

Caracterização molecular de uma progênie de tangerineira ‘Clementina Fina’ e ‘Montenegrina’

Molecular characterization of a progeny between tangerines ‘Clementina Fina’ and ‘Montenegrina’

Roberto Luis Weiler^I Eduardo Cesar Brugnara^I Sergio Francisco Schwarz^{II}
Marinês Bastianel^{III} Marcos Antônio Machado^{III} Maria Teresa Schifino-Wittmann^{IV}

RESUMO

Os citros apresentam uma taxonomia muito complexa, principalmente com relação ao número de espécies que constituem o gênero *Citrus* e os gêneros afins. Genótipos classificados como espécies podem ter sido originados por hibridação interespecífica e preservados por meio da embrião nuclear. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar uma população de tangerineiras híbridas oriundas do cruzamento das tangerineiras ‘Clementina Fina’ (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.), genitor feminino, e ‘Montenegrina’ (*Citrus deliciosa* Ten.), genitor masculino, utilizando marcadores do tipo microssatélites (SSR). Com 12 pares de primers, foi possível diferenciar 93 acessos do estudo e agrupar a F_1 em indivíduos mais próximos do genitor feminino e do genitor masculino. O PIC (Conteúdo de Informação de Polimorfismo) dos primers variou de 0,27 a 0,65. Toda a progênie do cruzamento entre ‘Clementina Fina’ e ‘Montenegrina’ analisada neste estudo é híbrida, e os SSRs foram eficientes para identificar híbridos com maior similaridade genética em relação aos genitores, mostrando a existência de variabilidade genética entre as plantas da população estudada.

Palavras-chave: *Citrus*, marcadores moleculares, microssatélites.

ABSTRACT

Citrus have a very complex taxonomy, especially considering the number of species included in genus *Citrus* and related genera. What is classified as a species may have originated by interespecific hybridization and preserved through nucellar embryony. This research aimed to characterize a

population of hybrid tangerines, originated from the cross of ‘Clementina Fina’ (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) as female and ‘Montenegrina’ (*Citrus deliciosa* Ten.) as male parents, using microsatellite molecular markers. With 12 pairs of primers it was possible to differentiate 93 of the studied accessions and to group F_1 individuals nearer to the male or to the female parent. The primers PIC (Polymorphism Information Content) ranged from 0.27 to 0.65. All the analyzed progeny between ‘Clementina Fina’ and ‘Montenegrina’ is hybrid, where SSR were efficient in identifying hybrids more similar to the genitors, showing genetic variability among plants of the studied population.

Key words: *Citrus*, molecular markers, microsatellites.

INTRODUÇÃO

A citricultura é uma das mais importantes atividades da fruticultura mundial, e a disseminação mundial de citros tem sido associada às grandes explorações e aos conflitos da história, incluindo as conquistas de Alexandre, o Grande, a dispersão do muçulmanismo e as explorações de Colombo, que trouxeram para o novo mundo as plantas cítricas (KOEHLER-SANTOS et al., 2003). A citricultura foi introduzida no Brasil pelos primeiros colonizadores, nos primórdios do descobrimento, mais especificamente no atual Estado da Bahia (KOLLER, 1994). A produção

^IPrograma de Pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, RS, Brasil.

^{II}Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Departamento de Horticultura e Silvicultura, UFRGS. Av. Bento Gonçalves, 7712, 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: schwarz@ufrgs.br. Autor para correspondência.

^{III}Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio, Centro APTA Citros Sylvio Moreira, Cordeirópolis, SP, Brasil.

^{IV}Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Departamento Plantas Forrageiras e Agrometeorologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

1 mundial foi de cerca de 105 milhões de toneladas em
2 2007, sendo o Brasil responsável por cerca de 20%
3 dessa produção, com aproximadamente 21 milhões de
4 toneladas (FAO, 2009).

5 Os citros apresentam uma taxonomia muito
6 complexa, principalmente com relação ao número de
7 espécies que constituem o gênero *Citrus* e os gêneros
8 correlacionados. É possível que muitos biótipos,
9 classificados como espécies, tenham sido originados
10 por hibridação interespecífica e preservados por meio
11 da embrião nucelar (IWAMASA & NITO, 1988).

