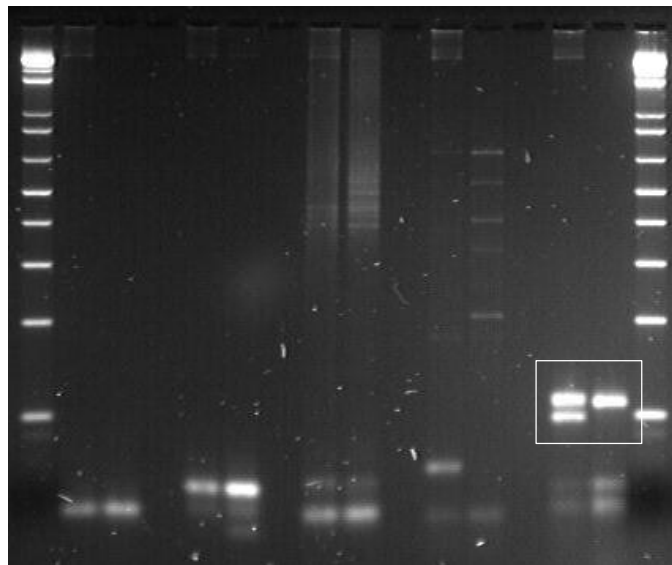


Figura 10 – Gel de agarose a 3%, revelando teste de cinco *primers* com os genitores, destaque na amplificação com *primer* 18, um dos selecionados para serem utilizados em toda população.

Utilizando os 12 *primers* selecionados, as 94 plantas do estudo, mais os seus genitores, puderam ser diferenciadas com exceção de seis plantas onde de duas a duas não puderam ser diferenciadas.

Pela análise de similaridade houve distinção de três grandes grupos: um, contendo o genitor ‘Clementina Fina’ com 32 indivíduos (34,8%); outro, contendo o

genitor ‘Montenegrina’ com 37 indivíduos (40,2%) e, um terceiro, com uma distância genética maior dos pais do que os próprios pais entre si, perfazendo 23 indivíduos (25,0%). Este comportamento é possível ocorrer em virtude da segregação transgressiva.

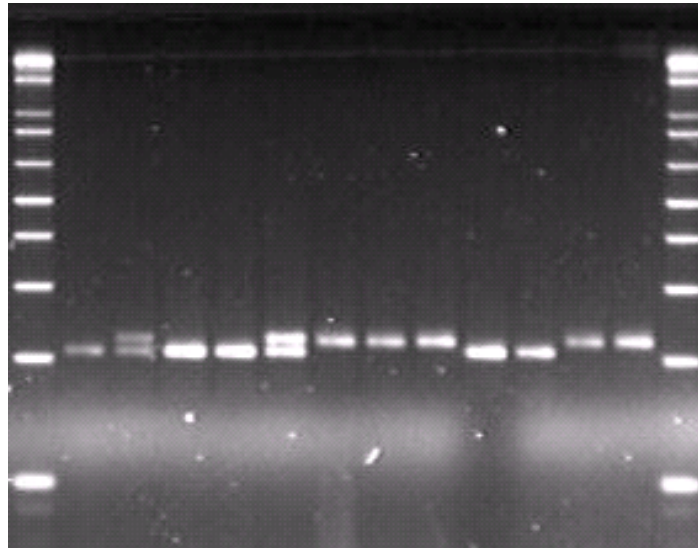


Figura 11 – Gel de agarose a 3%, revelando 12 híbridos amplificados com *primer* 18.

O agrupamento por similaridade com os pais possibilita a escolha de híbridos mais próximos das tangerineiras ‘Clementina Fina’ ou ‘Montenegrina’ em função do objetivo do programa de melhoramento.

A formação do terceiro grupo distinto indica que a constituição genética dos híbridos foi gerada pela segregação independente das marcas de microssatélites.

A cultivar Clementina Fina possui sementes monoembriônicas, pressupondo que as plântulas geradas por estas sementes sejam híbridos, pois o embrião destas sementes seria obrigatoriamente zigótico. Contudo, eventualmente pode ocorrer que mesmo de sementes monoembriônicas seja gerado um embrião nucelar, o qual seria uma cópia idêntica a planta mãe. Todos os 94 indivíduos analisados confirmaram ser híbridos, pois no dendograma de análise por similaridade (Figura 12) todos os acessos se distanciaram do genitor feminino.

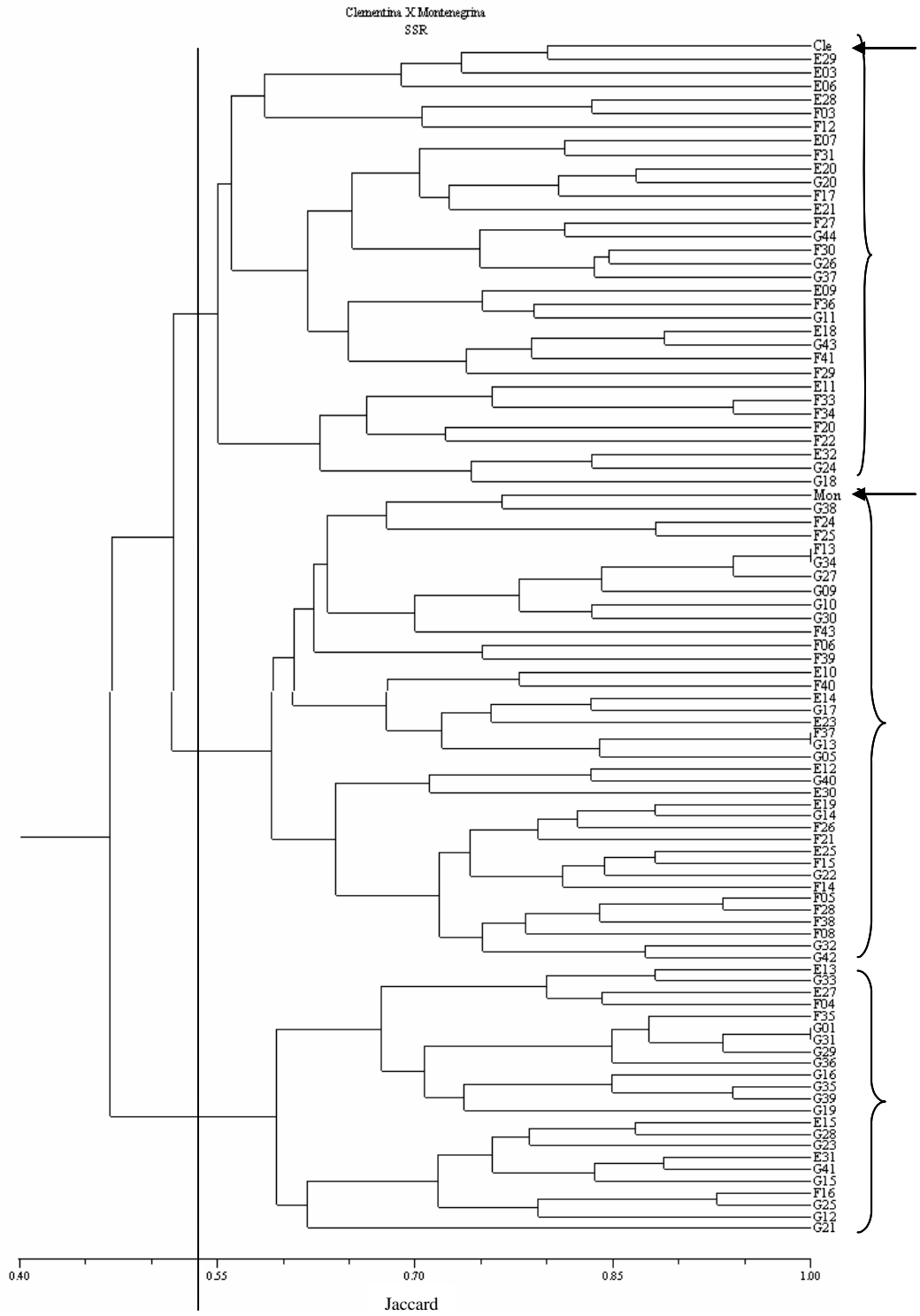


Figura 12 – Dendrograma com 96 plantas, gerado através do programa NTSYS, utilizando marcadores SSR.

