

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

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE
HÍBRIDOS DA TANGERINEIRA 'MONTENEGRINA'

Eduardo Cesar Brugnara
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
Dezembro de 2006

AGRADECIMENTOS

Sou grato:

aos meus pais, irmãos, parentes, especialmente à Tia Maria, pelo apoio, amor, compreensão;

à minha namorada, Ester, pelo amor, amizade, companheirismo, ajuda, coleguismo, e, porque não, pelo mate nas aulas e companhia no RU;

aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia pelos ensinamentos e orientação, especialmente ao meu orientador, Dr. Sergio Francisco Schwarz e à Dr^a. Maria Tereza Schifino-Wittmann;

ao Centro Apta Citros “Sylvio Moreira” - IAC, nas pessoas da Dr^a. Marinês Bastianel e do Dr. Marcos A. Machado, por me permitir desenvolver parte da pesquisa em suas dependências;

aos colegas, especialmente Flávia, Roberto, João Paulo e Juliana;

aos servidores do DHS pela ajuda;

à UFRGS pelas oportunidade da Graduação e Pós-Graduação;

ao CNPq pela bolsa de mestrado.

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE HÍBRIDOS DA TANGERINEIRA 'MONTENEGRINA'¹

Autor: Eduardo Cesar Brugnara

Orientador: Sergio Francisco Schwarz

RESUMO

A baixa diversidade de cultivares de citros do Brasil é um risco para a sanidade dos pomares. A obtenção de novos cultivares através do melhoramento genético, além de aumentar a diversidade, permite atingir nichos de mercado ainda não ocupados. Na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul vêm sendo realizadas hibridações controladas envolvendo cultivares cítricas, em especial tangerineiras. O objetivo deste trabalho foi gerar informações úteis à escolha de híbridos superiores. O estudo envolveu duas populações de híbridos que tiveram a tangerineira 'Montenegrina' (*Citrus deliciosa* Ten.) como parental feminino e a tangerineira 'King' (*C. nobilis* Lour.) e a laranjeira 'Caipira' [*C. sinensis* (L.) Osb.] como parental masculino. Identificou-se a paternidade dos híbridos e se estimou a similaridade genética através de marcadores SSR. Os híbridos foram submetidos também a avaliação da ploidia em células em meiose e da fertilidade do pólen, determinada por coloração dos grãos de pólen com carmim propiônico. Foram realizadas ainda avaliações da morfologia, baseadas em descritores morfológicos, inclusive do tamanho de frutos e número de sementes por fruto, e da época de maturação. Os marcadores moleculares permitiram a identificação de 12 clones nucelares de 'Montenegrina', 25 híbridos de 'Montenegrina' x 'King' e 12 de 'Montenegrina' x 'Caipira'. Os filhos da 'King' D18, C32, D06, C05 e D09 e os da 'Caipira' D12 e C20 foram geneticamente mais similares a 'Montenegrina' que seus irmãos inteiros. Todos os híbridos avaliados são diplóides e a fertilidade de pólen variou de zero a 98%. Houve variação em quase todas as características morfológicas avaliadas. Os cruzamentos da 'Montenegrina' resultaram em melhorias no tamanho dos frutos e número de sementes na progênie e época de maturação distinta em relação a ela.

¹Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (84 p.) Dezembro, 2006.

MORPHOLOGICAL, CYTOGENETIC AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF HYBRIDS OF THE 'MONTENEGRINA' MANDARIN¹

Autor: Eduardo Cesar Brugnara
Adviser: Sergio Francisco Schwarz

ABSTRACT

Low diversity in citrus cultivars in Brazil is a risk for orchard's sanity. Obtaining new cultivars through breeding, beyond increasing diversity, allows attaining free market niches. At the Faculdade de Agronomia of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, controlled hybridisations have been performed involving citrus cultivars, especially mandarins. This work's objective was to generate useful information to choose superior hybrids. The study involved two hybrid populations that had 'Montenegrina' mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) as female parent and 'King' mandarin (*C. nobilis* Lour.) and 'Caipira' sweet orange [*C. sinensis* (L.) Osb.] as male parent. Hybrids' fatherhood was identified and genetic similarity was estimated through SSR markers. The hybrids were submitted to ploidy determination in cells at meiosis and to pollen fertility evaluation by staining pollen grains with propionic carmine. Morphological evaluations using morphological descriptors, including fruit size and seed number per fruit, and estimates of ripening period were as well performed. The molecular markers allowed identification of 12 nucellar clones of 'Montenegrina', 25 hybrids of 'Montenegrina' x 'King' and 12 hybrids of 'Montenegrina' x 'Caipira'. The 'King's' progenies D18, C32, D06, C05 and D09 and 'Caipira's' progenies D12 and C20 were genetically more similar to 'Montenegrina' than all their full sibs. All the evaluated hybrids are diploids and pollen fertility varied from zero to 98 %. There was variation in almost all the evaluated morphological traits. The crosses of 'Montenegrina' resulted in improvement of progeny's fruit size and seed number and in different ripening period comparing to female parent.

¹Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (84 p.) December, 2006.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	1
1.1. Importância sócio-econômica dos citros	1
1.2. Origem e classificação botânica dos citros	5
1.3. Objetivos do trabalho	6
CAPÍTULO II - IDENTIFICAÇÃO DA ORIGEM E ESTIMATIVA DA SIMILARIDADE GENÉTICA EM PROGÊNIES DE TANGERINEIRA 'MONTENEGRINA'	8
2.1. Introdução	8
2.2. Material e métodos	12
2.3. Resultados e discussão	15
2.3.1. Origem da população	16
2.3.2. População 'Montenegrina' x 'King'	18
2.3.3. População 'Montenegrina' x 'Caipira'	21
CAPÍTULO III - PLOIDIA E FERTILIDADE DE PÓLEN EM PROGÊNIES DOS CRUZAMENTOS DE TANGERINEIRA 'MONTENEGRINA' COM TANGERINEIRA 'KING' E LARANJEIRA 'CAIPIRA'	24
3.1. Introdução	24
3.2. Material e métodos	28
3.3. Resultados e discussão	30
CAPÍTULO IV - AVALIAÇÃO FENOTÍPICA E AGRONÔMICA DE HÍBRIDOS DE TANGERINEIRA 'MONTENEGRINA' COM TANGERINEIRA 'KING' E LARANJEIRA 'CAIPIRA'	34
4.1. Introdução	34
4.2. Material e métodos	37
4.2.1. Material vegetal	37
4.2.2. Morfologia da planta	37
4.2.3. Morfologia das folhas	37
4.2.4. Morfologia dos frutos	38
4.2.5. Maturação	39
4.2.6. Similaridade fenotípica	40
4.3. Resultados e discussão	40
4.3.1. Planta	40
4.3.2. Folha	42
4.3.3. Morfologia dos frutos	46

4.3.4. Maturação.....	55
4.3.5. Similaridade fenotípica.....	58
CAPÍTULO V - CONCLUSÕES.....	62
CAPÍTULO VI - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
ANEXO I.....	74

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
2.1 - Primers utilizados na geração de marcadores moleculares SSR na população 'Montenegrina' x 'King': número de alelos amplificados na população, tamanho dos fragmentos gerados e tipo de gel utilizado na revelação. Cordeirópolis, SP, 2006.....	15
2.2 – Relação dos clones e híbridos encontrados na população oriunda da polinização dirigida da tangerineira 'Montenegrina'.....	16
2.3 Matriz de similaridade genética (índice de Jaccard) baseada em marcadores SSR entre a tangerineira 'Montenegrina' (M) e a progênie do seu cruzamento com a tangerineira 'King' (K).....	20
2.4 – Matriz de similaridade genética (índice de Jaccard) baseada em marcadores SSR entre a tangerineira 'Montenegrina' (M) e a progênie do seu cruzamento com a laranjeira 'Caipira' (L).....	22
3.1 – Fertilidade do pólen (FP) e nível de ploidia (P) de híbridos da tangerineira 'Montenegrina' com tangerineira 'King' (MK) e laranjeira 'Caipira' (MC). Eldorado do Sul, RS, 2005/06.....	31
4.1 – Características morfológicas qualitativas avaliadas e suas possíveis classes.....	38
4.2 – Hábito de crescimento, forma e altura de copa e circunferência do tronco a 30 cm do solo de plantas híbridas de 'Montenegrina' x 'King' e de 'Montenegrina' x 'Caipira'. Eldorado do Sul, RS, 2006.....	41
4.3 – Parâmetros morfológicos de folhas de híbridos de tangerineira 'Montenegrina' cruzada com tangerineira 'King' e com laranjeira 'Caipira'. Eldorado do Sul, RS, 2006.....	43
4.4 – Comprimento e largura do limbo, relação entre largura e comprimento do limbo (L/C) e relação entre comprimento do pecíolo e comprimento do limbo (P/L) de folhas de híbridos de 'Montenegrina' com 'King' e 'Caipira'. Eldorado do Sul, RS, 2006.....	45

4.5 – Parâmetros morfológicos de frutos de uma população de híbridos da tangerineira ‘Montenegrina’ com a tangerineira ‘King’. Eldorado do Sul, RS, 2005/06.....	47
4.6 – Parâmetros morfológicos de frutos de uma população de híbridos da tangerineira ‘Montenegrina’ com a laranjeira ‘Caipira’. Eldorado do Sul, RS, 2005/06.....	48
4.7 – Altura (mm) dos frutos de híbridos de tangerineira ‘Montenegrina’ com tangerineira ‘King’ e com laranjeira ‘Caipira’ em quatro anos de avaliação. Eldorado do Sul, RS, 2003-2006.....	50
4.8 Diâmetro (mm) dos frutos de híbridos de tangerineira ‘Montenegrina’ com tangerineira ‘King’ e com laranjeira ‘Caipira’ em quatro anos de avaliação. Eldorado do Sul, RS, 2003-2006.....	51
4.9 – Peso (g) dos frutos de híbridos de tangerineira ‘Montenegrina’ com tangerineira ‘King’ e com laranjeira ‘Caipira’ em quatro anos de avaliação. Eldorado do Sul, RS, 2003-2006.....	52
4.10 – Número de sementes viáveis por fruto de híbridos de tangerineira ‘Montenegrina’ com tangerineira ‘King’ e com laranjeira ‘Caipira’ em quatro anos de avaliação. Eldorado do Sul, RS, 2003-2006.....	53
4.11 – Matriz de similaridade morfológica (índice de Gower) entre a tangerineira ‘Montenegrina’ (M) e a progênie do seu cruzamento com a tangerineira king’.....	59
4.12 – Matriz de similaridade morfológica (índice de Gower) entre a tangerineira ‘Montenegrina’ (M) e a progênie do seu cruzamento com a laranjeira Caipira’.....	60

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
2.1 – Gel de agarose 4 % mostrando os alelos amplificados com o primer CCSM 6 em Montenegrina (M), King (K), 'Pêra' (L) e em um tangor (C09). Note que a banda superior do C09 (seta branca) é igual a superior da 'Pêra' e diferente dos outros pais (M e K) e a banda inferior (seta amarela) é igual a do genitor feminino (M). Cordeirópolis, SP, 2006.....	17
2.2 – (A) Gel de acrilamida 8 % revelando a amplificação do primer CCSM 129 e (B) interpretação do resultado da "A": as colunas C14 e C15 só possuem alelos da 'Montenegrina' (M), ou seja, nenhum da 'King' (K) ou 'Pêra' (P), sendo assim clones da M. Cordeirópolis, SP, 2006.....	17
2.3 – Semelhança genética entre híbridos e genitores do cruzamento da tangerineira 'Montenegrina' com a tangerineira King'.....	19
2.4 – Semelhança genética entre híbridos e genitores do cruzamento da tangerineira 'Montenegrina' com a laranja 'Caipira'.....	22
3.1 – À esquerda grãos de pólen corados e parcialmente corado (superior) do híbrido D29; à direita uma prófase I no híbrido C25 apresentando 9 bivalentes; (escala: 10 µm).....	29
3.2 – Flores dos híbridos C20 e C27 com anteras de coloração anormal, indicando baixa fertilidade masculina. Eldorado do Sul, RS, 2005/06.....	32
4.1 – Folhas lanceoladas com margem dentada da tangerineira 'Montenegrina' (esquerda) e folhas elipsóides com margem crenada da 'King' (direita).....	42
4.2 – Frutos dos híbridos C32 (esquerda) e C05 (direita). Nota-se que os frutos do C05 possuem boa aparência apesar do alto número de sementes. Eldorado do Sul, RS, 2006.....	54
4.3 – Evolução da maturação dos frutos de híbridos da tangerineira 'Montenegrina' com 'King' e 'Caipira'. Eldorado do Sul, RS, 2003-2006.....	56

	Página
4.4 – Árvore de similaridade fenotípica entre híbridos de 'Montenegrina' e 'King'. Linha de corte na similaridade média.....	58
4.5 – Árvore de similaridade fenotípica entre híbridos de 'Montenegrina' e 'Caipira'. Linha de corte na similaridade média.....	60

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1.1. Importância sócio-econômica dos citros

No mundo foram produzidas mais de 500 milhões de toneladas de frutas em 2005. O maior volume produzido, mais de 105 milhões de toneladas, foi de frutas cítricas, sendo as frutas com maior volume produzido, em uma área cultivada de cerca de 7,6 milhões de hectares. O Brasil é o maior produtor mundial de frutas cítricas, à frente dos Estados Unidos e China, segundo e terceiro colocados, respectivamente, produzindo em torno de 19 % da produção mundial em 2005, cerca de 20 milhões de toneladas (FAO, 2006). Estima-se que o Estado de São Paulo, Brasil, produz 80 % do suco de laranja consumido no mundo (Mourão Filho et al., 2002).

Das 23 milhões de toneladas de tangerinas produzidas no mundo em 2005, 1,2 milhão de toneladas foram produzidas pelo Brasil. Em 2004 o país exportou cerca de 18 mil toneladas, faturando mais de oito milhões de dólares, sendo que aumentou a importação de 730 t em 2003 para 1340 t em 2004, o que custou 1,52 milhão de dólares em 2004. Contudo, o país esteve muito aquém da exportação de países como Espanha, que exportou 1,5 milhão de toneladas, e Uruguai, que exportou mais de 37 mil toneladas em 2004 (FAO,

2005). A demanda por tangerinas no mercado mundial se deve à exigência do consumidor por produtos saudáveis, ricos em vitaminas e de fácil consumo (como frutos fáceis de descascar). Uma tendência atual no mercado de frutas é a busca de frutas sem sementes.

A produtividade dos pomares brasileiros é limitada pelo uso de variedades pouco produtivas e que sofrem com pragas e doenças (Mourão Filho et al., 2002). Historicamente a citricultura brasileira vem sofrendo com epidemias, como a tristeza, o declínio, o cancro cítrico e mais recentemente a morte súbita e a huanglongbing (*greening*), principalmente no Estado de São Paulo, que comprometeram e ainda comprometem pomares inteiros. Atribui-se fortemente a culpa destes problemas à uniformidade genética dentro de pomares e entre pomares.

O Estado do Rio Grande do Sul apresenta condições de clima e solo favoráveis à produção de frutas cítricas de mesa, pois os frutos obtidos são de qualidades físico-químicas muito boas (Koller, 1994), principalmente em função das baixas temperaturas noturnas na época de maturação que favorecem o acúmulo de ácidos no suco, e a alternância de temperaturas moderadamente altas durante o dia e menores durante a noite, que permite maior fotossíntese líquida e, conseqüentemente, maior concentração de sólidos solúveis no suco e melhor coloração da casca (Rodriguez, 1987; Sentelhas, 2005; Koller, 2006). A maior parte da produção gaúcha de citros se dá em pequenas propriedades, e o mercado de frutos para mesa é o destino da maior parte da produção (GRUPEX, 2005). A área cultivada com tangerineiras em 2004 era de 13.195 hectares, onde foram produzidas 174.746 toneladas da fruta, sendo o segundo maior produtor do Brasil (IBGE, 2006). A grande freqüência de pequenas propriedades

faz do Estado uma região apta a produzir frutas com características adequadas ao mercado de cítricos de mesa, o qual exige cuidados mais intensivos com vistas à qualidade do produto.

A existência de extensas áreas de terra com clima e solo favoráveis a produção de frutos de boa qualidade e a insuficiente produção atual forma um cenário de grandes possibilidades para o cultivo de citros no Estado. O mercado interno necessita de variedades com época de maturação distinta das cultivadas hoje. Ainda, a obtenção de variedades sem sementes através de programas de melhoramento genético abriria grandes portas para o mercado externo.

A cultura das tangerineiras apresenta pequena diversidade no Estado de São Paulo, reunindo apenas quatro variedades comerciais: tangerineira 'Poncã' (*C. reticulata* Blanco), tangor 'Murcott' [*C. reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osbeck] e com menos importância a 'Mexerica do Rio' (*C. deliciosa* Ten.) e a tangerineira 'Cravo' (*C. reticulata* Blanco) (Pio, 2003).

A 'Montenegrina' (*C. deliciosa* Ten.) é o principal cultivar de tangerineira em cultivo no Estado do Rio Grande do Sul, ocupando aproximadamente 30 % da área plantada (GRUPEX, 2005), fato devido às preferências do mercado consumidor local, à sua adaptação climática e à maturação tardia. Essa variedade surgiu por volta de 1930 no município de Montenegro, RS (Campani apud Rodrigues & Dornelles, 1999) provavelmente a partir de um *seedling* da cultivar Caí. Sua maturação ocorre de agosto a outubro, na região da Depressão Central (Sartori et al., 1998; Rodrigues & Dornelles, 1999), e no período anterior outras variedades abastecem o mercado local, como 'Okitsu', 'Caí', 'Poncã' e 'Pareci' (EMATER, 2004).

Produzir na entressafra é o grande segredo na produção de frutas em geral, ou seja, produzir tangerineiras do final da primavera a meados do outono para o mercado interno e no inverno para o hemisfério norte, já que a safra no hemisfério sul coincide com a entressafra do norte. Portanto, há um grande espaço a ser conquistado. Em todas as partes do mundo os consumidores vêm se tornando cada vez mais exigentes. Buscam frutas com características de sabor diferente, tamanho, forma e cor atrativos, sem sementes, fáceis de descascar, com vida de prateleira mais longa e livre de resíduos químicos (Pio, 2003).

Além de gerar novos tipos de frutos, o melhoramento genético é uma importante forma de garantir a produtividade e a sanidade dos pomares, sendo uma ferramenta com longo prazo para dar resultados, que, no entanto, são permanentes (Mourão Filho et al., 2002). Para o estabelecimento de um programa de melhoramento consistente é importante que conheçamos os recursos genéticos disponíveis. É provável que os programas de melhoramento que empregam técnicas convencionais associadas à biotecnologia tenham maiores chances de sucesso. Algumas características das plantas cítricas como poliembrionia, baixo pegamento de frutos por flor polinizada e período juvenil longo tornam essa integração de ferramentas fundamental no melhoramento da espécie (Mourão Filho et al., 2002).

O melhoramento de variedades copa de citros deve objetivar plantas com poucas ou nenhuma semente, com boa coloração, bom rendimento de suco (acima de 50 % do peso do fruto), além de produtividade e resistência a doenças (Mourão Filho et al., 2002).

1.2. Origem e classificação botânica dos citros

Os citros são plantas dicotiledôneas pertencentes a família Rutaceae, subfamília Aurantioideae, tribo Citreae e subtribo Citrinae. Dos 13 gêneros dessa subtribo, *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus* têm importância econômica no mundo. Swingle apud Swingle & Reece (1967) dividiu o gênero *Citrus* em 16 espécies. Em outra classificação feita por Tanaka apud Swingle & Reece (1967), o gênero *Citrus* é composto por 162 espécies, onde a tangerineira 'Montenegrina' pertence à espécie *C. deliciosa* Ten. e a tangerineira 'King' à *C. nobilis* Lour. A classificação de Tanaka é a mais utilizada hoje.

As tangerineiras têm origem antiga e progenitores selvagens desconhecidos. A maioria delas se originou na China, no Japão e sudeste da Ásia. O grupo das tangerineiras já era cultivado na Ásia nos tempos pré-modernos, e elas só foram introduzidas na Inglaterra em 1805 (Spina, 1985; Davies & Albrigo, 1994). As laranjeiras, os limoeiros e as cidreiras foram introduzidos na América por Colombo em 1493. Outras espécies cítricas foram introduzidas mais tarde através da colonização Espanhola e Portuguesa (Soost & Roose, 1996).

A espécie *C. nobilis* Lour. provavelmente se originou na Indo-China e se espalhou para o Japão e Malásia. Sua semelhança com laranjas ou características intermediárias entre laranja e tangerina faz crer que a espécie é um tangor natural. A variedade King está entre as tangerineiras que produzem os maiores frutos. Possui casca espessa, moderadamente aderente, com superfície moderadamente lisa a rugosa e verrugosa. A coloração da casca vai do laranja-amarelado ao laranja na maturidade. As sementes podem ser muitas. A maturação é tardia, e a estocagem na planta é boa. A variedade já teve

importância na Flórida, chegando a ser utilizada como progenitora em cruzamentos dirigidos, os quais originaram híbridos como 'Kinnow', 'Kara', 'Wilking' e 'Frua' (Hodgson, 1967; Mourão Filho et al., 2002).

A espécie *C. deliciosa* Ten. é conhecida como tangerineiras do Mediterrâneo. Sua origem não é clara, mas é provável que tenha se originado por hibridação de *C. reticulata* Blanco. No mundo, principalmente em países da região mediterrânea, existe uma série de nomes que se referem à espécie, e muitos significam comum ou nativa (Hodgson, 1967). No Brasil, as principais variedades são a 'Mexerica do Rio', também conhecida por 'Caí' e bergamota comum no Rio Grande do Sul, e a 'Montenegrina', que é a principal variedade em cultivo no Estado do Rio Grande do Sul. Seus frutos são de tamanho médio, de casca fina e pouco aderente e com sementes. A maturação é precoce a tardia, dependendo da variedade, e os frutos mantidos na planta perdem qualidade.

1.3. Objetivos do trabalho

Em 1993, na Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Eldorado do Sul, RS, foram feitos cruzamentos controlados envolvendo as tangerineiras 'Montenegrina' (parental feminino) e 'King' (parental masculino). O objetivo do cruzamento foi combinar a qualidade de fruto da 'Montenegrina' com o tamanho de frutos e maturação tardia da 'King', para estender a colheita além da época da 'Montenegrina'. Na ocasião foi coletado intencionalmente pólen de tangerineiras 'King', componentes do pomar coleção de citros daquela estação experimental, para polinizar flores de 'Montenegrina', e acidentalmente coletou-se também pólen de laranjeira doce 'Caipira' (uma planta jovem de 'Caipira' existia entre as cinco plantas

identificadas por 'King'), fato só descoberto no ano seguinte, após a polinização, quando da maturação dos frutos destas. Bastianel et al. (1998), utilizando marcadores moleculares do tipo RAPD, identificaram 52 novas plantas híbridas oriundas daquele cruzamento, que foram plantadas no campo juntamente com outras 12 cuja natureza híbrida era duvidosa, devido a limitações do marcador utilizado, totalizando 64 plantas.

Este trabalho se propõe a identificar a origem das plantas e a fazer sua caracterização molecular, morfológica e citogenética visando a seleção de genótipos superiores.