12 Os citros são plantas dicotiledôneas
13 pertencentes à família Rutaceae, subfamília
14 Aurantioideae, tribo Citreae e subtribo Citrinae, esta
15 contendo 13 gêneros, incluindo *Citrus*, *Fortunella* e
16 *Poncirus*, os quais têm importância econômica mundial.
17 Swingle, em 1943, dividiu o gênero *Citrus* em 16 espécies
18 e incluiu as tangerineiras ‘Montenegrina’ e ‘Clementina
19 Fina’ em uma mesma espécie: *C. reticulata* Blanco. Em
20 outra classificação, feita por Tanaka, em 1961, as
21 tangerineiras foram classificadas em várias espécies, a
22 ‘Montenegrina’ pertencendo à espécie *C. deliciosa*
23 Ten., e a ‘Clementina Fina’, à espécie *C. clementina*
24 Hort. ex Tan. (BRUCKNER, 2002). A classificação de
25 Tanaka é a mais utilizada atualmente.

26 O uso da hibridação no melhoramento de
27 citros foi iniciado no século XIX e tem gerado várias
28 cultivares copa de tangerineiras, algumas das quais
29 vêm ganhando expressão no Brasil. A estimativa da
30 semelhança genética entre genótipos pode auxiliar na
31 escolha de tipos mais ou menos distintos, cujo
32 cruzamento pode levar a uma maior ou menor variância
33 genética da progênie (MESSMER et al., 1993).

34 Nesse aspecto, o estudo com marcadores
35 moleculares permite avaliar a variabilidade genética de
36 uma população ao nível do DNA, permitindo também
37 associar as plantas em grupos por similaridade e
38 refletindo as semelhanças, ou diferenças, entre os
39 genótipos a partir de uma amostra direta do genoma.
40 Estudos dessa natureza têm sido frequentes em
41 populações obtidas por cruzamentos dirigidos em citros
42 (RAO et al., 2008); entretanto, esses trabalhos têm sido
43 baseados no uso de marcadores dominantes, como
44 RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) e AFLP
45 (*amplified fragment length polymorphism*). A análise
46 de similaridade em plantas perenes, assim como os
47 citros, pode auxiliar programas de melhoramento
48 genético, pois permite identificar precocemente
49 genótipos mais ou menos semelhantes aos parentais e
50 a formação de combinações gênicas diferentes das
51 encontradas nos genitores.

52 Microsatélites ou SSR (simple sequence
53 repeats) são sequências de DNA moderadamente

repetitivas e altamente variáveis que, quando utilizadas
como marcadores moleculares, têm herança mendeliana,
constituindo um marcador codominante. Em citros, esse
marcador tem sido utilizado em estudos com cultivares
de laranja doce *C. sinensis* (L.) Osb. para a seleção
de híbridos zigóticos obtidos em cruzamentos
interespecíficos e intraespecíficos (OLIVEIRA et al.,
2002), a análise filogenética de citros e gêneros
relacionados (NOVELLI et al., 2006) e a construção de
mapas genômicos (THOMAS et al., 1998).

O presente trabalho teve como objetivo
estimar a diversidade genética de uma população de
tangerineiras híbridas de ‘Clementina Fina’ (*Citrus
clementina* Hort. ex Tan.), genitor feminino, e
‘Montenegrina’ (*Citrus deliciosa* Ten.), genitor
masculino, utilizando marcadores microssatélites.

MATERIAIS E MÉTODOS

As plantas utilizadas neste estudo estão
localizadas em um pomar da Estação Experimental
Agrônômica da Universidade Federal do Rio Grande
do Sul (EEA/UFRGS), localizada no Município de
Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul, onde o clima é do
tipo Cfa. A precipitação pluviométrica média anual é
de 1440mm, e a umidade relativa do ar média anual é de
77,3%.

