

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

IDENTIFICAÇÃO PRECOCE DE INDIVÍDUOS ZIGÓTICOS EM POPULAÇÕES
PROVENIENTES DE AUTOPOLINIZAÇÃO EM TANGERINEIRA
'MONTENEGRINA'

Juliana Ribeiro Bressan
Engenheira Agrônoma / UFRGS

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

Porto Alegre (RS), Brasil
Abril de 2008

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus orientadores, Dr. Sergio Francisco Schwarz e à Dr.^a Fernanda Bered, pela orientação, dedicação e amizade.

Ao Departamento de Horticultura e Silvicultura da Faculdade da Agronomia – UFRGS, seus professores e funcionários.

Ao Departamento de Genética – UFRGS pela utilização do Laboratório de Genética Vegetal.

Ao Departamento de Plantas de Lavoura da Faculdade de Agronomia – UFRGS, pela utilização dos equipamentos do Laboratório de Genética Molecular.

Ao Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia - UFRGS, pela utilização dos laboratórios.

Ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira e a Marinês Bastianel pela disponibilização de material e demais colaborações.

Aos colegas do Departamento de Horticultura e Silvicultura da Faculdade da Agronomia – UFRGS, Eduardo Brugnara, Matheus Gonzatto, Alisson Kovalesk, e Willian Heintze, pelas inúmeras e indispensáveis colaborações no desenvolvimento deste trabalho. .

A colega Camila Martini Zanella (Departamento de Genética – UFRGS) pela disposição e paciência em me ensinar tudo sobre PCRs e géis de poliacrilamida.

A colega Gecele Matos Pagi (Departamento de Genética – UFRGS) pela colaboração.

A minha família, pela presença constante em minha vida, pelo apoio incondicional, pela compreensão e por tudo mais.

IDENTIFICAÇÃO PRECOCE DE INDIVÍDUOS ZIGÓTICOS EM POPULAÇÕES PROVENIENTES DE AUTOPOLINIZAÇÃO EM TANGERINEIRA 'MONTENEGRINA'¹

Autora: Juliana Ribeiro Bressan
Orientador: Sergio Francisco Schwarz
Co-orientadora: Fernanda Bered

RESUMO

A apomixia e a poliembrionia são fatores que dificultam o melhoramento genético em citros, embora sejam características favoráveis para a propagação comercial de genótipos. Distinguir embriões zigóticos entre embriões nucelares de forma rápida é necessário para acelerar programas de melhoramento. A avaliação morfológica da progênie pode ser utilizada na identificação de indivíduos de origem zigótica oriundos de fecundação cruzada, mas para que seja eficiente as plantas devem estar expressando a totalidade de suas características fenotípicas. A Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA-UFRGS) possui um banco de germoplasma de citros, onde estão estabelecidas populações de tangerineiras provenientes de polinização dirigida, cuja caracterização é necessária para que se dê continuidade ao programa de melhoramento de citros. O objetivo principal deste trabalho foi encontrar ferramentas que possibilitem a identificação precoce de indivíduos zigóticos em populações de citros provenientes de autopolinização. Com este fim, foi utilizada uma população de plantas cítricas adultas, obtida através da autopolinização da tangerineira 'Montenegrina' (*Citrus deliciosa* Ten.) realizada em 1993. Realizou-se avaliação morfológica das plantas, com base em descritores morfológicos, avaliação dos frutos quanto ao tamanho, ao número de sementes e a época de maturação e avaliação molecular através de marcadores de microssatélite. As plantas foram agrupadas pela similaridade fenotípica. Os resultados indicam que avaliações morfológicas e físico-químicas, assim como o agrupamento fenotípico não foram eficientes para identificar os indivíduos de origem zigótica na população, por outro lado os marcadores de microssatélite permitiram a identificação de quatro plantas de origem zigótica na população.

¹Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (60p.)
Abril, 2008.

EARLY IDENTIFICATION OF ZYGOTIC INDIVIDUALS IN POPULATIONS RESULTING FROM SELF-POLLINATION IN 'MONTENEGRINA' MANDARIN¹

Autora: Juliana Ribeiro Bressan
Adviser: Sergio Francisco Schwarz
Co-adviser: Fernanda Bered

ABSTRACT

Apomixis and polyembryony are factors that make citrus breeding programs hard, although these are positive traits for commercial propagation of genotypes. Distinguish zygotic embryos among nucellar embryos rapidly is necessary to speed up breeding programs. The morphological evaluation of the progeny can be used in the identification of zygotic individuals, however the plants have to express fully their fenotypic features. The Estação Experimental Agrônômica of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA – UFRGS) maintains a citrus germoplasm bank, where populations of tangerines resulting from controlled pollinations were established. Characterization is necessary to continue with the citrus breeding program. The main objective of this study was to obtain tools for early identification of zygotic individuals in citrus populations resulting from self-pollination. A population of adult citrus plants was used. This population was obtained through self-pollination of the 'Montenegrina' mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) in 1993. Plant evaluation based on morphological descriptors, fruit evaluation (size, number of seeds, and ripening period) and molecular evaluation by SSR markers were performed. The plants were grouped for fenotypic similarity. Results indicated that morphological and fruit quality evaluations, as well as fenotypic groupment were not adequate to identify zygotic individuals in the population. On the other hand, the SSR markers allowed the identification of four plants with zygotic origin in the population.

¹Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (60p.) April, 2008.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 A citricultura – aspectos gerais.....	3
2.2 A planta cítrica.....	5
2.3 Tangerineira ‘Montenegrina’.....	9
2.4 Melhoramento genético e marcadores moleculares.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Material vegetal.....	19
3.2 Caracterização morfológica das plantas.....	21
3.3 Avaliação físico-química dos frutos.....	22
3.4 Análise molecular.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 Caracterização morfológica das plantas.....	28
4.2 Avaliação físico-química dos frutos.....	42
4.3 Similaridade fenotípica.....	44
4.4 Análise molecular.....	47
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Características morfológicas qualitativas avaliadas e suas possíveis classes (IBPGR, 1988).....	21
2. Relação dos lócus utilizados com suas respectivas descrições. Centro APTA Citros Sylvio Moreira – IAC (Cordeirópolis, São Paulo) (Novelli et al., 2006; Palmieri et al., 2007).....	26
3. Forma, hábito de crescimento, altura e diâmetro de copa de uma população obtida através da autopolinização da tangerineira 'Montenegrina'. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2008.....	29
4. Cor de folha (VE = verde escuro, V = verde, VC = verde claro), área acumulada de cinco folhas, comprimento médio e largura média de limbo e relação entre largura e comprimento de limbo (L/C) de uma população obtida através da autopolinização da tangerineira 'Montenegrina'. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2007.....	31
5. Diâmetro médio (mm) dos frutos de uma população obtida através da autopolinização da tangerineira 'Montenegrina' em cinco anos de avaliação. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2008.....	33
6. Altura média (mm) dos frutos de uma população obtida através da autopolinização da tangerineira 'Montenegrina' em cinco anos de avaliação. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2008.....	36
7. Massa média (g) dos frutos de uma população obtida através da autopolinização da tangerineira 'Montenegrina' em cinco anos de avaliação. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2008.....	37
8. Número médio de sementes por fruto em uma população obtida através da autopolinização da tangerineira 'Montenegrina' em cinco anos de avaliação. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2008.....	40
9. Qualidade de amplificação obtida com a utilização de <i>primers</i> de microssatélite desenvolvidos para <i>Citrus sinensis</i> , quando utilizados em tangerina 'Montenegrina'.....	47

10. Identificação de indivíduos zigóticos obtidos através da autopolinização da tangerineira 'Montenegrina'. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2008..... 49

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Tangerineira 'Montenegrina': A – Vista externa dos frutos na planta; B – Folha com formato lanceolado; C - Semente poliembriônica descascada; D – Vista interna dos frutos; E – Frutos embalados para transporte; F - Embriões separados oriundos de uma única semente.....	10
2. Planta adulta de tangerineira 'Montenegrina' sob <i>P. trifoliata</i> em pomar de produção. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2007.....	11
3. Vista parcial da população proveniente de autopolinização da tangerineira 'Montenegrina'. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, 2008.....	20
4. Ramos jovens com espinhos. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, 2008..	42
5. Maturação de frutos das plantas da Fila A de uma progênie de autopolinização da tangerineira 'Montenegrina'. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2003 a 2007. (n = Número de anos de avaliação).....	43
6. Maturação de frutos das plantas da Fila B de uma progênie de autopolinização da tangerineira 'Montenegrina'. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2003 a 2007. (n = Número de anos de avaliação).....	44
7. Árvore de similaridade fenotípica (dendograma) entre as plantas de uma população obtida pela autofecundação da tangerineira 'Montenegrina'. Linha de corte na similaridade média (0,502).....	46
8. Amplificação obtida com o locus 62 com DNA da planta mãe 'Montenegrina' (1), plantas nucelares ou de origem zigótica não identificadas (2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17 e 19) e plantas de origem zigótica (7, 8, 15 e 18) em gel de poliacrilamida 6%.....	48
9. Plantas B02 e B21 identificadas como zigóticas por marcadores de microssatélites na população obtida por autopolinização da tangerineira 'Montenegrina'. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2008.....	50

10. Plantas B28 e B33 identificadas como zigóticas por marcadores de microssatélites na população obtida por autopolinização da tangerineira 'Montenegrina'. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2008..... 50

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um grande produtor de frutas cítricas, tanto em área cultivada quanto em volume de produção, o que torna a citricultura bastante importante para o país, tanto do ponto de vista econômico quanto social.