Analisando-se os genitores e os híbridos observou-se uma similaridade mínima de 0,47, sendo que a maioria das plantas se manteve numa similaridade de 0,70 a 0,80, indicando um grau de similaridade de médio a alto. Estes dados estão de acordo com os obtidos por Coletta Filho et al. (1998) que, ao utilizarem RAPDs para comparar diferentes genótipos de tangerineiras, encontraram índices de similaridade (Jaccard) superiores a 0,77. Já Bastianel *et al.* (2001) analisaram as tangerineiras ‘Lee’, ‘Sunki’, ‘Ponkan’, ‘Tangerina de Umbigo’, ‘Caí’ e ‘Osceola’, e encontraram uma similaridade mínima de 0,81.

Oliveira & Radmann (2005), observaram alta similaridade genética (> 0,725), analisando as tangerineiras ‘Clemenules’ e ‘Marisol’ (*C. reticulata* Blanco), ‘Okitsu’ (*C. unshiu* Marc.) e híbridos ‘Nova’ [*C. clementina* Hort. ex Tan. X (*C. paradisi* Macf. X *C. tangerina* Hort. ex Tan.)] e ‘Ortanique’ (tangor provavelmente entre *C. sinensis* (L.) Osb. e *C. reticulata* Blanco), utilizando marcadores isoenzimáticos.

Torres et al. (1978) observaram baixo nível de polimorfismo de quatro locos isoenzimáticos entre 33 cultivares de tangerineiras. Machado *et al.* (1996) encontraram baixo polimorfismo usando marcadores do tipo RAPD entre acessos de tangerineiras do Mediterrâneo (*C. deliciosa* Ten.), sugerindo que este grupo é híbrido de tangerineira comum (*C. reticulata* Blanco). Estes autores sugerem que hibridações e mutações possivelmente foram fatores importantes na evolução destas espécies sendo responsável pela grande diversidade fenotípica encontrada neste grupo.

Behrouz et al. (2005), determinaram a variabilidade genética entre seis acessos de tangerineiras e oito acessos de laranjeiras, distinguindo-os através da utilização de marcadores do tipo SSR, sendo possível discriminar as tangerineiras, porém não sendo possível discriminar as laranjeiras, utilizando sete pares de *primers*, não refletindo a variabilidade morfológica existente.

Os indivíduos G01 e G31; F37 e G13; F13 e G34 não puderam ser distingüidos entre si pelos marcadores SSR. Os motivos que podem explicar isto são a utilização de um pequeno número de marcadores de microssatélites, sendo possível cobrir apenas uma pequena área do genoma, ou existe uma variabilidade muito pequena entre os híbridos (bases genéticas estreitas).

A descrição das seqüências iniciadoras com seu respectivo número de fragmentos amplificados e o tamanho dos fragmentos em pares de bases, é importante para estudos futuros, pois possibilita ao usuário destes *primers* saber o tamanho e o número possível de alelos que serão amplificados.

Loco é uma região específica do genoma, sendo que cada *primer* amplifica um loco e este é específico do local flanqueado por cada par de *primers*. No caso das plantas analisadas todas eram diplóides (segundo análises citogenéticas); então em cada planta poderiam ser amplificados, no máximo, dois alelos no caso de heterozigotos ou um alelo no caso de homozigotos, por *primer*.

No cálculo do Conteúdo de Informação de Polimorfismo (PIC), através da freqüência alélica, utilizando-se a fórmula $PIC = 1 - \sum p_i^2$, onde p_i é a freqüência do alelo i na população, obteve-se os valores de PIC, os quais podem variar de 0 a 1, onde 1 seria o infinito superior. Os *primers* 03; 28; 147 tiveram um valor de PIC, respectivamente de 0,65; 0,60; 0,61 (Tabela 4). Esses foram os maiores valores de marcadores deste estudo. Os três marcadores amplificaram três alelos, mostrando-se mais informativos. Os valores de PIC variaram de 0,27 do *primer* 06, até 0,65 do *primer* 03, para o marcador 41 não foi possível calcular o PIC, pois neste, houve amplificação de somente um alelo, o qual está presente sempre em homozigose ou totalmente ausente. Num estudo futuro estas informações podem ser úteis na escolha de

marcadores mais informativos, possibilitando a redução do número de reações para obter a quantidade de informação desejada.

Tabela 4 – Valores do Conteúdo de Informação de Polimorfismo (PIC), por loco.

Primer	3	4	6	12	18	28
1	0,32	0,83	0,66	0,08	0,64	0,29
2	0,23	0,17	0,34	0,52	0,36	0,05
3	0,44	—	—	—	—	0,05
Som p^2	0,35	0,72	0,73	0,60	0,54	0,40
PIC	0,65	0,28	0,27	0,40	0,46	0,60
<hr/>						
46	101	147	150	170		
0,77	0,48	0,28	0,49	0,40		
0,23	0,52	0,06	0,51	0,60		
—	—	0,06	—	—		
0,65	0,50	0,39	0,50	0,52		
0,35	0,50	0,61	0,50	0,48		

$PIC = 1 - \sum p_i^2$, onde p_i = frequência do alelo i na população.

Os *Primers* 3, 4, 6, 12, 18, 28, 46, 101, 147, 150 e 170 com os alelos numerados de 1 a 3 e as suas respectivas frequências.

Behrouz et al. (2005), utilizando marcadores do tipo microssatélites para diferenciar tangerineiras e laranjeiras determinaram o PIC para os *primers* utilizados, sendo que os valores ficaram entre 0,505 e 0,950, estes altos valores de PIC se devem principalmente ao número de alelos amplificados por loco que ficou entre três e dez, com uma média de 7,42 alelos por loco amplificado.

Foi estabelecido um perfil molecular individual (Tabela 5), objetivando diferenciar os acessos e futuramente poder servir de auxílio no caso de registro de algum dos híbridos como uma cultivar.

Tabela 5 – Perfil molecular para discriminação de 96 acessos (altura em pares de base (pb) dos alelos de cada *primer*).

	Primers											
	3	4	6	12	18	28	41	46	101	147	150	170
Alelo 1	215pb	210pb	230pb	300pb	205pb	70pb	70pb	100pb	110pb	110pb	130pb	170pb
Alelo 2	250pb	230pb	270pb	320pb	220pb	80pb		115pb	120pb	145pb	170pb	195pb
Alelo 3	270pb					95pb						
Clem.	12	11	12	12	12	12	11	12	11	12	11	12
Mont.	13	12	11	22	11	13	—	11	22	13	22	22
E03	12	12	11	22	11	12	11	11	11	12	12	11
E06	12	12	11	12	12	11	11	11	11	11	11	11
E07	13	11	12	12	12	11	11	11	22	11	22	—
E09	12	12	11	12	12	12	11	11	22	12	11	22
E10	12	11	12	22	22	12	11	11	22	12	22	22
E11	23	12	11	12	11	13	—	11	11	13	11	22
E12	23	12	12	12	—	12	—	12	11	12	22	22
E13	23	12	12	—	12	23	11	11	11	23	11	22
E14	13	11	12	12	11	12	—	11	22	12	22	22
E15	13	11	12	22	11	23	11	11	11	23	22	22
E18	23	12	12	12	22	12	11	12	22	12	11	22
E19	13	12	12	12	12	11	—	11	11	11	22	11
E20	23	11	11	22	22	11	11	12	22	11	11	11
E21	23	11	11	22	11	11	11	11	22	11	11	22
E23	13	11	12	22	11	12	11	11	22	12	22	11
E25	13	11	12	12	11	11	—	12	11	11	22	11
E27	13	11	12	12	11	23	11	11	11	23	11	22
E28	12	11	12	22	11	13	—	11	11	13	11	12
E29	12	11	12	—	22	12	—	11	11	—	11	11
E30	13	12	11	12	11	12	—	11	11	23	22	22
E31	13	12	12	12	11	23	11	11	11	23	22	11
E32	23	12	12	22	22	13	11	12	11	13	11	22
F03	12	11	12	12	11	13	—	11	22	13	11	12
F04	12	11	12	12	12	23	11	11	11	23	11	22
F05	13	11	12	22	12	11	—	11	11	11	22	22
F06	13	—	11	—	—	11	—	11	22	13	22	11
F08	12	11	12	22	11	11	—	11	11	11	22	22
F12	12	11	12	12	11	11	—	12	22	11	11	11
F14	13	11	11	22	11	11	—	12	11	11	22	12
F15	13	12	12	12	11	11	—	12	11	11	22	22
F16	13	11	12	12	11	23	—	11	22	23	22	22
F17	23	12	11	22	11	11	—	12	22	11	11	11
F20	13	12	12	22	11	13	—	12	11	11	11	22
F21	13	11	12	12	12	11	—	11	22	12	22	11
F22	23	12	11	22	11	13	—	12	11	11	22	22
F24	13	11	12	22	11	11	11	11	22	13	11	22
F25	13	12	12	22	11	13	11	11	22	13	11	22
F26	13	11	12	12	11	11	—	11	11	12	22	11
F27	23	11	12	22	11	11	11	12	11	12	11	22
F28	13	11	12	22	12	11	—	12	11	11	22	22
F29	13	11	12	22	22	12	—	12	22	12	11	11
F30	23	11	12	12	11	11	11	—	—	11	11	—
F31	23	11	12	22	12	11	11	11	22	11	11	11
F33	23	12	11	22	11	13	11	12	11	13	11	11
F34	23	12	11	22	11	13	11	11	11	13	11	11
F35	23	11	12	22	11	23	11	11	22	23	11	11
F36	13	11	11	12	12	12	—	12	22	12	11	22
F38	13	11	12	12	11	11	—	11	11	11	22	22
F39	13	12	12	22	12	11	—	12	22	11	22	11