Na primavera de 1993, foram realizados
cruzamentos entre as tangerineiras das cultivares
‘Clementina Fina’ (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) e
‘Montenegrina’ (*Citrus deliciosa* Ten.), por meio de
polinização dirigida em plantas do banco de
germoplasma. As sementes obtidas dos cruzamentos
foram colhidas e cultivadas em 1994, por meio de
semeadura *in vitro*, no Laboratório de Biotecnologia
do Departamento de Horticultura e Silvicultura da
UFRGS. No ano de 1995, as respectivas mudas foram
para o campo, totalizando 94 plantas. A progênie
permaneceu de “pé franco”, ou seja, não foi enxertada,
para que o porta-enxerto não fosse responsável por
imprimir as suas características e mascarar as
características dos híbridos.

A extração de DNA foi feita utilizando a
metodologia descrita por SHILLITO & SAUL (1988),
com adaptações desenvolvidas pelo Laboratório de
Biotecnologia do Centro APTA Citros Sylvio Moreira
– IAC (Cordeirópolis, SP).

As reações de amplificação foram feitas com
oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) desenvolvidos
no próprio Centro de Citricultura, a partir da biblioteca
de DNA genômico da laranja doce da cultivar ‘Pêra’
(*Citrus sinensis* (L.) Osb.) (NOVELLI et al., 2006). As
reações foram preparadas num volume de 25µl,

contendo água autoclavada, 2,5µl de tampão 10X (10mmol/L de Tris-HCl 9 pH 8,3); 1µl de MgCl (50mM); 1µl de dNTP mix (dATP, dTTP, dCTP, dGTP à 10mM); 4 pmol de cada *primer* (Direito e Reverso); 1,5U da enzima Taq polimerase e 100ng de DNA genômico.

As reações foram amplificadas em termociclador MJ com a utilização de um programa com 30 ciclos por 30 segundos, 65-56°C por 30 segundos (touchdown 0,3°C a cada ciclo) e 72°C por cinco segundos. A visualização foi feita em gel de agarose a 3,0% preparado com tampão TAE (0,04M, tris acetato, 1mM de EDTA), corados com brometo de etídeo (0,5µg ml⁻¹) e com migração no gel por cerca de duas horas a 120 volts em cubas horizontais. A visualização também foi feita em géis de poliacrilamida 8% corados com nitrato de prata. Os géis de poliacrilamida foram utilizados quando a diferença no tamanho dos alelos foi muito pequena (menos de 15pb) ou quando a amplificação em gel de agarose mostrava dúvidas quanto à nitidez de bandas. Não havia informações prévias do comportamento dos *primers* utilizados nos genitores, porém havia informações dos *primers* quando da utilização destes em laranja doce da cultivar 'Pêra' (*Citrus sinensis* (L.) Osb.).

Foram testados 84 *primers* descritos por NOVELLI et al. (2006), portanto já havia informações sobre o tamanho dos alelos esperados quando da utilização de cada par de *primers*. Os testes foram feitos no genitor feminino ('Clementina Fina') e no genitor masculino ('Montenegrina'), objetivando encontrar *primers* que fossem polimórficos entre os parentais.

O tamanho dos alelos em cada loco foi determinado por marcador de DNA (100 pb). A partir das imagens dos géis de agarose e poliacrilamida foram avaliadas a presença (1) e ausência (0) de cada alelo por loco, em cada acesso, utilizando-se o sistema de taxonomia numérica e multivariada 'Numerical Taxonomic and Multivariate Analysis System' (NTSYS) – versão 2.1 (ROHLF, 1998), em que a matriz de similaridade foi gerada pelo coeficiente de 'Jaccard' (JACCARD, 1901). Um dendrograma foi construído pelo método de agrupamento por meio da média aritmética 'Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average' (UPGMA).

Foi calculado o Conteúdo de Informação de Polimorfismo (PIC), para cada loco, para fornecer uma estimativa do poder discriminativo do marcador. Para tal, foi calculada a frequência alélica por meio de contagem direta no gel de revelação, aplicando-se a fórmula $PIC = 1 - \sum p_i^2$, em que p_i é a frequência do alelo i na população.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De um total de 84 pares de *primers* microsatélites testados, 43 amplificaram fragmentos no teste com os genitores feminino ('Clementina Fina') e masculino ('Montenegrina'). Porém, desses 43 *primers*, somente 12 (Tabela 1) mostraram polimorfismo entre os genitores. O baixo número de oligonucleotídeos iniciadores que mostraram polimorfismo se deve, possivelmente, à baixa diversidade genética existente entre as tangerineiras analisadas.