Devido às características específicas do clima, o Estado do Rio Grande do Sul possui grande potencial no que diz respeito à produção de frutas de mesa. A diferença entre as temperaturas diurnas (mais altas) e noturnas (baixas) no período de desenvolvimento do fruto faz com que estes desenvolvam uma coloração bastante atrativa e qualidade de suco ideais para o consumo *in natura*.

O interesse em não apenas manter, mas também em aumentar a produtividade e a qualidade destes frutos se deve a grande aceitação destes para o consumo humano, tanto *in natura* quanto processado, gerando os mais diversos produtos.

O processo de melhoramento de citros deve ser constante, buscando a obtenção de novas variedades que, além de serem apreciadas pelo público consumidor, sejam produtivas e/ou resistentes a doenças e tenham épocas distintas de maturação, podendo assim suprir diferentes mercados.

O melhoramento tradicional de citros é um processo bastante lento, pois a planta cítrica possui um ciclo de vida bastante longo. Uma planta cítrica proveniente de propagação sexuada leva anos para se desenvolver, superar o

período de juvenilidade e entrar em produção, a fim de que possa ser completa e adequadamente avaliada. Além disso, a apomixia, com a produção de vários embriões por semente, é uma característica presente na maioria das espécies cítricas de interesse que também dificulta o trabalho do melhorista.

A caracterização do germoplasma de plantas cítricas é um importante recurso para aceleração dos processos de melhoramento, ajudando na identificação de genótipos superiores que podem ser úteis tanto para o lançamento de novas cultivares quanto para direcionar cruzamentos em programas de melhoramento genético.

A Estação Experimental Agrônômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA-UFRGS) possui uma coleção de germoplasma de citros, onde estão estabelecidas populações de tangerineiras provenientes de polinização dirigida, cuja caracterização é necessária para evitar duplicidade de materiais, para revelar a qualidade das frutas produzidas e também para proporcionar conhecimentos citogenéticos e moleculares, que guiem a escolha dos futuros parentais em cruzamentos.

O objetivo principal deste trabalho foi encontrar ferramentas que possibilitem a identificação precoce de indivíduos zigóticos em populações de citros provenientes de autopolinização. Com este fim, foi utilizada uma população obtida através da autopolinização da tangerineira 'Montenegrina' localizada na EEA-UFRGS.

Especificamente, os objetivos foram: a) caracterizar as plantas morfológicamente; b) avaliar os frutos físico-quimicamente; c) identificar graus de similaridade entre as plantas através de polimorfismos morfológicos; d) identificar indivíduos zigóticos através de marcadores moleculares de microssatélites; e) buscar polimorfismos entre 'Montenegrinas'.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A citricultura – aspectos gerais

A citricultura foi introduzida no Brasil nos primórdios do descobrimento, pelos primeiros colonizadores, no atual estado da Bahia (Koller, 1994).

A produção mundial de frutas em 2006 foi cerca de 500 milhões de toneladas. Destas, mais de 105 milhões de toneladas foram de frutas cítricas, em uma área cultivada de mais de sete milhões de hectares. O Brasil é o maior produtor mundial de frutas cítricas, à frente da China e dos Estados Unidos, segundo e terceiro colocados respectivamente, e produziu em torno de 19 % da produção mundial em 2005, mais de 20 milhões de toneladas (FAO, 2008). Estima-se que o Brasil produz 80% do suco de laranja consumido no mundo (Mourão Filho *et al.*, 2002).

Das mais de 23 milhões de toneladas de tangerinas produzidas no mundo em 2005, 1,27 milhões foram produzidas pelo Brasil (FAO, 2008).

Ao apresentar em maior parte de seu território clima classificado como subtropical úmido (Köppen), com temperatura média do mês mais quente superior a 22° C e temperatura média do mês mais frio entre três e 18° C, o Estado do Rio Grande do Sul apresenta condições de clima favoráveis a produção de frutos com maior teor de sólidos solúveis totais (principalmente açúcares) e melhor coloração da casca em comparação com regiões mais quentes (Agustí *et al.*, 1991), ou seja, favoráveis à produção de frutas cítricas

de mesa, caracterizados como de qualidades físico-químicas muito boas (Koller, 1994).

A área cultivada com tangerineiras no Rio Grande do Sul em 2004 era de 13.195 hectares, onde foram produzidas 174.746 toneladas da fruta, sendo o segundo maior produtor do Brasil (IBGE, 2008).

Além das condições edafoclimáticas favoráveis, o Estado do Rio Grande do Sul apresenta grande demanda por frutos cítricos, o que justifica a constante busca pelo aumento das áreas de produção e da produtividade dos pomares.

O Estado de São Paulo, maior produtor de tangerinas do Brasil, apresenta pequena diversidade no que se refere a este grupo de frutas cítricas, cultivando apenas quatro variedades comerciais: tangerineiras 'Ponkan' e 'Cravo' (*C. reticulata* Blanco), tangor 'Murcott' (*C. reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osbeck) e 'Mexerica do Rio' (*C. deliciosa* Tenore) (Pio, 2003).

Produzir na entressafra é o grande segredo na produção de frutas em geral, ou seja, produzir tangerineiras no verão para o mercado interno e no inverno para o hemisfério norte, já que a safra no hemisfério sul coincide com a entressafra do norte, desta forma, há um grande espaço a ser conquistado. Variedades cujos frutos apresentem maturação em épocas diferentes das variedades atualmente cultivadas seriam úteis para suprir o mercado em diferentes períodos, fora do período de safra, obtendo assim um maior valor agregado.

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 atrativas, sem sementes, fáceis de descascar, vida de prateleira mais longa e livre de resíduos químicos (Pio, 2003). De acordo com Mourão Filho *et al.* (2002) a obtenção de variedades copa de citros melhoradas,

com ênfase nas sem sementes, por exemplo, também seria interessante para aumentar a capacidade do Brasil de competir no mercado externo, onde existe a preferência por frutos que não possuam sementes, que sejam fáceis de descascar e que não possuam excesso de óleo na casca. Deste modo, torna-se visível a necessidade de um trabalho constante de melhoramento genético, para a obtenção de novas cultivares que possuam importância comercial.

2.2 A planta cítrica

As plantas cítricas apresentam uma taxonomia muito complexa, principalmente com relação ao número de espécies que constituem o gênero *Citrus* e gêneros afins. São plantas dicotiledôneas pertencentes à família Rutaceae, subfamília Aurantioideae, tribo Citreae e subtribo Citrinae, esta contendo 13 gêneros (Swingle & Reece, 1967), incluindo *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus*, os quais têm importância econômica no Brasil.

É possível que muitos biótipos, classificados como espécies, tenham sido originados por hibridação interespecífica e preservados através da embrião nuclear (Iwamassa & Nito 1988), isto devido a grande habilidade das plantas cítricas em cruzar e produzir híbridos, tanto intra quanto interespecíficos (Araújo *et al.*, 2003).

A grande diversidade fenotípica, a poliembrião, as hibridizações e as mutações, além dos diferentes conceitos de espécie fazem com que o gênero *Citrus* receba diferentes divisões e classificações. Além da taxonomia complexa, muitos exemplares de citros são acessos oriundos de seleções locais, e, em alguns casos, a mesma cultivar possui diferentes nomes (Coletta Filho *et al.*, 1998).

Swingle (1967) dividiu o gênero *Citrus* em 16 espécies, incluindo todas as tangerineiras como *C. reticulata*. Em outra classificação feita por Tanaka em 1962, as tangerineiras foram classificadas em mais de uma dezena de espécies, destacando-se as mexericas (*C. deliciosa*), satsumas (*C. unshiu* (Mak) Marc.), ponkans (*C. reticulata*) e clementinas (*C. clementina* Hort. ex Tan.) com interesse como produtoras de frutos comerciais e as tangerineiras 'Sunki' (*C. sunki* Hort et Tan.) e 'Cleópatra' (*C. reshni* Hort. ex Tan.) como porta-enxertos (Swingle & Reece, 1967). A classificação de Tanaka é a mais utilizada hoje.

O fruto típico dos citros é o hespirídium, com a casca rica em óleos essenciais em sua composição, variável esta que serve também para diferenciar espécies (Moreira & Pio, 1991; Frizzo *et al.*, 2004).

O uso da hibridação no melhoramento genético de citros se depara com algumas dificuldades: reprodução apomítica, esterilidade, incompatibilidade, longo período juvenil da progênie e o alto custo do cultivo das plantas. Isso explica o fato de a maioria das variedades largamente empregadas comercialmente serem originadas de mutações somáticas (García *et al.*, 1999).