CAPÍTULO II

IDENTIFICAÇÃO DA ORIGEM E ESTIMATIVA DA SIMILARIDADE GENÉTICA EM PROGÊNIES DE TANGERINEIRA ‘MONTENEGRINA’

2.1. Introdução

Os principais cultivares de citros em cultivo comercial no Brasil foram originadas por mutações espontâneas ou por seleção de plantas individuais. Poucos cultivares se originaram de programas de melhoramento por hibridação (Schwarz, 2006). Há grandes oportunidades para troca de genes e manipulação genética no grupo dos citros, já que são possíveis cruzamentos interespecíficos e intergenéricos. Para a grande maioria dos caracteres há muita variabilidade a ser explorada dentro do gênero (Gmitter Jr. et al., 1992; Bordignon, 1995).

O uso da hibridação no melhoramento genético permite a geração de variação genotípica e fenotípica, que são o “substrato” para a seleção de indivíduos superiores. Em citros, programas de melhoramento baseados em hibridação se deparam com algumas dificuldades. A alta heterozigose dos parentais faz com que as progênies se assemelhem pouco com eles, pois a variância observada nos pais não se deve apenas a efeitos aditivos (herdáveis). A reprodução apomítica dificulta a identificação de híbridos. Esterilidade e incompatibilidade limitam o uso de alguns genitores e algumas combinações.

Ainda, a juvenilidade das plantas oriundas de sementes dificulta a seleção de genótipos quanto às características dos frutos, pois são necessários de 10 a 15 anos para se ter uma boa avaliação destas características (Gmitter Jr. et al., 1992; Köller, 1994; García et al., 1999).

A obtenção eficiente de ganhos genéticos depende do conhecimento da variabilidade genética da espécie (Barbosa Neto & Bered, 1998). Diferentes técnicas podem ser utilizadas na estimativa da similaridade genética entre plantas, como a avaliação da morfologia, os marcadores enzimáticos, bioquímicos e de DNA (Barbosa Neto & Bered, 1998; Frizzo et al., 2004).

Os trabalhos com marcadores moleculares começaram com o advento da técnica RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição), que se baseia na restrição do DNA com enzimas arbitrárias. Com o surgimento da reação da polimerase em cadeia (PCR), novas técnicas foram incorporadas (RAPD, polimorfismo de DNA amplificado ao acaso; SSR, seqüências simples repetidas; AFLP, polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados; e outras) com vantagens de praticidade e custo menor (Ferreira e Grattapaglia, 1996; Milach, 1998).

Marcadores do tipo microssatélites (SSR) são diferenciados pela sua natureza codominante. As seqüências amplificadas por primers arbitrários são repetições simples de 1 a 4 pares de bases. A técnica permite o uso de primers desenvolvidos para espécies relacionadas (Ferreira & Grattapaglia, 1996). Em citros, Novelli et al. (2006) identificaram e testaram mais de cem *loci* de microssatélites em laranja doce [*C. sinensis* (L.) Osb.].

Marcadores do tipo SSR foram comparados com RAPD em genótipos de milho doce (*Zea mays*), mostrando-se mais informativos (Amorim, 2002).

Ruiz et al. (2000) compararam marcadores SSR e isoenzimas na sua habilidade em detectar híbridos em progênes do cruzamento de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. var. Flying Dragon com o tangor 'Ortanique' [*C. reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osb.] e da autopolinização de *Fortunella crassifolia* Swing. Ambos os marcadores foram eficientes no cruzamento de *Poncirus* e 'Ortanique', já que a distância genética e o número de *loci* polimórficos era maior. Mas os SSRs foram mais eficiente no caso da autopolinização, dado que identificaram mais plantas híbridas e um maior número de *loci* foi capaz de o fazer.

Muitos trabalhos usaram marcadores moleculares na pesquisa em citros, objetivando estimativa de diversidade genética (Corazza-Nunes et al., 2002), identificação de híbridos (Bastianel et al., 1998), mapeamento gênico (Cai et al., 1994), entre outros.

Corazza-Nunes et al. (2002) testaram 20 primers SSR desenvolvidos para laranja doce 'Pêra' [*C. sinensis* (L.) Osb.] em 32 acessos de pomeleiro (*C. paradisi* Macf.) e toranjeira [*C. maxima* (Burm.) Merr.], e somente cinco primers foram polimórficos entre os acessos, apresentando de quatro a sete alelos por loco.

Marcadores SSR usados na identificação de híbridos em retrocruzamento de *C. limon* var. Femminello (genitor masculino) com o cíbrido 'Valência' [*C. sinensis* (L.) Osb.] x 'Femminello' se mostraram mais convenientes que marcadores AFLP, desde que analisado um número suficiente de *loci* (Scarano et al., 2003).

Devido à alta heterozigosidade das plantas cítricas é esperada variação genética na progênie de um cruzamento. Oliveira et al. (2002a)

verificaram, utilizando marcadores do tipo RAPD e plantas oriundas do cruzamento entre *C. reticulata* Blanco cv. Cravo e *C. sinensis* (L.) Osb. cv. Pêra, que os híbridos têm diferentes coeficientes de semelhança aos genitores e entre si. A estimativa da semelhança entre genótipos pode auxiliar na escolha de tipos mais ou menos distintos, cujo cruzamento pode levar a uma maior ou menor variância genética da progênie (Messmer et al.,1993). Outros trabalhos de estimativa de similaridade genética em híbridos de citros foram publicados e permitiram identificar genótipos mais ou menos semelhantes aos parentais, e revelaram a formação de combinações gênicas diferentes das encontradas nos pais (Bastianel et al., 2006; Weiler, 2006).

Na Estação Experimental Agrônômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul encontra-se estabelecida uma população de *seedlings* da tangerineira 'Montenegrina' oriundas de polinização dirigida. O objetivo do cruzamento foi combinar a qualidade de fruto da 'Montenegrina' com o tamanho de frutos e maturação bastante tardia da tangerineira 'King'. A polinização foi realizada em 1993. Na ocasião foi coletado pólen de tangerineiras 'King', componentes do pomar coleção daquela estação experimental, para polinizar flores de 'Montenegrina', e acidentalmente coletou-se também pólen de laranjeira doce cv. Caipira, fato só descoberto após a polinização (S.F. Schwarz, comunicação pessoal). Bastianel et al. (1998), utilizando marcadores moleculares do tipo RAPD, identificaram 52 novas plantas híbridas dentre a progênie daquele cruzamento, que foram plantadas no campo juntamente com outras 12 cuja natureza híbrida era duvidosa, devido às limitações do marcador utilizado, totalizando 64 plantas.

Este trabalho objetivou investigar a origem das plantas oriundas daquele cruzamento entre *C. deliciosa* Ten. cv. Montenegrina e *C. nobilis* Lour. cv. King, que atualmente é composta de 49 plantas, e estimar a semelhança genética entre híbridos e entre cada híbrido e os parentais.

2.2. Material e métodos

Para alcançar os objetivos do trabalho utilizou-se marcadores moleculares do tipo SSR (microssatélites). Incluiu-se a laranjeira doce cultivar Pêra para identificar os possíveis filhos de laranjeira 'Caipira, já que existe pouca variação genética entre as cultivares de laranjeira doce (Novelli et al., 2006) por terem, possivelmente, se originado por mutações.

Para a extração de DNA genômico total utilizou-se a metodologia descrita por Doyle & Doyle (1987) com modificações. As amostras de folhas das 49 plantas filhas mais os parentais 'Montenegrina', 'King' e 'Pêra' foram trituradas em nitrogênio líquido e depois suspensas em tampão de extração, composto de 950 µl de CTAB (2 % CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris EP pH 8,0 e 0,1 mg/ml proteinase K) e 13 µl de mercaptoetanol, em tubos ependorfs e mantidas em banho-maria a 60 °C durante 30 a 60 minutos. Após adicionou-se 650 µl de solução CIA (clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 24:1) e manteve-se a temperatura ambiente por 10 minutos sob leve agitação. Centrifugou-se a suspensão por 15 minutos a 1300 rpm. Depois, coletou-se o sobrenadante e se adicionou imediatamente 650 µl de isopropanol a -20 °C, com posterior inversão dos tubos para homogeneização. A solução obtida foi mantida em geladeira (± 4 °C) durante a noite. Na manhã seguinte as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 1300 rpm. Após, a fase líquida foi removida e os tubos com o *pellet* de DNA foram invertidos e mantidos nessa

posição por 30 minutos para que secassem. Passada a fase de secagem, adicionou-se aos tubos solução de lavagem (76 % etanol e 10 mM acetato de amônio) e após 10 minutos fez-se nova centrifugação (5 minutos a 1300 rpm) para separação do pellet de DNA. Repetiu-se o processo de secagem. O DNA limpo e seco foi dissolvido em 50 µl TE (10 mM Tris Base pH 8,0 e 1 mM EDTA).

A concentração de DNA das amostras foi determinada através de eletroforese (uma hora a 120 V) em gel de agarose 0,8% contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio e comparação das bandas com padrões de concentração conhecida. O DNA foi diluído a 100 ng/µl e mantido em congelador a -20 °C. No mesmo gel se observou a presença de RNA, que quando em grande quantidade foi tratado com RNase.

As reações de amplificação, a eletroforese e a revelação dos géis foram feitas no Laboratório de Biotecnologia do Centro Apta Citros Sylvio Moreira – IAC (Cordeirópolis, SP). As reações foram preparadas num volume de contendo uma unidades da enzima Taq polimerase, 10 mM de dNTP mix (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 2,5 µl 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 amplificação dos fragmentos foi feita submetendo-se as soluções de reação a 30 ciclos de: 94 °C por 30 segundos, 65-56 °C por 30 segundos (touchdown 0,3 °C a cada ciclo) e 72 °C por cinco segundos, e, ao final dos 30 ciclos, a 72 °C por cinco minutos. Para visualização dos fragmentos amplificados as amostras foram submetidas à eletroforese em géis de agarose ou acrilamida. Quando em agarose utilizou-se géis a 4 %, preparado com tampão TAE 1X (0,04 M, tris acetato, 1 mM de EDTA) e brometo de etídio (0,5 µg/ml), submetidos a eletroforese (120 V) por 2 horas em tampão TAE 1X após

aplicação de 8 µl da reação, e a revelação foi feita em luz UV. Quando os géis de agarose não separaram claramente as bandas utilizou-se géis de acrilamida preparados com 1,5 mL de TAE 10X, 8 ml de acrilamida 29:1 (acrilamida:bis-acrilamida), 350 µl de persulfato de amônia, 25 µl de temed e 20,12 mL de água bidestilada autoclavada. Aplicou-se 6 µl de cada reação e submeteu-se o gel a corrente elétrica de 80 V por 2,5 horas em tampão TAE 1X. A revelação foi feita colocando-se os géis por 10 minutos em etanol 70 % seguido por 2 lavagens em água destilada, 3 minutos em solução de ácido nítrico 1 % seguido por 2 lavagens, 20 minutos em nitrato de prata 0,2 % seguido por 3 lavagens com água destilada, seguido pela aplicação de solução reveladora (100 mL CaCO₃ 3 % com 54 µl de formaldeído) até o aparecimento das bandas, quando aplicou-se acetato 5 % por 0,5 a 5 minutos para interromper a reação.

Os primers utilizados neste estudo (Tabela 2.1) foram identificados a partir do genoma da laranjeira doce [*C. sinensis* (L.) Osb.] (prefixo CCSM) e de seqüências expressas (ESTs) de citros (prefixo CCSMEc) no próprio Centro Apta Citros Sylvio Moreira. Vinte e três pares de primers foram testados e se selecionou os que amplificaram pelo menos uma banda diferente entre os parentais tangerineiras 'Montenegrina' e 'King'.

Os híbridos que tiveram laranjeira doce como parental masculino foram identificados por compartilharem com laranjeira 'Pêra' alelos ausentes nos outros dois parentais.

Os marcadores gerados foram avaliados atribuindo-se o conceito 1 para presença e 0 para ausência em cada planta. Os cálculos de similaridade genética foram feitos utilizando-se o coeficiente de Jaccard ($S = a/(n - d)$), onde a é o número de bandas compartilhadas por cada par de genótipos (1,1), n é o

número possível de combinações entre genótipos (1,1, 0,0, 0,1 e 1,0) e d é o número de combinações (0,0) (Jaccard, 1908 apud Brown-Guedira et al., 2000). O agrupamento foi realizado pelo método UPGMA, cujo resultado foi utilizado na construção de um dendrograma. Aplicou-se a correlação cofenética (coeficiente de Mantel) para avaliar a fidelidade entre dendrogramas e matrizes de similaridade.

TABELA 2.1 - Primers utilizados na geração de marcadores moleculares SSR na população 'Montenegrina' x 'King': número de alelos amplificados na população, tamanho dos fragmentos gerados e tipo de gel utilizado na revelação. Cordeirópolis, SP, 2006.

Primer	Fonte	Alelos amplificados	Gel utilizado
CCSM 1	Novelli et al., 2006	2 (176 e 153 pb)	Acrilamida 8 %
CCSM 4	Novelli et al., 2006	2 (<100 pb)	Acrilamida 8 %
CCSM 6	Novelli et al., 2006	3 (236, 227 e 210 pb)	Agarose 4 %
CCSM 19	Novelli et al., 2006	2 (267 e 249 pb)	Agarose 4 %
CCSM 25	Novelli et al., 2006	3 (156, 127 e 120 pb)	Acrilamida 8 %
CCSM 35	Novelli et al., 2006	2 (197 e 167 pb)	Agarose 4 %
CCSM 119	Novelli et al., 2006	3 (<100 pb)	Agarose 4 %
CCSM 129	Novelli et al., 2006	3 (173, 157 e 150 pb)	Acrilamida 8 %
CCSM 147	Novelli et al., 2006	3 (133, 117 e 110 pb)	Acrilamida 8 %
CCSM 150	Novelli et al., 2006	3 (165, 159 e 146 pb)	Agarose 4 %
CCSM 170	Novelli et al., 2006	2 (189 e 167 pb)	Acrilamida 8 %
CCSMEc 11	Palmieri et al. 2006	3 (153, 139 e 135 pb)	Acrilamida 8 %
CCSMEc 58	Palmieri et al. 2006	3 (150, 145 e 140 pb)	Acrilamida 8 %
CCSMEc 67	Palmieri et al. 2006	4 (231 a 250 pb)	Acrilamida 8 %

2.3. Resultados e discussão

Dos vinte e três pares de primers testados, quatorze (60 %) mostraram polimorfismo entre 'Montenegrina' e 'King'. Esta proporção é maior que a observada por Weiler (2006) entre 'Montenegrina' e 'Clementina Fina', provavelmente porque no presente trabalho os primers a serem testados foram

escolhidos com base em experiências anteriores dos pesquisadores do Centro de Citricultura e também de Weiler (2006), e, portanto, não foram escolhidos ao acaso.

2.3.1. Origem da população

A comparação dos perfis genéticos dos híbridos e pais, através da presença de alelos dos pais nos híbridos, permitiu identificar 12 híbridos filhos de laranja doce com 'Montenegrina' (Tabela 2.2). Dentre os doze híbridos filhos de laranja doce, o primer CCSM 6 (Figura 2.1) identificou dez tangoreiros, enquanto o CCSM 4 identificou nove, o CCSM 119 revelou cinco tangores e três deles foram identificados através do CCSMEc 67. Os doze tangoreiros e laranja doce têm a distância genética estimada dos demais indivíduos de 0,54 (dados não apresentados).

TABELA 2.2 – Relação dos clones e híbridos encontrados na população oriunda da polinização dirigida da tangerineira 'Montenegrina'.

Clones nucleares	C14, C15, C19, C29, D11, D14, D19, D20, D24, D28, D30 e D31
Híbridos (Montenegrina x King)	C01, C02, C05, C07, C08, C10, C17, C18, C22, C23, C24, C26, C28, C32, D03, D06, D08, D09, D16, D18, D21, D22, D25, D29 e D32
Híbridos (Montenegrina x Caipira)	C09, C11, C13, C20, C21, C25, C27, C31, D04, D10, D12 e D17

A constituição alélica referente ao primer CCSM 129 de doze das plantas estudadas (Tabela 2.2) mostrou que elas são clones de 'Montenegrina', pois apresentaram os mesmos alelos que a 'Montenegrina' e nenhum da 'King' ou da 'Pêra' (Figura 2.2). Esperava-se encontrar doze clones nucleares, já que eles foram adicionados à população de híbridos no momento do transplante ao

pomar por causa das dúvidas deixadas pelo marcador RAPD (dados não publicados).

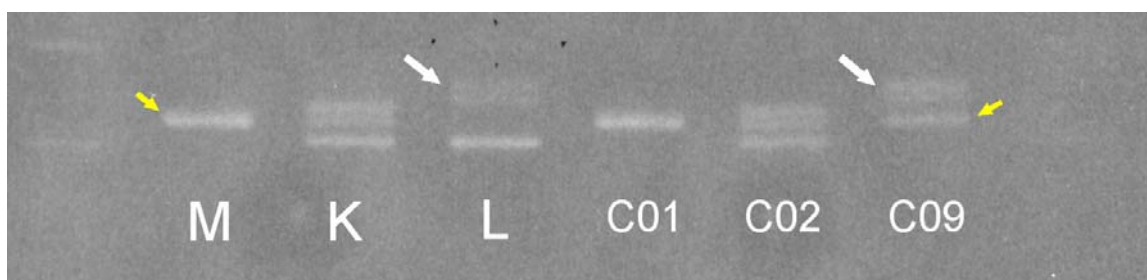


FIGURA 2.1 – Gel de agarose 4 % mostrando os alelos amplificados com o primer CCSM 6 em Montenegrina (M), King (K), 'Pêra' (L) e em um tangor (C09). Note que a banda superior do C09 (seta branca) é igual a superior da 'Pêra' e diferente dos outros pais (M e K) e a banda inferior (seta amarela) é igual a do genitor feminino (M). Cordeirópolis, SP, 2006.

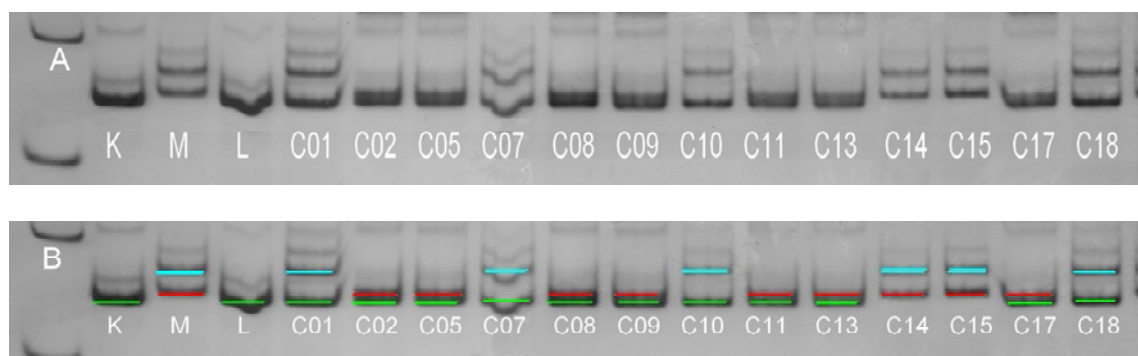


FIGURA 2.2 – (A) Gel de acrilamida 8 % revelando a amplificação do primer CCSM 129 e (B) interpretação do resultado da "A": as colunas C14 e C15 só possuem alelos da 'Montenegrina' (M), ou seja, nenhum da 'King' (K) ou 'Pêra' (P), sendo assim clones da M. Cordeirópolis, SP, 2006.

A técnica RAPD utilizada por Bastianel et al. (1998) na identificação dos híbridos deste cruzamento tem problemas de repetibilidade, provavelmente por utilizar baixas temperaturas de anelamento na reação da polimerase em

cadeia o que torna o anelamento mais inespecífico que no caso dos microssatélites (Ferreira e Gratapaglia, 1996).

Grattapaglia et al. (2004) usaram marcadores microssatélites para testar paternidade em *Eucalyptus*, e a técnica se mostrou eficiente na identificação dos genitores masculinos da progênie avaliada.

2.3.2. População 'Montenegrina' x 'King'

Os 14 primers utilizados no trabalho geraram 38 bandas na população de híbridos de 'Montenegrina' com 'King', com destaque para o CCSMEc 67 que gerou 4 alelos, 2 em cada parental (Tabela 2.1). Os marcadores gerados permitiram diferenciar todos os híbridos da população, com distância mínima de 0,14 que ocorreu entre os híbridos D32 e C08 (Tabela 2.3).

A similaridade estimada entre 'Montenegrina' e 'King' foi 0,31 (Tabela 2.3), muito semelhante a observada por Koehler-Santos et al. (2003), mas inferior a observada por Herrero et al. (1996) com isoenzimas. Atribuem-se as diferenças ao tipo de marcador e aos critérios de escolha dos *loci* e sistemas enzimáticos. O agrupamento por similaridade genética dividiu a população em três grupos com similaridade menor que a média, um contendo a 'Montenegrina' e mais 12 híbridos, um segundo grupo contendo a 'King' e mais sete híbridos e outro com seis híbridos mais distantes de ambos os parentais do que os próprios parentais entre si (Figura 2.3) o que não se observa na matriz de similaridade (Tabela 2.3).

Esse fenômeno foi observado por Weiler (2006), em uma população de híbridos de 'Clementina Fina' (*C. Clementina* Hort. ex Tan.) com 'Montenegrina' utilizando também marcadores SSR, e por Bastianel et al. (2006) com 'Murcott' x 'Pêra'. Porém, híbridos de tangerineira 'Cravo' e laranjeira 'Pêra'

não se comportaram da mesma forma (Oliveira et al., 2002b). Os autores atribuem a não formação de grupos significativos ao grande número de marcadores utilizados e ausência de ligação entre eles.

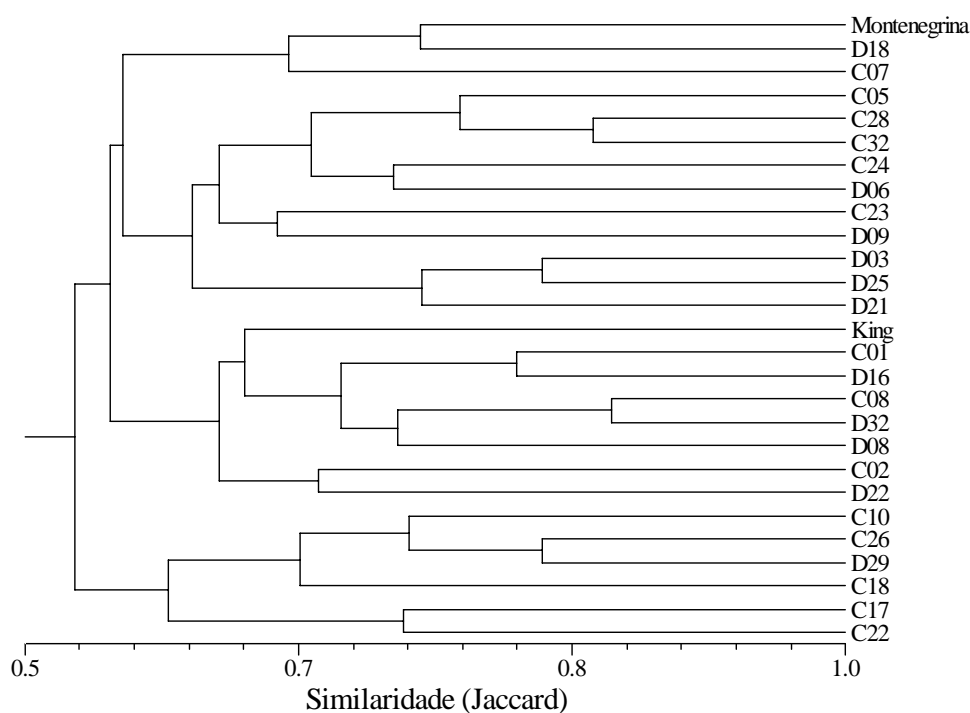


FIGURA 2.3 – Semelhança genética entre híbridos e genitores do cruzamento da tangerineira 'Montenegrina' com a tangerineira 'King'.