De fato, MACHADO et al. (1996) encontraram baixo polimorfismo de RAPD entre tangerineiras do Mediterrâneo (*C. delisiosa* Ten.). BASTIANEL et al. (2001), utilizando marcadores RAPD, não conseguiram diferenciar as cultivares de laranja doce 'Caipira', 'Valência', 'Pêra do Rio' e 'Cipó', e a similaridade mínima estimada entre as tangerineiras 'Lee', 'Sunki', 'Ponkan', 'Cai', 'Osceola' e 'De Umbigo' foi de 0,81. OLIVEIRA & RADMANN (2005) observaram alta similaridade genética (>0,725) na análise das tangerineiras 'Clemenules', 'Marisol' (*C. reticulata* Blanco) e 'Okitsu' (*C. unshiu* Marc.) e dos híbridos 'Nova' [*C. clementina* Hort. ex Tan. X (*C. paradisi* Macf. X *C. tangerina* Hort. ex Tan.)] e 'Ortanique' (tangor provavelmente entre *C. sinensis* (L.) Osb. e *C. reticulata* Blanco), utilizando marcadores isoenzimáticos. BEHROUZ et al. (2005) determinaram a variabilidade genética entre seis acessos de tangerineiras e oito acessos de laranjeiras, distinguindo-os por meio da utilização de marcadores do tipo SSR, sendo possível discriminar as tangerineiras, porém não sendo possível discriminar as laranjeiras.

Os 12 pares de *primers* utilizados para análise de microsatélites em 96 acessos de tangerineiras (genitores e progênie) geraram um total de 25 fragmentos amplificados, variando de 1 a 3 alelos por *primer*, com tamanho variando de 70 a 320 pares de bases (Tabela 1). Para a maioria dos *primers*, os alelos puderam ser separados em géis de agarose 3% (Figura 1); porém, em casos em que isso não era possível, foram utilizados géis de poliacrilamida a 8%. O gel de agarose consegue separar fragmentos com mais de 15 pares de base de diferença e possui a vantagem de ser simples e barato de ser elaborado, já no caso do gel de poliacrilamida é possível separar fragmentos com até um par de bases de diferença.

Com os 12 pares de *primers* selecionados, os 94 híbridos da população em estudo, mais os seus genitores, puderam ser diferenciados, com exceção das três duplas de plantas (Figura 2). Isso se justifica provavelmente pelo pequeno número de marcadores

Tabela 1 - Relação dos *primers* utilizados neste estudo com repetições amplificadas em laranja doce da cultivar 'Pêra' (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) e número e tamanho aproximado de alelos amplificados em 96 acessos de tangerineiras (genitores e progênie) oriundas do cruzamento entre a cultivar 'Clementina Fina' (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) e a cultivar 'Montenegrina' (*Citrus deliciosa* Ten.). Essas sequências foram extraídas de NOVELLI et al. (2006).

Primers	Sequências F	Sequências R	Nº de alelos amplificados	Tamanho dos fragmentos (pb)
	(5'→3')	(5'→3')		
CCSM 3 (AG)n	GCAATGCACCTTGTCATTAG	CATCACAGGCACTTATGCAG	3	215 - 240 - 270
CCSM 4 (AG)n	TTCTCCTCATCTTCGACTCC	CCGATCTTACGACGTATCAA	2	210 - 230
CCSM 6 (AG)n	ATCTGTGTGAGGACTGAA	CCTCTATTAATGTGCCTG	2	230 - 270
CCSM 12 (AG)n	GATTGAATCTTCTGTAGCTC	ATCATCATCTAGTGCTACTG	2	300 - 320
CCSM 18 (AG)n	AACAGTTGATGAAGAGGAAG	GTGATTGCTGGTGTGCGTT	2	205 - 220
CCSM 25 (TGA)9	CTTGACATAATAGAGTGGAG	TCGTTTCATGTACTCTCCATT	3	70 - 80 - 95
CCSM 40 (GCAACA)10	ACAAGAGTCGCAACAATC	GACAACAGTGGCAATACC	1	70
CCSM 46 (GCA)6(CAA)8	ATACCTTATCAAGTAACACG	TCAGAATGAGTACTAGCTCC	2	100 - 115
CCSM 101 (AG)12	TGTGATTACTGATTATTG	CTACTTGTATGTGCTCCT	2	110 - 120
CCSM 147 (AG)18	AGACTCACGTAACCTACTTC	GCTATGTTATGATACGTCTG	2	110 - 145
CCSM 150 (AG)11 N (AG)8	TCAGACAATGTGTTAGAGAG	TCGTTGCTACTTGTATC	2	130 - 170
CCSM 170 (GA)21	AGTTGAGTACTGTGTGCGAA	CTAATGGCTGAGAGAGTTGC	2	170 - 195