A juvenilidade das plantas oriundas de sementes dificulta a seleção de genótipos de citros quanto às características dos frutos, pois são necessários de 10 a 15 anos para se ter uma boa avaliação destas características (Koller, 1994).

A propagação de plantas cítricas pode ocorrer por sementes, por alporquia, por estaquia e por enxertia. Atualmente, a técnica mais utilizada é a da enxertia, por apresentar vantagens sob a propagação por sementes, gerando mudas mais uniformes, com menor período de juvenilidade e maior produtividade. Na realidade, a propagação por enxertia utiliza duas técnicas de

propagação, pois a variedade copa de interesse (propagada assexuadamente) se desenvolve sobre um porta-enxerto propagado por semente (sexualmente). Segundo Castle (1987) o porta-enxerto influi sobre o desenvolvimento da variedade copa, podendo dar a esta maior ou menor vigor, resistência a doenças e maior produtividade.

A enxertia, entretanto, além de permitir a transmissão de patógenos sistêmicos, como vírus, viróides e bactérias, pode favorecer a ocorrência de mutações espontâneas de gemas. Devido ao atual sistema de produção em massa de borbulhas e de mudas é necessário o constante monitoramento das plantas matrizes e blocos adensados de multiplicação de borbulhas (borbulheiras), visando à identificação de variações que possam comprometer a qualidade genética das borbulhas produzidas (Carvalho *et al.*, 2004).

Mutações espontâneas, constatadas por mudanças repentinas em caracteres herdáveis, são freqüentes em citros, sendo observadas sob a forma de variações em ramos ou setores em frutos, podendo também ser ocasionalmente detectadas em *seedlings* nucelares, situação esta em que toda a planta é afetada. Apesar das variações somáticas identificadas em pomares comerciais serem geralmente desfavoráveis, apresentando baixa produtividade de frutos, caracteres foliares atípicos, ou frutos anormais, muitas mutações espontâneas de elevado valor têm sido verificadas, sendo que a maioria das variedades cítricas comerciais surgiu como decorrência de algum tipo de mutação natural (Soost & Cameron, 1975).

A produção de sementes é a forma mais comum de reprodução em plantas, estas, por sua vez, são resultantes da união de gametas femininos e masculinos, gerando embriões zigóticos. A formação de embriões de forma assexuada, sem que ocorra a redução do número cromossômico e a posterior

fecundação caracteriza um fenômeno denominado apomixia. No caso dos citros, os embriões apomífticos são geneticamente idênticos à planta mãe e desenvolvem-se junto ao embrião zigótico, fenômeno denominado poliembrionia (Frost & Soost, 1967; Koltunow *et al.*, 1993).

A poliembrionia é um fenômeno freqüente em citros (Frost & Soost, 1968). Ocorre devido ao grande potencial embriogênico do tecido nucelar do ovário circundante ao saco embrionário. Desta forma, a grande maioria das variedades cítricas produz sementes poliembriônicas, ocorrendo a formação de múltiplos embriões adventícios (chamados comumente de nucleares) ao redor dos embriões sexuais, o que se denomina embriões adventícia (Koltunow, 1993). Em contrapartida, existem também variedades monoembriônicas, como as tangerineiras Lee e Clementina (Cameron & Frost, 1968)

Eventualmente, pode ocorrer o desenvolvimento de mais de um embrião zigótico, pela formação de dois sacos embrionários, ou pela clivagem do embrião zigótico, originando, neste caso, gêmeos idênticos. Pode-se considerar que as espécies cítricas, de um modo geral, são pré-adaptadas à ocorrência de poliploidia, uma vez que, segundo Mehra & Bawa (1969), a manifestação conjunta da reprodução sexuada e da apomixia permite um escape a possíveis casos de esterilidade, aumentando as chances imediatas de sobrevivência e difusão de novas formas.

O número de embriões por semente varia muito entre as espécies e nem sempre é constante nas variedades poliembriônicas (Frost & Soost, 1968). O tipo de polinização, auto-polinização ou polinização cruzada, pode exercer influência sobre o número de sementes por fruto (Moreira & Gurgel, 1941) e nas proporções entre plântulas de origem zigótica e nucleares (Frost & Soost, 1968).

A apomixia pode vir a ser um grande problema para o melhoramento de citros, impondo limites à variabilidade genética obtida com polinizações controladas (Ruiz *et al.*, 2000), pois plântulas zigóticas de espécies cítricas são muito frágeis, e morrem muito cedo, especialmente quando são oriundas de auto-polinização (Ruiz *et al.*, 2000). No entanto, a apomixia é desejável na produção de porta-enxertos, porque normalmente a reprodução comercial de porta enxertos é realizada por meio de sementes oriundas de polinização aberta (Bastianel, 1999), pois os embriões nucelares reproduzem uniformemente o tipo parental (Moore & Castle, 1988).

2.3 Tangerineira ‘Montenegrina’

A tangerineira ‘Montenegrina’ (*C. deliciosa*) é uma das principais variedades de tangerina em cultivo no Estado do Rio Grande do Sul, devido às preferências do mercado consumidor local, sua adaptação climática e produção tardia. Desta forma, a tangerineira ‘Montenegrina’ possui, a partir do mês de agosto, um mercado bastante favorável na maior parte do país, concorrendo com frutos importados do Uruguai pelos comerciantes do centro do país (João & Conte, 2006).

Atualmente, a região da Serra do Rio Grande do Sul, especialmente no Vale do Rio das Antas, desenvolve-se um pólo importante de produção de tangerinas, graças ao clima bastante favorável ocorrente na região, destacando-se a tangerineira ‘Montenegrina’ como a principal cultivar (João & Conte, 2006).

A variedade ‘Montenegrina’ (Figura 2) surgiu por volta de 1930 no distrito de Lajeadozinho, município de Montenegro, Rio Grande do Sul, provavelmente a partir de uma mutação ou recombinação na progênie nucelar ou zigótica da

cultivar Caí, a qual, naquela época, tinha cultivo expressivo na região (Rodrigues & Dornelles, 1999). É uma cultivar tardia, sua maturação ocorre de agosto a outubro, na região da Depressão Central do RS (Sartori *et al.*, 1998), e no período anterior, outras variedades como 'Okitsu', 'Caí', 'Ponkan', 'Pareci' e 'Murcott' (João & Conte, 2007) abastecem o mercado local.

A folhagem da tangerineira 'Montenegrina' é medianamente densa (Figura 1), suas folhas possuem formato lanceolado e margem crenada, são simples, pequenas, sésseis e brevepeciouladas e o tronco possui superfície lisa (Donadio *et al.*, 1995). As flores apresentam-se normalmente individuais ou em racemos, nas extremidades de ramos da última brotação, ocorrendo na primavera (Rodrigues & Dornelles, 1999).

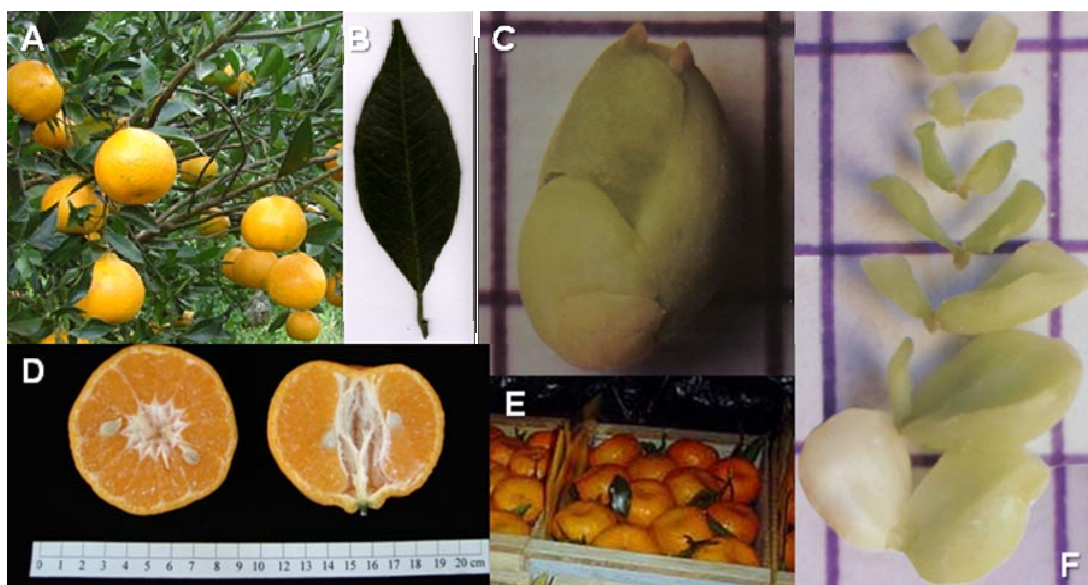


FIGURA 1. Tangerineira 'Montenegrina': A – vista externa dos frutos na planta; B – folha com formato lanceolado; C – semente poliembriônica descascada; D – vista interna dos frutos; E – frutos embalados para transporte; F – embriões separados oriundos de uma única semente.