O dendrograma não foi uma boa representação da matriz de similaridade, pois o coeficiente de Mantel obtido foi de 0,62, abaixo dos valores críticos normalmente aceitos de 0,8 e 0,85 (Sokal & Rohlf, 1962; Sokal, 1986). Isso indica que há grande quantidade de variação ao acaso, ou seja, uma estrutura pobre na população. Rodrigues & Diniz-Filho (1998) sugerem que o método de agrupamento UPGMA funciona melhor em grandes matrizes, necessitando de uma verificação pelo cálculo da correlação cofenética (r). O agrupamento por UPGMA obtido por Rodrigues et al. (2002) também não atingiu r maior que 0,8, juntamente com outros métodos de ordenamento.

TABELA 2.3 – Matriz de similaridade genética (índice de Jaccard) baseada em marcadores SSR entre a tangerineira ‘Montenegrina’ (M) e a progênie do seu cruzamento com a tangerineira ‘King’ (K).

	M	K	C01	C02	C05	C07	C08	C10	C17	C18	C22	C23	C24	C26	C28	C32	D03	D06	D08	D09	D16	D18	D21	D22	D25	D29	D32
M	1																										
K	0,31	1																									
C01	0,51	0,61	1																								
C02	0,20	0,59	0,59	1																							
C05	0,62	0,57	0,42	0,52	1																						
C07	0,58	0,58	0,58	0,56	0,47	1																					
C08	0,20	0,64	0,82	0,73	0,41	0,61	1																				
C10	0,53	0,58	0,75	0,61	0,48	0,60	0,72	1																			
C17	0,57	0,47	0,47	0,55	0,63	0,39	0,50	0,53	1																		
C18	0,58	0,53	0,58	0,56	0,70	0,50	0,47	0,65	0,64	1																	
C22	0,50	0,57	0,47	0,69	0,61	0,44	0,60	0,58	0,73	0,57	1																
C23	0,52	0,62	0,52	0,50	0,63	0,48	0,50	0,35	0,51	0,48	0,50	1															
C24	0,53	0,58	0,53	0,51	0,68	0,55	0,56	0,37	0,53	0,54	0,57	0,70	1														
C26	0,48	0,63	0,58	0,51	0,53	0,60	0,56	0,78	0,48	0,71	0,64	0,44	0,45	1													
C28	0,58	0,53	0,44	0,61	0,80	0,50	0,47	0,50	0,57	0,60	0,57	0,53	0,65	0,50	1												
C32	0,65	0,51	0,48	0,67	0,73	0,50	0,56	0,45	0,53	0,55	0,62	0,59	0,71	0,45	0,84	1											
D03	0,48	0,64	0,54	0,62	0,58	0,67	0,68	0,56	0,55	0,47	0,71	0,50	0,72	0,56	0,56	0,56	1										
D06	0,64	0,54	0,59	0,62	0,60	0,67	0,62	0,51	0,45	0,56	0,53	0,55	0,72	0,47	0,61	0,78	0,62	1									
D08	0,48	0,62	0,64	0,65	0,42	0,57	0,74	0,55	0,48	0,36	0,57	0,69	0,53	0,48	0,48	0,58	0,65	0,56	1								
D09	0,61	0,48	0,55	0,62	0,53	0,50	0,57	0,37	0,61	0,37	0,57	0,65	0,67	0,32	0,61	0,73	0,57	0,64	0,67	1							
D16	0,58	0,53	0,80	0,60	0,52	0,55	0,70	0,57	0,43	0,45	0,52	0,57	0,64	0,50	0,58	0,64	0,62	0,62	0,67	0,73	1						
D18	0,70	0,45	0,52	0,63	0,50	0,74	0,50	0,48	0,47	0,53	0,48	0,50	0,52	0,52	0,57	0,59	0,48	0,65	0,47	0,64	0,56	1					
D21	0,50	0,64	0,59	0,48	0,65	0,67	0,48	0,51	0,45	0,61	0,54	0,60	0,72	0,67	0,61	0,56	0,73	0,62	0,55	0,52	0,68	0,58	1				
D22	0,50	0,53	0,61	0,68	0,34	0,55	0,64	0,52	0,55	0,52	0,63	0,53	0,50	0,55	0,36	0,50	0,51	0,59	0,61	0,63	0,55	0,64	0,47	1			
D25	0,47	0,60	0,52	0,58	0,55	0,62	0,54	0,44	0,63	0,44	0,61	0,61	0,68	0,47	0,62	0,57	0,81	0,50	0,68	0,70	0,64	0,55	0,75	0,53	1		
D29	0,47	0,62	0,51	0,64	0,53	0,53	0,64	0,69	0,56	0,63	0,69	0,42	0,48	0,81	0,63	0,58	0,59	0,46	0,52	0,39	0,48	0,50	0,54	0,53	0,55	1	
D32	0,42	0,76	0,70	0,68	0,48	0,62	0,86	0,61	0,54	0,47	0,60	0,60	0,61	0,56	0,43	0,51	0,73	0,57	0,71	0,52	0,62	0,44	0,53	0,62	0,58	0,59	1

As informações geradas (Tabela 2.3) estimam que os híbridos D18, C32, D06, C05 e D09 são os mais semelhantes a 'Montenegrina' e os mais indicados para retrocruzamentos com este parental objetivando a criação de novos genótipos fenotipicamente semelhantes a ele, lembrando que este é o objetivo principal do programa de melhoramento genético no qual este trabalho se insere diretamente. Oliveira et al. (2002b) selecionaram facilmente híbridos mais semelhantes aos parentais através de marcadores RAPD.

Os primers CCSM 129 (Figura 2.2) e CCSMEc 67 foram capazes de diferenciar todos os híbridos da planta mãe 'Montenegrina', e, por isso, podem ser usados isoladamente para identificação de híbridos da tangerineira 'Montenegrina' com 'King' ou 'Pêra' em cruzamentos dirigidos. Bastianel et al (1998) identificou 54 híbridos entre 202 indivíduos (26,7%) gerados a partir de embriões cultivados *in vitro* e extraídos de sementes de 'Montenegrina' utilizando 4 primers de RAPD. O uso de um único primer de microsatélite, CCSM 129, certamente traria maior eficiência com redução do tempo e do custo do procedimento e com maior eficiência. Cabe ressaltar que o uso de SSR em citros é recente, não tendo estado disponível como técnica de rotina em 1993/94, quando da realização do trabalho de Bastianel et al..

2.3.3. População 'Montenegrina' x 'Caipira'

Quanto à população de híbridos de 'Montenegrina' com 'Caipira', o agrupamento por similaridade através do método UPGMA baseado nas informações de 12 primers polimórficos entre os parentais (Tabela 2.1, exceto CCSMEc 11 e CCSM 150) dispôs todos os híbridos em posição mais próxima à laranjeira 'Caipira' do que a 'Montenegrina' (Figura 2.4). Apesar disso, o índice

de Jaccard entre quatro dos híbridos e a 'Montenegrina' é maior do que entre eles e a 'Caipira' (Tabela 2.4).

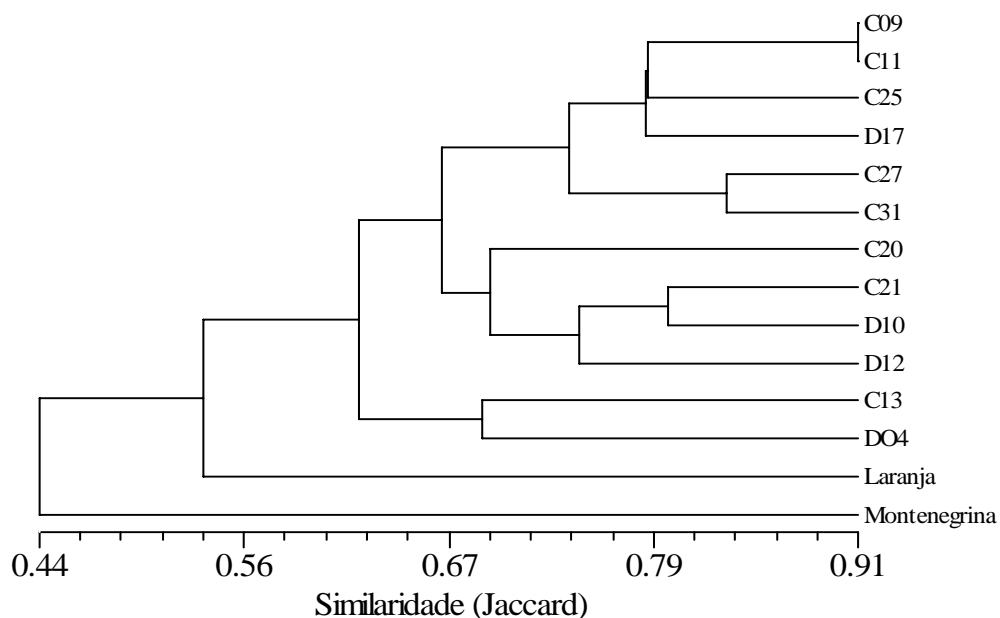


FIGURA 2.4 – Semelhança genética entre híbridos e genitores do cruzamento da tangerineira 'Montenegrina' com a laranja 'Caipira'.

TABELA 2.4 – Matriz de similaridade genética (índice de Jaccard) baseada em marcadores SSR entre a tangerineira 'Montenegrina' (M) e a progênie do seu cruzamento com a laranja 'Caipira' (L).

	M	L	C09	C11	C13	C20	C21	C25	C27	C31	DO4	D10	D12	D17
M	1													
L	0,15	1												
C09	0,47	0,68	1											
C11	0,47	0,69	0,93	1										
C13	0,56	0,59	0,65	0,72	1									
C20	0,62	0,59	0,78	0,84	0,65	1								
C21	0,50	0,66	0,78	0,84	0,75	0,75	1							
C25	0,59	0,56	0,81	0,87	0,78	0,78	0,78	1						
C27	0,50	0,59	0,84	0,78	0,69	0,69	0,69	0,78	1					
C31	0,55	0,55	0,70	0,77	0,74	0,68	0,81	0,84	0,87	1				
DO4	0,44	0,72	0,65	0,72	0,75	0,62	0,81	0,66	0,56	0,68	1			
D10	0,59	0,56	0,75	0,81	0,59	0,84	0,84	0,75	0,59	0,71	0,72	1		
D12	0,68	0,49	0,59	0,65	0,69	0,69	0,75	0,72	0,56	0,68	0,56	0,84	1	
D17	0,55	0,61	0,87	0,81	0,68	0,64	0,81	0,84	0,84	0,80	0,68	0,77	0,74	1

A correlação cogenética entre a matriz de similaridade e a matriz gerada pelo UPGMA foi de 0,78, o que é próxima mas inferior ao mínimo de 0,8 a 0,85 necessário para se obter uma boa representação gráfica (Sokal & Rohlf, 1962; Sokal 1986). Apesar disso, o dendrograma não expressou suficientemente bem a matriz de similaridade.

Os híbridos C09 e C11 tiveram distância genética estimada de apenas 0,07 (Tabela 2.4). Weiler (2006) não conseguiu diferenciar três pares de híbridos de 'Montenegrina' com 'Clementina Fina', e atribuiu o fato ao pequeno número de marcadores utilizado (doze primers SSR) e a uma possível alta similaridade entre os genomas. A similaridade média entre os híbridos foi de 0,74, maior que a observada na população 'Montenegrina' x 'King' (0,54), apesar da maior distância entre os parentais 'Montenegrina' e 'Caipira' (0,85). Efeitos de tamanho de população, número de marcadores e escolha de primers possivelmente expliquem esse fenômeno. O híbrido D12 foi o mais próximo à 'Montenegrina' (Tabela 2.4), e por isso é mais indicado que os demais para retrocruzamentos que visem indivíduos semelhantes àquele genitor.

CAPÍTULO III

PLOIDIA E FERTILIDADE DE PÓLEN EM PROGÊNIES DOS CRUZAMENTOS DE TANGERINEIRA 'MONTENEGRINA' COM TANGERINEIRA 'KING' E LARANJEIRA 'CAIPIRA'

3.1. Introdução

Os citros são plantas em que a reprodução sexuada pode ocorrer associada a assexuada, já que nas suas sementes podem ocorrer embriões sexuais e apomíticos nucelares. Mas, para que ocorra a formação de sementes é necessária a fecundação dos núcleos polares por um dos núcleos generativos do grão de pólen, formando o endosperma (Koltunow et al., 1995). Assim, o pólen tem função primordial na reprodução dos citros.

A primeira hibridação artificial em citros de que se tem registro foi realizada por Swingle e Webber na Flórida em 1893. Alguns porta-enxertos importantes foram produzidos através de cruzamentos dirigidos, dentre eles alguns citranges (Cameron & Frost, 1968). Variedades copa produzidas por cruzamentos controlados existem, porém ainda têm pouca importância comercial (Mourão Filho et al., 2002).

Apesar dos crescentes avanços em biotecnologia que permitem a transformação genética e a hibridação somática, a hibridação convencional tem

um importante papel na recombinação e introgressão de genes. Variedades com esterilidade masculina parcial ou completa apresentam limitações ao uso como doadoras de pólen em cruzamentos (Frost & Soost, 1968).

Em programas de melhoramento que visam variedades copa que tenham poucas ou nenhuma semente, a baixa viabilidade do pólen é um dos mecanismos que podem levar a atingir tal objetivo. Outro mecanismo que leva a variedades que produzem frutos com poucas sementes é a poliploidização. Variedades triplóides de citros produzem poucas ou nenhuma sementes. Alguns caminhos para se chegar aos triplóides são cruzamentos envolvendo uma planta tetraplóide e outra diplóide (Soost & Roose, 1996), a hibridação envolvendo pelo menos uma planta diplóide produtora de gametas $2n$ (Lee, 1988) e a hibridação somática (Ollitrault et al., 1998).

As plantas do gênero *Citrus* e outros gêneros relacionados normalmente são diplóides e têm número de cromossomos $2n$ igual a 18. Os cromossomos dos citros são pequenos (2 μm de comprimento na metáfase I da meiose) (Soost & Roose, 1996; Yamamoto & Tominaga, 2003).

Poliplóides foram observados em várias espécies do gênero *Citrus* (Gmitter Jr. et al., 1992; Guerra et al., 1997). Tetraplóides ocorrem em cruzamentos entre diplóides por causa da duplicação espontânea dos cromossomos durante a embriogênese somática, mas podem ter origem híbrida (Lee, 1988; Soost & Roose, 1996). Schwarz (2001) observou tetraplóides em progênies de citros diplóides, com frequência variando em função do ambiente e do genótipo. O mesmo autor observou redução no tamanho das copas enxertadas sobre porta-enxertos tetraplóides.

Triplóides se originam de cruzamentos entre diplóides pela não redução do número cromossômico durante a meiose ou em cruzamentos entre diplóides e tetraplóides (Krug & Bacchi, 1943; Lee, 1988; Soost & Roose, 1996). Triplóides naturais são sempre de origem zigótica e ocorrem em menor frequência, devido a problemas na relação da ploidia do embrião e do endosperma, que quando desvia de 2:3 causa pobre desenvolvimento do endosperma. Sementes com embriões triplóides têm invariavelmente endosperma pentaplóide, o que dá a relação de ploidia próxima a normal (Soost & Roose, 1996). Plantas cítricas triplóides podem ser obtidas também pelo cultivo *in vitro* de calos provenientes do tecido do endosperma de embriões diplóides (Gmitter Jr. et al., 1990) e através de hibridação somática (Ollitrault et al., 1998). Plantas triplóides produzem variável quantidade de frutos, e os frutos não possuem semente, o que é altamente desejável agronomicamente (Soost & Roose, 1996).

As anteras dos citros, quando normais, são amarelas e brilhantes, enquanto anteras brancas ou creme-pálidas não contém pólen (Frost & Soost, 1968).

A viabilidade do pólen de citros é bastante variável (Soost & Roose, 1996). Dentro da mesma planta e dentro da mesma variedade ocorrem variações menores que entre espécies e variedades. O local de coleta do material de uma mesma variedade pode influenciar a viabilidade do pólen (Moreira e Gurgel, 1941). Temperaturas abaixo de 19 °C incrementam as anormalidades meióticas em limoeiros e a esterilidade em tangerineiras satsumas (*C. unshiu* Marc.) segundo Soost & Roose (1996), e estas temperaturas são comuns no Sul do Brasil.

A laranjeira de umbigo 'Baía' não produz pólen viável devido à degeneração do tecido esporogênico antes da meiose. A infertilidade masculina parcial ocorre também em pomeleiros e limoeiros, muitas vezes causando ausência de sementes nos frutos. A maioria das tangerineiras tem pólen funcional (Moreira e Gurgel, 1941; Soost & Roose, 1996), mas híbridos podem ter fertilidade variável (Cavalcante et al., 2000). Também a tangerineira satsuma (*C. unshiu* Marc.) produz muito pouco pólen viável, pois ocorre degeneração do mesmo, pelo tamanho pequeno das células mãe de pólen (Soost & Roose, 1996). As satsumas possuem citoplasma androestéril e por isso quando cruzadas com genótipos portadores de genes nucleares para androesterilidade produzem híbridos androestéreis, os quais podem ser usados como produtores de frutas sem sementes (Yamamoto et al., 1997). Weiler (2006) observou em 32 híbridos de 'Clementina Fina' (*C. clementina* Hort. ex Tan.) com 'Montenegrina' (*C. deliciosa* Ten.) fertilidade de pólen acima de 79%.

Domingues et al. (2000) não encontraram correlação entre fertilidade de pólen e número de sementes em uma série de clones da laranjeira doce 'Pêra' estudados. Já Latado et al. (2004) encontraram alta e positiva correlação em mutantes de laranjeira 'Pêra' [*C. sinensis* (L.) Osb.] e Moreira e Gurgel (1941) uma correlação média.

A viabilidade de pólen pode ser estimada corando-se o mesmo com carmim acético e outras substâncias (Soost & Roose, 1996). Moreira e Gurgel (1941) tentaram a coloração com iodo, que não deu bons resultados, o que os levou a utilizar carmim acético a 40 %. Concentrações menores foram utilizadas por Domingues et al. (2000), 25 %, e Latado et al. (2004), 2,5%. Outro corante utilizado com sucesso foi o carmim propiônico (Cavalcante et al., 2000).

O método de coloração pode superestimar a viabilidade do pólen. Melhor indicativo de viabilidade é obtido pela germinação em meio de cultura apropriado (Soost & Roose, 1996). Moreira e Gurgel (1941) observaram grãos de pólen bem corados, pouco corados e não corados, sendo que apenas os bem corados germinaram *in vitro*. Cavalcante et al. (2000) observaram coeficiente de correlação 0.8 entre germinação de pólen *in vitro* e coloração do pólen com carmim propiônico em uma população de polinização aberta do tangeleiro 'Lee' [*C. clementina* Hort. ex Tan. x (*C. tangerina* Hort. ex Tan. x *C. paradisi* Macf.)]. Apesar da menor acurácia, a estimativa por coloração é suficiente a ponto de ser a mais utilizada.

Este trabalho foi desenvolvido para estimar a fertilidade do pólen e determinar o número cromossômico em duas progênies dos cruzamentos da tangerineira 'Montenegrina' (*C. deliciosa* Ten.) com a tangerineira 'King' (*C. nobilis* Lour.) e a laranjeira 'Caipira' [*C. sinensis* (L.) Osb.].

3.2. Material e métodos

As plantas avaliadas neste trabalho pertencem as populações de híbridos de 'Montenegrina' com 'King' e 'Caipira'. Botões florais das plantas em avaliação foram coletados em setembro de 2005 e agosto a setembro de 2006. Para contagem de cromossomos coletou-se botões com 2,5 a 4 mm de diâmetro e para análise do pólen coletou-se botões em pré abertura. O material foi imediatamente mergulhado em solução fixadora (etanol : ácido acético 3:1), por 24 horas, depois transferido para etanol 70% e conservado em geladeira até a análise, de acordo com Cavalcante et al. (2000).

A contagem de cromossomos foi feita macerando-se as anteras cortadas ao meio em uma gota de carmim propiônico 0,6 % sobre uma lâmina

de microscopia, que após foi observada em microscópio com aumentos de 400 e 1000 vezes. O número cromossômico foi determinado em no mínimo cinco células em meiose, nas fases de diacinese ou metáfases, anáfases e telófases I e II.

Para avaliação da fertilidade do pólen foram utilizados botões florais fechados de tamanho semelhante àqueles em abertura de forma a garantir que se estava analisando pólen maduro. Lâminas foram preparadas macerando-se levemente as anteras de um botão floral em carmim propiônico 0,6 % (totalizando quatro botões por planta, exceto para o híbrido C20, do qual foram avaliados seis botões). As lâminas foram observadas em aumento de 40x, observando-se no mínimo 250 grãos de pólen de cada botão e classificando-os em corados e não corados. Grãos parcialmente corados (Figura 3.1) foram considerados não corados. Ainda para certificar-se de que o pólen não corado era inviável e não imaturo, as contagens que resultaram em baixa percentagem de pólen corado foram repetidas em flores abertas.

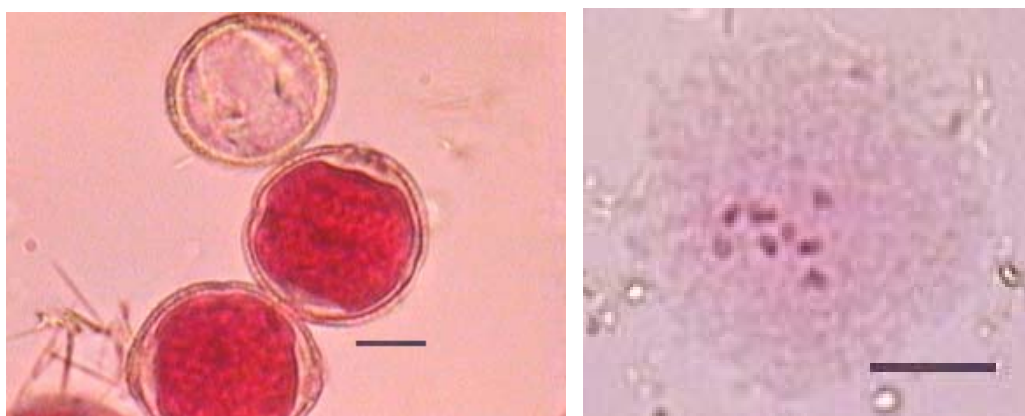


FIGURA 3.1 – À esquerda grãos de pólen corados e parcialmente corado (superior) do híbrido D29; à direita uma prófase I no híbrido C25 apresentando 9 bivalentes; (escala: 10 μ m).

3.3. Resultados e discussão

Todas as plantas analisadas (Tabela 3.1) apresentaram células mãe de pólen com 9 bivalentes (Figura 3.1) e/ou células em telófases e anáfases com 9 cromossomos em cada pólo, indicando que são diplóides ($2n=2x=18$). A ocorrência de poliplóides em populações de origem sexual é em geral baixa (Soost & Roose, 1996). Grãos de pólen gigantes, possíveis indicadores de gametas não reduzidos, foram observados na 'Montenegrina' e na 'Caipira', porém em frequências menores que 0,1%. Em populações pequenas como as quais a que se dedicou este trabalho a chance de se encontrar pelo menos um poliplóide originado pela fusão de gametas não reduzidos é também pequena.