Continuação da Tabela 5.

F40	13	11	11	22	22	12	11	12	22	12	22	22
F41	23	11	12	12	22	11	—	12	22	11	11	11
F43	13	11	11	12	22	13	—	11	—	13	11	22
G05	13	11	12	12	11	11	11	12	22	11	22	22
G09	13	12	12	22	22	13	11	12	22	13	22	22
G10	13	11	12	12	22	13	11	12	11	13	22	22
G11	13	12	11	12	12	11	11	12	22	11	11	22
G12	13	12	12	12	12	23	11	12	22	23	22	22
G14	13	11	12	12	12	11	11	11	11	11	22	11
G15	13	11	12	22	11	23	—	12	11	23	22	11
G16	23	11	11	12	22	23	—	11	22	23	11	22
G17	13	—	12	12	12	12	11	12	22	12	22	22
G18	23	11	12	22	22	11	11	11	11	11	11	22
G19	13	11	11	22	12	23	11	12	22	23	11	11
G20	23	11	11	22	11	11	11	12	22	11	11	11
G21	23	12	11	22	22	23	11	11	11	23	22	12
G22	13	12	11	12	12	11	—	12	11	11	22	—
G23	13	11	11	22	12	23	11	12	11	23	22	—
G24	23	12	12	22	22	13	11	11	22	13	11	—
G25	13	11	—	12	11	23	11	11	22	23	22	—
G26	23	11	12	12	11	12	11	11	22	12	11	—
G27	13	11	12	12	22	13	11	11	22	23	22	—
G28	13	11	12	22	—	23	11	11	11	12	22	—
G29	23	11	12	12	11	23	—	11	22	23	11	—
G30	13	11	11	12	12	13	11	11	11	13	22	—
G32	13	11	12	12	11	13	—	11	11	13	22	—
G33	23	11	12	—	12	23	11	12	11	23	11	—
G35	23	11	11	12	22	23	11	12	22	23	11	—
G36	23	12	12	22	11	23	—	12	22	23	11	—
G37	23	11	12	12	11	12	—	11	11	12	11	—
G38	23	12	12	12	11	13	—	11	22	13	22	—
G39	23	11	11	12	12	23	11	12	22	23	11	—
G40	13	12	12	12	11	12	11	12	11	12	22	—
G41	13	12	12	12	11	23	—	12	11	23	22	—
G42	13	11	12	22	11	13	—	12	11	13	22	—
G43	23	11	12	12	22	12	—	12	22	12	11	—
G44	23	11	11	22	11	12	—	12	11	12	11	—

Em cada coluna, a partir da identificação do acesso, encontram-se descritos os alelos amplificados.

O perfil molecular individual é útil no caso de confirmação da pureza de lotes de mudas ou sementes no momento da compra destas, pois muitas vezes nem pelas sementes e nem no caso de mudas é possível ter certeza da cultivar. Neste trabalho foi estabelecido um perfil molecular individual de 86 híbridos, do genitor ‘Clementina Fina’ e do genitor ‘Montenegrina’.

4.4 – Análise Morfológica x Molecular

Numa análise conjunta, comparando os dendogramas, dos dados de marcadores morfológicos e de marcadores moleculares, observa-se que não existe relação entre os grupos formados entre os dois métodos de análises. No dendograma obtido analisando as marcas moleculares, seis materiais não puderam ser distinguidos entre si (G13, F37, F13, F37, G01, G31). Por sua vez, na análise dos dados morfológicos G13 e F37 tiveram uma similaridade entre si de apenas 27,5%; os acessos F13 e G34, tiveram uma similaridade de apenas 28%; e os outros dois materiais, G01 e G31, foram separados e mostraram uma similaridade de apenas 25%.

No dendograma utilizando os dados de morfologia, as plantas E09, E18, E19, E28, F25, G30, G36, G39 são as que mais se aproximaram ao genitor masculino ‘Montenegrina’. Já na análise utilizando os dados moleculares estas plantas tiveram uma distribuição aleatória onde E09, E18, E28 se localizaram no subgrupo do genitor feminino ‘Clementina Fina’, as plantas E19, F25, G30 se localizaram no subgrupo do genitor masculino ‘Montenegrina’ e as plantas G36, G39 se localizaram no terceiro subgrupo, distante dos genitores.

Na análise utilizando os dados morfológicos as plantas E10, E20, E29, F26, G31, G37, G40 são as que mais se aproximaram ao genitor feminino ‘Clementina Fina’, porém no dendograma utilizando os dados gerados através de marcadores moleculares, as plantas E20, E29 e G37, foram as que se localizaram no subgrupo do genitor feminino, as plantas E10, F26, G40 foram as que se localizaram no subgrupo do genitor masculino, e ainda a planta G31 se localizou no terceiro subgrupo, independente dos genitores. A planta E29 que no dendograma gerado a partir dos dados moleculares foi a mais próxima do genitor feminino ‘Clementina Fina’, com uma similaridade de cerca de

80%, no dendograma utilizando os dados da análise morfológica localizou-se novamente no grupo mais próximo do genitor feminino.

As plantas F06, G01, G14 foram os acessos mais distantes das demais plantas no dendograma analisando os dados morfológicos, com 25% de similaridade do restante dos acessos. No dendograma analisando os dados fornecidos pelos marcadores moleculares as plantas F06 e G14 se localizaram no subgrupo das plantas mais próximas geneticamente do genitor masculino 'Montenegrina' e a planta G01 se localizou no terceiro subgrupo de plantas, distante dos genitores.

A similaridade utilizando os dados da análise molecular foi muito maior, com uma média, em torno de 70%, se comparada com a similaridade entre os acessos estudados utilizando os dados de análise morfológica, a qual ficou em torno de 40%. Davies & Albrigo (1994) já relatavam a discordância entre análises moleculares e morfológicas, considerando 12 acessos cítricos, dentre estes seis tangerineiras, que foram classificadas morfológicamente por Tanaka em 12 espécies, e por Swingle em seis espécies. Estes autores, numa análise utilizando marcadores bioquímicos e moleculares classificaram os 12 acessos em três espécies.

5. CONCLUSÕES

A época de maturação de frutos das 80 plantas do estudo abrange o início de abril até o início de agosto, concentrando-se esta entre maio e junho.

Todas as plantas avaliadas podem ser utilizadas como genitores masculinos no que se refere à viabilidade de pólen.

Todos os 52 acessos e os genitores, avaliados citologicamente neste estudo, são diplóides, apresentando um número cromossômico $2n = 18$.

Os marcadores moleculares do tipo microssatélites são eficientes para identificar híbridos com maior similaridade genética em relação aos genitores.

Ambas as caracterizações, morfológica e molecular, demonstraram a existência de variabilidade entre as plantas da população estudada e confirmaram que todas são híbridas da tangerineira 'Clementina Fina' e 'Montenegrina'.