FIGURA 2. Planta adulta de tangerineira 'Montenegrina' sob *P. trifoliata* em pomar de produção. EEA – UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2007.

De acordo com Koehler (2001), que classificou tangerineiras de acordo com IBPGR (1988), as folhas são consideradas de comprimento médio e largura pequena, sendo o comprimento do pecíolo é pequeno quando comparado com outras cultivares de tangerina. A floração tem início na segunda quinzena de agosto e termina na segunda quinzena de outubro. O fruto possui formato oblato e diâmetros horizontal e vertical médios. O epicarpo é fino, de cor amarelo-alaranjado e superfície lisa, sendo a aderência do epicarpo ao mesocarpo leve. Os frutos possuem na maioria dos casos menos de 10-12 gomos.

A produção da tangerineira 'Montenegrina' apresenta-se normalmente alternante com excessiva produção em um ano e muito baixa no ano seguinte. No entanto, segundo Rodrigues *et al.* (1999), os efeitos da alternância de produção podem ser amenizados com o desbaste ou raleio de frutos, de forma química ou manual, retirando-se o excesso de frutos em ano de sobrecarga.

Sartori *et al.* (1998) avaliou características qualitativas de tangerineiras 'Montenegrina' (entre outras) nos anos de 1994 e 1995, as plantas avaliadas possuíam dez anos de idade e haviam sido enxertadas sobre limoeiro Cravo (*C. limonia*). Segundo este, o ponto médio de maturação da tangerineira 'Montenegrina' ocorre na segunda quinzena de agosto, sendo que o teor de sólidos solúveis totais (SST) encontrado é de 11,60%, a acidez total titulável (ATT) é de 1,23% e o teor de suco é de 47,07%.

Como a grande maioria das plantas cítricas, a 'Montenegrina' é diplóide, e seu número cromossômico básico é nove onde $x = 9$ e $2x = 18$ (Guerra *et al.*, 1997; Rodrigues, 1998; Weiler 2006; Brugnara, 2006).

Tanto a auto-fecundação da tangerineira 'Montenegrina' quanto seu cruzamento com plantas de outras espécies do gênero pode gerar progênie fértil.

Segundo Rodrigues (1998), sob polinização aberta, a tangerineira 'Montenegrina' apresentou de zero a 19 embriões por semente, sendo seis o número médio de embriões por semente. Sob polinização dirigida o número de embriões por semente produzidos foi diferente, ficando em média de 3,31 embriões por semente em polinizações dirigidas de 'Montenegrina' com 'King' (Bastianel *et al.*, 1997).

Devido às características organolépticas, à aceitabilidade por parte do mercado consumidor, à produção tardia e a adaptação ao clima do Rio Grande do Sul, a tangerineira 'Montenegrina' vem sendo utilizada como genitor feminino no programa de melhoramento genético de tangerineiras do Departamento de Horticultura e Silvicultura da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Bastianel *et al.*, 1997; Brugnara, 2006).

2.4 Melhoramento Genético e Marcadores Moleculares

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, os quais, no entanto, podem ser permanentes (Mourão Filho *et al.*, 2002).

O melhoramento de variedades copa de citros deve objetivar plantas com poucas ou sem 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).

O padrão de herança uniparental dos genes de organelas (mitocôndrias e cloroplastos) deve ser lembrado no momento da escolha dos genitores. Os cromossomos de organelas estão situados no citoplasma e, na maioria dos casos, é o genitor feminino quem contribui com o citoplasma e, conseqüentemente com as organelas, no momento da fecundação (Griffiths *et al.*, 2006).

Até o momento, não existem muitas informações sobre a natureza e o modo de herança genética das principais características de importância agrônômica, no entanto, diversos trabalhos de mapeamento vêm sendo realizados com sucesso em citros, buscando-se genes e/ou caracteres de locos quantitativos (QTLs) de resistência/tolerância a sais e ao frio (Moore *et al.*, 2000), ao vírus da tristeza (Cristofani, 1997; Mestre *et al.*, 1997a; Mestre *et al.*, 1997b), dormência, juvenildade e vigor (Roose *et al.*, 1992), porte das plantas e acidez dos frutos (Gmitter JR. *et al.*, 1996).

Segundo Siviero *et al.* (2002) a herança da resistência à gomose de *Phytophthora em Poncirus trifoliata* e *Citrus sunki* é de natureza quantitativa e complexa.

O número cromossômico haplóide das espécies do gênero *Citrus*, assim como dos gêneros *Poncirus* e *Fortunella*, é nove, sendo a condição diplóide predominante, embora formas poliplóides sejam identificadas ou produzidas, mostrando-se úteis em programas de genética e de melhoramento. Formas tetraplóides têm sido reportadas para esses gêneros, havendo, também, indicações de indivíduos triplóides, pentaplóides, hexaplóides, bem como aneuplóides (Cameron & Frost, 1968; Chapot, 1975; Lee, 1988; Schwarz, 2001).

Raghuvanshi (1969) comenta que células somáticas apresentando divisão desigual, restabelecimento do núcleo resultando em células poliplóides, pontes somáticas e atraso dos cromossomos na anáfase, parecem não ser incomuns em citros, enfatizando que tais problemas na cariocinese poderiam facilmente induzir o aparecimento de células somáticas com genótipo modificado em regiões de crescimento, determinando, com as divisões celulares posteriores, o aparecimento de ramos modificados ou de variações em gemas.

Frost & Krug (1942) chamam a atenção para o fato de que a enorme diversidade observada em *Citrus*, além de sua elevada heterozigose, sugere a ocorrência de frequências relativamente altas de mutações gênicas, podendo ser essa uma das prováveis causas das variações de gemas verificadas nesse gênero.

A identificação dos indivíduos zigóticos obtidos em cruzamentos dirigidos ainda nos estágios iniciais do crescimento é difícil (Tan, 2007), assim, desenvolver novas técnicas com este objetivo, ou mesmo aprimorar técnicas existentes é necessário para que se reduzam o tempo e os custos nos programas de melhoramento genético em citros.

A caracterização apenas por caracteres morfológicos pode ser imprecisa devido à influência do ambiente no fenótipo (Barbosa Neto & Bered, 1998). Porém, marcadores morfológicos têm sido utilizados para identificação de paternidade em *Citrus*. Os resultados mostraram 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 (Ballvé *et al.*, 1997; Bastianel, 1999).

Minhas *et al.* (1991) estudaram a segregação de caracteres vegetativos em populações F1 de cruzamentos de cultivares de *C. reticulata* Blanco, obtendo plântulas que, em sua grande maioria, eram morfológicamente semelhantes a um dos pais ou intermediárias a ambos os genitores, para todos os caracteres estudados, indicando que a identificação morfológica de indivíduos zigóticos pode ser eficiente, quando tais indivíduos são oriundos de fecundação cruzada. Nestes casos, plantas com características intermediárias as dos pais, ou morfológicamente mais semelhantes ao progenitor masculino são consideradas zigóticas.

Híbridos obtidos em cruzamentos dirigidos onde a planta doadora de pólen possui alguma característica de caráter dominante são mais facilmente identificáveis. O *Poncirus trifoliata* (L.), por exemplo, possui como característica controlada por poucos genes de caráter dominante (Cameron & Soost, 1980), a produção de folhas trifolioladas, facilmente identificáveis visualmente.

Para o estabelecimento de um programa de melhoramento consistente é importante conhecer os recursos genéticos disponíveis. É provável que os programas de melhoramento que empreguem técnicas convencionais associadas à biotecnologia tenham maiores chances de sucesso frente às

barreiras reprodutivas apresentadas pelas plantas cítricas, como poliembrionia e longo período juvenil (Mourão Filho *et al.*, 2002).

Em razão dos caracteres morfológicos geralmente apresentarem natureza poligênica com herança aditiva e serem altamente influenciados pelo meio ambiente (Cameron & Frost, 1968), a identificação precisa dos híbridos vem sendo realizada por meio de marcadores bioquímicos e moleculares (Oliveira *et al.*, 2003).

O uso de marcadores moleculares tornou possível a construção de mapas genéticos para um grande número de espécies de plantas, permitindo também a seleção precoce de características que somente irão se expressar no estágio adulto das plantas (Tanksley *et al.*, 1981; Grattapaglia & Sederoff, 1994). Os marcadores moleculares são mais eficientes do que os marcadores fenotípicos, pois não são influenciados pelo ambiente e são detectados em todas as fases do crescimento da planta (Mohan *et al.*, 1997).

De acordo com Cervera *et al.* (1996), as técnicas de marcadores moleculares têm facilitado e potencializado a análise genética de plantas e vêm tornando-se uma ferramenta extremamente útil no melhoramento genético de várias espécies. Marcadores moleculares têm sido utilizados com objetivo de avaliar relações genéticas entre cultivares, espécies e híbridos intra e interespecíficos. O uso de técnicas como Análise de Isoenzimas e Marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) se mostram eficientes, mas com algumas limitações.