Em *Actinidia* spp., Yan et al. (1997) não encontraram nenhum poliplóide em cruzamento entre duas plantas diplóides produtoras de gametas $2n$. Já Geraci et al. (1975) obteve triplóides do cruzamento entre dois diplóides e atribuiu o efeito a gametas femininos não-reduzidos.

Quanto à fertilidade do pólen, foram avaliados 21 híbridos de 'Montenegrina' com 'King' e 10 híbridos de 'Montenegrina' e 'Caipira' (Tabela 3.1). A maioria dos híbridos de 'Montenegrina' x 'King' apresentou mais de 70% de pólen corado, sendo que a C26 atingiu 98% de viabilidade estimada, o que sugere que estas têm boa fertilidade masculina e, quanto a isso, são aptas ao uso como genitores masculinos em cruzamentos. Já o híbrido C08 apresentou 42% do pólen corado e foi o menos fértil da sua população. Avaliações feitas em flores abertas confirmaram as observações em botões em pré-abertura.

Weiler (2006) observou fertilidade acima de 70% em todos os híbridos 'Clementina Fina' x 'Montenegrina' avaliados, e Moreira & Gurgel (1941) demonstraram que todas as tangerineiras avaliadas (exceto a satsuma 'Owari')

apresentaram mais de 60 % de pólen viável. Cavalcante et al. (2000) observaram, em híbridos de polinização aberta do tangeleiro 'Lee', variação de 9 a 98 % na fertilidade do pólen medida por coloração com carmim propiônico, com predomínio de plantas com mais de 80 % de fertilidade de pólen.

Tabela 3.1 – Fertilidade do pólen (FP) e nível de ploidia (P) de híbridos da tangerineira 'Montenegrina' com tangerineira 'King' (MK) e laranjeira 'Caipira' (MC). Eldorado do Sul, RS, 2005/06.

Híbridos MK			Híbridos MC					
Híbrido	FP(%*)	P	Híbrido	FP (%*)	P	Híbrido	FP (%*)	P
C08	42±11,1	2x	D22	85±1,9	2x	C27	Nula	2x
D06	62±5,9	2x	D18	85±11,4	2x	C20	10±14,2	2x
D32	65±8,0	2x	C10	87±5,9	2x	C21	59±1,6	2x
C07	68±4,3	2x	C23	92±3,9	Nd	C11	62±5,9	2x
D09	70±2,7	2x	D16	94±4,3	2x	D12	73±8,2	2x
C32	70±1,3	2x	C05	95±4,5	2x	C13	75±4,8	2x
D25	75±1,0	2x	C01	96±2,5	Nd	C31	81±7,2	2x
D03	79±2,9	2x	D08	97±3,0	2x	D10	88±3,7	2x
C17	80±9,8	2x	D21	97±2,1	2x	C09	90±2,5	2x
D29	81±4,7	2x	C26	98±1,7	2x	C25	95±3,5	2x
C22	83±8,4	Nd						
Montenegrina	58±6,8		King	79±6,8		Caipira	47±8,6	

*Média ± semi-amplitude do intervalo de confiança 95%

Nd = não determinado

Os híbridos de 'Montenegrina' com 'Caipira' apresentaram maior variação na fertilidade de pólen. O híbrido C20 apresentou em média 10% de pólen corado, sendo que um dos botões avaliados teve 42% de pólen corado e os outros cinco de 1 a 6%. Esse fato sugere um efeito genético interagindo com um efeito do ambiente. As anteras dessa planta apresentaram-se esbranquiçadas (Figura 3.2), com exceção daquele botão mais fértil que teve algumas anteras amareladas. Quanto a planta C27, as quatro lâminas confeccionadas continham poucos ou nenhum grão de pólen, e praticamente todos não corados, o que indica que a planta é praticamente androestéril. As anteras deste híbrido apresentaram coloração parda (Figura 3.2).



FIGURA 3.2 – Flores dos híbridos C20 e C27 com anteras de coloração anormal, indicando baixa fertilidade masculina. Eldorado do Sul, RS, 2005/06.

Frost & Soost (1968) afirmam que anteras brancas ou creme-pálidas não contém pólen, o que confirma as observações feitas nos híbridos C20 e C27. A laranjeira de umbigo 'Baía', a qual apresenta esterilidade masculina, da mesma forma que outras variedades de laranjeira de umbigo, também forma anteras esbranquiçadas (Frost & Soost, 1968). O abortamento de anteras em citros parece estar relacionado com interações entre genes citoplasmáticos e nucleares (Vardi & Spiegel-Roy, 1988), mas não há relatos do fenômeno envolvendo citoplasma de *C. deliciosa* Ten.

A diferença entre a fertilidade média do pólen das duas populações não foi significativa. Apesar disso, a progênie da laranjeira 'Caipira' apresentou dois indivíduos, o que representa quase 20% da população, com baixíssima fertilidade masculina. Coerentemente, a média dos pais nesse cruzamento foi menor, já que 'Montenegrina' teve 58% e 'King' 79% de pólen corado. A laranjeira 'Caipira' avaliada por Moreira & Gurgel (1941) apresentou viabilidade de pólen média (78,2%), superior a encontrada neste trabalho, provavelmente por efeito do ambiente ou mesmo por efeito genético, já que existem diferenças

entre clones de um cultivar (Domingues et al., 2000). Outros exemplos de baixa fertilidade masculina foram observados na espécie *C. sinensis* pelos próprios Moreira & Gurgel (1941) e Latado et al (2004) e em híbridos de polinização aberta do tangeleiro 'Lee' por Cavalcante et al. (2000).

CAPÍTULO IV

AVALIAÇÃO FENOTÍPICA E AGRONÔMICA DE HÍBRIDOS DE TANGERINEIRA 'MONTENEGRINA' COM TANGERINEIRA 'KING' E LARANJEIRA 'CAPIRA'

4.1. Introdução

A ampliação da base genética dos cultivos deve ser uma preocupação constante dos programas de melhoramento, pois está relacionada com a vulnerabilidade a pragas e doenças. Grande parte dos cultivares comercial de citros surgiu por mutações e seleção, e, portanto, possuem constituição genética idêntica a da planta que sofreu a mutação, exceto para o gene mutante. O uso da hibridação é uma forma de recombinar e introgridir genes úteis na garantia de uma maior estabilidade do cultivo com relação a epidemias de pragas e moléstias.

Pouco se conhece sobre o controle gênico das características em citros, exceto a resistência a algumas doenças. O caráter folha trifoliolada é um dos poucos estudados e os dados de Cameron & Soost (1980) apontam para controle por poucos genes. Os estudos genéticos são dificultados por algumas características inerentes ao grupo, como o longo período juvenil, apomixia e alta heterozigosidade.

Diferentes técnicas podem ser utilizadas em estudos genéticos, como a avaliação morfológica, os marcadores moleculares de DNA e os marcadores enzimáticos e bioquímicos (Barbosa Neto & Bered, 1998; Frizzo et al., 2004). Apesar da possibilidade de imprecisão na caracterização de genótipos apenas através de caracteres morfológicos, devida à influência do ambiente no fenótipo (Barbosa Neto & Bered, 1998; Koehler, 2001), a morfologia é a primeira e mais simples observação feita na avaliação das plantas.

Apesar das limitações citadas, características morfológicas propostas pelo *International Board for Plant Genetic Resources* (IBPGR, 1988) e por Zubrzycki (apud Radman & Oliveira, 2003) permitiram diferenciar com facilidade algumas variedades cítricas apirênicas, inclusive de laranja doce (Radman & Oliveira, 2003), o que não foi possível com marcadores moleculares do tipo RAPD no trabalho de Bastianel (2001).

Koehler (2001) caracterizou morfológicamente um conjunto de variedades de tangerineiras para uso como genitores no melhoramento genético da espécie. A caracterização permitiu indicar genitores superiores para melhoramento de diversas características, como cor de fruto e número de sementes. Os dados morfológicos foram usados para agrupamento por semelhança morfológica. Foram verificadas diferenças entre diferentes acessos da mesma variedade em 'Murcott' (*Citrus reticulata* Blanco x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck), 'Cravo' (*C. reticulata* Blanco) e 'Lee' [*C. clementina* x (*C. paradisi* x *C. tangerina*)], que foram confirmadas pelos dados moleculares (marcadores do tipo Microssatélites ou SSR).

Teich e Spiegel-Roy (1972) demonstraram que a relação entre o comprimento e a largura da folha pode ser usada para identificar híbridos entre

progênes de variedades poliembrionicas de citros, com pequenos erros, os quais podem ser aceitáveis já que é uma técnica fácil e barata.

Marcadores morfológicos foram usados para identificação de paternidade em citros. Os resultados mostram que a técnica é útil para análises preliminares, reduzindo o número de genótipos a serem analisados por outras técnicas mais caras, como os marcadores moleculares, ou em casos de pais muito diferentes (Ballve et al., 1997; Bastianel, 1999).

Em progênes dos cruzamentos de *C. limonia* Osbeck 'Limeira' x *C. aurantium* L. 'São Paulo', *C. sunki* Hort. ex. Tanaka '200' x *C. aurantium*, seus recíprocos, e *C. sunki* x *C. sinensis* Osbeck 'Natal', 'Valência', 'Pêra' e 'Hamlin', a simples observação visual da largura da asa do pecíolo foi suficiente para identificar 90 % dos híbridos identificados com isoenzimas (Ballve et al., 1997).

Oliveira et al. (2002a) avaliaram a eficiência da seleção utilizando características das folhas para separar híbridos de clones nucelares em uma progênie do cruzamento do tangoreiro 'Murcott' [*C. reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osb.] com a laranjeira 'Pêra' [*C. sinensis* (L.) Osb.] (sendo a primeira o genitor feminino e poliembrionica). A técnica se mostrou eficiente para reduzir o tempo necessário e os custos para seleção através de marcadores SSR, além de aumentar a precisão da seleção.

Neste capítulo serão descritas a caracterização fenotípica e a avaliação agrônômica de híbridos oriundos dos cruzamentos entre a tangerineira 'Montenegrina' (*C. deliciosa* Ten.) e os genitores masculinos tangerineira 'King' (*C. nobilis* Lour.) e laranjeira 'Caipira' [*C. sinensis* (L.) Osb.].

4.2. Material e métodos

4.2.1. Material vegetal

As plantas avaliadas neste estudo foram os híbridos identificados no Capítulo I. A população foi obtida da polinização da variedade Montenegrina (*C. deliciosa* Ten.) com pólen da espécie *C. nobilis* Lour. 'King' (população MK) e *C. sinensis* (L.) Osb. 'Caipira' (população MC) em 1993 e atualmente se encontram em um pomar na Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA-UFRGS), localizada no município de Eldorado do Sul (30°29'S e 51°06'E), Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

4.2.2. Morfologia da planta

Para avaliação das características de morfologia foram seguidos os descritores propostos pelo International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR, 1998), "Descriptors for Citrus". As plantas foram classificadas pela forma da copa e hábito de crescimento conforme especificado na Tabela 4.1 e ainda foram medidas a sua altura e circunferência do tronco a 30 cm do solo.

4.2.3. Morfologia das folhas

Para a análise de folhas foram coletadas aquelas em posição intermediária em ramos de 20 a 30 cm de comprimento. Foram analisadas 10 folhas por planta. Para avaliação do genitor 'King' utilizou-se um exemplar da coleção de citros do Centro de Pesquisa de Citricultura da FEPAGRO, localizado no município de Taquari, RS, já que os exemplares da coleção da EEA-UFRGS foram perdidos. As características avaliadas foram o tipo, a cor, a forma, a presença de pecíolo alado, a forma do limbo, a forma da margem do limbo (Tabela 4.1), o comprimento do limbo, a largura do limbo, a relação entre largura e comprimento do limbo e a relação entre comprimento do pecíolo e do

limbo. Diferenças entre médias foram analisadas por análise de variância, considerando um delineamento completamente casualizado, complementada pelo testes de Duncan.

TABELA 4.1 – Características morfológicas qualitativas avaliadas e suas possíveis classes

Característica	Classes
1. Planta	
Forma	Elipsóide, Esferóide e Elipsóide-achatada
Hábito de crescimento	Vertical, Aberto, Inclinado e Choroso
2. Folha	
Tipo	Simples e Trifoliolada
Cor	Verde-claro, Verde e Verde-escuro
Forma	Séssil, Brevipeciolada e Longipeciolada
Pecíolo alado	Ausente, Estreito e Largo
Forma do limbo	Elipsóide, Ovada, Obovada, Lanceolada, Orbiculada
Forma da margem	Crenada, Dentada, Inteira e Ondulada
3. Fruto	
Forma	Esferóide, Elipsóide, Periniforme, Oblíquo, Achatado, Ovóide-oblíquo, Ovóide, Outros
Formato da base	Com pescoço, Convexo, Achatado, Côncavo, Com colarinho, Colarinho com pescoço, Outro
Formato do ápice	Mamiliforme, Angular, Convexo, Retilíneo e Deprimido
Superfície da epiderme	Lisa, Ondulada, Rugosa e Sulcada
Visibilidade das glândulas de óleo	Invisíveis, Visíveis e Muito visíveis ou salientes
Aderência do mesocarpo ao endocarpo	Leve, Moderada e Forte
Aderência entre gomos	Leve, Moderada e Forte
Cor do mesocarpo	Branco, Amarelo e Outra

Fonte: IBPGR, 1988

4.2.4. Morfologia dos frutos

Os frutos foram classificados quanto à forma, formato da base, formato do ápice, superfície da epiderme, visibilidade das glândulas de óleo, aderência do mesocarpo ao endocarpo, aderência entre gomos e cor do mesocarpo (Tabela 4.1). Nos anos de 2003 a 2006, dos híbridos que produziram

frutos, foram coletadas amostras de três a dez frutos, conforme sua disponibilidade, das quais se determinou o diâmetro, a altura, o peso e o número de sementes. Comparações entre médias dos híbridos e da 'Montenegrina' foram feitas aos pares por análise de variância complementada pelo teste de Tukey.

4.2.5. Maturação

Foi acompanhada a evolução da maturação dos frutos nos anos de 2003 a 2006. A cada 14 dias foram feitas amostragens de 3 a 10 frutos de cada híbrido, conforme a quantidade de frutos produzida pela planta, coletados ao acaso. No ano de 2003 as amostragens foram iniciadas quando os frutos apresentavam indícios de proximidade ao ponto de maturação (amarelecimento da epiderme, amolecimento da polpa e perda de acidez do suco ao paladar). Nos demais anos foram considerados também os dados de acidez e teor de sólidos solúveis do suco obtidos nas análises laboratoriais do(s) ano(s) anterior(es). As amostras foram condicionadas em câmara fria a 4° C e analisadas até 10 dias após a colheita no Laboratório de Pós-colheita de Produtos Hortícolas do Departamento de Horticultura e Silvicultura da UFRGS, em Porto Alegre, RS. Foram determinados o rendimento de suco dos frutos (% suco), a acidez total titulável (ATT), o teor de sólidos solúveis totais do suco (SST) e o índice de maturação (IM), também conhecido por *ratio*. O rendimento de suco foi determinado pela relação entre massa de suco extraído da amostra e massa total da amostra. A ATT foi determinada por titulação de uma amostra de suco, de cerca de 6,0 g e diluída em 50 ml de água destilada, com NaOH em concentração 0,1 N. A mesma foi calculada pela equação $ATT = \frac{V \times 0,1 \times 0,062}{m}$,

onde V é o volume de NaOH consumido e m é a massa de suco. O SST foi medido por refratometria. O IM foi calculado pela relação SST/ATT. A época de maturação (comercial) foi definida pelos limites de IM 8,0 e 16,0 e, simultaneamente, pelo rendimento de suco superior a 40 %.

Como controle parental no caso da 'Montenegrina' utilizou-se os clones nucelares identificados no Capítulo 2 (Tabela 2.2), os quais são pés francos dispersos entre os híbridos em avaliação.

4.2.6. Similaridade fenotípica

A partir dos dados gerados na avaliação da morfologia estimou-se a similaridade fenotípica entre as plantas através do índice de Gower (Gower, 1972). Os índices de similaridade obtidos foram utilizados para o agrupamento dos genótipos pelo método UPGMA.

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Planta

As formas de planta predominantes na população MK são a elipsóide e a esferóide, sendo também observada a forma achatada. Na população MC a forma esferóide predomina sobre as demais (Tabela 4.2).

O hábito de crescimento das plantas das duas populações é aberto ou vertical, sendo o aberto predominante principalmente na população MC (Tabela 4.2).

A altura das plantas variou de 1,6 a 4,6 metros e a circunferência do tronco oscilou entre 8 e 50 centímetros (Tabela 4.2). As diferenças entre populações em altura de planta e circunferência do tronco não foram significativas (Teste t , $\alpha=0,05$). Na população MK, o grupo de copa elipsóide teve altura superior ao esferóide, concordando com as observações de Donadio

(1984) sobre esta relação em híbridos de tangerineira 'Satsuma' x laranja 'Natal'.

TABELA 4.2 – Hábito de crescimento, forma e altura de copa e circunferência do tronco a 30 cm do solo de plantas híbridas de 'Montenegrina' x 'King' e de 'Montenegrina' x 'Caipira'. Eldorado do Sul, RS, 2006.

Genótipo	Hábito de		Altura (m)	CT (cm)
	Forma da copa	crescimento		
Híbridos 'Montenegrina' x 'King'				
C01	Esferóide	Aberto	2,7	31
C02	Esferóide	Aberto	3,2	45
C05	Elipsóide	Vertical	4,2	41
C07	Esferóide	Aberto	3,5	38
C08	Elipsóide	Vertical	3,6	42
C10	Elipsóide	Aberto	3,7	39
C17	Esferóide	Aberto	3,1	39
C18	nd ¹	nd	2,2	15
C22	Elipsóide	Vertical	4,0	30
C23	Elipsóide	Vertical	4,2	39
C24	Esferóide	Aberto	2,9	31
C26	Elipsóide	Vertical	4,6	45
C28	Achatada	Aberto	2,9	38
C32	Esferóide	Vertical	3,9	48
D03	Esferóide	Aberto	3,4	32
D06	Esferóide	Aberto	nd	49
D08	Esferóide	Aberto	2,3	42
D09	Esferóide	Aberto	3,6	43
D13	Esferóide	Aberto	3,1	34
D16	Esferóide	Aberto	2,9	40
D18	Elipsóide	Aberto	3,3	38
D21	Elipsóide	Vertical	4,0	40
D22	Elipsóide	Vertical	3,9	44
D25	Esferóide	Vertical	4,1	45
D29	Esferóide	Aberto	4,1	50
D32	Esferóide	Aberto	3,3	37
Híbridos 'Montenegrina' x 'Caipira'				
C09	Elipsóide	Vertical	4,1	42
C11	Esferóide	Aberto	3,0	36
C13	Esferóide	Aberto	2,9	31
C20	Achatada	Aberto	2,5	31
C21	Esferóide	Aberto	3,8	39
C25	Elipsóide	Vertical	4,6	49
C27	Achatada	Aberto	3,3	45
C31	Esferóide	Aberto	2,6	27
D10	Esferóide	Aberto	3,8	41
D12	Esferóide	Aberto	2,8	35
D17	nd	Aberto	1,6	8
Montenegrina	Esferóide	Aberto	2,8	33

¹nd= não determinado

Altura e circunferência do tronco apresentaram correlação significativa ($r=0,9$; $p<0,0001$) apenas na população MC, onde predominaram copas esferóides.

4.3.2. Folha

Todos os híbridos analisados possuem folhas simples, brevipetioladas e em sua maioria de cor verde escuro (Tabela 4.3). Dezesesseis híbridos MK (64%) possuem pecíolo alado estreito e nove deles não possuem asas nos pecíolos.

Já na população MC a proporção foi de nove com pecíolos alados (82%) para dois sem asas. Supõe-se que a diferença se deva ao parental masculino 'Caipira' que tem pecíolo com asas largas enquanto os pecíolos da 'King' as tem estreitas. Todas as plantas da população MC apresentaram folhas com margem dentada, semelhante a seus parentais (Figura 4.1). Enquanto isso, na progênie MK, cujos parentais são diferentes (Tabela 4.3), houve equilíbrio entre os tipos de margem presente nos genitores.



FIGURA 4.1 – Folhas lanceoladas com margem dentada da tangerineira 'Montenegrina' (esquerda) e folhas elipsóides com margem crenada da 'King' (direita).

TABELA 4.3 – Parâmetros morfológicos de folhas de híbridos de tangerineira ‘Montenegrina’ cruzada com tangerineira ‘King’ e com laranjeira ‘Caipira’. Eldorado do Sul, RS, 2006.

Genótipo	Cor	Pecíolo alado	Forma de limbo	Forma da margem do limbo
Híbridos 'Montenegrina' x 'King'				
C01	Verde escuro	Estreito	Elipsóide	Dentada
C02	Verde escuro	Estreito	Elipsóide	Crenada
C05	Verde escuro	Ausente	Lanceolada	Crenada
C07	Verde escuro	Estreito	Elipsóide	Dentada
C08	Verde escuro	Ausente	Lanceolada	Dentada
C10	Verde escuro	Estreito	Lanceolada	Crenada
C17	Verde escuro	Ausente	Elipsóide	Crenada
C18	Verde escuro	Ausente	Elipsóide	Crenada
C22	Verde	Estreito	Lanceolada	Dentada
C23	Verde escuro	Ausente	Elipsóide	Crenada
C24	Verde escuro	Estreito	Lanceolada	Dentada
C26	Verde escuro	Estreito	Elipsóide	Crenada
C28	Verde	Estreito	Elipsóide	Crenada
C32	Verde	Ausente	Lanceolada	Dentada
D03	Verde escuro	Estreito	Elipsóide	Dentada
D06	Verde escuro	Estreito	Elipsóide	Dentada
D08	Verde escuro	Estreito	Elipsóide	Crenada
D09	Verde escuro	Estreito	Elipsóide	Crenada
D16	Verde escuro	Estreito	Elipsóide	Crenada
D18	Verde escuro	Ausente	Lanceolada	Dentada
D21	Verde escuro	Ausente	Elipsóide	Crenada
D22	Verde	Estreito	Elipsóide	Dentada
D25	Verde escuro	Estreito	Elipsóide	Dentada
D29	Verde escuro	Estreito	Lanceolada	Crenada
D32	Verde escuro	Ausente	Elipsóide	Dentada
Híbridos 'Montenegrina' x 'Caipira'				
C09	Verde escuro	Estreito	Lanceolada	Dentada
C11	Verde escuro	Estreito	Elipsóide	Dentada
C13	Verde escuro	Estreito	Lanceolada	Dentada
C20	Verde escuro	Ausente	Lanceolada	Dentada
C21	Verde escuro	Estreito	Elipsóide	Dentada
C25	Verde escuro	Estreito	Lanceolada	Dentada
C27	Verde	Ausente	Elipsóide	Dentada
C31	Verde	Estreito	Lanceolada	Dentada
D10	Verde escuro	Estreito	Elipsóide	Dentada
D12	Verde escuro	Estreito	Elipsóide	Dentada
D17	Verde	Estreito	Lanceolada	Dentada
Caipira	Verde escuro	Largo	Elipsóide	Dentada
King	Verde escuro	Estreito	Elipsóide	Crenada
Montenegrina	Verde escuro	Ausente	Lanceolada	Dentada

Na população MK a forma de limbo da folha elipsóide (Figura 4.1) predominou sobre a forma lanceolada, enquanto na população MC houve equilíbrio entre as duas formas (Tabela 4.3).