Não foi possível estabelecer uma relação entre as análises morfológicas e moleculares.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, P. K. Cytogenetical investigations in Rutaceae V. Cytomorphology of the three intergeneric hybrids of *Citrus* and *Poncirus*. **Cytologia**, Tokyo, v. 54, n. 4, p. 705-708, 1989.

ALLARD, R. W. Híbridaciones interespecíficas no melhoramento de plantas. In: ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético de plantas**. São Paulo-SP: [s. n.], 1960. p. 349-355.

BASTIANEL, M. **Diversidade Genética em *Citrus* e Análise de Pedigree em um população Segregante de Tangerineira ‘Lee’ [*Citrus reticulata* x (*C. reticulata* x *C. paradisi*)] Obtida por polinização Aberta Através do marcador Molecular RAPD e Marcadores Morfológicos**. 1999. 91f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

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

BASTIANEL, M.; SCHWARZ, S. F.; COLLETA FILHO, H. D. *et al.* Identification of zygotic and nucellar tangerine seedlings (*Citrus* spp.) using RAPD. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto-SP, v. 21, n. 1, p. 123-127, 1998.

BEHROUZ, G.; TALAIE, A.; ZAMANI, Z.; EBADI, A.; BEHJATNIA, A. Assessment of genetic variability in some Iranian sweet oranges (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) and mandarins (*Citrus reticulata* Blanco) using SSR markers. **International Journal of Agriculture and Biology**, Pakistan, v. 7, n. 2, p. 167-170, 2005

BRUCKNER, C. H. **Melhoramento de fruteiras tropicais**. Viçosa-MG: UFV, 2002. p. 422.

CAMERON, J. W.; FROST, H. B. Genetics, breeding and nucellar embryony In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L. D.; WEBBER, H. J. **The citrus Industry**. Califórnia: [s. n.], 1968. v. 2, p. 325-370.

CAVALCANTE, H. C. **Análise da Meiose e Estimativa da Fertilidade do Pólen de uma População de Tangerineira 'LEE' [Citrus clementina X (Citrus paradisi X Citrus tangerina)] de Polinização Aberta.** 1999. 104f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

CENTRO DE CITRICULTURA. Dados: a polêmica dos números citrícolas. In: **Informativo do Centro de Citricultura**, Cordeirópolis-SP, n. 68, p. 3, 2001.

COLLETA FILHO, H. D.; MACHADO, M. A.; TARGON, M. L. P. N. Analysis of the genetic among mandarins (*Citrus spp.*) using RAPD markers. **Euphytica**, Wageningen, n. 102, p. 133-139, 1998.

COLLETA FILHO, H. D.; MACHADO, M. A.; TARGON, M. L. P. N. The use of Random Amplified Polymorphic DNA to Evaluate the Genetic Variability of Ponkan Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) Accessions. **Genetic Molecular Biololy**, Ribeirão Preto-SP, v. 23, n. 1, p. 169-172, 2000.

CROSSA, J.; FRANCO, J. Statistical methods for classifying genotypes. **Euphytica**, Wageningen, v. 137, p. 19-37, 2004.

DAVIES, F. R.; ALBRIGO, L. G. **Crop Production Science in Horticulture 2: Citrus.** Wallingford: [s. n.], 1994. p. 254.

DOMINGUES, E. T.; SOUZA, V. C.; SAKIRAGUI, C. M. Caracterização Morfológica de Tangerinas do Banco de Germoplasma de Citros do Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC. **Science Agriculture**, Piracicaba-SP, v. 56, n. 1, p. 197-206, 1999.

EMATER. Rio Grande do Sul / ASCAR. **Estudo da Cadeia Produtiva dos Citros no Vale do Caí/ RS.** Porto Alegre, 2002. p. 46.

EMATER. Rio Grande do Sul / ASCAR. **Levantamento da fruticultura comercial do Rio Grande do Sul – 2003/2004.** Porto Alegre, 2004. p. 89.

FAO. **Dados agrícolas de FAOSTAT.** Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma. Disponível em: <http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture&language=ES>. Acesso em: 19 de novembro de 2005.

FEDERICI, C. T.; FANG, D. Q.; SCORA, R. W.; Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. **Theor Appl genética**, Berlin, v. 96, p. 812-822, 1998.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética.** Brasília: EMBRAPA, 1998. p. 220.

GALLETTA, G. J. Pollen and seed management. In: MOORE, J. N.; JANICK, J. **Methods in fruit breeding.** West Lafayette: Purdue University Press, 1983. cap. 9, p. 136-144.

GOWER, J. C. A general coefficient of similarity and some of its properties. **Biometrics**, Washigton, v. 27, p. 857-874, 1971.

GRANER, A.; LUDWIG, W. F.; MELCHINGER, A. E. Relationships among European barley germplasm : II. Comparison of RFLP and redigree data. **Crop Science**, Madison, v. 34, p. 1199-1205, 1994.

GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross strategy and RAPD markers. **Genetics**, Bethesda, n. 137, p. 1121-1137, 1994.

GUERRA, M. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro-RS: Guanabara, 1988. p. 142.

GUERRA, M.; PEDROSA, A.; SILVA, A. E. B. Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a *Cirus* germplasm bank. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto-SP, v. 20, n. 3, p. 489-496, 1997.

GURGEL, J. T. A. Poliembrionia e embrionia adventícia em *citrus*, *Mongifera* e *Eugenia*. **Dusenía**, Curitiba-PR, v. 3, n. 6, p. 443-450, 1952.

IBGE. **Anuário Estatístico Brasileiro**, Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/. Acesso em: 19 de novembro de 2005.

INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES. **Descriptors for Citrus**. Rome, 1988. p. 27.

IWAMASA, M.; NITO, N. Cytogenetics and the evolution of modern cultivated Citrus. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 6., 1988, Tel Aviv. **Proceedings...** Tel Aviv: International Society of Citriculture , 1988. v. 1, p. 265-275.

KAUTZMANN, M. E. M.; PADILHA, M. **Montenegro de Ontem e Hoje**. São Leopoldo: Prefeitura Municipal de Montenegro, 1982. v. 2, p. 416-418.

KOEHLER-SANTOS, P.; DORNELLES, A. L. C.; FREITAS, L. B. Characterization of mandarin citrus gremoplasm Southern Brazil by morfological and molecular analyses. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília-DF, v. 38, n. 7, p. 797-806, 2003.

KOEHLER, P. **Caracterização morfológica e molecular de variedades de tangerineiras em Cultivo na Estação Experimental Agronômica da UFRGS, em Eldorado do Sul, RS**. 2001, 75f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

KÖEPPEN, W. **Climatologia**. Cidade do México: Fondo de Cultura Econômica, 1948, p. 478.

KOLLER, O. C. **Citricultura: laranja, limão e tangerina**. Porto Alegre: Rigel, 1994. p. 446.

KRUG, C. A.; BACCHI, O. Triploid varieties of *Citrus*. **The Journal of Heredity**, Washington, v. 39, n. 9, p. 227-283, 1943.

LEE, L. S. Citrus Polyploidy – Origins and Potential for Cultivar Improvement. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 39, p. 735-747, 1988.

LURO, F.; LORIEUX, M.; LAIGRET, F. Genetic Mapping of an Intergenetic Citrus Hybrid Using Molecular Markers. **Fruits**, Paris, v. 49, n. 5-6, p. 404-408, 1994.

MILACH, S. C. K. **Marcadores Moleculares em Plantas**. Porto Alegre: Ed. Autor, 1998. p. 141.

MIOZZO, A. K.; KOLLER, O. C.; SCHWARZ, S. F. Efeito da poda de ramos e do raleio manual de frutos sobre a produção de tangerineiras ‘Montenegrina’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas-BA, v. 14, n. 2, p. 59-63, 1992.

MOREIRA, C. S.; MOREIRA, S. História da Citricultura no Brasil. In: RODRIGUES, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J. **Citricultura Brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v. 1, p. 1-21.

MOURÃO FILHO, F. A. A.; MENDES, B. M. J.; DONADIO, L. C. **Melhoramento de Frutíferas Tropicais**. Viçosa: UFV, 2002, p. 422.