Segundo Tusa *et al.* (2002) o resultado obtido com a utilização de Análise de Isoenzimas pode ser influenciado pelas condições ambientais e pelo estágio de desenvolvimento dos tecidos da planta, além disto, o número de *loci* polimórficos é muito pequeno.

De acordo com Andrade-Rodriguez *et al.* (2005), a técnica de Marcadores de RAPD é eficiente na identificação de plântulas zigóticas provenientes de polinização aberta, no entanto, nenhum *primer* por si só foi capaz de identificar todas as plântulas zigóticas encontradas no estudo. Além disso, de um total de 30 plântulas obtidas com o resgate de embriões de sete sementes (onde se teve 100% de germinação de embriões) apenas cinco plântulas foram identificadas como de origem zigótica, diferente do que seria o esperado.

No início dos anos 1980, através de diversos estudos, determinou-se que o genoma dos eucariotos é constituído de 20 a 50% de DNA repetitivo, sendo o DNA altamente repetitivo mais concentrado em regiões de heterocromatina. As seqüências de DNA repetitivo mais complexas foram denominados minissatélites e outras mais simples de SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou microsatélites (Tautz & Renz, 1984).

Marcadores do tipo Microsatélites baseiam-se na amplificação por PCR de seqüências de DNA de um a quatro pares de bases repetidas e adjacentes, que se dispersam por todo o genoma de eucariotos (Zhao & Kochert, 1993). Os *primers* devem ser homólogos às seqüências que flanqueiam os microsatélites. A técnica permite o uso de *primers* desenvolvidos para determinada espécie em espécies relacionadas ou mesmo em gêneros afins (Ferreira & Grattapaglia, 1996), mas, sua maior vantagem é o elevado polimorfismo revelado, podendo-se encontrar mais de 30 alelos por loco, além de ser mais rápido e barato que outros marcadores (exceto RAPD) (Milach, 1998; Bezte & Penner, 1998; Parker *et al.*, 1998; Pinto, 2001), e possuir repetitibilidade de resultados (Zane *et al.*, 2002).

Por possuírem uma expressão codominante e multialélica, os marcadores de microssatélites são os que possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo dentre os marcadores moleculares, possibilitando, para um determinado *locus*, a distinção entre indivíduos homozigotos e heterozigotos. Além disso, estes marcadores são eficientes para caracterizar e discriminar populações muito relacionadas, determinando as relações genéticas entre elas, e atualmente tem sido utilizados também para a identificação de plantas de origem zigótica (Ferreira & Grattapaglia, 1996; Barkley *et al.*, 2006).

Segundo Ruiz *et al.* (2000), que utilizaram microssatélites para rápida identificação de plântulas de origem zigótica, dentro de um programa de melhoramento de citros, nenhum dos marcadores co-dominantes é capaz de detectar mais do que 50% dos indivíduos zigóticos quando estes são obtidos por autopolinização, pois indivíduos heterozigóticos provenientes do cruzamento são geneticamente idênticos aos indivíduos oriundos de embriões nucelares. Oliveira *et al.* (2002), utilizaram os microssatélites associados a marcadores morfológicos para diferenciar plantas híbridas de plantas nucelares num cruzamento entre o tangoreiro 'Murcott' (*C. reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osb.) e laranjeira 'Pera' (*C. sinensis* (L.) Osb.), sendo que a associação dos dois marcadores, morfológico e molecular, tornou a determinação mais barata e mais rápida do que a utilização somente de marcadores moleculares.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

O grupo principal de plantas utilizadas neste trabalho faz parte da coleção de germoplasma de citros da Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA-UFRGS), localizado no Município de Eldorado do Sul – RS, à 30⁰39'S de latitude e 51⁰06'E de longitude.

Em 1993 efetuou-se a autopolinização da tangerineira 'Montenegrina', obtendo-se nove frutos. Em 1994 estes frutos foram colhidos e deles foram extraídas um total de 28 sementes para inoculação de seus embriões em meio de cultura, gerando um total de 118 embriões inoculados em condições assépticas e mantidos em ambiente controlado, com temperatura em torno de 25° C e fotoperíodo de 16 horas até o desenvolvimento de plântulas, no Laboratório de Biotecnologia em Horticultura do Departamento de Horticultura e Silvicultura. Dos 118 embriões inoculados em meio de cultura, 88 se desenvolveram e geraram plântulas, que foram transplantadas para vasos e mantidas em casa de vegetação. Destas, 82 plantas se desenvolveram e atingiram o tamanho necessário para, em 1995, serem levadas a campo (Dados provenientes das cadernetas do Programa de Melhoramento Genético de Tangerineiras do Departamento de Horticultura e Silvicultura da UFRGS).

A população inicial levada a campo, composta por 82 plantas (Figura 3), foi plantada em duas linhas de plantio que, para fins de identificação a campo, foram denominadas de filas A e B, contendo 41 plantas cada uma. Quando do início dos trabalhos da presente dissertação, em maio de 2006, ainda se encontravam disponíveis (vivas) 67 plantas, das quais se procedeu à coleta de material para extração de DNA, realizada no fim do mês de maio de 2006.



FIGURA 3. Vista parcial da população proveniente de autopolinização da tangerineira 'Montenegrina'. EEA – UFRGS, 2008.

Além destas, foram coletadas amostras da tangerineira 'Caí' (cultivar que deu origem a tangerineira 'Montenegrina'), 'Pareci' (cultivar originada da tangerineira 'Caí', assim como a tangerineira 'Montenegrina') e 'Montenegrina Rainha' (material selecionado a partir de uma mutação ocorrida na tangerineira 'Montenegrina'), além de quatro amostras de tangerineira 'Montenegrina' oriundas de diferentes viveiros.

3.2 Caracterização morfológica das plantas

Para avaliação das características morfológicas foram analisadas apenas algumas características que se mostraram mais promissoras em outros estudos com tangerineira ‘Montenegrina’ (Brugnara, 2006 e Weiler, 2006) como hábito de crescimento, forma de copa e tamanho, forma, cor e tipos de margens das folhas segundo os descritores propostos pelo International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR, 1998), “Descriptors for Citrus” (Tabela 1).

As variáveis de avaliação do tamanho das folhas foram: área foliar (cm²), comprimento do limbo (mm), largura do limbo (mm), relação entre largura e comprimento do limbo (mm), cor da folha e forma da margem do limbo. Foram coletadas cinco folhas por planta, em posição intermediária em ramos de 20 a 30 cm de comprimento. Diferenças entre médias foram analisadas por análise de variância, considerando um delineamento completamente casualizado, complementada pelo teste de Tukey.

Para comparação foi utilizada uma planta de tangerineira ‘Montenegrina’ em pé franco, que foi produzida em 1994 e levada a campo junto com as demais plantas da população em 1995.

TABELA 1. Características morfológicas qualitativas avaliadas e suas possíveis classes (IBPGR, 1988).

Característica	Classes
1. Planta	
Forma	Elipsóide, Esferóide e Elipsóide-achatada
Hábito de crescimento	Vertical, Aberto, Inclinado e Choroso
2. Folha	
Cor	Verde-claro, Verde e Verde-escuro
Forma do limbo	Elipsóide, Ovada, Obovada, Lanceolada, Orbiculada
Forma da margem	Crenada, Dentada, Inteira e Ondulada

Para avaliação morfológica da copa foram coletados também a altura das plantas, assim como seu diâmetro de copa.

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.

Segundo as cadernetas de campo do Programa de Melhoramento de Tangerineiras, o início da produção de frutos nesta população ocorreu em 2003. A partir de então, até a safra de 2007, das plantas que produziram frutos, foram coletadas amostras de três a dez frutos, conforme sua disponibilidade, destas foram medidos o diâmetro, a altura, a massa, o número total de sementes e o número de sementes viáveis, comparações entre médias dos indivíduos provenientes da autopolinização e da tangerineira 'Montenegrina' foram realizadas através da análise de variância complementada pelo teste de Tukey.

3.3 Avaliação físico-química dos frutos

A evolução da maturação dos frutos foi avaliada através dos dados coletados nas safras de 2003 a 2007, onde seguiu-se a rotina de colheita de frutos a cada 14 dias, coletando-se (de forma aleatória) de 3 a 10 frutos de cada planta, de acordo com a quantidade de frutos disponíveis em cada planta.

Em 2003, quando se iniciou o trabalho de avaliação físico-química dos frutos, as colheitas tiveram início quando os frutos apresentavam-se próximos 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 acondicionadas 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). A relação entre massa de suco extraído da amostra e massa total da amostra determinou o rendimento de suco. A ATT, expressa em porcentagem de ácido cítrico, 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 $ATT = (V \times N \times 0,064 \times 100) / G$, onde V é o volume de NaOH consumido, N é a normalidade do NaOH, $0,064$ é o fator para expressar a acidez em ácido cítrico em meq e G 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 %.

3.4 Análise Molecular

Para extração de DNA foram coletadas quatro folhas jovens e sadias, aleatoriamente, em diferentes ramos da planta, pois, devido à comum ocorrência de mutações de gema, deve-se evitar coletar de apenas um ramo. Estas folhas foram colocadas em sacos plásticos identificados com o número da planta e armazenadas em caixa de isopor com gelo, para transporte até o laboratório. Após, foram mantidas à 4° C até o momento da extração do DNA.