O comprimento médio do limbo foliar na população MK variou de 52,7 a 91,77 mm, e a largura alcançou o mínimo de 27,80 e o máximo de 45,67 e os parentais foram dispostos em posições intermediárias na classificação, de forma semelhante à relação entre comprimentos do pecíolo e do limbo (Tabela 4.4).

Enquanto isso, as larguras dos limbos de 77% dos híbridos foram estatisticamente maiores que do parental feminino (Tabela 4.4), e o mesmo aconteceu com a relação entre largura e comprimento do limbo. A variação das características apresentadas na tabela 4.4 foi contínua, sugerindo controle poligênico.

Na população MC houve diferenças significativas nas quatro características. O parental 'Caipira' e 30% dos híbridos superaram a 'Montenegrina' em comprimento do limbo (Tabela 4.4). Enquanto isso 70% dos híbridos tiveram folhas mais largas que o parental feminino, de forma semelhante ao observado na população MK. Porém, poucos híbridos superaram a 'Montenegrina' na relação entre largura e comprimento do limbo. Isso sugere um grande potencial para o uso da largura do limbo e da relação entre largura e comprimento do limbo na identificação preliminar de híbridos nas progênes desses cruzamentos, reduzindo a necessidade de testes moleculares que são mais caros. Oliveira et al. (2002a) provaram ser viável a pré-seleção de híbridos em progênes originadas de sementes poliembriônicas através de caracteres da folha.

TABELA 4.4 - Comprimento e largura do limbo, relação entre largura e comprimento do limbo (L/C) e relação entre comprimento do pecíolo e comprimento do limbo (P/L) de folhas de híbridos de 'Montenegrina' com 'King' e 'Caipira'. Eldorado do Sul, RS, 2006.

Genótipo	Comprimento do limbo (mm)	Largura do limbo (mm)	L/C	P/L
Híbridos 'Montenegrina' x 'King'				
C01	70,20 defg	35,6 defghij	0,51 cde	0,123 fgh
C02	58,50 h	33,32 fghijk	0,58 ab	0,132 efg
C05	71,10 def	30,00 jklm	0,42 jkl	0,103 i
C07	52,7 l	28,35 lm	0,54 bc	0,155 abcd
C08	68,35 efg	34,30 efg hijk	0,50 cdef	0,136 efg
C10	72,50 def	29,47 jklm	0,41 klm	0,150 bcdef
C17	73,85 cde	36,25 defghi	0,49 cdefg	0,150 bcdef
C18	58,2 h	27,8 m	0,48 defghi	0,137 ef
C21	73,27 cdef	32,32 hijk	0,44 hijk	0,136 efg
C22	74,33 cde	28,08 lm	0,37 m	0,138 ef
C23	88,24 a	41,13 abc	0,47 efghi	0,142 cdef
C24	77,48 bcd	31,94 ijkl	0,42 jkl	0,144 cdef
C26	77,69 bcd	33,40 fghijk	0,43 ijk	0,170 abcd
C28	86,12 ab	38,79 bcd	0,45 fghij	0,114 ghi
C32	91,77 a	37,92 cdefg	0,41 jklm	0,099 i
D03	71 def	32,26 hijk	0,45 efghij	0,172 abc
D06	74,7 cde	33,93 efg hijk	0,45 ghijk	0,130 efg
D08	74,52 cde	32,71 ghijk	0,44 hijk	0,144 bcdef
D09	63,82 gh	30,97 jklm	0,49 cdefgh	0,143 cdef
D16	75,5 cde	36,55 cdefg	0,48 cdefgh	0,136 efg
D18	85,11 abc	40,12 bcd	0,48 efghi	0,108 hi
D21	87,69 ab	45,67 a	0,53 bcd	0,101 i
D22	76,63 bcde	34,71 defghij	0,45 efghij	0,136 efg
D25	76,07 bcde	36,36 cdefgh	0,48 defgh	0,173ab
D29	90,31 a	38,62 cd	0,43 jkl	0,185 a
D32	65,75 fg	32,39 hijk	0,49 cdefg	0,132 efg
Montenegrina	68,93 defg	27,37 m	0,4 lm	0,134 efg
King	75,27 cde	43,80 ab	0,6 a	0,139 cdef
Híbridos 'Montenegrina' x 'Caipira'				
C09	89,70 a	37,24 b	0,42 cd	0,14 bc
C11	67,91 ef	37,01 b	0,46 bcd	0,14 bc
C13	83,27 ab	31,59 cd	0,40 cd	0,14 bc
C20	63,44 f	33,61 bcd	0,43 bcd	0,15 bc
C25	87,76 ab	28,11 ef	0,41 cd	0,16 b
C27	70,68 de	36,70 b	0,47 bc	0,14 bc
C31	68,55 ef	34,91 bc	0,47 bc	0,19 a
D10	76,21 cd	32,33 cd	0,49 ab	0,16 b
D12	64,80 ef	30,63 de	0,47 bc	0,15 bc
D17	70,87 de	27,05 f	0,39 d	0,18 a
Montenegrina	68,93 ef	27,37 f	0,41 cd	0,13 c
Caipira	82,40 bc	45,52 a	0,55 a	0,16 b

¹ Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada população não diferem segundo o teste de Duncan ($\alpha=0,05$)

4.3.3. Morfologia dos frutos

A cultivar 'Montenegrina' possui frutos achatados, com base côncava e com colarinho, com ápice deprimido, epiderme lisa com glândulas de óleo visíveis, aderência entre gomos e do mesocarpo ao endocarpo moderadas e albedo de cor branca.

Todos os frutos avaliados apresentaram forma achatada e glândulas de óleo visíveis. Houve variação do formato do ápice e da base, da aderência entre gomos e entre mesocarpo e endocarpo, do tipo de superfície da casca e da cor do albedo ou mesocarpo (Tabelas 4.5 e 4.6).

Na população MK (Tabela 4.5), a forma da base predominante foi a truncada, tendo sido observadas também a côncava, convexa e a presença de colarinho. O formato do ápice truncado predominou sobre o deprimido. Foram observados frutos com casca rugosa, lisa e esburacada em proporções semelhantes, enquanto frutos com sulcos na região basal foram minoria. Os frutos apresentaram mesocarpo levemente ou moderadamente aderido ao endocarpo, a exemplo da aderência entre gomos. Foram observados albedos das cores branco, amarelada e creme.

Já na população MC (Tabela 4.6), além dos formatos de base observados em MK, os frutos do híbrido C11 apresentaram base com pescoço e colarinho. O ápice dos frutos foi truncado ou deprimido, e a superfície da casca lisa, rugosa, ondulada ou com sulcos basais. A aderência moderada entre gomos e do endocarpo ao mesocarpo foi predominante sobre a leve, provavelmente como herança do parental masculino. O mesocarpo se apresentou branco ou creme, nunca amarelado.

TABELA 4.5 – Parâmetros morfológicos de frutos de uma população de híbridos da tangerineira ‘Montenegrina’ com a tangerineira ‘King’. Eldorado do Sul, RS, 2005/06.

Genótipo	Formato da base	Formato do ápice	Superfície da casca	Aderência entre mesocarpo e endocarpo	Cor do albedo	Aderência entre gomos	Espessura da casca (mm)	Número de gomos
C01	Com colarinho	Truncado	Ondulada	Moderada	Branca	Moderada	5.57	11.1
C05	Com colarinho	Truncado	Lisa	Moderada	Amarelada	Moderada	4.37	10.8
C07	Convexo	Deprimido	Ondulada	Moderada	nd	Moderada	6.62	11.6
C08	Truncado	Deprimido	Ondulada	Leve	Amarelada	Leve	8.60	12.1
C10	Truncado	Deprimido	Ondulada	Moderada	Amarelada	Moderada	6.10	11.6
C17	Côncavo	Deprimido	Sulcos na base	Leve	Amarelada	Leve	5.93	10.0
C23	Convexo	Truncado	Lisa	Moderada	Branca	Moderada	4.58	12.1
C24	Convexo	Truncado	Lisa	Moderada	Creme	Moderada	5.30	12.0
C26	Truncado	Truncado	Lisa	Leve	Branca	Leve	4.34	10.7
C28	Truncado	Deprimido	Esburacada	Leve	Creme	Moderada	5.25	10.0
C32	Convexo	Truncado	Ondulada	Leve	Branca	Leve	5.18	11.3
D03	Com colarinho	Truncado	Rugosa	Moderada	Branca	Moderada	6.62	11.7
D06	Com colarinho	Truncado	Esburacada	Moderada	Branca	Moderada	5.86	9.0
D08	Côncavo	Deprimido	Esburacada	Leve	Branca	Leve	nd	13.0
D09	Truncado	Truncado	Lisa	Leve	Creme	Leve	5.48	11.0
D16	Côncavo	Deprimido	Esburacada	Moderada	Branca	Moderada	5.77	9.0
D18	Truncado	Deprimido	Esburacada	Moderada	Creme	Moderada	7.00	12.0
D21	Convexo	Truncado	Lisa	Moderada	Creme	Moderada	4.86	13.0
D22	Truncado	Truncado	Esburacada	Moderada	Branca	Moderada	5.62	10.0
D23	Truncado	Truncado	Lisa	Leve	Branca	Leve	5.28	10.0
D25	Com colarinho	Truncado	Lisa	nd ¹	nd	nd	6.40	12.7
D29	Truncado	Deprimido	Sulcos na base	Leve	Amarelada	Leve	6.96	14.0
D32	Truncado	Truncado	Ondulada	Moderada	Branca	Moderada	11.50	11.0
Montenegrina	Com colarinho	Deprimido	Lisa	Moderada	Branca	Moderada	2.59	10.9
King	Côncavo ²	Deprimido ²	Rugosa ²	Moderada ²		Moderada ²	Espessa ²	12-14
C.V.							19,52	9,03

¹nd = não determinado; ² Fonte: Hodgson, 1967

TABELA 4.6 – Parâmetros morfológicos de frutos de uma população de híbridos da tangerineira ‘Montenegrina’ com a laranjeira ‘Caipira’. Eldorado do Sul, RS, 2005/06.

Genótipo	Formato da base	Formato do ápice	Superfície da casca	Aderência entre mesocarpo e endocarpo	Cor do albedo	Aderência entre gomos	Espessura da casca (mm)	Número de gomos
C09	Com colarinho	Deprimido	Lisa	Moderada	Branca	Moderada	5.23	12.8
C11	Com pescoço e colarinho	Truncado	Lisa	Leve	Branca	Leve	5.50	10.0
C13	Convexo	Truncado	Ondulada	Moderada	Branca	Moderada	5.53	10.3
C20	Truncado	Deprimido	Lisa	Moderada	Branca	Moderada	2.21	10.7
C21	Côncavo	Deprimido	Sulcos na base	Moderada	Creme	Moderada	7.66	10.0
C25	Truncado	Truncado	Sulcos na base	Moderada	Creme	Moderada	3.88	11.0
C27	Convexo	Deprimido	Rugosa	Leve	Branca	Moderada	6.56	11.5
D10	Com colarinho	Truncado	Ondulada	Moderada	Branca	Leve	3.43	10.7
D12	Truncado	Deprimido	Sulcos na base	Moderada	Creme	Leve	6.81	12.0
Montenegrina	Com colarinho	Deprimido	Lisa	Moderada	Branca	Moderada	2.59	10.9
Caipira	Convexo	Truncado	Lisa	Forte	Amarelada	Forte	nd	nd
C.V.							15,62	8,88

¹nd = não determinado

As características dos frutos sofrem influências da idade da planta (Cameron & Frost, 1968), que não são efeitos genéticos. São esperadas alterações em algumas características com o envelhecimento das plantas.

Em uma população de híbridos de 'Clementina Fina' e 'Montenegrina', Weiler (2006) observou frutos de forma esferóide e achatados, com ápice mamiliforme entre outros, e sempre com albedo branco.

As características quantitativas dos frutos são apresentadas nas Tabelas 4.7 a 4.10. Os híbridos C02, C18, C31, D04 e D17 não foram avaliados por não terem produzido frutos suficientes.

Não houve diferença significativa entre as médias das duas populações para número de sementes viáveis e peso médio dos frutos (Teste t, $\alpha=0,05$).

Frutos de 'King' superaram os de 'Montenegrina' em tamanho (Koehler, 2001) e em peso (Hodgson, 1967). Mais da metade dos híbridos avaliados superaram a 'Montenegrina' em altura, diâmetro e peso médios dos frutos, o que nem sempre se refletiu em peso de fruto. Isso pode ser explicado pelas diferenças na espessura da casca (Tabela 4.5) e de rendimento de suco no endocarpo (Figura 4.3 e Anexo I). Os frutos de alguns híbridos, como D16 e C20, apresentaram tamanho inferior ao da 'Montenegrina' apesar do parental masculino produzir frutos de tamanho grande. Variação em peso de fruto além da amplitude parental foram observados por Donadio (1984) e Weiler (2006).

Apesar de os parentais dos cruzamentos produzirem frutos com média a alta quantidade de sementes, o híbrido D21 destacou-se por produzir frutos com menos sementes, em média, que a 'Montenegrina' (Tabela 4.10), revelando um grande potencial agrônomico. O D25 também apresentou muito

poucas sementes por fruto, porém foram poucos os frutos avaliados. Um grupo maior, produzindo frutos com até 22 sementes, superou a 'Montenegrina' em número de sementes por fruto.

TABELA 4.7 – Altura (mm) dos frutos de híbridos de tangerineira 'Montenegrina' com tangerineira 'King' e com laranja 'Caipira' em quatro anos de avaliação. Eldorado do Sul, RS, 2003-2006.

Genótipo	2003	2004	2005	2006	Média ¹	C.V. ¹
Híbridos 'Montenegrina' x 'King'						
C01			53,91 **	54,42 **	54,21 **	6,5
C05	55,87 **	56,39 **	65,73 **	56,22 **	58,75 **	10,9
C07	58,17 **	50,06		48,81 **	50,57 **	9,9
C08	58,17 **			61,10 **	60,47 **	9,4
C10	53,42 **	52,79 **	51,02	46,47 **	50,47 **	10,1
C17	51,87 **	51,66 **	56,59 **	52,60 **	53,18 **	10,1
C23				48,01	48,01 **	6,3
C24			47,44		47,44	19,9
C26	51,77 **		55,16 **	52,12 **	52,63 **	6,9
C28	57,80 **		54,64 **	60,26 **	57,49 **	7,5
C32	54,39 **	48,87		50,49 **	51,25 **	10,7
D03				66,86 **	66,86 **	16,0
D06	51,80	50,66 **	50,88 **	49,37 **	50,54 **	9,2
D08	44,07 **		47,50	43,45	45,01	8,2
D09	(42,28) **	49,77	40,64 **		42,58	9,9
D16	49,70	(39,88) **	46,60	44,25	42,99	10,9
D18	53,88 **	53,88 **	53,63 **	59,01 **	55,27 **	8,4
D21	(44,20) **		52,80 **	49,06 **	49,58 **	8,9
D22	(45,22) **	55,67 **	48,78	54,16 **	50,72 **	16,8
D23	53,98 **	52,13 **	46,36		49,58 **	10,6
D25				63,34 **	63,36 **	13,9
D29	(45,72) **	50,73	44,12	45,05 **	46,39	11,6
D32	55,03 **	52,41 **	59,52 **	49,46 **	53,88 **	10,3
Híbridos 'Montenegrina' x 'Caipira'						
C09	57,70 **	56,18 **	60,22 **	59,54 **	58,54 **	5,1
C11	56,50 **	56,01 **	52,49 **	52,09 **	53,99 **	7,2
C13	65,43 **		63,63 **	47,35 **	55,34 **	18,4
C20				(31,80) **	(31,80) **	8,9
C21		48,41	53,07 **	49,52 **	50,54 **	10,2
C25	55,37 **	55,70 **	50,12 **	49,42 **	51,65 **	11,0
C27	50,65		43,28	48,65 **	47,52 **	10,6
D10				41,11	41,11	9,3
D12			47,7		47,70	9,0
Montenegrina	49,90	45,91	45,54	41,32	44,50	10,3

** Diferença em relação a 'Montenegrina' significativa dentro da coluna segundo o teste de Tukey com $\alpha=0,01$;

¹Todos os frutos coletados em todos os anos;

Médias entre parênteses inferiores a 'Montenegrina'.

TABELA 4.8 – Diâmetro (mm) dos frutos de híbridos de tangerineira ‘Montenegrina’ com tangerineira ‘King’ e com laranjeira ‘Caipira’ em quatro anos de avaliação. Eldorado do Sul, RS, 2003-2006.

Genótipo	2003	2004	2005	2006	Média ¹	C.V. ¹
Híbridos ‘Montenegrina’ x ‘King’						
C01			66,41 **	67,41 **	67,00 **	6,0
C05	66,88 **	67,12 **	71,13 **	65,04 **	67,59 **	10,2
C07	66,16 **	64,23 **		59,26 **	62,32 **	8,5
C08	73,90 **			69,26 **	70,43 **	10,9
C10	68,92 **	65,17 **		58,57 **	63,11 **	9,3
C17	66,81 **	65,36 **	69,53 **	64,74 **	61,17 **	7,3
C23				61,17 **	56,86	5,1
C24			56,86		56,86	4,0
C26	63,47		73,11 **	65,28 **	67,21 **	9,8
C28	78,00 **		73,52 **	83,52 **	78,45 **	10,2
C32	65,09	62,11 **		65,33 **	64,16 **	10,0
D03				79,81 **	79,81 **	13,7
D06	62,72	58,41	60,85	53,90	58,43	9,3
D08	57,59		64,62 **	57,09	59,76 **	8,2
D09	59,27	72,27 **	59,66		61,41 **	11,8
D16	64,10 **	(49,40) **	59,67	55,94	54,06	14,1
D18	65,10 **	64,69 **	66,46 **	69,48 **	66,56 **	6,7
D21	56,40		68,23 **	63,19 **	63,84 **	10,0
D22	54,58	59,00	63,41 **	63,99 **	60,50 **	9,9
D23	62,00 **	63,60	53,95		58,10	12,4
D25				73,73 **	73,73 **	13,7
D29	64,90 **	68,87 **	64,55 **	63,5 **	65,31 **	10,5
D32	65,70	62,75	70,55 **	59,01 **	64,25 **	10,4
Híbridos ‘Montenegrina’ x ‘Caipira’						
C09	65,86 **	63,50	74,40 **	65,13 **	66,41 **	7,8
C11	65,76 **	62,38	63,27 **	59,62 **	62,30 **	9,0
C13	73,93 **		66,30 **	55,39 **	61,76 **	14,0
C20				43,85	(43,82) **	10,7
C21		63,76	67,37 **	64,29 **	65,29 **	10,1
C25	66,70 **	66,67 **	62,98 **	61,8 **	64,25 **	7,8
C27	66,53 **		48,45	59,68 **	57,22	19,7
D10				48,87	(48,87) **	10,5
D12			66,54 **		66,54 **	11,5
Montenegrina	58,99	57,90	56,64	52,91	55,73	9,9

** Diferença em relação a ‘Montenegrina’ significativa dentro da coluna segundo o teste de Tukey com $\alpha=0,01$;

¹Todos os frutos coletados em todos os anos;

Médias entre parênteses inferiores a ‘Montenegrina’.

TABELA 4.9 – Peso (g) dos frutos de híbridos de tangerineira ‘Montenegrina’ com tangerineira ‘King’ e com laranja ‘Caipira’ em quatro anos de avaliação. Eldorado do Sul, RS, 2003-2006.

Genótipo	2003	2004	2005	2006	Média ¹	C.V. ¹
Híbridos ‘Montenegrina’ x ‘King’						
C01			128,84 **	133,71 **	131,70 **	15,4
C05	145,74 **	148,56 **	173,69 **	135,21 **	152,25 **	23,4
C07	130,80 **	116,70 **		92,40 **	107,97 **	22,6
C08	143,80 **			145,49 **	145,12 **	22,1
C10	135,24 **	114,44 **	106,36	88,58 **	107,39 **	22,7
C17	117,94 **	118,27 **	131,37 **	111,50 **	117,26 **	21,6
C23				101,56 **	101,56 **	15,1
C24			79,34		79,34	15,9
C26	118,74 **		164,42 **	126,88 **	136,17 **	24,2
C28	189,50 **		161,62 **	202,82 **	183,16 **	22,1
C32	150,30 **	108,92		120,90 **	126,70 **	19,8
D03				188,10 **	188,10 **	32,9
D06	109,32	87,58	102,57 **	69,20	89,71 **	24,7
D08	80,42		99,53	83,80 **	87,91	18,0
D09	83,36	125,50	80,30		88,15	29,6
D16	108,07	(53,01) **	75,17	71,78	(67,89) **	35,0
D18	118,08 **	108,90	113,68 **	139,37 **	119,09 **	17,8
D21	157,62 **		136,10 **	107,20 **	128,84 **	25,4
D22	78,08	96,31	112,45 **	125,49 **	137,21 **	148,4
D23	113,16 **	114,25	74,48		93,03	31,9
D25				190,00 **	190,00	35,9
D29	104,44	116,26	94,60 **	87,95 **	99,62 **	27,7
D32	128,61	109,03	157,49 **	92,00 **	120,33 **	30,0
Híbridos ‘Montenegrina’ x ‘Caipira’						
C09	142,00 **	126,87 **	183,95 **	135,70 **	142,60 **	19,4
C11	136,86 **	120,77 **	114,85 **	103,40 **	116,46 **	21,4
C13	197,97 **		137,63 **	78,50	116,03 **	43,8
C20				(37,90) **	(37,90) **	27,3
C21		105,61	119,04 **	106,14 **	110,98 **	24,6
C25	139,40 **	142,87 **	112,14 **	102,57 **	118,08 **	22,1
C27	101,92		(58,58) **	77,63	79,37	31,3
D10				55,53	(55,53) **	36,1
D12			106,96		106,96 **	23,9
Montenegrina	94,09	88,46	82,75	65,45	78,55	27,0

** Diferença em relação a ‘Montenegrina’ significativa dentro da coluna segundo o teste de Tukey com $\alpha=0,01$;

¹Todos os frutos coletados em todos os anos;

Médias entre parênteses inferiores a ‘Montenegrina’.

TABELA 4.10 – Número de sementes viáveis por fruto de híbridos de tangerineira ‘Montenegrina’ com tangerineira ‘King’ e com laranjeira ‘Caipira’ em quatro anos de avaliação. Eldorado do Sul, RS, 2003-2006.