MOTA, F. S.; BEIRDORF, M. I. C.; GARCEZ, J. R. B. **Zoneamento Agroclimático do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**: Normais Agroclimáticos. Porto Alegre: Ministério da Agricultura. Instituto de Pesquisa Agropecuária do Sul, 1971. v. 1 (Circular, 50).

NOCOLOSI, E.; DENG, Z. N.; GENTILE, A. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, p. 1155-1166, 2000.

NIEDZ, R. P.; BAUSHER, M. G.; HEARN, J. Use of store pollen to hybridize a mandarin hybrid and *Citrus tachibana*. **HortScience**, Alexandria, v. 27, n. 1, p. 43-44, 1992.

NOVELLI, V. M.; CRISTOFANI, M.; DE SOUZA, A. A. DNA Polymorphism in cultivars of Sweet Orange *Citrus sinensis* (L.) Osbedeck Revealed by Simple Sequence Repeats (SSRs). **Genetic Molecular Biology**, Ribeirão Preto-SP, v. 23, n. 3, p. 433, 2000.

OLIVEIRA, A. C.; GARCIA, A. N.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A. Identification of citrus hybridus through the combination of leaf apex morphology and SSR markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 128, p. 397-403, 2002.

OLIVEIRA, A. C.; MACHADO, M. A. Resgate in Vitro de Embriões de Tangor ‘Murcote’ (*Citrus reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osbeck) e Laranja ‘Pera’ (*C.*

sinensis (L.) Osbeck) e Identificação de Híbridos através de Marcadores Morfológicos e Moleculares. **Genetic Molecular Biology**, Ribeirão Preto-SP, v. 23, n. 3, p. 515, 2000.

OLIVEIRA, R. P.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; MACHADO, M. A. Selection processes in a Citrus Hybrid Population Using RAPD Markers. **PAB - Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 11, p. 1297-1302, 2003.

OLIVEIRA, R. P.; RADMANN, E. B. Similaridade genética de cultivares de citros de mesa. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas-BA, v. 27, n. 2, p. 332-334, 2005.

PIO, R. M. **Caracterização e Avaliação de Frutos de Oito Variedades do Grupo das Tangerineiras**. 1992. 77f. Dissertação (Mestrado - Fitotecnia) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1992.

RADMANN, E. B.; OLIVEIRA, R. P. Caracterização de Cultivares Apirênicas de Citros de Mesa por Meio de Descritores Morfológicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 9, p. 1123-1129, 2003.

RAGHUVANSHI, S. S. Cytogenetical studies in genus *Citrus* IV. Evolution in genus *Citrus*. **Cytologia**, Tokyo, v. 27, p. 172-188, 1962.

RAMOS, D. J. **Taxa de poliembrionia e identificação do embrião sexual *in vitro* dos porta-enxertos *Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.** 1990. 73f. Dissertação (Mestrado - Genética e melhoramento de plantas) – Escola Superior de Agronomia de Lavras, Lavras, 1990.

RODRIGUES, J. C. V.; MACHADO, M. A.; CARVALHO, S. A. Microscopia eletrônica de varredura de pólen de algumas espécies de *Citrus* e gêneros correlatos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas-BA, v. 20, n. 3, p. 382-386, 1998.

RODRIGUES, L. R. **Caracterização da poliembrionia, comportamento meiótico e fertilidade do pólen de quatro cultivares de tangerineiras: 'Caí', 'Montenegrina' (*Citrus deliciosa* Tenore), 'Poncã' (*Citrus reticulata* Blanco) e 'King' (*Citrus nobilis* Loureiro).** 1998. 111f. . Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

RUIZ, C.; PAZ, BRETOM.; ASÍNS, M. J. A quick methodology to identify sexual seedlings in citrus breeding programs using SSR markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 112, p. 89-94, 2000.

SANTOS, F. C.; CHAGAS, E. A.; RAMOS, J. D.; PIO, L. A. S.; JUNQUEIRA, K. P. Número de Anteras e Grãos de Pólen em Variedades Copa de Citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém. **Anais...**

SARTORI, I. A.; SHÄFER, G.; SCHWARZ, S. F.; KOOLER, O. C. Épocas de Maturação de Tangerinas na Depressão Central do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas-BA, v. 20, n. 3, p. 313-322, 1998.

SCORA, R. W. On the history and origin of citrus. **Bolletín of the Torrey Botanical Club**, Lancaster, v. 102, n. 6, p. 369-375, 1975.

SELLITO-BOAVENTURA, Y. M.; PIO, R. M. Análise citogenética em três cultivares de laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto-SP, v. 12, n. 1, p. 117-126, 1989.

SHILLITO, R. D.; SAUL, M. W. Protoplast Isolation and Transformation. **Plant Molecular Biology**, Ribeirão Preto-SP, v. 11, p. 181, 1988.

SYBENGA, J. **Cytogenetics in Plant Breeding**. Berlin: [s. n.], 1993. p. 469.

SYBENGA, J. Forty years of cytogenetics in plant breeding: a personal view. In: LELLEY, T. **Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement**. Vienna: [s. n.], 1998. p. 22-32.

TARGON, M. L. P. N.; MACHADO, M. A.; POMPEU JÚNIOR, J. Marcadores "RAPD" para identificação de plântulas de citrange e citrumelo. **Laranja**, Cordeirópolis-SP, v. 19, n. 2, p. 375-381, 1998.

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequence are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, Cary, n. 12, p. 4127-4138, 1984.

THOMAS, M. R.; SCOTT, N. S.; BOTTA, R. Sequence-tagged Site Markers in Grapevine and *Citrus*. **Journal of the Japanese Society Horticultural Science**, Tokyo, v. 67, n. 6, p. 1189-1192, 1998.

TONIETTO, S. M.; TONIETTO, A. Floração da variedade Tobias (*Citrus sinensis* Osbeck.) sobre três porta-enxertos no Vale do Taquari-RS. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v. 27, n. 1, 2005.

TORRES, A. M.; SOOST, R. K.; DIEDENHOFEN, U. Leaf isozymes as genetic markers in *Citrus*. **American Journal of Botany**, Baltimore, n. 65, p. 869-881, 1978.

Apêndice 1 – Características morfológicas avaliadas.