A extração do DNA genômico, bem como as demais etapas da análise molecular, foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular Vegetal do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os DNAs foram armazenados em tubos *ependorfs* e congelados, ficando estocados até serem quantificados.

A extração do DNA genômico foi realizada segundo metodologia descrita por Doyle & Doyle (1990), com modificações. A superfície das folhas foi previamente limpa para retirada de pó e fuligem, a nervura central das folhas foi retirada para facilitar a maceração em nitrogênio líquido. O material macerado foi depositado em tubos *ependorf* de 2 ml contendo 800 µl de tampão de extração, composto de 2% CTAB, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, Tris 100 mM pH 8,0), 1,5 µl de mercaptoetanol e 1,3 µl de Proteinase K. O tampão foi previamente aquecido à 65° C. A suspensão do material macerado no tampão de extração foi realizada com o auxílio do aparelho *Vórtex*. As amostras permaneceram em banho-maria a 65°C por 40 minutos, sendo levemente agitadas a cada 10 minutos. Após, em temperatura ambiente, foi adicionado 800 µl de solução de clorofórmio:álcool isoamílico, na proporção de 24:1, e as amostras foram agitadas por 30 minutos. A suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 12.000 rotações por minuto (rpm). O sobrenadante foi cuidadosamente retirado e transferido para outro tubo limpo, onde foi adicionado o mesmo volume de isopropanol a -20° C. Realizou-se a inversão dos tubos para observação da precipitação do DNA. A solução foi mantida à 4° C durante uma noite. No dia seguinte os tubos foram retirados da geladeira e centrifugados por 10 minutos a 12.000 rpm. A fase líquida foi descartada, foi acrescentado 500 µl de álcool 70% e os *pellets* de DNA foram novamente centrifugados por 10 minutos a 12.000 rpm para lavagem. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram mantidos invertidos até a total evaporação do álcool. Os *pellets* de DNA obtidos foram resuspendidos em 100 µl de TE (10 mM Tris base pH 8,0 e 1 mM EDTA). Os tubos foram mantidos por um dia à 4° C e depois armazenados à -18° C até a utilização.

A quantificação e a qualificação do DNA das amostras foi determinada segundo metodologia descrita por Sambrook *et al.* (1989) com modificações, através de eletroforese (uma hora a 100 V) à temperatura ambiente, em tampão TBE 1X, em gel de agarose 0,8% corado com de brometo de etídio (0,5 ng/ml) para a visualização das bandas e comparação com padrões de concentração conhecida. A qualificação do DNA foi realizada observando-se a ausência de rastros na corrida eletroforética no gel de agarose. Após a quantificação, uma alíquota de cada amostra foi diluída com água estéril a uma concentração de trabalho de 20 ng/μl em tubos *ependorf* de 0,6 ml e armazenadas a – 18°C.

As reações de amplificação foram preparadas utilizando *primers* de microssatélites desenvolvidos no Centro APTA Citros Sylvio Moreira – IAC (Cordeirópolis, São Paulo), a partir de bibliotecas de *Citrus sinensis* L. Obseck, cultivar Pêra (Tabela 2), sendo as reações preparadas num volume final de 20 μl contendo 0,4μl da enzima Taq polimerase (5U/μl); 0,4 μl de dNTP mix (dATP, dTTP, dCTP, dGTP à 10 mM); 2,0 μl de tampão de reação 10X (10 mM tris – HCl 9 pH 8,3); 1,0 μl de MgCl (50mM); 4,0 μl de *primer* R e 4,0 μl de *primer* F (10 mM); 2,0 μl de DNA genômico (20 ng/ml) e 6,2 μl de água de miliQ estéril.

A amplificação das regiões específicas foi realizada com a utilização da técnica de PCR (“Polymerase Chain Reaction”) em termociclador submetendo-se as soluções de reação a 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 65-56°C por 30 segundos (*touchdown* de 0,3°C a cada ciclo) e 72°C por cinco segundos. Após a amplificação foi acrescentado 10 μl de *stop solution* em cada amostra.

TABELA 2. Relação dos lócus utilizados com suas respectivas descrições. Centro APTA Citros Sylvio Moreira – IAC (Cordeirópolis, São Paulo). (Novelli *et al.*, 2006; Palmieri *et al.*, 2007).

Locí	Código Apta Citros	Seqüência F (5' » 3') Seqüência R (3' » 5')	Motivo
01	CCSM1	cagctccaagaaacccta gccaatatatcatgcaggta	(AG)n
03	CCSM3	gcaatgcacctgtcattag catcacaggcacttatgcag	AG)n
12	CCSME49	aataagcgtatcagcagcagg aatcatgaacgggatgaaac	(GTTGA)6
19	CCSM19	ggacactgtgactaa agctaccaagacaccacc	(AG)n
25	CCSM25	ctgacataatagagtggag tcgttcatgtactctccatt	(TGA)9
46	CCSM46	ataccttatcaagtaacacg tcagaatgagtactagctcc	(GCA)6(CAA)8
49	CCSM49	accgatcagcagaagagg ttgctgttgcctctgttg	(CAA)9
54	CCSMEc1	acgctctctccactatccga ctgcagccgaagatatgtga	(GAA)10
60	CCSMEc7	ctggaggaaaacagcagagg cgaattggaatcaaaggcat	(ATC)8
62	CCSMEc9	ttc gatagcgcgtgtgtttg caccatcaccatcacggtag	(GATGAC)6
63	CCSMEc10	ggtggcgagattatgctgtt tgcagtccaacaaaaacaa	(AAC)7
67	CCSMEc14	gccgatcctctttctctttg aagcacgttatcgggatctg	(AG)15ccat (GGC)7
90	CCSM90	gtgcagttgcatatgag ctgtaagtcaaacggaag	(AG)13
129	CCSM129	gtatgtggagagatgttc atctgcttattgaccac	(CA)7(TA)4
146	CCSM146	tggttagaaggatgaacag acatagaggtttgcttacc	(AG)25
147	CCSM147	agactcacgtaacctacttc gcattgttatgatacgtctg	(AG)18
150	CCSM150	tcagacaatgtgtagagag tcggttgctactgtatc	(AG)11N(A)8
156	CCSM156	gtctctgtgtgtgtcggtt acgaagtgaagtgtgtaatg	(TC)20

A visualização dos fragmentos amplificados foi feita em gel de poliacrilamida desnaturante 6% (5,7 g de acrilamida, 0,3 g de bisacrilamida, 42,5 g de uréia, 20 ml de Tampão TBE 0,5X), aplicando-se 6 µl de reação por canaleta, sob uma corrente elétrica de 1400 a 1600 Volts. A revelação dos géis

foi feita com coloração por nitrato de prata, seguindo o seguinte protocolo: quatro minutos em Ácido Nítrico 1%, uma lavagem com água deionizada, 20 minutos em Nitrato de Prata 0,2%, duas lavagens com água deionizada, 3 a 8 minutos em Solução de Revelação (29,6 g Na_2CO_3 , 540 μl de Formaldeído, 200 μl de Tiosulfato de Sódio à 10ng/ml, para um litro de solução), duas lavagens com água deionizada, 4 minutos em Ácido Acético 10%, uma lavagem com água deionizada. O produto amplificado foi comparado com marcadores de peso molecular 10 pares de base (10 pb).

A análise dos resultados foi feita através da observação dos géis, de acordo com a presença e/ou ausência de bandas.

4 RESULTDOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização morfológica das plantas

A forma de planta predominante na população proveniente de autopolinização da tangerineira 'Montenegrina' é a esferóide (Tabela 3), sendo que também se observou plantas achatadas (B02, B11 e B28) e elipsóides (B15, B21, B27 e B30).

O hábito de crescimento predominante é o aberto (Tabela 3). Observou-se também uma planta com hábito de crescimento inclinado (B28) e duas plantas com hábito de crescimento vertical (B21 e B27).

A altura das plantas variou de 1,30 a 3,90 metros e o diâmetro de copa variou de 1,60 a 5,10 metros (tais dados não foram avaliados estatisticamente, por serem de apenas um ano) (Tabela 3).

Na população avaliada, todas as plantas possuíam folhas simples e formato lanceolado sendo as margens da folha crenadas. A cor predominante foi o verde, mas também houveram plantas cujas folhas apresentaram cor verde claro e também plantas com folhas verde escuro.

A área acumulada de cinco folhas variou de 34,10 a 115,50 cm² (Tabela 4).

TABELA 3. Forma, hábito de crescimento, altura e diâmetro de copa de uma população obtida através da autopolinização da tangerineira 'Montenegrina'. EEA – UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2008.