utilizados. Se for considerado um locus com dois alelos em heterozigose nos dois pais, a probabilidade de dois indivíduos irmãos inteiros herdarem alelos iguais é de 0,5 (BORÉM & CAIXETA, 2009).

Pela análise de similaridade, houve distinção de três grandes grupos: um contendo o genitor 'Clementina Fina', com 32 indivíduos (34,8%); outro contendo o genitor 'Montenegrina', com 37 indivíduos (40,2%); e um terceiro, com uma distância genética maior dos pais do que os próprios pais entre si, perfazendo 23 indivíduos (25,0%). O agrupamento por similaridade com os pais possibilita a escolha de híbridos mais próximos das tangerineiras 'Clementina Fina' ou 'Montenegrina' em função do objetivo do programa de melhoramento.

A cultivar 'Clementina Fina' foi utilizada como progenitor feminino porque produz frutos de maturação precoce e sem sementes quando cultivada isolada, devido à autoincompatibilidade, e também por possuir sementes monoembriônicas, motivo pelo qual se espera que todos os indivíduos originados de suas sementes sejam híbridos. Contudo, eventualmente,

pode ocorrer que, mesmo em sementes monoembriônicas, seja gerado um embrião nucelar. Neste trabalho, a origem sexual dos 94 indivíduos da progênie analisados foi confirmada, pois, no dendrograma de análises por similaridade (Figura 2), todos os acessos foram geneticamente distintos do genitor feminino.

Com a análise dos genitores e da progênie, observou-se uma similaridade mínima de 0,47, e a maioria das plantas se manteve em uma similaridade de 0,70 a 0,80, indicando um grau de similaridade de médio a alto. Esses dados estão de acordo com os obtidos por MACHADO et al. (1996) e BASTIANEL et al. (2001), que utilizaram marcadores RAPD e também encontraram altos índices de similaridade entre genótipos de tangerineiras. Estudos sugerem que hibridações e mutações, possivelmente, foram fatores importantes na evolução dessas espécies, sendo responsáveis pela grande diversidade fenotípica encontrada nesse grupo. BORÉM & CAIXETA (2009) citam que, em trabalho realizado com AFLP em *Capsicum*, foi observado que, apesar da grande variabilidade morfológica entre