Planta	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
Clem	2	2,4	2	34	X	X	1	1	2	1	0	1	4	78,7	29,7
Mont	3	3,2	2	28	X	X	1	2	2	1	0	4	1	72,4	24,2
E 03	2	2,1	2	29	16,5	2	1	2	2	1	0	1	4	69,6	25,7
E 06	2	3,3	2	35,5	19,4	2	1	2	2	1	0	1	4	79,1	29,8
E 07	1	1,3	2	17	31,6	2	1	2	2	1	0	1	1	48,4	16,1
E 09	1	3,1	2	34,5	20,1	2	1	3	2	1	0	4	1	87,8	27,4
E 10	2	3,2	2	34	15,0	2	1	2	2	1	0	1	4	76,2	30,9
E 11	3	2,2	2	27	23,8	2	1	2	2	1	0	1	4	67,7	24,9
E 12	1	3,6	2	40	22,9	2	1	2	2	1	0	1	4	88,1	30,1
E 13	2	3,3	2	36	22,8	2	1	2	2	1	0	1	1	70,9	29,9
E 14	2	3,2	2	38	15,4	2	1	2	2	1	0	2	1	91,9	39,1
E 15	1	3,8	2	45	22,8	2	1	3	2	1	0	1	4	90,7	34,3
E 16	2	X	2	X	24,7	2	1	1	2	1	0	1	1	45,7	19,8
E 17	X	X	X	X	X	X	1	1	2	1	0	2	1	89,3	42,1
E 18	2	1,9	2	23	23,6	2	1	3	2	1	0	1	1	93,2	34,1
E 19	1	3,1	2	37	18,0	2	1	3	2	1	0	1	1	70,4	29,2
E 20	1	2,6	2	32	26,7	2	1	3	2	1	0	2	1	79,1	30,7
E 21	1	3,2	2	37	15,8	2	1	3	2	1	0	1	4	85,4	30,8
E 23	1	3,0	2	42	16,2	2	1	2	2	1	0	1	1	84,5	33,8
E 25	2	2,9	2	38,5	19,9	2	1	2	2	1	0	1	1	91,5	33,4
E 27	2	3,0	2	35	41,9	2	1	3	2	1	0	2	4	89,4	37,8
E 28	2	2,2	2	31,5	20,4	2	1	2	2	1	0	1	4	92,1	34,0
E 29	1	2,3	2	26	10,0	2	1	3	2	1	0	1	1	93,5	28,4
E 30	2	3,0	2	37	22,0	2	1	3	2	1	0	4	4	72,6	28,9
E 31	1	3,2	2	43	19,6	2	1	3	2	1	0	2	1	82,5	37,8
E 32	2	2,3	2	32	26,3	2	1	2	2	1	0	4	1	69,6	23,3
F 03	1	2,4	2	25	41,8	2	1	2	2	1	0	1	1	78,8	31,1
F 04	X	1,3	X	15	X	X	1	1	2	1	0	4	4	73,7	25,7
F 05	2	3,0	2	39,5	40,2	2	1	2	2	1	0	1	1	76,2	27,7
F 06	1	2,8	2	32	17,9	2	1	2	2	1	0	1	4	89,8	33,3
F 08	1	3,6	2	41,5	18,1	2	1	2	2	1	0	1	1	78,2	31,5
F 12	2	3,1	2	30,5	26,2	2	1	2	2	1	0	1	1	99,2	32,4
F 13	1	3,4	2	34	26,9	2	1	2	2	1	0	1	1	94,2	33,7
F 15	2	3,1	2	39	18,9	2	1	2	2	1	0	1	2	87,5	33,9
F 16	2	2,4	2	29,5	28,9	2	1	1	2	1	0	1	1	82,3	28,2
F 17	2	2,6	2	32,5	44,9	2	1	2	2	1	0	1	1	100,3	30,8
F 20	1	2,2	2	33	31,3	2	1	2	2	1	0	1	4	86,5	29,5
F 21	2	2,5	1	23	35,2	2	1	2	2	1	0	4	1	95,9	31,7
F 22	2	2,6	2	34,5	19,7	2	1	3	2	1	0	1	4	81,0	36,2
F 24	1	3,1	2	41	21,0	2	1	3	2	1	0	1	1	79,6	27,1
F 25	2	2,8	2	31,5	20,2	2	1	2	2	1	0	1	1	98,7	36,6
F 26	2	1,9	2	16	28,7	2	1	3	2	1	0	1	1	56,0	20,1
F 27	2	2,8	2	32,5	31,4	2	1	3	2	1	0	1	1	71,0	24,7
F 28	2	3,2	2	39	27,9	2	1	2	2	1	0	1	1	84,5	30,2
F 29	2	2,5	2	27	30,9	2	1	2	2	1	0	1	1	85,3	29,1
F 30	2	3,2	2	38	31,7	2	1	3	2	1	0	1	1	101,1	33,5
F 31	1	3,8	2	46,5	29,4	2	1	3	2	1	0	1	1	98,2	39,2
F 33	2	3,2	2	36,5	22,5	2	1	3	2	1	0	1	1	114,5	37,0
F 34	2	2,4	2	25,5	25,8	2	1	2	2	1	0	1	2	66,2	25,1
F 35	1	3,6	2	36	20,1	2	1	3	2	1	0	2	1	144,8	36,1
F 36	1	3,3	2	28	20,8	2	1	3	2	1	0	1	1	99,5	31,6
F 37	1	3,7	2	41,5	28,5	2	1	3	2	1	0	1	1	82,2	33,4
F 38	X	3,2	X	33,5	13,4	2	1	3	2	1	0	1	1	99,6	36,1
F 39	X	3,0	X	33	28,5	2	1	2	2	1	0	4	1	94,9	26,7
F 40	X	2,5	X	29	20,7	2	1	1	2	1	0	1	2	72,1	24,4

Apêndice 1 – continuação

F 41	X	4,1	X	38,5	34,5	2	1	1	2	1	0	1	1	75,0	25,9
F 43	X	3,0	X	27	26,3	2	1	1	2	1	0	1	4	93,8	34,4
F 44	X	X	X	X	37,2	2	1	1	2	1	0	1	4	81,0	28,3
G 01	1	4,1	2	45	31,3	2	1	1	2	1	0	1	1	99,6	40,0
G 05	2	2,3	2	32	20,4	2	1	2	2	1	0	1	1	90,7	32,4
G 09	1	3,1	2	37	24,5	2	1	2	2	1	0	4	4	97,2	31,0
G 10	1	3,2	1	33	18,1	2	1	2	2	1	0	2	1	99,9	43,5
G 11	3	2,1	2	21,5	32,3	2	1	2	2	1	0	4	1	71,6	24,5
G 12	2	2,6	1	26	34,6	2	1	2	2	1	0	1	4	91,8	38,7
G 13	1	3,4	2	42	27,3	2	1	2	2	1	0	1	4	94,9	35,7
G 14	X	X	X	X	X	X	1	2	2	1	0	1	1	71,8	26,9
G 15	1	3,1	2	37	19,6	2	1	3	2	1	0	1	1	91,0	34,1
G 16	1	3,5	2	35	27,9	2	1	3	2	1	0	1	1	104,9	43,0
G 17	2	2,6	2	29	34,6	2	1	2	2	1	0	1	1	74,7	31,1
G 18	2	2,4	2	40	24,6	2	1	2	2	1	0	1	1	73,2	28,7
G 19	2	2,6	2	26	21,8	2	1	1	2	1	0	1	1	90,4	31,7
G 20	2	2,5	2	24	25,8	2	1	3	2	1	0	4	2	106,7	28,5
G 21	1	3,3	2	31	33,7	2	1	2	2	1	0	1	1	80,5	28,3
G 22	2	2,4	2	30	23,7	2	1	2	2	1	0	1	4	81,2	31,2
G 23	2	2,8	2	27,5	37,5	2	1	2	2	1	0	1	1	93,7	31,0
G 24	2	3,1	2	33	21,4	2	1	2	2	1	0	1	1	90,7	34,4
G 25	2	3,0	2	27,5	21,7	2	1	2	2	1	0	1	1	96,7	33,1
G 26	2	2,6	1	28	27,9	2	1	3	2	1	0	1	1	88,0	35,2
G 27	1	3,6	2	42,5	14,2	2	1	2	2	1	0	1	1	95,0	34,8
G 28	2	2,0	2	20	40,1	2	1	3	2	1	0	4	2	73,8	22,7
G 29	2	3,1	1	31,5	38,6	2	1	2	2	1	0	1	1	69,5	28,8
G 30	2	2,6	2	35	22,0	2	1	2	2	1	0	1	1	98,7	34,6
G 31	2	2,6	2	28	27,1	2	1	1	2	1	0	1	1	97,2	41,9
G 32	1	3,3	1	32	17,1	2	1	3	2	1	0	1	1	81,4	38,5
G 33	1	3,3	2	30	35,1	2	1	2	2	1	0	1	4	99,1	33,8
G 34	1	3,5	2	34,5	22,3	2	1	2	2	1	0	1	1	93,5	33,6
G 35	2	2,8	2	29	45,9	2	1	3	2	1	0	2	2	103,4	41,7
G 36	1	3,6	2	38	25,3	2	1	3	2	1	0	2	4	102,5	43,9
G 37	1	2,9	2	29	21,6	2	1	1	2	1	0	1	4	83,9	35,4
G 38	1	3,5	2	35	32,0	2	1	2	2	1	0	3	4	91,5	36,2
G 39	1	3,1	2	30,5	13,4	2	1	2	2	1	0	1	4	97,0	36,2
G 40	2	2,7	2	31,5	19,8	2	1	3	2	1	0	3	1	90,2	38,6
G 41	2	2,2	1	21	39,8	2	1	3	2	1	0	1	2	74,0	26,6
G 42	2	1,7	2	17,5	38,7	2	1	2	2	1	0	1	1	54,0	19,5
G 43	1	3,3	2	38	20,9	2	1	2	2	1	0	4	1	95,2	31,6
G 44	3	2,1	2	26	23,6	2	1	2	2	1	0	1	1	75,5	25,6