Genótipo	Forma da copa	Hábito de crescimento	Altura (m)	Diâmetro(m)
A01	Esferóide	Aberto	2,50	2,00
A02	Esferóide	Aberto	3,60	3,90
A03	Esferóide	Aberto	3,90	5,10
A04	Esferóide	Aberto	3,40	3,50
A05	Esferóide	Aberto	3,50	4,60
A06	Esferóide	Aberto	3,20	3,90
A08	Esferóide	Aberto	3,40	3,70
A09	Esferóide	Aberto	3,20	4,60
A11	Esferóide	Aberto	3,30	4,00
A12	Esferóide	Aberto	3,90	4,20
A13	Esferóide	Aberto	3,50	4,00
A14	Esferóide	Aberto	2,90	3,50
A16	Esferóide	Aberto	2,75	2,80
A17	Esferóide	Aberto	2,70	3,20
A18	Esferóide	Aberto	2,50	2,10
A21	Esferóide	Aberto	2,20	1,70
A22	Esferóide	Aberto	3,50	4,20
A23	Esferóide	Aberto	3,70	3,80
A24	Esferóide	Aberto	2,50	1,70
A25	Esferóide	Aberto	2,30	1,60
A26	Esferóide	Aberto	3,20	3,60
A27	Esferóide	Aberto	3,10	4,70
A28	Esferóide	Aberto	2,90	3,40
A29	Esferóide	Aberto	3,30	4,20
A30	Esferóide	Aberto	3,50	2,70
A31	Esferóide	Aberto	3,70	3,60
A33	Esferóide	Aberto	3,00	3,20
A34	Esferóide	Aberto	3,10	3,70
A35	Esferóide	Aberto	3,50	3,70
A36	Esferóide	Aberto	3,50	4,50
A37	Esferóide	Aberto	3,20	4,00
A39	Esferóide	Aberto	3,10	2,90
A40	Esferóide	Aberto	3,30	3,40
A41	Esferóide	Aberto	3,30	3,50
B01	Esferóide	Aberto	2,90	3,50
B02	Achatada	Aberto	1,30	1,80
B04	Esferóide	Aberto	3,10	4,10
B05	Esferóide	Aberto	3,40	4,60
B06	Esferóide	Aberto	3,50	4,20
B07	Esferóide	Aberto	2,80	1,80
B11	Achatada	Aberto	2,40	3,00
B12	Esferóide	Aberto	3,50	4,40
B15	Elipsóide	Aberto	3,30	2,90

continuação TABELA 3. Forma, hábito de crescimento, altura e diâmetro de copa de uma população obtida através da autopolinização da tangerineira 'Montenegrina'. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2008.

Genótipo	Forma da copa	Hábito de crescimento	Altura (m)	Diâmetro(m)
B16	Esferóide	Aberto	2,70	4,00
B17	Esferóide	Aberto	2,60	3,20
B18	Esferóide	Aberto	3,10	4,20
B19	Esferóide	Aberto	3,10	3,90
B20	Esferóide	Aberto	3,20	4,20
B21	Elipsóide	Vertical	2,70	2,30
B22	Esferóide	Aberto	3,10	4,00
B24	Esferóide	Aberto	2,60	2,50
B26	Esferóide	Aberto	3,20	3,60
B27	Elipsóide	Vertical	2,50	2,10
B28	Achatada	Inclinado	1,90	1,60
B29	Esferóide	Aberto	2,60	2,80
B30	Elipsóide	Aberto	2,90	3,40
B31	Esferóide	Aberto	3,20	4,50
B32	Esferóide	Aberto	3,30	3,20
B33	Esferóide	Aberto	2,80	2,30
B34	Esferóide	Aberto	2,80	2,40
B35	Esferóide	Aberto	3,10	2,40
B36	Esferóide	Aberto	3,00	3,50
B37	Esferóide	Aberto	3,30	3,50
B38	Esferóide	Aberto	3,20	3,60
B39	Esferóide	Aberto	2,50	3,10
B40	Esferóide	Aberto	2,40	2,50
B41	Esferóide	Aberto	3,00	2,70
Montenegrina	Esferóide	Aberto	3,10	3,80

O comprimento médio do limbo foliar variou de 5,67 a 9,91 cm, havendo diferença estatística entre a tangerineira 'Montenegrina' e onze plantas da progênie, sendo que as plantas A16, A34, A41, B02, B12, B20, B24 e B33 apresentaram folhas com comprimento médio do limbo foliar inferior ao da 'Montenegrina' e as plantas A09, A14 e A28 apresentaram folhas de comprimento médio do limbo foliar superior do que o da tangerineira 'Montenegrina' (Tabela 4).

A largura média do limbo foliar variou de 2,17 a 3,98 cm, sendo que onze plantas da progênie foram estatisticamente diferentes da tangerineira

'Montenegrina', sendo que as plantas A01, A05, A16, A34, A39, B04, B12, B24, B33 apresentaram largura média do limbo foliar inferior a tangerineira 'Montenegrina' e as plantas A18 e B28 apresentaram largura média do limbo foliar superior ao da tangerineira 'Montenegrina' (Tabela 4).

A relação entre largura e comprimento de limbo foliar variou de 0,33 a 0,54, onde apenas as plantas A41 e B07 foram estatisticamente superiores a tangerineira 'Montenegrina' (Tabela 4).

TABELA 4. Cor de folha (VE = verde escuro, V = verde, VC = verde claro), área acumulada de cinco folhas, comprimento médio e largura média de limbo e relação entre largura e comprimento de limbo (L/C) de uma população obtida através da autopolinização da tangerineira 'Montenegrina'. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2007.

Genótipos	Cor	Área acumulada de 5 folhas (cm ²) ^z	Comprimento médio do limbo (cm) ^y	Largura média do limbo (cm) ^y	L/C ^y
A01	V	38,61	5,67	(2,38)**	0,42
A02	VE	76,13	8,28	2,91	0,33
A03	V	86,49	9,27	3,10	0,33
A04	V	89,67	9,22	3,18	0,35
A05	V	48,89	7,02	(2,37)**	0,34
A06	VE	103,37	9,38	3,67	0,39
A08	V	84,30	8,39	3,25	0,38
A09	VE	113,21	9,91 *	3,73	0,38
A11	V	70,12	7,94	2,89	0,37
A12	V	62,43	7,60	2,71	0,36
A13	V	109,00	9,64	3,68	0,38
A14	VC	57,82	6,57 **	2,83	0,43
A16	VC	39,34	(5,43) **	(2,17) **	0,40
A18	V	102,20	8,93	3,83*	0,43
A21	V	63,70	6,99	3,06	0,44
A22	V	68,90	8,65	2,84	0,33
A23	V	71,32	7,87	2,72	0,35
A24	V	77,90	8,32	3,02	0,36
A25	V	56,60	6,87	2,89	0,42
A26	V	66,09	7,28	2,85	0,39
A27	V	58,52	7,43	2,65	0,36
A28	V	107,24	9,89 *	3,47	0,35
A29	VC	89,85	9,12	3,27	0,36
A30	V	98,82	8,84	3,47	0,39
A31	VC	71,40	7,77	2,98	0,38
A33	V	68,12	7,95	2,79	0,35
A34	V	49,35	(6,72) *	(2,45)**	0,37

continuação TABELA 4. Cor de folha (VE = verde escuro, V = verde, VC = verde claro), área acumulada de cinco folhas, comprimento médio e largura média de limbo e relação entre largura e comprimento de limbo (L/C) de uma população obtida através da autopolinização da tangerineira 'Montenegrina'. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2007.

Genótipos	Cor	Área acumulada de 5 folhas (cm ²) ^z	Comprimento médio do limbo (cm) ^y	Largura média do limbo (cm) ^y	L/C ^y
A35	V	92,77	9,01	3,31	0,37
A36	V	115,03	9,71	3,61	0,38
A37	V	81,15	8,71	3,03	0,35
A39	V	52,08	7,42	(2,47)**	0,33
A40	V	93,03	9,15	3,36	0,37
A41	VC	63,41	(6,32)**	3,00	0,48*
B01	V	69,01	7,51	2,88	0,39
B02	V	52,91	(6,75)*	2,72	0,40
B04	V	46,26	6,78	(2,38)**	0,35
B05	V	61,45	7,60	2,69	0,35
B06	VE	101,59	9,50	3,47	0,37
B07	V	71,05	6,58	3,55	0,54**
B11	VC	63,23	7,64	2,84	0,37
B12	V	49,45	(6,33)**	(2,54)*	0,40
B15	V	81,02	7,60	3,42	0,45
B16	VE	106,45	9,52	3,61	0,38
B17	VC	98,98	9,24	3,52	0,38
B18	V	79,03	8,28	3,02	0,37
B19	V	101,69	9,73	3,47	0,36
B20	VC	49,79	(6,68)*	2,61	0,39
B21	V	74,63	8,43	3,11	0,37
B22	V	93,31	9,14	3,32	0,36
B24	V	42,38	(6,19)**	(2,48)**	0,40
B26	VE	79,54	8,16	3,06	0,38
B27	V	58,79	7,38	2,84	0,38
B28	VE	115,50	9,38	3,98**	0,42
B29	VC	87,28	9,06	3,11	0,34
B30	VE	74,19	8,28	3,03	0,37
B31	V	84,67	8,59	3,18	0,37
B32	V	69,52	7,87	2,96	0,38
B33	V	34,10	(6,08)**	(2,06)**	0,34
B34	VE	87,30	8,36	3,38	0,40
B35	VE	77,88	7,83	3,19	0,41
B36	V	91,91	8,91	3,29	0,37
B37	V	95,96	9,09	3,42	0,38
B38	V	90,09	8,41	3,32	0,40

continuação TABELA 4. Cor de folha (VE = verde escuro, V = verde, VC = verde claro), área acumulada de cinco folhas, comprimento médio e largura média de limbo e relação entre largura e comprimento de limbo (L/C) de uma população obtida através da autopolinização da tangerineira 'Montenegrina'. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2007.