Genótipo	2003	2004	2005	2006	Média ¹	C.V. ¹
Híbridos ‘Montenegrina’ x ‘King’						
C01			7,9	11,3	9,8	59,7
C05	21,3 **	22,1 **	12,4	14,5 **	17,2 **	40,1
C07	9,0	(4,6) **		7,8	6,4	54,4
C08	13,0			14,1 **	13,8 **	40,4
C10	21,8 **	26,4 **	18,1 **	16,3 **	20,5 **	27,2
C17	13,6 **	11,2	13,6 **	13,6 **	13,0 **	24,9
C23				14,0 **	14,1 **	49,7
C24			10,7		10,7 **	33,8
C26	17,8 **		9,3	15,1 *	14,0 **	56,2
C28	10,0		18,0 **	8,2	12,7	47,4
C32	5,8	7,7		(5,5) **	(6,3) **	36,9
D03				7,5	7,8	80,4
D06	6,0	13,0 **	11,6	(5,2) **	9,4	54,8
D08	28,6 **		19,9 **	19,9 **	22,8 **	34,6
D09	11,5 **	8,0	17,3 **		13,9 **	39,8
D16	18,5 **	17,5 **	3,7	10,5	14,9 **	39,9
D18	11,8	13,4	18,7 **	12,3	14,4 **	39,0
D21	6,0		(3,4) **	(1,6) **	(3,2) **	99,0
D22	13,0 **	20,4 **	20,7 **	17,3 **	17,8 **	33,5
D23	22,2 **	15,5 **	17,7 **		18,4 **	28,4
D25				(2,0) **	(2,0) **	132,3
D29	8,4	11,3	5,8	7,1	8,1	63,8
D32	20,6 **	13,2	12,0	14,6 **	13,9 **	40,2
Híbridos ‘Montenegrina’ x ‘Caipira’						
C09	18,7 **	16,7 **	23,3 **	9,9	15,1 **	52,6
C11	21,8 **	20,4 **	13,6 **	19,0 **	18,3 **	38,2
C13	9,0		5,8	13,3 **	10,2	49,8
C20				6,6	6,6	54,5
C21		4,7 **	5,5	(5,0) **	(5,1) **	68,7
C25	21,7 **	20,7 **	11,2	11,5	14,6 **	51,9
C27	17,5 **		10,8	8,5	12,2 **	49,0
D10				13,6 **	13,6 **	35,8
D12			(2,3) **		(2,3) **	109,8
Montenegrina	6,8	9,1	7,9	9,1	8,5	43,9

** Diferença em relação a ‘Montenegrina’ significativa dentro da coluna segundo o teste de Tukey com $\alpha=0,01$;

¹Todos os frutos coletados em todos os anos;

Médias entre parênteses inferiores a ‘Montenegrina’.

O híbrido D21, além da redução do número de sementes em relação à 'Montenegrina', apresentou um dos maiores pesos médios de fruto (Tabela 4.9), o que é altamente desejado. Os híbridos C07, C28, C32 (Figura 4.2), D03, D06 e D25, alguns dos quais superaram a 'Montenegrina' em número de sementes por fruto, apresentaram maiores frutos e relação entre número de sementes e peso de fruto inferior à da 'Montenegrina' (dados não apresentados), em um ano, enquanto o D21 o fez em dois anos. Menor relação entre número de sementes e peso de fruto significa mais gramas de fruto por semente, o que torna esses híbridos interessantes para cultivo comercial.



FIGURA 4.2 – Frutos dos híbridos C32 (esquerda) e C05 (direita). Nota-se que os frutos do C05 possuem boa aparência apesar do alto número de sementes. Eldorado do Sul, RS, 2006.

Em geral é esperado que o tamanho dos frutos seja maior quando eles têm maior número de sementes, pelo efeito de reguladores de crescimento produzidos nas sementes que estimulam o crescimento do fruto. Este efeito hormonal parece modular outros efeitos genéticos.

Dos 25 frutos do híbrido D21 avaliados no trabalho, seis não continham sementes viáveis, o que é indicativo de partenocarpia.

Em uma população de híbridos de 'Clementina Fina' e 'Montenegrina', Weiler (2006) observou frutos cuja quantidade média de sementes variou de 1 a 33. O autor afirma que a polinização cruzada pode afetar o número de sementes por fruto. Assim, o isolamento de um genótipo, através do ensacamento de flores ou isolamento de plantas do mesmo clone, poderia reduzir o número de sementes por fruto, em geral por auto-incompatibilidade genética e infertilidade masculina (Frost & Soost, 1968). Portanto, avaliações da produção de sementes por fruto de alguns híbridos com boas características, como o C05 (Figura 4.2), sem polinização cruzada podem trazer melhoria no valor de cultivo e uso estimado.

4.3.4. Maturação

Foram avaliados frutos de 22 híbridos da população MK, sete da população MC e do genitor 'Montenegrina' (Figura 4.3). Alguns híbridos não produziram frutos suficientes para a avaliação. Apesar da maturação tardia da 'Montenegrina' e 'King', esta última extremamente tardia, a maioria dos híbridos avaliados atingiu maturação na meia-estação (maio a julho). Os híbridos D24 e D06 foram tão tardios quanto a 'Montenegrina'. Frutos dos híbridos C07 e D22 puderam ser colhidos até a primeira quinzena de setembro e do C32 até a segunda quinzena do mesmo mês e dentro dos limites aceitáveis de Índice de Maturação (8,0 a 16,0) e rendimento de suco. Na maioria dos casos, como dos híbridos C01, C07 e C32, não foi possível determinar a época final da colheita, devido à falta de frutos para estender as amostragens. Esse fato pode estar relacionado a queda dos frutos que pode ser característica do genótipo.

Foi notável o baixo Índice de Maturação dos frutos dos híbridos C26, C11 e C13, que ao final de setembro não atingiram o limite inferior 8,0. É possível que eles atinjam o índice mínimo após o mês de agosto. Novas avaliações devem ser feitas iniciando-se em agosto e estendendo-se o quanto possível nos meses posteriores.

Apesar das progênes terem sido mais precoces em época de maturação que o esperado, em especial a MK, elas aparentam menor precocidade que híbridos da 'Montenegrina' com 'Clementina Fina', avaliados no mesmo ambiente por Weiler (2006), provavelmente devido a maior precocidade da 'Clementina Fina' quando comparada a 'King'. Como o aumento da média da progênie em função do aumento da média dos parentais é um estimador de herdabilidade (Falconer & Mackay, 1996), estas observações sugerem que a época de maturação é em parte controlada por genes de efeito aditivo. A maioria dos híbridos que atingiram o índice de maturação mínimo de 8,0 mostrou problemas quanto ao rendimento de suco. Os frutos do híbrido C27 apresentaram baixíssimo rendimento de suco (Anexo I) por conter pouco suco no endocarpo, como em uma das avaliações em que não se conseguiu extrair um mínimo de suco para a titulação. O rendimento de suco insatisfatório de alguns frutos como os do híbrido D32 se deve ao mesocarpo e o epicarpo serem muito espessos em relação ao calibre do fruto (Tabela 4.5).

Os híbridos C07, C32 e D21 mostraram bom comportamento em relação à maturação em um mínimo de três anos de avaliação, além de produzir frutos de tamanho superior a 'Montenegrina' e com poucas sementes. Por isso merecem ser testados quanto a outras características como de rendimento,

resistência a doenças e, no caso do C07 e C32, quanto à extensão da época de colheita além do período avaliado.

4.3.5. Similaridade fenotípica

O agrupamento dos híbridos da população MK baseado na similaridade fenotípica resultou em quatro grupos, um deles contendo a 'Montenegrina' e mais 10 híbridos: C01, C07, C23, C24, C32, D03, D06, D16, D18 e D32 (Figura 4.4). Os híbridos C01, C24 e D03 foram os que mais se assemelharam a 'Montenegrina' (Tabela 4.11). Na população MC formaram-se quatro grupos, o maior contendo a 'Montenegrina' e cinco híbridos (C11, C13, C21, D10 e D12) (Figura 4.5) e o híbrido D10 teve a maior similaridade com a mãe (Tabela 4.12). A similaridade média da 'Montenegrina' com os híbridos foi semelhante nas duas populações, cerca de 0,6.

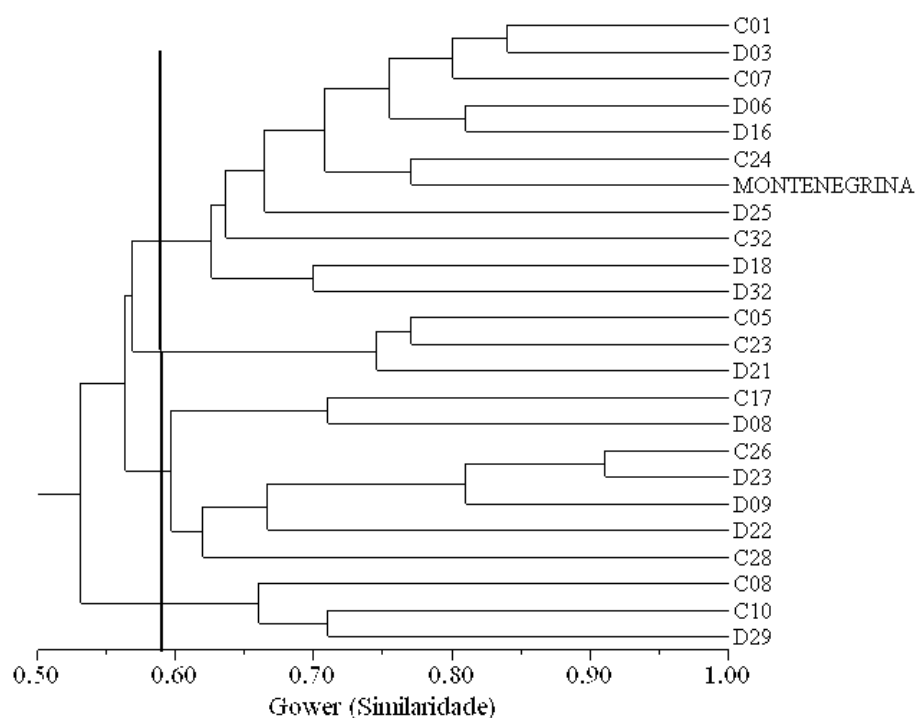


FIGURA 4.4 – Árvore de similaridade fenotípica entre híbridos de 'Montenegrina' e 'King'. Linha de corte na similaridade média.

TABELA 4.11 – Matriz de similaridade morfológica (índice de Gower) entre a tangerineira ‘Montenegrina’ (M) e a progênie do seu cruzamento com a tangerineira ‘King’.

	M	C01	C05	C07	C08	C10	C17	C23	C24	C26	C28	C32	D03	D06	D08	D09	D16	D18	D21	D22	D23	D25	D29	D32
M	1																							
C01	0,78	1																						
C05	0,56	0,58	1																					
C07	0,66	0,82	0,50	1																				
C08	0,36	0,48	0,66	0,57	1																			
C10	0,56	0,63	0,69	0,76	0,69	1																		
C17	0,48	0,63	0,59	0,60	0,59	0,58	1																	
C23	0,59	0,61	0,77	0,65	0,52	0,63	0,60	1																
C24	0,77	0,70	0,52	0,73	0,44	0,64	0,50	0,57	1															
C26	0,46	0,54	0,61	0,54	0,57	0,56	0,61	0,71	0,52	1														
C28	0,53	0,58	0,46	0,58	0,41	0,55	0,65	0,49	0,55	0,60	1													
C32	0,73	0,64	0,59	0,68	0,53	0,53	0,48	0,70	0,59	0,47	0,42	1												
D03	0,78	0,84	0,50	0,78	0,38	0,57	0,55	0,63	0,71	0,49	0,50	0,64	1											
D06	0,71	0,78	0,49	0,75	0,38	0,57	0,55	0,60	0,67	0,55	0,58	0,61	0,78	1										
D08	0,55	0,60	0,41	0,57	0,43	0,52	0,71	0,56	0,52	0,60	0,61	0,45	0,64	0,64	1									
D09	0,56	0,57	0,46	0,63	0,46	0,55	0,68	0,57	0,70	0,78	0,67	0,45	0,59	0,61	0,71	1								
D16	0,71	0,77	0,53	0,72	0,34	0,62	0,70	0,69	0,67	0,57	0,70	0,60	0,76	0,82	0,79	0,68	1							
D18	0,58	0,62	0,62	0,69	0,60	0,69	0,59	0,62	0,70	0,52	0,66	0,58	0,59	0,62	0,51	0,56	0,64	1						
D21	0,44	0,53	0,73	0,59	0,53	0,59	0,54	0,77	0,64	0,68	0,54	0,53	0,51	0,47	0,41	0,60	0,54	0,64	1					
D22	0,62	0,61	0,54	0,62	0,47	0,57	0,43	0,67	0,58	0,70	0,64	0,66	0,60	0,71	0,51	0,57	0,65	0,63	0,60	1				
D23	0,59	0,50	0,47	0,46	0,50	0,45	0,62	0,64	0,62	0,91	0,60	0,54	0,47	0,58	0,62	0,84	0,55	0,51	0,50	0,74	1			
D25	0,67	0,67	0,56	0,63	0,45	0,45	0,53	0,66	0,63	0,62	0,39	0,61	0,77	0,68	0,64	0,69	0,63	0,45	0,55	0,59	0,52	1		
D29	0,49	0,50	0,49	0,62	0,64	0,71	0,70	0,46	0,56	0,59	0,50	0,46	0,50	0,53	0,63	0,68	0,56	0,50	0,45	0,39	0,55	0,55	1	
D32	0,58	0,79	0,54	0,77	0,56	0,60	0,61	0,61	0,65	0,58	0,56	0,62	0,67	0,68	0,53	0,60	0,64	0,71	0,61	0,66	0,62	0,49	0,44	1

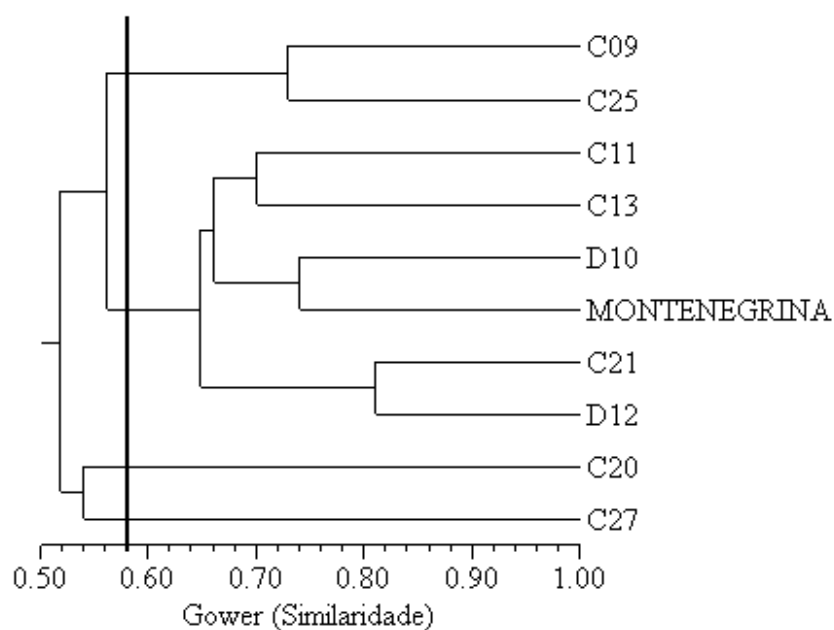


FIGURA 4.5 – Árvore de similaridade fenotípica entre híbridos de ‘Montenegrina’ e ‘Caipira’. Linha de corte na similaridade média.

TABELA 4.12 – Matriz de similaridade morfológica (índice de Gower) entre a tangerineira ‘Montenegrina’ (M) e a progênie do seu cruzamento com a laranja ‘Caipira’.

	M	C09	C11	C13	C20	C21	C25	C27	D10	D12
M	1									
C09	0,62	1								
C11	0,60	0,56	1							
C13	0,71	0,63	0,70	1						
C20	0,68	0,48	0,51	0,58	1					
C21	0,63	0,52	0,62	0,67	0,46	1				
C25	0,51	0,73	0,52	0,62	0,42	0,62	1			
C27	0,54	0,49	0,62	0,52	0,54	0,54	0,44	1		
D10	0,74	0,57	0,67	0,66	0,54	0,70	0,51	0,51	1	
D12	0,60	0,47	0,65	0,61	0,48	0,81	0,58	0,50	0,70	1

O trabalho revelou grande variabilidade fenotípica nas populações estudadas, que já era esperada visto que as plantas cítricas são altamente heterozigotas, condição que resulta em segregação dos alelos já na primeira geração de um cruzamento. Apesar de cruzamentos entre pais complementares freqüentemente gerarem progênies que não atingem a produção e qualidade esperadas (Mourão Filho et al., 2002), é esperado que alguns dos híbridos avaliados desempenhem suficientemente bem em avaliações de produção e palatabilidade dos frutos, a ponto de serem lançados como novos cultivares.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES

Dentre a população analisada há híbridos de tangerineira 'Montenegrina' x laranjeira 'Caipira', 'Montenegrina' x tangerineira 'King' e clones nucelares da 'Montenegrina'.

Os híbridos D18, C32, D06, C05 e D09 (*C. deliciosa* Ten. X *C. nobilis* Lour.), nesta ordem, são os mais indicados para retrocruzamentos com a tangerineira 'Montenegrina', por terem maior semelhança genética a ela, na busca de genótipos que produzam frutos semelhantes a este cultivar que tem grande aceitação no mercado.

Não há poliplóides nas populações avaliadas.

A variação encontrada na fertilidade masculina das populações analisadas confirma a necessidade de um monitoramento dessa característica em populações de citros incluídas em programas de melhoramento por hibridação sexual.

Os cruzamentos da tangerineira 'Montenegrina' com a tangerineira 'King' e com a laranjeira 'Caipira' possibilitam a obtenção de genótipos melhorados em tamanho de fruto e número de sementes por fruto e com épocas de maturação distintas.

Há grande variabilidade fenotípica nas populações avaliadas. A semelhança fenotípica entre a 'Montenegrina' e sua progênie com 'King' e 'Caipira' é variável.

Os híbridos C07, C32 e D21 (*C. deliciosa* Ten. X *C. nobilis* Lour.), no que se refere a tamanho de fruto, número de sementes e época de colheita, têm potencial para uso como novos cultivares de tangerineiras.

CAPÍTULO VI

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentro da perspectiva do programa de melhoramento genético de tangerineiras desenvolvido na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, os dados gerados neste trabalho servirão como guia à seleção de novos genótipos para possível uso em futuros cruzamentos ou diretamente como novas variedades comercial.

Retrocruzamentos e autofecundações devem ser realizados para concentrar genes de efeito aditivo que conduzam a época de maturação tão ou mais tardia que a dos cultivares 'Montenegrina' e 'King'.

Os híbridos indicados, pelo seu potencial para lançamento como cultivares comerciais devem ser propagados sobre porta-enxertos comuns nos pomares brasileiros para que se avalie o rendimento, resistência a doenças e a quantidade de sementes por fruto em cultivo isolado. Os porta-enxertos afetam as características dos frutos da cultivar copa. Dessa forma, avaliações em diferentes porta-enxertos podem resultar em uma ferramenta para melhorar as características dos frutos, principalmente tamanho e época de maturação. As características dos frutos avaliadas neste trabalho devem ser acompanhadas

nos clones dos híbridos, já que o envelhecimento do tecido altera algumas características.

Características relacionadas a qualidade do produto muitas vezes limitam o melhoramento genético, pois blocos de ligação que resultam em características muito desejáveis são quebrados nos cruzamentos e dificilmente se formam novamente. Por isso, nos híbridos destacados como produtores de frutos de bom tamanho e com poucas sementes, avaliações do sabor e aroma devem ser feitas para que não sejam lançados cultivares que não agradem o consumidor.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, E. P. **Variabilidade genética em milho doce estimada através de caracteres morfológicos, RAPD e microssatélites**. 2002. 69 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.
- BALLVÉ, R.M.L.; MEDINA FILHO, H.M.; BORDIGNON, R. Identification of reciprocal hybrids in citrus by de broadness of the leaf petiole wings. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.20, n.4, p.697-702, 1997.
- BARBOSA NETO, J. F.; BERED, F. Marcadores moleculares e diversidade genética no melhoramento de plantas. In: MILACH, S. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 141p.
- BASTIANEL, M. **Análise de uma população segregante de tangerineira ‘Lee’ [*Citrus clementina* Hort. ex Tanaka x (*C. tangerina* Hort. ex Tanaka x *C. paradisi* Macf.)] através de RAPD e marcadores morfológicos**. 1999. 94 f. 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. et al. Characterization of Citrus genotypes (*Citrus spp.*) using RAPDs markers. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.5, p.763-768, 2001.
- BASTIANEL, M.; OLIVEIRA, A.C.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A. Diversidade genética entre híbridos de laranja-doce e tangor ‘Murcott’ avaliada por AFLP e RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.5, p.779-784, 2006.
- BASTIANEL, M.; SCHWARZ, S.F.; COLETA FILHO, H.D.; LIN, L.L.; MACHADO, M.; KOLLER, O.C. Identification of zygotic and nucellar tangerine seedlings (*Citrus spp.*) using RAPD. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.21, n.1, p.123-127, 1998.

BORDIGNON, R. **Hibridações interespecíficas, intergenéricas, intergrupais, intersubtribais, intertribais e intersubfamiliares de *Citrus* e gêneros relacionados**. 1995. 104 f. Dissertação (Mestrado) – Mestrado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

BROWN-GUEDIRA, L.; THOMPSON, J.A.; NELSON, R.L.; WARBURTON, M.L. Evaluation of Genetic Diversity of Soybean Introductions and North American Ancestors Using RAPD and SSR Markers. **Crop Science**, Madison, v.40, n.3, p.815-823, 2000.

CAI, Q.; GUY, C.L.; MOORE, G.A. Extension of the linkage map in citrus using random amplified polymorphic DNA and RFLP mapping of cold-acclimation-responsive loci. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.89, p.606-614, 1994.

CAMERON, J.W.; FROST, H.B. Genetics, Breeding, and Nucellar Embryony. In: REUTHER, W., BATCHELOR, L.D; WEBBER, H.J. (Ed). **The Citrus Industry**. rev. ed. Oakland, Calif.: University of California, 1968. v.2 p.325-370.

CAMERON, J.W.; SOOST, R.K. Leaf types of F1 hybrids and backcrosses involving unifoliolate *Citrus* and trifoliolate *Poncirus*. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v.105, n.4, p.517-519, 1980.

CAVALCANTE, H. C.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DORNELLES, A. L. C. Meiotic behavior end pollen fertility in an open-pollinated population of 'Lee' mandarin [*Citrus clementina* x (*C. paradisi* x *C. tangerina*)]. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.86, p.103-114, 2000.

CORAZZA-NUNES, M.J.; MACHADO, M.A.; NUNES, W.M.C.; CRISTOFANI, M.; TARGON, M.L.P.N. Assessment of genetic variability in grapefruits (*Citrus paradisi* Macf.) and pummelos (*C. maxima* (Burm.) Merr.) using RAPD and SSR markers. **Euphytica**, Wageningen, v.126, n.2, p.169–176, 2002.

DAVIES, F.S.; ALBRIGO, L.G. **Crop production science in horticulture 2: citrus**. Wallingford: CAB International, 1994. 254p.

DOMINGUES, E.T.; TULMANN NETO, A.; TEÓFILO SOBRINHO, J. Viabilidade de pólen de laranja Pêra e outras variedades assemelhadas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.1, p.85-89, 2000.

DONADIO, L.C. Segregation in hybrids from 'Satsuma' x 'Natal'. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 5, 1984, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo, 1984. v.1, p.4-6.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. **Phytochemical Bulletin**, [S.l.], v.19, p.11-15, 1987.

EMATER. **Levantamento da fruticultura comercial do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: EMATER/RS-ASCAR, 2004. 89p.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. 4th. ed. London: Longmann & Co, 1996. 464p.

FAO. **Agricultural Data – FAOSTAT**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 20 dez. 2006.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa/Cenargen, 1996. 220p.

FRIZZO, C.D.; LORENZO, D.; DELLACASSA, E. Composition and seasonal variation of the essential oils from two mandarin cultivars of southern Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.52, p.3036-3041, 2004.