Apêndice 1 - continuação

Planta	XVI	XVII	XVIII	XIX	XX	XXI	XXII	XXIII	XXIV	XXV	XXVI	XXVII	XXVIII
Clem	1	2	4	1	2	1	1	2	9,5	19,8	97,3	63,2	52,4
Mont	5	1	5	1	1	1	1	1	9,2	10,4	81,7	52,6	43,5
E 03	5	3	5	5	2	2	1	1	11,4	X	X	X	X
E 06	5	3	4	1	2	1	1	2	10,4	26,8	120,6	64,8	49,2
E 07	5	2	4	1	1	1	1	1	9,2	X	X	X	X
E 09	1	2	4	5	1	2	1	2	8,8	16,8	84,2	56,2	49,6
E 10	5	2	5	1	1	1	1	1	9,6	18,4	50,6	48,4	40,2
E 11	5	1	5	2	3	1	1	2	9,8	X	X	X	X
E 12	1	1	4	5	2	2	1	2	9,6	32,3	108,3	48,7	42,5
E 13	1	1	4	1	1	1	1	1	9,6	11,0	71,4	53,3	47,3
E 14	5	2	4	5	3	2	1	2	9,8	10,0	165,8	72,0	57,1
E 15	1	1	4	5	2	3	1	2	8,8	28,0	117,8	63,1	52,9
E 16	1	3	5	1	2	1	1	3	9	X	X	X	X
E 17	5	1	4	5	2	2	1	2	10	X	X	X	X
E 18	1	1	4	5	2	1	1	2	10,4	11,3	49,6	49,7	45,0
E 19	5	3	5	1	2	2	1	2	10,8	20,7	79,9	60,9	40,0
E 20	5	2	4	1	3	2	1	2	10,4	7,0	71,6	54,7	45,2
E 21	5	2	5	1	2	3	1	1	9,2	1,0	55,1	49,2	41,0
E 23	5	3	5	5	1	1	1	1	10,8	4,5	83,9	58,3	46,9
E 25	5	2	5	5	1	2	1	1	10,8	16,3	103,2	64,8	48,7
E 27	1	2	4	5	1	2	1	1	9,8	7,8	107,2	61,2	52,3
E 28	1	1	4	1	1	2	1	2	9	19,3	126,3	65,4	52,6
E 29	1	1	4	1	1	2	1	2	9,4	X	X	X	X
E 30	1	2	4	5	3	2	1	3	10,4	10,9	106,9	62,6	49,8
E 31	1	3	5	5	1	1	1	1	10	X	X	X	X
E 32	1	2	4	1	3	1	1	2	9,6	8,2	56,0	48,5	43,5
F 03	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
F 04	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
F 05	5	3	4	1	3	3	1	2	9,8	20,7	96,1	58,6	47,0
F 06	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
F 08	5	3	5	5	1	3	1	1	9,8	X	X	X	X
F 12	5	1	4	5	2	3	1	2	10	19,6	121,7	64,1	53,5
F 13	1	1	4	5	3	2	1	2	9,6	29,5	102,2	59,8	50,2
F 15	5	3	5	1	1	2	1	1	10,6	14,6	54,4	37,1	28,6
F 16	1	1	4	5	2	2	1	2	9	X	X	X	X
F 17	5	3	5	5	1	2	1	1	9,8	17,7	65,5	54,6	43,8
F 20	5	3	4	1	1	3	1	1	9	16,0	146,9	71,4	54,1
F 21	5	2	4	1	1	2	1	1	9	16,0	79,2	55,2	45,2
F 22	1	1	4	5	3	2	1	2	9,8	15,5	57,9	49,9	44,6
F 24	1	1	4	1	2	2	1	2	8,6	12,6	81,9	54,0	50,1
F 25	1	2	4	5	2	2	1	2	9,2	9,7	112,7	61,7	50,0
F 26	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
F 27	1	1	4	1	3	2	1	3	9,8	X	X	X	X
F 28	5	2	4	5	2	1	1	1	9,8	18,0	95,7	59,3	47,7
F 29	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
F 30	1	1	4	1	1	2	1	1	8,8	17,0	134,0	65,2	62,3
F 31	1	2	4	1	3	2	1	2	8,6	19,6	88,0	55,1	49,2
F 33	1	3	4	1	1	1	1	1	10,4	8,9	76,9	56,7	42,9
F 34	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
F 35	5	2	5	5	3	2	1	2	10,4	22,9	141,4	68,9	56,8
F 36	5	3	5	1	1	2	1	1	8,8	X	X	X	X
F 37	5	2	5	1	1	2	1	2	10,6	22,0	92,8	60,3	49,0

Apêndice 1 – continuação

F 38	5	2	4	1	1	1	1	2	10,6	33,0	123,5	69,1	50,9
F 39	5	1	5	1	2	1	1	2	12	17,4	51,9	48,3	40,0
F 40	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
F 41	1	1	5	5	2	1	1	2	9,6	5,5	60,9	49,0	44,6
F 43	1	2	4	1	2	2	1	1	8,4	X	X	X	X
F 44	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G 01	1	3	4	1	2	1	1	2	10	13,3	74,4	52,2	46,3
G 05	5	1	4	1	2	1	1	2	10,6	23,6	113,0	63,6	50,1
G 09	1	1	4	1	3	1	1	3	9,2	X	X	X	X
G 10	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G 11	1	2	4	2	2	1	1	1	9,4	14,3	85,5	56,3	49,0
G 12	5	2	5	1	1	2	1	1	11	X	X	X	X
G 13	5	2	4	5	1	1	1	1	11,2	X	X	X	X
G 14	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G 15	5	1	5	5	2	2	1	2	10,8	21,4	99,3	59,7	50,6
G 16	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G 17	1	1	4	1	2	1	1	2	9,6	19,0	60,5	50,2	42,6
G 18	5	2	5	5	2	3	1	2	10,4	X	X	X	X
G 19	5	3	5	5	1	1	1	2	8,8	21,3	91,8	58,8	49,9
G 20	5	1	5	5	1	1	1	1	9,6	26,3	57,9	52,4	41,7
G 21	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G 22	5	3	4	1	2	3	1	1	10	25,3	42,6	44,4	38,0
G 23	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G 24	5	2	5	5	1	1	1	1	9	X	X	X	X
G 25	1	1	5	1	1	1	1	2	9,2	26,5	114,1	65,2	59,2
G 26	1	2	4	1	2	2	1	2	9,6	26,0	59,8	44,6	42,5
G 27	5	3	5	1	1	1	1	1	10,8	12,7	77,7	58,8	44,7
G 28	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G 29	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G 30	5	3	5	1	2	1	1	1	8,8	19,3	97,0	60,0	47,3
G 31	5	1	4	5	2	2	1	2	10,2	21,4	91,4	58,5	49,3
G 32	5	3	5	1	2	2	1	2	11	17,8	86,5	61,3	41,3
G 33	5	3	5	1	1	1	1	1	9	20,5	63,6	55,0	40,4
G 34	1	2	4	1	2	1	1	2	8,8	29,3	85,9	55,3	48,6
G 35	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G 36	5	3	5	1	1	3	1	1	10	7,3	69,8	51,2	40,1
G 37	5	2	5	5	3	2	1	2	10,4	14,4	79,4	61,0	43,8
G 38	5	1	4	1	1	1	1	1	9,4	20,9	126,0	64,6	54,0
G 39	5	3	5	1	1	3	1	1	9,6	7,2	95,8	58,7	45,9
G 40	5	3	5	5	1	1	1	1	11,4	12,0	83,1	56,6	46,5
G 41	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G 42	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
G 43	5	3	4	1	1	1	1	1	9,2	17,8	72,9	53,1	45,8
G 44	5	1	5	1	1	1	1	1	10,4	14,3	141,2	69,2	52,6

Apêndice 2 – Dados de viabilidade de pólen de 52 acessos.