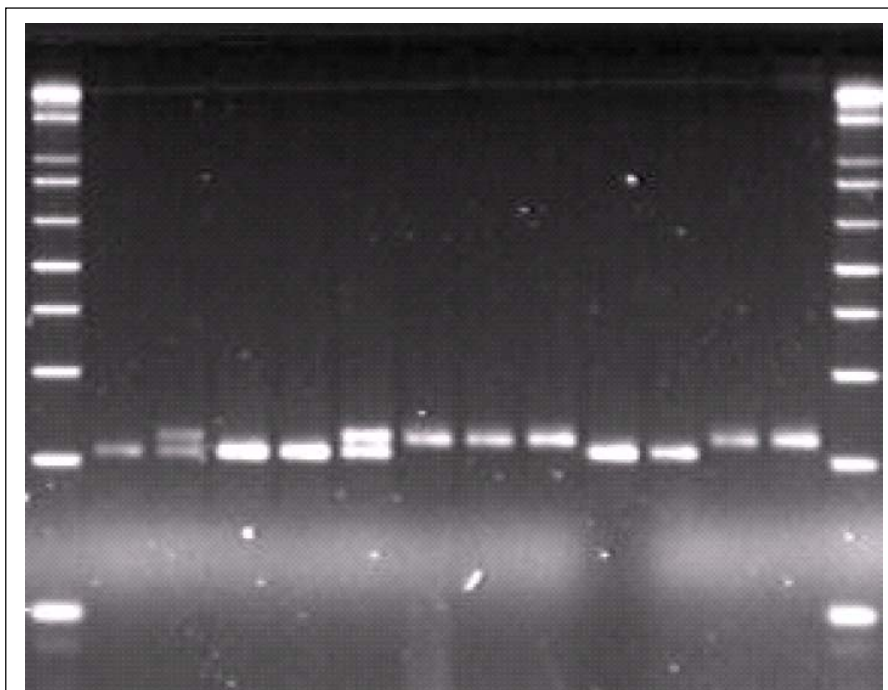


Figura 1 - Gel de agarose a 3%, onde em cada extremidade há uma coluna com marcador molecular de 100pb (Ladder). Da segunda até a décima terceira coluna, está demonstrada a variabilidade entre plantas híbridas da cultivar 'Clementina Fina' (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) e da cultivar 'Montenegrina' (*Citrus deliciosa* Ten.) amplificadas com primer CCSM 18.

acessos/espécies, como diferenças de forma e cores das flores e dos frutos, a diversidade genética foi baixa, sugerindo que a diversidade genética dos acessos estudados é baixa e que as espécies estudadas são muito próximas. Já BRUCKNER (2008) destaca que uma das limitações no uso de marcadores moleculares para a identificação de frutíferas é a facilidade do surgimento de mutações espontâneas, as quais muitas vezes não têm sido identificadas por esses marcadores como seria esperado, por serem pontuais e nem sempre estarem localizadas na região de amplificação.

Os primers 03, 28, e 147 tiveram um valor de PIC, respectivamente, de 0,65; 0,60 e 0,61 (Tabela 2). Estes foram os maiores valores para os marcadores deste estudo. Os três marcadores amplificaram três alelos, mostrando-se mais informativos. O Conteúdo de Informação de Polimorfismo (PIC) pode variar de 0 a 1, em que 1 seria o infinito superior. Neste estudo, os valores de PIC variaram de 0,27 do primer 06, até 0,65 do primer 03. Para o marcador 41, não foi possível calcular o PIC, pois neste o alelo estava ausente/nulo em um dos pais. Essas informações podem ser úteis em estudos futuros, mais especificamente, para a escolha

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

BEHROUZ et al. (2005), utilizando marcadores do tipo microssatélites para diferenciar tangerineiras e laranjeiras, determinaram o PIC para os primers utilizados, e os valores ficaram entre 0,505 e 0,950. Esses altos valores de PIC se devem principalmente ao número de alelos amplificados por loco, que ficou entre três e 10, com uma média de 7,42 alelos por loco amplificado.

CONCLUSÃO

Os marcadores moleculares do tipo microssatélites são eficientes para identificar híbridos de citros com maior similaridade genética em relação aos genitores. Toda a progênie do cruzamento entre 'Clementina Fina' e 'Montenegrina' analisada neste estudo é híbrida. A caracterização molecular, utilizando marcadores do tipo microssatélites, mostra a existência de variabilidade entre as plantas da população estudada.