FROST, H.B.; SOOST, R.K. Seed Reproduction: Development of Gametes and Embryos. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J. (Ed.). **The Citrus Industry**. rev. ed. Oakland, Calif.: University of California, 1968. v.2, p.290-324.

GARCÍA, M. R.; ASÍNS, M. J.; CARBONELL, E. A. QTL analysis of yield and seed number in *Citrus*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.101, n.3, p.487-493, 1999.

GERACI, G.; ESEN, A.; SOOST, R.K. Triploid progenies from 2x x 2x crosses of *Citrus* cultivars. **Journal of Heredity**, Washington, v.66, p.177-178, 1975.

GMITTER JR., F.G.; GROSSER, J.W.; MOORE, G.A. Citrus. In: HAMMERSCHLAG, F.A; LITZ, R.E. **Biotechnology of perennial fruit crops**. Wallingford: CAB International, 1992. p.335-369.

GMITTER Jr., F.G.; LING, X. B.; DENG, X.X. Induction of triploid *Citrus* plants from endosperm calli in vitro. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.80, n.6, p.785-790, 1990.

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

GRATTAPAGLIA D.; RIBEIRO VJ.; REZENDE GD. Retrospective selection of elite parent trees using paternity testing with microsatellite markers: an alternative short term breeding tactic for Eucalyptus. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.109, n.1, p.192-1999, 2004.

GRUPEX. **O cultivo dos citros no Rio Grande do Sul**: referências tecnológicas. Porto Alegre: FEPAGRO, 2005. 141p.

GUERRA, M.; PEDROSA, A.; SILVA, A.E.B; CORNÉLIO, M.T.M.; SANTOS, K.; SOARES FILHO, W.S. Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a *Citrus* germplasm bank. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.20, n.3, p.489-496, 1997.

HERRERO, R.; ASINS, M.J.; PINA, J.A.; CARBONELL, E.A.; NAVARRO, L. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. II. Genetic relationships among genera and species. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.93, n.8, p.1327-1334, 1996.

HODGSON, R.W. Horticultural varieties of citrus. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D.(Ed.). **The Citrus Industry**. rev. ed. Oakland, Calif.: University of California, 1967. v.1, p.431-591.

IBGE. **Tabela 4 - Áreas destinada à colheita e colhida, quantidade produzida, rendimento médio e valor da produção dos principais produtos das lavouras permanentes, segundo as Grandes Regiões e Unidades da Federação - Brasil - 2004**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 03 nov. 2006.

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

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

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

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

KOLLER, O. C. **Citricultura**: 1. Laranja: tecnologia de produção, pós-colheita, industrialização e comercialização. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2006. 396p. Cap.3: Clima e solo.

KOLTUNOW, A.M.; SOLTYUS, K.; NITO, N.; McCLURE, S. Anther, ovule, seed and nucellar embryo development in *Citrus sinensis* cv. Valencia. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.73, 1567-1582, 1995.

KRUG, C.A.; BACCHI, O. Triploid varieties of citrus. **Journal of Heredity**, Washington, v.34, p.277-283, 1943.

LATADO, R.R.; BUENO FILHO, J.S.S.; POMPEU JUNIOR, J.; TULMANN NETO, A. Correlações entre viabilidade de pólen e características de frutos em mutantes de laranja 'Pêra'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.10, p.961-965, 2004.

LEE, L.S. Citrus polyploidy – origins and potential for cultivar improvement. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v.39, p.735-747, 1988.

MESSMER, M.M.; MELCHINGER, A.E.; HERRMANN, R.G.; BOPPENMAIER, J. Relationships among early European maize inbreds. (Comparison of Pedigree and RFLP Data, part 2). **Crop Science**, Madison, v.33, n.5, p.944-950, 1993.

MILACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 141p. Capítulo: Principais tipos de marcadores moleculares e suas características.

MOREIRA, S.; GURGEL, J.T.A. A fertilidade de pólen e sua correlação com o número de sementes, em espécies e formas do gênero *Citrus*. **Bragantia**, Campinas, v.1, n.11-12, p.669-711, 1941.

MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; DONADIO, L.C. Citros. In: BRUCKNER, C.H. (Ed.). **Melhoramento de fruteiras tropicais**. Viçosa: UFV, 2002. p.77-224.

NOVELLI, V.M.; CRISTOFANI, M.; SOUZA, A.A.; MACHADO, M.A. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for the sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.29, n.1, p.90-96, 2006.

OLIVEIRA, A.C.; GARCIA, A.N.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A. Identification of citrus hybrids through the combination of leaf apex morphology and SSR markers. **Euphytica**, Wageningen, v.128, n.2, p.397-403, 2002a.

OLIVEIRA, R.P.; CRISTOFANI, M.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; MACHADO, M.A. Diversidade genética entre híbridos de tangerina 'Cravo' e laranja 'Pêra'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.4, p.479-484, 2002b.

OLLITRAULT, P.; DAMBIER, D.; SUDAHONO; MANDEBA-SY, F.; VANEL, F.; LURO, F.; AUBERT, B. Biotechnology for triploid mandarin breeding. **Fruits**, Paris, v.53, n.5, p.307-317, 1998.

PALMIERI, D.A.; NOVELLI, V.M.; BASTIANEL, M.; CRISTOFANI-YALY, M.; ASTÚA-MONGE, G.; CARLOS, E.F.; OLIVEIRA, A.C.; MACHADO, M.A. Frequency and distribution of microsatellites from ESTs of citrus. 2006. (Texto obtido com o autor).

PIO, R.M. A qualidade e as exigências do mercado de tangerinas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.25, n.3, 2003. Disponível em: <<http://test.scielo.br/pdf/rbf/v25n3/18644.pdf>>. Acesso em: 24 out. 2006.

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.

RODRIGUES, F.M.; DINIZ-FILHO J.A.F. Hierarchical structure of genetic distances: effects of matrix size, spatial distribution and correlation structure among gene frequencies. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.21, n.2, p.233-240, 1998.

RODRIGUES, F.M.; DINIZ-FILHO, J.A.F.; BATAUS, J.A.M.; BASTOS, R.P. Hypothesis testing of genetic similarity based on RAPD data using Mantel tests and model matrices. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.25, n.4, p. 435-439, 2002.

RODRIGUES, L.R.; DORNELLES, A.L.C. Origem e caracterização horticultural da tangerineira 'Montenegrina'. **Laranja**, Cordeirópolis, v.20, n.1, 167-185, 1999.

RODRIGUEZ, O. Ecofisiologia dos citros. In: CASTRO, P.R.C.; FERREIRA, S.O.; YAMADA, T. **Ecofisiologia da produção agrícola**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo, 1987. p.149-164.

RUIZ, C.; PAZ BRETO, M.; ASÍNS, M.J. A quick methodology to identify sexual seedlings in citrus breeding programs using SSR markers. **Euphytica**, Wageningen, v.112, n.1, p.89-94, 2000.

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

SCARANO, M.T.; TUSA, N.; ABBATE, L.; LUCRETTI, S.; NARDI, L.; FERRANTE, S. Flow cytometry, SSR and modified AFLP markers for the identification of zygotic plantlets in backcrosses between 'Femminello' lemon cybrids (2n and 4n) and a diploid clone of 'Femminello' lemon (*Citrus limon* L.

Burm. F.) tolerant to *mal secco* disease. **Plant Science**, Limerick, v.164, n.6, p.1009-1017, 2003.

SCHWARZ, S.F. **Autotetraplóides espontâneos em patrones de cítricos: incidência, características y comportamiento em vivero y campo**. 2001. 176 f. Tesis (Doctoral) - Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, 2001.

SCHWARZ, S.F. Melhoramento genético e variedades. In: KOLLER, O.C. **Citricultura: 1. Laranja: tecnologia de produção, pós-colheita, industrialização e comercialização**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2006. 396p.

SENTELHAS, P.C. Agrometeorologia dos citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, 2005. p.317-344.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, Berlin, v.11, n.1, p.30-40, 1962.

SOKAL, R.R. Phenetic taxonomy: theory and methods. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v.17, p.423-442, 1986.

SOOST, R.K.; ROOSE, M.L. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. **Fruit breeding**. New York: J. Wiley, 1996. v.1, p.257-323.

SPINA, P. **Trattato di agumicoltura**. Bologna: Edagricole, 1985. 552p. Cap.1: Origine e diffusione degli agrumi coltivati.

SWINGLE, W.T.; REECE, P.C. The Botany of Citrus and Its Wild Relatives. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (Ed.). **The Citrus Industry**. rev. ed. Oakland, Calif.: University of California, 1967. v.1, p.90-196.

TEICH, A.H.; SPIEGEL-ROY, P. Differentiation between nucellar and zygotic Citrus seedlings by leaf shape. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.42, n.7, p.314-315, 1972.

VARDI, A.; SPIEGEL-ROY, P.A. A new approach to selection for seedlessness. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS MIDDLE EAST, 6., 1988, Tel Aviv. **Proceedings...** Tel Aviv: International Society of Citriculture, 1988. v.1, p.131-136, 1988.

WEILER, R. **Caracterização morfológica, citogenética e molecular de uma população de tangerineiras híbridas de 'Clementina Fina' (*Citrus clementina* Hort. ex. Tan.) e 'Montenegrina' (*C. deliciosa* Ten.)**. 2006. 67 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

YAN, G.; FERGUSON, A.R.; McNEILAGE, M.A. Numerically unreduced (2n) gametes and sexual polyploidization in *Actinidia*. **Euphytica**, Wageningen, v.96, p.267-272, 1997.

YAMAMOTO, M.; MATSUMOTO, R.; OKUDAI, N.; YAMADA, Y. Aborted anthers of Citrus result from gene-cytoplasmic male sterility. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.70, p.9-14, 1997.

YAMAMOTO, M.; TOMINAGA, S. High chromosomal variability of mandarins (*Citrus* spp.) revealed by CMA banding. **Euphytica**, Wageningen, v.129, n.3, p.267-274, 2003.

ANEXO I

Tamanho da amostra (n), rendimento de suco (% suco), teor de sólidos solúveis totais (SST), acidez total titulável (ATT) e índice de maturação (IM) do suco dos frutos dos híbridos avaliados no trabalho e da tangerineira 'Montenegrina' (M) em diferentes datas e anos de avaliação (Eldorado do Sul, RS, 2003/06)

Genótipo	Data	n	% suco	SST	ATT	IM
Ano 2003						
C05	11-abr	4	49,0	8,2	1,5	5,6
C05	25-abr	5	48,1	9,8	1,5	6,7
C05	9-mai	5	50,1	8,5	1,0	8,1
C05	23-mai	6	48,3	9,0	0,9	9,8
C05	6-jun	6	47,6	9,9	0,8	12,0
C05	20-jun	5	48,7	10,8	0,7	14,7
C05	4-jul	4	50,2	11,0	0,8	14,1
C07	6-jun	3	52,0	7,4	1,0	7,4
C07	20-jun	2	43,9	7,2	1,0	7,5
C07	4-jul	4	43,2	9,1	0,9	10,7
C08	4-jul	3	30,6	8,8	1,0	8,4
C08	18-jul	3	37,1	8,0	1,1	7,6
C10	23-mai	2	36,9	7,6	1,0	7,3
C10	6-jun	5	39,5	8,4	1,1	8,0
C10	20-jun	3	33,3	8,6	0,9	9,6
C10	4-jul	3	42,6	10,5	1,0	10,4
C17	9-mai	4	38,4	8,0	0,9	9,0
C17	23-mai	4	35,4	7,6	0,7	10,6
C17	6-jun	5	35,4	7,8	0,7	11,6
C17	20-jun	4	27,8	7,6	0,6	12,5
C17	4-jul	9	25,8	9,4	0,7	13,2
C17	18-jul	8	23,2	9,0	0,7	12,5
C17	1-ago	5	27,3	8,8	0,6	14,0
C26	25-abr	4	52,3	9,0	2,3	3,9
C26	9-mai	5	48,1	8,4	1,8	4,8
C26	6-jun	6	52,8	9,0	1,2	7,3
C26	20-jun	2	56,9	8,8	1,0	8,6
C28	6-jun	3	35,0	6,3	1,3	4,7
C28	4-jul	3	30,3	7,6	1,0	7,4
C28	18-jul	3	40,0	7,2	0,9	8,4
C28	1-ago	3	23,6	8,2	0,9	8,9
C28	15-ago	2	29,9	7,8	0,8	9,7
C32	23-mai	5	46,5	7,0	1,2	5,7
C32	6-jun	5	45,5	7,2	1,1	6,8
C32	20-jun	4	46,0	7,6	0,9	8,5
C32	4-jul	5	37,8	7,8	0,7	10,9
C32	18-jul	5	40,8	7,8	0,8	10,0
C32	1-ago	5	37,7	8,4	0,7	11,5
C32	15-ago	4	35,2	8,0	0,8	9,9
C32	29-ago	3	36,2	8,7	0,5	16,0
D06	9-mai	4	41,4	9,0	1,3	6,8
D06	23-mai	4	46,9	8,0	0,8	10,6

D06	23-mai	4	18,6	8,6	1,2	7,4
D06	6-jun	5	41,1	8,2	1,0	8,5
D06	20-jun	4	39,3	8,4	0,8	10,7
D06	4-jul	5	42,9	9,6	0,8	12,1
D06	18-jul	5	45,8	10,4	0,7	13,9
D06	1-ago	3	42,7	10,0	0,7	14,7
D08	11-abr	10	43,1	7,7	1,5	5,1
D08	25-abr	9	39,8	8,2	1,3	6,4
D08	9-mai	7	36,4	8,0	1,3	6,1
D08	23-mai	4	36,9	7,4	1,1	6,8
D09	11-abr	6	48,0	7,6	1,8	4,2
D09	25-abr	6	46,6	8,4	1,4	5,9
D09	9-mai	5	46,5	7,8	1,2	6,3
D09	23-mai	10	39,5	7,8	1,1	7,2
D09	6-jun	10	39,1	8,0	1,1	7,1
D09	20-jun	8	41,7	8,2	1,0	8,2
D09	4-jul	10	45,3	8,9	0,9	9,8
D09	18-jul	10	37,6	8,2	0,9	8,8
D09	1-ago	10	41,9	8,8	0,9	9,9
D09	15-ago	8	31,2	9,4	1,0	9,7
D13	23-mai	5	54,4	7,8	1,5	5,3
D16	11-abr	5	38,1	8,0	64,4	0,1
D16	25-abr	5	36,7	8,5	1,0	8,4
D16	9-mai	5	39,5	8,0	0,7	12,1
D16	23-mai	5	59,7	8,0	0,6	13,4
D16	6-jun	4	38,3	8,0	0,5	16,3
D16	20-jun	5	36,2	10,2	0,5	20,9
D16	4-jul	5	30,5	10,3	0,4	25,7
D16	18-jul	6	21,7	9,8	0,3	28,8
D16	1-ago	4	20,9	10,9	0,3	35,3
D18	11-abr	4	44,4	8,0	2,2	3,7
D18	25-abr	5	42,7	8,2	1,3	6,1
D18	9-mai	5	43,0	7,2	1,1	6,7
D18	23-mai	4	39,1	8,0	1,0	8,1
D18	6-jun	7	42,0	8,0	0,9	9,0
D18	20-jun	6	37,1	8,4	0,7	12,3
D18	4-jul	8	38,0	9,0	0,6	15,1
D18	18-jul	10	39,2	8,8	0,6	14,0
D18	1-ago	10	38,7	9,6	0,3	36,3
D18	15-ago	8	34,5	9,4	0,5	18,4
D18	29-ago	5	41,8	9,8	0,5	19,0
D21	25-abr	3	49,3	9,2	1,3	6,8
D21	9-mai	3	52,3	9,2	0,8	11,1
D21	23-mai	5	50,2	8,4	0,6	12,9
D21	6-jun	5	49,0	8,6	0,6	14,1
D21	20-jun	5	48,7	8,8	0,6	13,5
D21	4-jul	5	48,1	9,3	0,5	17,2
D21	18-jul	3	44,9	9,0	0,5	17,2
D21	1-ago	2	45,9	9,2	0,5	19,2
D22	25-abr	6	43,5	9,1	1,9	4,7
D22	9-mai	7	47,9	8,2	1,7	4,9
D22	23-mai	10	47,9	8,6	1,2	7,5
D22	6-jun	10	46,5	8,4	1,0	8,4
D22	20-jun	10	48,7	9,0	0,7	13,0
D22	4-jul	10	66,3	9,7	0,7	14,2
D22	18-jul	7	47,9	9,9	0,6	15,5
D22	1-ago	10	52,6	10,0	0,7	14,5
D22	15-ago	7	45,8	11,4	0,6	18,6
D22	29-ago	8	44,1	11,8	0,6	19,4
D23	6-jun	5	28,1	8,4	1,5	5,4

D23	20-jun	2	42,9	7,9	1,1	7,2
D23	4-jul	4	48,5	8,9	1,3	7,1
D23	18-jul	2	48,1	8,7	1,2	7,3
D28	4-jul	5	50,4	8,1	0,8	10,0
D28	18-jul	5	53,2	8,4	0,7	11,4
D28	1-ago	7	51,0	9,2	0,8	11,1
D28	15-ago	4	52,7	9,8	0,7	13,4
D29	23-mai	4	38,3	8,2	1,4	5,8
D29	6-jun	6	36,6	8,9	1,3	6,7
D29	20-jun	4	38,0	9,0	1,1	8,5
D29	4-jul	9	38,7	10,0	1,1	9,0
D29	18-jul	9	65,8	10,4	1,0	10,3
D29	1-ago	4	33,3	11,0	1,2	8,8
D29	15-ago	8	39,3	12,0	1,2	9,9
D32	20-jun	3	31,2	11,0	1,1	10,4
D32	4-jul	4	35,3	12,7	1,0	12,4
D32	18-jul	3	38,4	12,3	1,0	12,7
C09	18-jul	3	48,7	8,0	1,1	7,1
C11	23-mai	2	48,5	7,8	2,1	3,7
C11	6-jun	5	43,8	8,4	2,3	3,7
C13	6-jun	3	19,7	7,8	1,3	5,8
C13	20-jun	3	27,2	7,4	1,3	5,8
C13	4-jul	2	35,3	9,3	1,3	7,2
C13	18-jul	2	23,9	7,0	0,9	7,4
C25	23-mai	2	50,5	8,4	1,9	4,4
C25	6-jun	3	42,4	7,8	1,8	4,3
C27	11-abr	4	13,3	8,4	1,7	5,1
C27	25-abr	4	9,6	5,8	0,9	6,5
C27	9-mai	8	9,2	6,6	0,9	7,2
M	23-mai	8	51,7	7,9	1,8	4,5
M	6-jun	17	51,2	7,5	1,4	5,6
M	20-jun	16	53,4	8,1	1,0	7,8
M	4-jul	23	53,6	8,5	0,9	9,4
M	18-jul	27	51,6	9,0	0,9	9,8
M	1-ago	26	51,2	9,8	0,9	10,7
M	15-ago	18	48,4	10,2	0,9	11,6
M	29-ago	10	45,1	8,9	0,7	12,8

Ano 2004

C05	16-abr	5	42,1	9,4	2,3	4,0
C05	30-abr	5	44,8	9,3	2,1	4,4
C05	14-mai	5	50,9	8,6	1,3	6,4
C05	28-mai	5	49,1	8,8	1,2	7,2
C05	11-jun	3	53,1	9,5	0,8	11,5
C05	25-jun	4	48,6	10,1	0,9	11,3
C05	9-jul	5	47,5	11,3	0,9	12,2
C05	23-jul	4	46,4	11,2	0,7	16,4
C05	6-ago	3	44,8	13,3	0,9	15,4
C07	30-abr	4	40,7	9,2	2,8	3,3
C07	14-mai	4	43,9	8,2	2,3	3,6
C07	28-mai	4	48,0	8,5	1,7	5,0
C07	11-jun	5	43,7	9,0	1,3	7,1
C07	25-jun	3	51,0	8,9	1,4	6,2
C07	9-jul	3	28,6	9,9	1,0	9,5
C07	23-jul	5	46,9	10,2	1,0	10,2
C07	6-ago	4	43,0	10,8	0,9	11,9
C07	20-ago	4	47,9	11,4	0,9	12,3
C10	16-abr	3	45,3	10,2	3,2	3,2
C10	30-abr	5	41,9	9,9	1,8	5,6
C10	14-mai	5	42,7	10,2	2,0	5,2
C10	28-mai	5	44,7	9,7	1,6	6,0

C10	11-jun	3	33,8	9,8	1,5	6,5
C10	25-jun	3	39,2	9,6	1,4	6,9
C10	9-jul	4	35,3	8,7	1,3	6,5
C10	23-jul	4	35,4	11,6	1,2	10,0
C10	6-ago	4	33,9	11,6	1,2	9,3
C17	30-abr	4	42,2	8,3	2,0	4,3
C17	14-mai	4	46,1	8,0	1,3	6,1
C17	28-mai	2	45,6	6,5	0,9	7,1
C17	11-jun	7	44,3	8,1	0,6	13,8
C17	25-jun	4	40,5	8,0	0,6	12,9
C17	9-jul	3	32,4	8,4	0,6	14,1
C17	23-jul	3	34,9	9,0	0,6	15,6
C17	6-ago	3	31,2	8,6	0,5	17,9
C17	20-ago	3	29,3	9,7	0,7	13,2
C17	3-set	3	28,2	9,6	0,6	15,3
C32	14-mai	5	54,1	9,4	2,3	4,1
C32	28-mai	7	44,5	9,0	1,9	4,7
C32	11-jun	7	57,1	8,9	1,7	5,1
C32	25-jun	7	55,8	8,8	1,5	5,7
C32	9-jul	7	59,5	9,2	1,6	5,7
C32	23-jul	5	51,5	11,3	1,5	7,7
C32	6-ago	5	54,6	9,8	1,5	6,8
C32	20-ago	6	50,4	10,3	1,4	7,3
C32	3-set	4	48,1	10,7	1,1	9,5
C32	17-set	8	51,5	12,0	1,3	9,5
C32	1-out	5	49,2	10,4	1,3	7,9
D03	28-mai	3	33,0	8,6	1,2	7,0
D03	11-jun	3	31,8	8,0	1,0	7,9
D03	25-jun	3	29,4	8,0	0,7	10,8
D06	14-mai	6	34,4	9,4	2,1	4,5
D06	28-mai	6	19,1	9,5	1,6	5,9
D06	11-jun	6	38,8	9,8	1,6	6,3
D06	25-jun	6	44,9	8,4	1,2	6,9
D06	9-jul	6	42,2	10,9	1,1	9,8
D06	23-jul	6	41,1	9,6	1,0	9,9
D06	6-ago	6	61,8	10,4	0,9	11,2
D06	20-ago	6	42,1	10,4	0,8	12,7
D06	3-set	5	39,5	11,7	0,9	13,0
D06	17-set	5	44,2	11,4	0,7	15,3
D08	16-abr	7	49,6	9,5	2,4	3,9
D08	14-mai	4	40,3	9,0	1,2	7,7
D08	28-mai	6	43,1	9,0	1,2	7,4
D08	11-jun	4	41,2	9,8	1,1	9,3
D08	25-jun	7	41,8	10,2	1,1	9,7
D09	30-abr	3	38,5	9,8	2,1	4,7
D09	14-mai	3	42,6	8,8	1,4	6,2
D09	28-mai	3	45,8	8,5	1,2	7,0
D09	25-jun	4	41,7	8,4	1,0	8,1
D09	9-jul	3	50,1	8,8	1,1	8,3
D09	23-jul	3	51,4	10,3	1,1	9,6
D09	6-ago	3	23,7	10,3	1,2	7,4
D16	16-abr	10	36,0	11,8	1,9	6,3
D16	30-abr	10	37,1	11,0	1,4	7,8
D16	14-mai	3	44,4	8,7	1,1	7,8
D16	28-mai	10	40,2	9,2	1,1	8,2
D16	28-mai	10	36,6	11,2	1,0	11,0
D16	11-jun	10	42,5	8,3	0,9	8,8
D16	25-jun	7	43,4	9,3	0,9	9,8
D16	9-jul	5	40,4	9,8	0,6	15,3
D18	11-jun	3	36,0	7,8	1,5	5,1