Avaliação de Viabilidade de Pólen									
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios	Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
E06	I	218	32	87,20	F30	I	277	16	94,54
	II	241	24	90,94		II	257	16	94,14
	III	253	38	86,94		III	381	16	95,97
	IV	268	22	92,41		IV	259	8	97,00
			MÉDIA	89,42				MÉDIA	95,45
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios	Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
E11	I	246	98	71,51	F31	I	340	19	94,71
	II	222	52	81,02		II	322	14	95,83
	III	241	57	80,87		III	241	8	96,79
	IV	264	51	83,81				MÉDIA	95,66
			MÉDIA	79,04					
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios	Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
E14	I	263	10	96,34	F35	I	303	15	95,28
	II	265	13	95,32		II	330	46	87,77
	III	278	17	94,24		III	262	20	92,91
	IV	277	15	94,86		IV	272	21	92,83
			MÉDIA	95,17				MÉDIA	91,96
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios	Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
E15	I	259	14	94,87	F39	I	237	17	93,31
	II	316	20	94,05		II	285	8	97,27
	III	305	12	96,21		III	245	8	96,84
	IV	312	9	97,20		IV	247	8	96,86
			MÉDIA	95,59				MÉDIA	96,11
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios	Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
E18	I	266	13	95,34	G01	I	251	29	89,64
	II	275	22	92,59		II	263	16	94,27
	III	274	11	96,14		III	260	17	93,86
	IV	273	12	95,79		IV	242	13	94,90
			MÉDIA	94,94				MÉDIA	93,13
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios	Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
E19	I	283	16	94,65	G05	I	238	24	90,84
	II	302	18	94,38		II	237	20	92,22
	III	229	26	89,80		III	252	15	94,38
	IV	215	47	82,06		IV	236	22	91,47
			MÉDIA	90,58				MÉDIA	92,24
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios	Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
E20	I	252	17	93,68	G12	I	374	9	97,65
	II	288	9	96,97		II	320	4	98,77
	III	240	12	95,24		III	258	5	98,10
	IV	244	10	96,06		IV	274	6	97,86
			MÉDIA	95,52				MÉDIA	98,08
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios	Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
E21	I	225	25	90,00	G13	I	241	19	92,69
	II	217	52	80,67		II	309	12	96,26
	III	232	45	83,75		III	305	25	92,42
	IV	246	25	90,77		IV	262	16	94,24
			MÉDIA	86,22				MÉDIA	93,94
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios	Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
E23	I	405	10	97,59	G15	I	268	21	92,73
	II	318	15	95,50		II	257	8	96,98
	III	248	18	93,23		III	286	5	98,28
	IV	268	10	96,40		IV	284	12	95,95
			MÉDIA	95,90				MÉDIA	95,97

Apêndice 2 - continuação

Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
E25	I	362	24	93,78
	II	240	34	87,59
	III	268	7	97,45
	IV	242	29	89,30
		MÉDIA	92,21	
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
E28	I	332	32	91,21
	II	262	11	95,97
	III	247	10	96,11
	IV	301	8	97,41
		MÉDIA	94,93	
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
E30	I	311	25	92,56
	II	241	15	94,14
	III	214	13	94,27
	IV	252	10	96,18
		MÉDIA	94,17	
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
E31	I	251	33	88,38
	II	232	22	91,34
	III	272	34	88,89
	IV	230	39	85,50
		MÉDIA	88,50	
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
F05	I	301	9	97,10
	II	273	5	98,20
	III	270	5	98,18
	IV	276	6	97,87
		MÉDIA	97,82	
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
F08	I	262	56	82,39
	II	247	28	89,82
	III	265	41	86,60
	IV	241	23	91,29
		MÉDIA	87,27	
Planta	grão	cheios	vazios	% de cheios
F12	lâmina	266	17	93,99
	II	248	15	94,30
	III	367	13	96,58
	IV	314	11	96,62
		MÉDIA	95,52	
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
F15	I	230	22	91,27
	II	238	29	89,14
	III	245	21	92,11
	IV	240	23	91,25
		MÉDIA	90,94	
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
F16	I	282	19	93,69
	II	247	6	97,63
	III	272	4	98,55
	IV	317	5	98,45
		MÉDIA	97,05	
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
G16	I	236	16	93,65
	II	307	8	97,46
	III	298	7	97,70
	IV	273	11	96,13
		MÉDIA	96,37	
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
G18	I	269	15	94,72
	II	270	11	96,09
	III	258	14	94,85
	IV	257	11	95,90
		MÉDIA	95,38	
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
G19	I	282	14	95,27
	II	251	27	90,29
	III	275	10	96,49
	IV	302	5	98,37
		MÉDIA	95,20	
Planta	grão	cheios	vazios	% de cheios
G20	lâmina	326	11	96,74
	II	311	4	98,73
	III	275	10	96,49
	IV	271	12	95,76
		MÉDIA	96,97	
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
G21	I	285	6	97,94
	II	247	6	97,63
	III	341	27	92,66
	IV	330	7	97,92
		MÉDIA	96,32	
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
G22	I	295	9	97,04
	II	307	13	95,94
	III	401	19	95,48
	IV	359	7	98,09
		MÉDIA	96,60	
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
G24	I	223	35	86,43
	II	241	37	86,69
	III	282	25	91,86
	IV	329	37	89,89
		MÉDIA	88,92	
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
G25	I	315	14	95,74
	II	242	8	96,80
	III	261	8	97,03
	IV	430	15	96,63
		MÉDIA	96,52	
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
G26	I	341	19	94,72
	II	352	32	91,67
	III	343	12	96,62
	IV	269	13	95,39
		MÉDIA	94,50	

Apêndice 2 - continuação

Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
F17	I	242	22	91,67
	II	274	22	92,57
	III	234	21	91,76
	IV	262	32	89,12
MÉDIA				91,25
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
F20	I	294	16	94,84
	II	259	11	95,93
	III	234	18	92,86
	IV	249	15	94,32
MÉDIA				94,53
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
F22	I	309	6	98,10
	II	273	7	97,50
	III	266	3	98,88
	IV	384	9	97,71
MÉDIA				98,01
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
F24	I	244	12	95,31
	II	256	36	87,67
	III	242	15	94,16
	IV	239	36	86,91
MÉDIA				90,83
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
F25	I	243	7	97,20
	II	273	3	98,91
	III	266	11	96,03
	IV	262	18	93,57
MÉDIA				96,40
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
F27	I	424	12	97,25
	II	270	10	96,43
	III	272	7	97,49
	IV	252	10	96,18
MÉDIA				96,90
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
F28	I	419	19	95,66
	II	252	5	98,05
	III	282	11	96,25
	IV	270	6	97,83
MÉDIA				96,76
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
F29	I	372	25	93,70
	II	420	29	93,54
	III	352	11	96,97
MÉDIA				94,62
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
G27	I	305	28	91,59
	II	313	32	90,72
	III	283	25	91,88
	IV	264	22	92,31
MÉDIA				91,59
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
G30	I	258	17	93,82
	II	242	55	81,48
	III	277	38	87,94
	IV	217	81	72,82
MÉDIA				83,88
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
G31	I	317	34	90,31
	II	238	14	94,44
	III	245	14	94,59
	IV	240	11	95,62
MÉDIA				93,44
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
G34	I	249	12	95,40
	II	286	5	98,28
	III	241	14	94,51
	IV	249	10	96,14
MÉDIA				96,15
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
G36	I	301	17	94,65
	II	262	30	89,73
	III	246	19	92,83
	IV	238	17	93,33
MÉDIA				92,65
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
G37	I	246	36	87,23
	II	324	42	88,52
	III	275	23	92,28
	IV	288	27	91,43
MÉDIA				89,85
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
G39	I	261	16	94,22
	II	245	24	91,08
	III	255	20	92,73
	IV	241	21	91,98
MÉDIA				92,52
Planta	lâmina	cheios	vazios	% de cheios
G40	I	261	13	95,26
	II	252	14	94,74
	III	344	13	96,36
	IV	277	18	93,90
MÉDIA				95,13

Apêndice 3 – continuação

G11	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	
G12	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	
G13	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	X	X	1	0	X	X	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	
G14	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0
G15	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	
G16	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	
G17	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	X	X	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	
G18	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	
G19	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	
G20	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	
G21	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	
G22	X	X	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
G23	X	X	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	
G24	X	X	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	
G25	X	X	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	X	X	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	
G26	X	X	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	
G27	X	X	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	
G28	X	X	1	0	1	0	1	1	0	1	X	X	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	
G29	X	X	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	
G30	X	X	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	
G31	X	X	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	
G32	X	X	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	
G33	X	X	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	X	X	1	0	0	1	1	0	1	1	
G34	X	X	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	
G35	X	X	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	
G36	X	X	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	
G37	X	X	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	
G38	X	X	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	
G39	X	X	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	
G40	X	X	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	
G41	X	X	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	
G42	X	X	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	
G43	X	X	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	
G44	X	X	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	