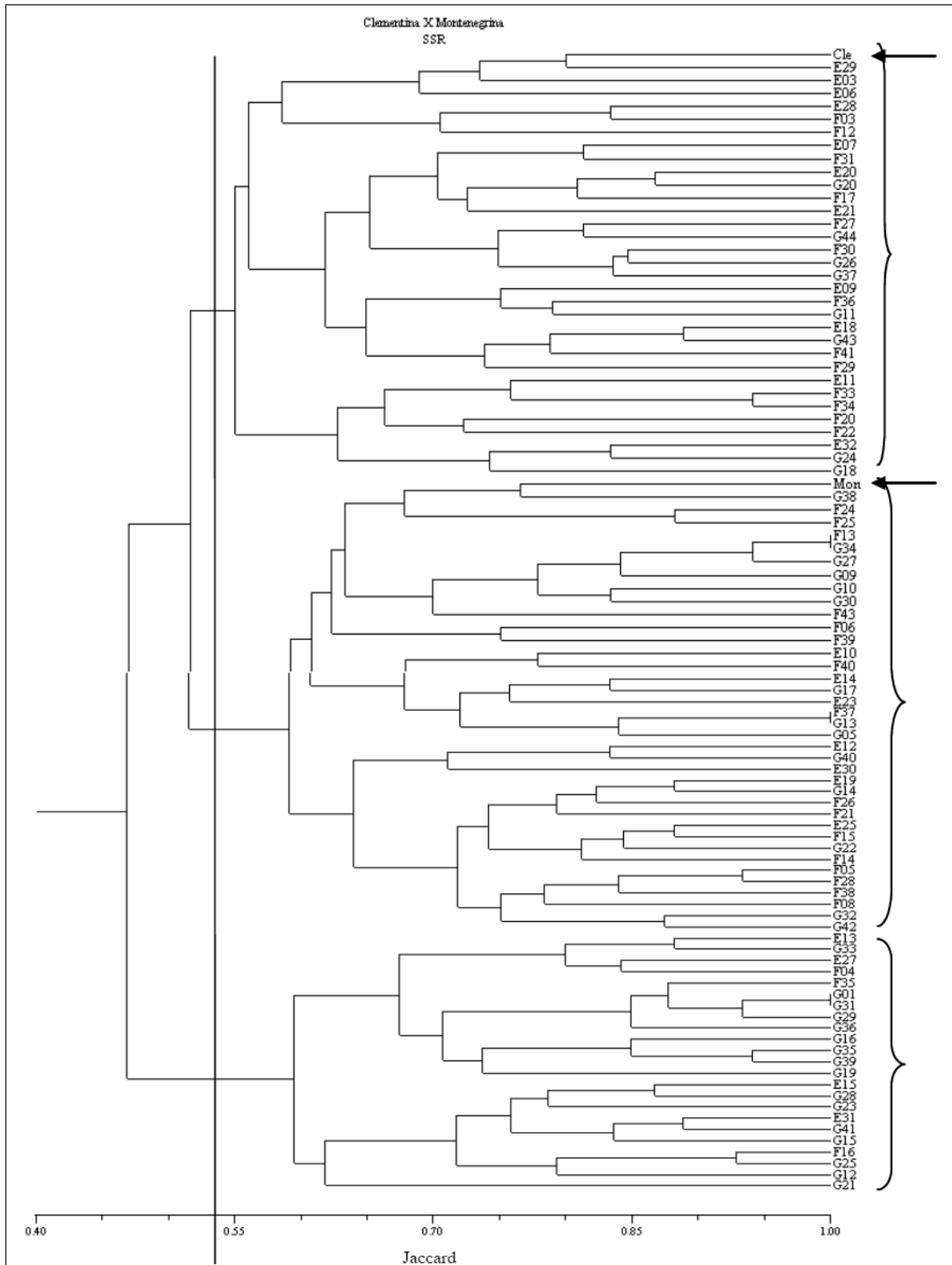


Figura 2 - Dendrograma com 96 plantas (progênie e genitores) oriundas do cruzamento entre a cultivar ‘Clementina Fina’ e a cultivar ‘Montenegrina’ (destacados por setas), gerado por meio do programa NTSYS, utilizando 12 pares de *primers* microssatélites.

Tabela 2 - Valores do Conteúdo de Informação de Polimorfismo, mostrando o poder discriminativo de cada *primer*.

Nº de alelos	Pares de <i>primers</i>										
	3	4	6	12	18	28	46	101	147	150	170
1	0,32	0,83	0,66	0,08	0,64	0,29	0,77	0,48	0,28	0,49	0,4
2	0,23	0,17	0,34	0,52	0,36	0,05	0,23	0,52	0,06	0,51	0,6
3	0,44	-	-	-	-	0,05	-	-	0,06	-	-
Som p ²	0,35	0,72	0,73	0,6	0,54	0,4	0,65	0,5	0,39	0,5	0,52
PIC	0,65	0,28	0,27	0,4	0,46	0,6	0,35	0,5	0,61	0,5	0,48

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por disponibilizar os pomares na Estação Experimental Agronômica; ao Centro APTA Citros Sylvio Moreira, pelo auxílio na análise molecular; e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelas bolsas concedidas.