D18	25-jun	3	26,1	9,5	1,6	6,0
D18	9-jul	5	31,5	8,0	1,2	6,5
D21	14-mai	2	51,2	8,9	1,2	7,3
D21	28-mai	2	52,3	8,0	0,8	9,8
D21	11-jun	3	49,4	9,2	0,8	11,6
D21	25-jun	3	49,2	9,0	0,9	10,3
D21	9-jul	3	41,7	9,1	0,8	11,4
D21	23-jul	2	46,2	9,5	0,6	15,1
D21	6-ago	2	51,7	11,5	0,7	16,5
D22	30-abr	3	47,5	9,8	1,5	6,7
D22	14-mai	2	41,7	8,4	2,4	3,6
D22	28-mai	3	41,0	8,1	2,1	3,9
D22	11-jun	3	37,9	8,2	1,9	4,3
D22	25-jun	3	41,3	8,7	1,3	6,5
D22	9-jul	3	54,6	9,0	1,3	7,0
D22	23-jul	3	40,9	8,5	1,3	6,4
D23	30-abr	3	38,4	10,1	4,1	2,5
D23	14-mai	2	39,0	7,9	2,6	3,0
D23	28-mai	4	40,8	8,7	2,5	3,5
D23	11-jun	4	42,9	8,2	1,9	4,2
D23	25-jun	3	44,9	9,9	1,7	5,8
D23	9-jul	4	39,6	10,3	1,5	7,0
D23	23-jul	4	43,1	11,1	1,5	7,2
D28	25-jun	3	61,1	8,1	1,2	6,6
D28	9-jul	5	51,4	7,6	1,3	6,0
D28	23-jul	5	54,3	8,5	1,2	7,2
D29	14-mai	2	32,3	7,5	2,6	2,9
D29	28-mai	3	32,8	8,2	1,9	4,3
D29	11-jun	3	36,5	8,8	1,9	4,5
D29	25-jun	2	36,1	8,0	1,3	6,0
D29	9-jul	3	37,5	8,3	1,3	6,3
D29	23-jul	3	32,1	9,5	1,3	7,5
D29	6-ago	2	29,9	9,2	1,2	7,5
D32	28-mai	3	33,7	7,2	1,6	4,4
D32	11-jun		33,9	8,0	1,2	6,7
D32	25-jun	3	37,4	8,7	0,9	9,4
D32	9-jul	5	33,2	9,5	0,9	10,4
D32	23-jul	5	31,0	11,2	1,0	11,3
D32	3-set	5	32,3	13,1	0,9	13,9
C09	11-jun	4	40,2	7,5	1,3	5,7
C09	25-jun	3	51,7	9,1	2,2	4,1
C09	9-jul	4	42,0	10,2	2,2	4,7
C09	23-jul	4	50,6	10,3	1,6	6,3
C09	6-ago	4	51,4	11,6	2,0	5,8
C09	20-ago	2	52,3	10,4	1,6	6,7
C09	3-set	3	51,5	11,2	1,4	8,0
C11	28-mai	3	48,3	9,6	2,9	3,3
C11	11-jun	5	45,9	9,3	2,8	3,3
C11	25-jun	3	47,7	8,6	2,2	4,0
C11	9-jul	5	47,7	10,5	2,2	4,8
C11	23-jul	5	47,9	10,4	2,3	4,6
C11	6-ago	3	47,7	11,1	2,3	4,9
C11	20-ago	4	45,7	11,0	1,9	5,9
C11	3-set	5	53,2	10,5	1,7	6,2
C11	17-set	4	47,7	11,5	1,8	6,4
C13	14-mai	3	36,7	8,2	1,8	4,4
C13	28-mai	3	31,2	7,3	1,4	5,2
C13	11-jun	3	25,7	7,8	1,4	5,5
C13	3-set	5	25,0	8,0	1,2	6,6
C21	11-jun	4	37,9	8,7	0,5	15,8

C21	25-jun	3	38,5	10,3	0,7	14,7
C21	9-jul	3	57,1	10,4	0,7	14,5
C25	28-mai	2	49,2	8,9	2,5	3,5
C25	11-jun	1	57,0	9,6	2,5	3,9
C25	25-jun	2	47,9	10,3	1,7	6,0
C27	16-abr	5	21,1	9,4	1,3	7,2
C27	30-abr	5	16,7	8,4	1,2	7,1
C27	14-mai	3	24,0	9,3	1,0	9,0
C27	28-mai	3	10,5	6,5	0,4	14,5
C27	23-jul	3	13,6	11,8	1,2	9,6
M	25-jun	11	53,3	8,5	1,3	6,6
M	9-jul	25	51,0	10,2	1,2	8,2
M	23-jul	26	51,9	8,2	1,1	7,4
M	6-ago	24	49,7	8,6	1,0	8,6
M	20-ago	20	53,3	9,5	1,0	9,8
M	3-set	22	54,0	9,7	0,9	10,5
M	17-set	32	53,8	10,1	0,9	11,2
M	1-out	13	52,6	9,9	0,8	11,7

Ano 2005

C01	24-jun	3	39,1	6,8	0,7	10,4
C05	29-abr	3	47,5	6,7	1,1	5,9
C05	13-mai	4	49,1	8,0	0,9	8,7
C05	26-mai	5	44,6	7,7	0,8	9,7
C05	10-jun	4	48,4	9,2	0,7	12,6
C05	24-jun	5	47,2	9,8	0,6	15,7
C08	26-mai	3	29,5	6,3	2,0	3,1
C08	10-jun	4	27,9	7,1	1,3	5,4
C08	24-jun	3	28,4	6,3	1,3	5,0
C10	26-mai	3	41,4	6,2	1,0	6,3
C10	10-jun	3	30,0	6,8	0,9	7,4
C10	24-jun	3	31,4	7,2	0,7	9,8
C17	13-mai	3	32,6	5,7	0,6	8,9
C17	26-mai	3	27,0	5,7	0,6	9,6
C17	10-jun	5	22,1	6,6	0,8	8,1
C17	24-jun	6	17,9	7,0	0,6	11,0
C17	8-jul	6	13,4	6,6	0,5	12,2
C17	21-jul	10	8,4	7,4	0,7	11,1
C17	4-ago	6	18,8	6,0	0,5	11,7
C22	8-jul	3	47,4	8,0	0,7	10,8
C24	10-jun	6	39,8	6,9	0,7	10,1
C24	24-jun	6	45,8	8,0	0,9	9,2
C24	8-jul	4	41,7	7,2	1,0	6,9
C24	21-jul	6	54,4	7,7	0,8	9,1
C24	4-ago	10	42,2	9,0	0,8	11,7
C24	19-ago	6	41,3	8,6	1,0	9,1
C24	2-set	5	37,5	9,2	0,9	10,7
C26	10-jun	4	49,2	7,3	0,9	7,8
C26	24-jun	4	46,4	7,8	0,6	12,2
C28	10-jun	6	37,4	6,1	1,8	3,4
C28	24-jun	10	42,7	7,2	1,4	5,1
C28	24-jun	3	36,9	8,6	0,8	11,0
C28	8-jul	10	35,4	7,2	1,2	6,0
C28	21-jul	4	38,8	7,2	1,1	6,8
C28	4-ago	10	38,0			
C28	19-ago	10	30,0	7,2	1,0	6,9
C28	2-set	4	38,3	6,9	0,9	7,4
D03	10-jun	3	20,2	5,6	0,5	10,6
D03	24-jun	3	23,5	5,8	0,4	13,5
D03	8-jul	3	8,9	4,8	0,3	14,8
D03	21-jul	3	5,1	3,6	0,1	28,2

D06	29-abr	5	31,8	6,4	1,8	3,5
D06	13-mai	4	34,8	7,1	1,1	6,2
D06	26-mai	5	35,4	7,2	1,0	7,4
D06	10-jun	10	23,2	8,3	0,8	9,8
D06	24-jun	5	29,3	7,1	0,7	9,6
D06	8-jul	9	37,6	6,8	0,7	9,3
D06	21-jul	5	25,8	7,8	0,7	10,6
D08	29-abr	5	32,7	6,6	1,2	5,4
D08	13-mai	4	32,3	7,0	0,8	9,3
D08	26-mai	6	29,8	7,2	0,8	9,3
D08	10-jun	4	32,9	9,2	0,7	12,7
D08	24-jun	7	28,1	9,6	0,8	11,6
D08	8-jul	8	20,0	9,0	0,8	11,4
D08	21-jul	7	21,6	9,9	0,7	15,2
D09	26-mai	10	34,4	6,5	1,4	4,7
D09	10-jun	10	35,2	6,8	1,3	5,4
D09	24-jun	9	43,7	7,5	1,2	6,3
D09	8-jul	8	34,6	7,0	1,0	7,2
D09	21-jul	10	32,0	8,3	1,1	7,5
D09	4-ago	10	36,9	7,6	1,2	6,4
D09	19-ago	10	31,0	9,1	1,2	7,9
D09	2-set	6	38,2	8,4	0,9	8,8
D18	26-mai	10	31,6	7,0	1,1	6,4
D18	10-jun	10	28,9	7,5	0,9	8,6
D18	24-jun	10	38,8	7,9	0,8	10,1
D18	8-jul	8	40,3	7,0	0,9	8,0
D18	21-jul	10	26,2	8,9	0,7	13,5
D18	4-ago	10	29,6	7,5	0,7	11,2
D18	19-ago	5	24,0	8,4	0,6	13,3
D18	2-set	4	22,4	9,4	0,6	14,7
D21	29-abr	3	45,4	6,8	1,1	6,1
D21	13-mai	3	50,6	7,3	0,7	10,0
D21	26-mai	3	52,3	7,4	0,6	11,8
D21	10-jun	4	43,7	7,3	0,6	12,8
D21	24-jun	4	39,2	7,1	0,5	13,8
D21	8-jul	4	44,1	8,0	0,5	14,8
D21	21-jul	5	32,9	7,6	0,5	16,6
D22	26-mai	5	38,5	6,7	1,3	5,1
D22	10-jun	5	39,7	7,3	0,8	9,0
D22	24-jun	5	40,4	7,7	0,7	10,3
D22	8-jul	5	39,2	7,2	0,7	10,1
D22	21-jul	7	35,5	9,2	0,8	12,2
D22	21-jul	5	44,7	6,8	0,8	8,1
D22	4-ago	10	35,5	8,6	0,7	12,7
D22	19-ago	6	34,7	8,7	0,7	12,7
D22	2-set	5	42,3	10,4	0,9	11,6
D22	16-set	3	34,5	9,8	0,7	14,3
D23	24-jun	5	40,9	7,3	1,2	6,0
D23	8-jul	4	37,7	7,8	1,1	7,1
D23	21-jul	10	31,4	7,6	1,2	6,5
D23	4-ago	9	30,0	10,0	1,1	9,2
D23	19-ago	7	31,8	8,8	1,1	7,7
D23	2-set	6	25,6	9,0	1,0	8,8
D29	10-jun	3	36,8	6,1	0,9	6,4
D29	24-jun	3	38,1	8,1	1,0	8,1
D32	26-mai	3	27,1	7,8	1,1	7,3
D32	10-jun	3	30,4	7,4	0,8	8,9
D32	24-jun	4	29,6	9,3	0,9	10,6
D32	8-jul	4	27,3	9,0	0,7	12,7
D32	21-jul	7	24,0	11,1	0,6	19,3

C09	8-jul	3	45,9	6,8	1,1	6,4
C09	21-jul	3	40,9	7,1	0,8	8,9
C09	4-ago	4	45,0	7,9	0,7	11,0
C11	21-jul	4	46,2	6,6	1,3	5,1
C11	4-ago	3	46,9	6,9	1,4	4,8
C11	19-ago	5	42,6	6,8	1,1	6,0
C13	21-jul	6	19,5	6,0	1,0	5,8
C15	24-jun	3	45,2	6,7	1,1	6,0
C15	8-jul	3	45,7	7,0	1,0	6,8
C15	21-jul	3	41,9	6,8	0,9	7,9
C21	13-mai	3	37,1	6,9	0,6	11,5
C21	26-mai	3	36,6	6,3	0,5	11,8
C21	10-jun	4	22,4	7,0	0,4	18,0
C25	10-jun	3	43,8	7,7	0,9	8,3
C25	8-jul	3	45,8	7,4	1,1	6,9
C25	21-jul	3	50,2	8,9	0,8	11,3
C27	26-mai	5	11,7	4,0	0,5	7,8
C27	10-jun	5	0,0			
M	24-jun	9	50,0	6,5	1,2	5,4
M	8-jul	14	47,4	7,0	1,0	7,1
M	21-jul	12	50,0	7,5	1,0	7,8
M	4-ago	16	47,2	7,6	0,9	8,8
M	19-ago	23	42,4	7,9	0,9	8,7
M	2-set	9	44,3	7,9	0,8	10,2
M	16-set	8	42,3	8,1	0,9	8,8

Ano 2006

C01	5-jun	3	37,6	8,2	1,5	5,4
C01	19-jun	5	38,5	9,0	1,2	7,3
C01	3-jul	5	41,3	9,6	1,1	8,4
C01	14-jul	5	40,3	9,8	1,1	9,2
C05	31-mar	5	43,4	9,6	1,6	6,1
C05	10-abr	5	47,4	8,3	1,5	5,6
C05	22-abr	5	47,6	8,9	1,3	7,0
C05	8-mai	6	44,3	9,5	1,6	5,9
C05	22-mai	5	45,0	10,9	1,2	9,5
C05	5-jun	5	45,4	11,2	1,1	10,4
C05	19-jun	5	45,5	12,2	1,2	10,3
C05	3-jul	5	48,9	13,0	1,2	10,9
C05	14-jul	5	46,1	12,4	1,1	10,9
C05	31-jul	5	43,6	13,1	1,1	11,8
C07	22-abr	5	42,3	9,4	3,2	3,0
C07	8-mai	5	43,5	9,9	2,0	5,1
C07	22-mai	5	42,6	9,8	2,5	3,9
C07	5-jun	5	45,0	11,2	2,3	4,9
C07	19-jun	5	38,9	9,8	1,6	6,3
C07	3-jul	5	42,4	10,2	1,7	6,1
C07	14-jul	5	44,8	10,2	1,2	8,4
C07	31-jul	5	42,2	10,9	1,1	9,9
C07	11-ago	5	46,4	12,2	1,2	10,2
C07	28-ago	3	45,2	9,7	1,0	10,1
C07	11-set	3	40,9	11,4	1,0	11,4
C10	22-mai	5	33,5	10,5	1,9	5,4
C10	5-jun	5	38,8	11,2	1,9	5,8
C10	19-jun	5	33,7	10,8	1,7	6,3
C10	3-jul	5	33,1	13,2	1,7	7,7
C10	14-jul	5	32,9	11,6	1,4	8,3
C10	31-jul	3	32,6	10,8	1,2	8,7
C17	8-mai	5	41,6	8,8	1,6	5,4
C17	22-mai	5	40,4	9,1	1,2	7,5
C17	5-jun	8	36,3	9,7	1,2	8,4

C17	19-jun	5	37,2	9,3	1,0	9,8
C17	3-jul	5	41,4	10,4	2,5	4,1
C17	14-jul	5	37,7	8,5	1,3	6,6
C17	31-jul	5	29,8	9,7	0,8	12,5
C17	11-ago	5	40,9	9,4	1,3	7,3
C17	28-ago	4	35,7	10,0	0,7	14,2
C23	5-jun	3	48,3	11,0	1,2	9,1
C23	19-jun	3	46,6	10,0	1,3	7,9
C26	5-jun	5	46,7	11,9	2,6	4,6
C26	19-jun	5	51,0	11,1	2,1	5,3
C26	3-jul	5	48,1	11,7	1,6	7,3
C26	14-jul	3	41,0	11,4	1,5	7,8
C26	31-jul	4	42,9	11,1	1,5	7,5
C28	5-jun	4	25,2	8,8	2,4	3,7
C32	8-mai	5	46,6	10,9	2,8	3,9
C32	22-mai	5	49,0	11,3	2,4	4,7
C32	5-jun	5	45,2	10,3	0,9	11,9
C32	19-jun	5	44,0	11,2	1,9	5,8
C32	3-jul	5	46,1	11,6	1,8	6,4
C32	14-jul	5	43,4	11,0	1,6	6,7
C32	31-jul	5	40,1	11,1	1,5	7,5
C32	11-ago	5	47,7	11,2	2,0	5,5
C32	28-ago	5	44,5	10,2	1,1	9,0
C32	11-set	5	52,8	14,2	1,5	9,3
C32	25-set	3	44,4	11,1	1,1	9,9
D03	5-jun	3	22,8	8,7	0,9	9,2
D06	22-mai	5	30,9	7,9	1,3	6,1
D06	5-jun	5	24,5	10,4	1,6	6,6
D06	19-jun	5	28,1	9,3	1,4	6,6
D06	3-jul	5	28,8	10,2	0,9	11,8
D06	14-jul	5	34,6	10,0	1,0	10,3
D08	31-mar	5	40,6	7,5	2,2	3,4
D08	10-abr	5	46,4	8,2	2,5	3,3
D08	22-abr	6	44,1	9,6	1,9	5,0
D08	8-mai	6	42,0	8,9	1,5	6,0
D08	22-mai	5	37,4	9,4	1,4	6,7
D08	5-jun	6	37,7	10,1	1,9	5,4
D08	19-jun	5	69,8	10,6	1,5	7,2
D08	3-jul	4	35,4	10,2	1,1	9,3
D08	14-jul	5	35,7	10,1	1,2	8,2
D08	31-jul	5	41,2	11,3	0,9	13,2
D08	31-jul	4	43,2	10,9	1,2	9,3
D16	10-abr	5	40,7	9,2	1,7	5,5
D16	22-abr	7	39,2	9,8	1,8	5,5
D16	8-mai	5	41,1	12,1	1,8	6,6
D16	22-mai	5	38,4	11,7	1,4	8,5
D16	5-jun	5	35,0	10,5	1,4	7,3
D16	19-jun	5	36,1	10,5	1,1	9,4
D16	3-jul	5	39,4	9,8	0,8	12,5
D16	14-jul	5	34,1	10,1	1,0	9,8
D16	31-jul	5	41,8	11,1	0,8	14,5
D18	3-jul	5	32,0	9,2	1,0	9,1
D18	14-jul	4	29,4	9,8	1,0	9,7
D18	31-jul	5	28,5	10,2	1,0	10,5
D19	19-jun	5	44,3	11,0	2,2	5,0
D19	3-jul	3	45,5	9,6	1,7	5,8
D21	31-mar	5	49,8	9,1	2,2	4,2
D21	10-abr	4	49,6	11,0	2,1	5,2
D21	22-abr	7	52,1	11,0	1,3	8,5
D21	8-mai	5	53,5	11,4	1,6	7,1

D21	22-mai	5	50,2	11,4	1,4	7,9
D21	5-jun	5	49,3	12,0	1,4	8,4
D21	19-jun	5	48,0	11,8	1,1	10,6
D21	3-jul	5	50,7	11,0	0,9	12,4
D21	14-jul	4	45,6	11,6	0,9	12,3
D22	5-jun	5	38,7	12,0	2,7	4,5
D22	19-jun	5	40,0	10,2	1,7	6,0
D22	3-jul	5	41,2	10,2	1,4	7,3
D22	14-jul	5	42,8	11,0	1,2	9,2
D22	14-jul	4	36,2	10,9	0,7	16,1
D22	31-jul	5	43,2	11,6	1,2	9,8
D22	11-set	3	48,5	12,4	0,9	13,7
D25	14-jul	3	25,5	8,8	1,4	6,4
D28	19-jun	5	47,0	10,0	2,2	4,6
D28	3-jul	5	50,9	11,2	1,6	6,8
D28	14-jul	5	49,0	10,0	1,3	7,7
D28	31-jul	5	48,7	10,2	0,9	10,7
D29	3-jul	5	29,8	10,8	2,0	5,4
D29	14-jul	5	37,0	10,7	2,4	4,4
D32	3-jul	5	29,2	12,8	1,4	9,2
D32	14-jul	5	35,8	12,7	1,1	11,1
D32	11-ago	4	42,9	13,6	1,5	8,9
D32	28-ago	5	43,8	15,3	0,9	16,4
C09	3-jul	5	55,9	11,2	2,7	4,1
C09	14-jul	3	50,6	10,0	2,0	4,9
C09	31-jul	5	50,8	11,0	2,3	4,8
C09	11-ago	4	66,6	11,4	2,7	4,2
C11	19-jun	5	49,4	11,0	2,9	3,8
C11	3-jul	4	47,3	12,2	2,9	4,3
C11	14-jul	5	51,9	10,2	3,2	3,2
C11	31-jul	4	50,3	10,9	2,5	4,4
C13	22-mai	4	58,2	10,6	2,4	4,5
C13	5-jun	5	51,2	10,8	2,4	4,4
C13	5-jun	5	38,8	12,1	2,7	4,5
C13	19-jun	5	29,7	11,0	0,8	13,1
C13	3-jul	5	29,6	12,2	2,2	5,4
C13	14-jul	5	27,6	10,7	2,0	5,4
C13	31-jul	5	26,2	12,9	2,1	6,2
C13	11-ago	5	42,5	13,2	3,4	3,8
C13	28-ago	4	40,0	10,4	1,6	6,3
C20	31-mar	10	40,8	7,6	1,4	5,4
C20	10-abr	5	47,0	8,4	1,5	5,6
C20	22-abr	4	38,0	7,0	1,1	6,5
C20	8-mai	7	49,4	11,6	1,6	7,4
C20	22-mai	4	37,6	6,8	0,9	7,7
C20	5-jun	5	38,0	8,6	1,0	8,5
C20	19-jun	5	33,7	8,2	1,0	8,1
C21	8-mai	5	34,7	9,3	1,4	6,9
C21	22-mai	4	28,8	9,6	1,0	9,7
C21	5-jun	4	32,7	10,1	1,4	7,2
C21	19-jun	5	21,7	8,9	0,8	11,2
C21	14-jul	3	31,4	9,3	0,7	13,5
C25	5-jun	3	52,5	10,9	2,6	4,2
C25	19-jun	5	50,5	10,2	2,7	3,8
C25	3-jul	3	52,8	11,4	2,8	4,1
D10	5-jun	3	27,6	4,2	0,5	8,7
M	5-jun	5	49,4	10,1	2,5	4,0
M	19-jun	20	48,1	9,8	2,0	4,8
M	3-jul	24	47,1	10,8	1,8	6,2
M	14-jul	25	47,4	9,4	1,1	7,0

M	31-jul	23	48,1	9,9	1,1	9,2
M	11-ago	14	62,8	11,3	1,4	8,5
M	28-ago	9	51,5	9,6	0,6	14,8
M	11-set	4	94,8	9,8	0,9	10,8