REFERÊNCIAS

BASTIANEL, M. et al. Caracterização de genótipos de *Citrus* spp. através de marcadores RAPD. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.5, p.763-768, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782001000500004&script=sci_arttext&tlng=en>. Acesso em: 15 dez. 2009. doi: 10.1590/S0103-84782001000500004.

BEHROUZ, G. et al. Assessment of genetic variability in some Iranian sweet oranges (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) and mandarins (*Citrus reticulata* Blanco) using SSR markers. **International Journal of Agriculture and Biology**, Pakistan, v.7, n.2, p.167-170, 2005. Disponível em: <http://www.fspublishers.org/ijab/past-issues/IJABVOL_7_NO_2/4.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2010. doi: 1560-8530/2005/07-2-167-170.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa-MG: UFV, 2009. 532p.

BRUCKNER, C.H. **Fundamentos do melhoramento de fruteiras**. Viçosa-MG: UFV, 2008. 202p.

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

FAO. **Agricultural Data – FAOSTAT**. Acesso em: 15 out. 2009. Online. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>>.

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

JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. **Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles**, Lancaster, v.37, p.547-579, 1901.

KOEHLER-SANTOS, P. et al. Characterization of mandarin citrus germplasm from Southern Brazil by morphological and molecular analyses. **Revista Pab Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.7, p.797-806, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-04X2003000700003&script=sci_arttext&tlng=en>. Acesso em: 10 dez. 2009. doi: 10.1590/S0100-04X2003000700003.

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

MACHADO, M.A. et al. Genetic relationships of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. **Euphytica**, Wageningen, v.92, p.321-326, 1996. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/k68733676970054q/?p=952ce3374d224a0d8b649_d8cf59f21d2&pi=5>. Acesso em: 20 dez. 2009. doi: 10.1007/BF00037115.

MESSMER, M.M. et al. Relationships among early european maize inbreds: I. Comparison of pedigree and RFLP data. **Crop Science**, Madison, v.33, p.944-950, 1993.

NOVELLI, V.M. et al. 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. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sciabstract&pid=S1415-7572006000100018&lng=en&nrm=iso&tlng=en>>. Acesso em: 15 dez. 2009. doi: 10.1590/S1415-7572006000100018.

OLIVEIRA, A.C. et al. Identification of citrus hybridus through the combination of leaf apex morphology and SSR markers. **Euphytica**, Wageningen, v.128, p.397-403, 2002. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/ln85862361341187/?p=842d8fc6013d4402ba77473_bfd894867&pi=12>. Acesso em: 15 dez. 2009. doi: 10.1023/A:1021223309212.

OLIVEIRA, R.P.; RADMANN, E.B. Similaridade genética de cultivares de citros de mesa. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas-BA, v.27, n.2, p.332-334, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-29452005000200037&script=sciabstract&tlng=pt>>. Acesso em: 18 dez. 2009. doi: 10.1590/S0100-29452005000200037.

RAO, M.N. et al. Characterizations of zygotic and nucellar seedlings from sour orange-like citrus rootstock candidates using RAPD and EST-SSR markers. **Tree Genetics and Genomes**, Florida, v.4, n.1, p.113-124, 2008. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/1737vp535195111r/>>. Acesso em: 15 dez. 2009. doi: 10.1007/s11295-007-0092-2.

ROHLF, J.F. **NTSYS – Numerical Taxonomy and multivariate analysis system**. Versão 2.1. New York: Exeter Software, 2000, 83p.

SHILLITO, R.D.; SAUL, M.W. Protoplast isolation and transformation. In: SHAW, C.H. (Ed.). **Plant molecular biology: a practical approach**. Oxford, IRL, 1988. p.161-186.

THOMAS, M.R. et al. Sequence-tagged Site Markers in Grapevine and *Citrus*. **Journal of the Japanese Society Horticultural Science**, Tokyo, v.67, n.6, p.1189-1192, 1998. Disponível em: <<http://www.journalarchive.jst.go.jp/jnlpdf.php?cdjournal=jshs1925&cdvol=67&noissue=6&startpage=1189&lang=en&from=jnlabstract>>. Acesso em: 20 dez. 2009. doi:10.2503/jshs.67.1189.