Genótipos	Cor	Área acumulada de 5 folhas (cm ²) ^z	Comprimento médio do limbo (cm) ^y	Largura média do limbo (cm) ^y	L/C ^y
B39	VC	68,67	8,06	2,79	0,35
B40	VC	77,27	8,02	3,06	0,38
B41	V	73,91	8,15	2,92	0,36
Montenegrina	VE		8,26	3,16	0,38
CV	--	--	7,06	7,55	9,20

^z Dados não analisados estatisticamente

^y Dados avaliados estatisticamente

*Diferença em relação à 'Montenegrina' significativa dentro da coluna segundo teste de Tukey (p<0,05), médias entre parêntesis inferiores a 'Montenegrina';

** Diferença em relação à 'Montenegrina' significativa dentro da coluna segundo o teste de Tukey (p<0,01), médias entre parêntesis inferiores a 'Montenegrina'.

Quando da avaliação dos frutos, nos anos de 2003 e 2006, a característica diâmetro médio (mm) apresentou diferença estatística entre 'Montenegrina' e as plantas A07, A08, A13, A22, A23, A26, A31, A36, B01, B03, B05, B17, B18, B20, B26 e B31 da progênie (Tabela 5).

TABELA 5. Diâmetro médio (mm) dos frutos de uma população obtida através da autopolinização da tangerineira 'Montenegrina' em cinco anos de avaliação. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2008.

Genótipo	2003	2004	2005	2006	2007
A01	58,02			59,21	60,55
A02	59,90	59,15	56,28		54,65
A03	60,23	58,55	59,59	55,24	56,93
A04	59,74	59,74	53,74	67,00	55,00
A05	60,00	58,88	58,49	60,80	
A06				55,60	55,40
A07				61,00**	
A08		62,17	54,10	62,43**	59,13
A09	60,14	60,53	63,07	62,37	61,10
A10				60,00	
A11	58,60	63,69		55,50	
A12		68,13		63,13	50,05

continuação TABELA 5. Diâmetro médio (mm) dos frutos de uma população obtida através da autopolinização da tangerineira 'Montenegrina' em cinco anos de avaliação. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2008

Genótipo	2003	2004	2005	2006	2007
A13		62,94	53,26	62,62**	49,30
A14	62,12	53,89		66,00	56,65
A16		63,73	63,36	48,75	49,60
A17	56,42	63,72	54,07	50,80	
A18		57,13	55,63		
A22	60,88	57,43	55,46	63,28**	56,13
A23	59,45	58,41	59,20	68,14**	48,43
A26	57,00	57,00		61,77**	50,20
A27				63,18	59,15
A28		62,25			55,50
A29	57,94	58,50	55,54	57,13	49,85
A30	56,74	54,46			
A31	56,67	61,31	60,02	66,63**	57,00
A33		57,85		54,43	52,65
A34		58,23	61,67	53,98	58,53
A35		60,43			47,75
A36	60,90	60,70	56,83	66,07**	56,30
A37	56,54	59,90		56,72	58,67
A39				64,53	41,17
A40	59,03		53,62	56,45	51,65
A41	57,80	55,17	56,65	50,55	
B01				64,90**	60,13
B03	(49,93)**				
B04	65,34	55,72	59,90	57,93	58,93
B05	60,80	60,28	55,48	62,08**	51,90
B06	61,24	60,17	52,56	58,89	65,43
B09		56,25			
B11	60,58	65,34	53,88		
B12	59,59	58,34		60,65	60,80
B15	63,66	56,35	48,83	53,80	52,67
B16			52,78	57,14	
B17			50,57	61,81**	47,10
B18	61,62	58,41	54,59	64,93**	56,03
B20		59,68		62,32**	51,90
B22		61,58	51,89	58,41	62,20
B26				63,34**	57,30
B27		58,30			
B29	56,63	59,27	55,53	58,90	
B30	58,63	57,20	56,81	54,36	
B31	59,93	58,27	60,79	61,58**	53,50
B32		59,01			

continuação TABELA 5. Diâmetro médio (mm) dos frutos de uma população obtida através da autopolinização da tangerineira 'Montenegrina' em cinco anos de avaliação. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2008

Genótipo	2003	2004	2005	2006	2007
B35	56,87	57,15			57,77
B36					52,03
B37	53,22	56,33	58,00	60,65	55,26
B38	56,59		52,84		48,75
B39	53,68			60,37	49,67
B41	56,90	59,00		60,50	
Montenegrina	58,49	57,23	57,88	54,31	54,46
CV	7,15	7,58	11,15	8,07	9,63

*Diferença em relação à 'Montenegrina' significante dentro da coluna segundo teste de Tukey ($p < 0,05$), médias entre parêntesis inferiores a 'Montenegrina';

** Diferença em relação à 'Montenegrina' significante dentro da coluna segundo o teste de Tukey ($p < 0,01$), médias entre parêntesis inferiores a 'Montenegrina'.

Nos anos de 2003, 2006 e 2007, a característica altura média (mm) dos frutos apresentou diferença estatística entre 'Montenegrina' e as plantas A01, A05, A08, A09, A12, A13, A22, A23, A26, A27, A31, A36, A39, B03, B04, B05, B06, B15, B17, B18, B20, B26, B31 e B38 da progênie (Tabela 6).

Nos anos de 2003 e 2004 a característica a massa média (g) dos frutos apresentou diferença significativa entre 'Montenegrina' e as plantas A12, B03 e B11 (Tabela 7).

TABELA 6. Altura média (mm) dos frutos de uma população obtida através da autopolinização da tangerineira 'Montenegrina' em cinco anos de avaliação. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2008.

Genótipo	2003	2004	2005	2006	2007
A01	47,84			53,57 **	59,20 *
A02	53,60	46,47	47,64		44,45
A03	51,18	46,87	49,71	44,41	47,40
A04	49,26	48,63	47,56	62,50	46,55
A05	49,50	48,20	49,40	50,73 **	
A06				49,20	48,07
A07				54,10	
A08		49,38	44,26	50,32 **	55,67
A09	51,98	46,78	53,42	51,62 **	52,00
A10				53,20	
A11	48,30	50,73		48,70	

continuação TABELA 6. Altura média (mm) dos frutos de uma população obtida através da autopolinização da tangerineira 'Montenegrina' em cinco anos de avaliação. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2008.

Genótipo	2003	2004	2005	2006	2007
A12		52,42		54,30 **	44,20
A13		49,95	45,26	53,82 **	42,75
A14	49,50	40,81		55,80	46,63
A16		50,18	52,41	41,40	39,80
A17	45,80	50,04	48,19	42,46	
A18		45,9	50,37		
A22	49,38	47,16	46,56	53,05 **	47,77
A23	48,14	45,00	49,17	61,32 **	44,53
A26	49,00	45,58		50,69 **	40,78
A27				54,06 **	50,85
A28		49,20			48,90
A29	47,50	46,63	45,60	45,63	41,70
A30	45,52	41,04			
A31	49,00	48,31	48,16	55,27 **	47,60
A33		45,08		44,46	44,65
A34		47,83	50,23	46,13	47,97
A35		48,70			39,28
A36	49,82	48,50	41,10	54,83 **	48,08
A37	46,96	46,84		47,55	48,20
A39				57,00 **	35,80
A40	47,70		52,48	46,92	43,45
A41	51,58	44,84	48,00	40,16	
B01				48,58	49,00
B03	(40,35) **				
B04	56,76 *	41,92	50,13	48,52	50,05
B05	51,67	47,13	46,16	53,16 **	42,75
B06	53,34	49,22	44,43	52,45 **	49,88
B09		43,38			
B11	49,17	51,14	44,54		
B12	48,10	47,07		49,23	51,53
B15	57,32 **	45,95	40,99	43,40	52,30
B16			46,16	46,46	
B17			42,87	55,11 **	40,73
B18	57,56	45,60	47,17	54,13 **	48,23
B20		46,02		53,55 **	45,30
B22		49,20	44,67	48,79	54,10
B26				54,82 **	51,53
B27		49,02			
B29	47,53	46,36	47,63	48,68	
B30	52,80	45,75	49,86	43,46	

continuação TABELA 6. Altura média (mm) dos frutos de uma população obtida através da autopolinização da tangerineira 'Montenegrina' em cinco anos de avaliação. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2008.

Genótipo	2003	2004	2005	2006	2007
B31	46,85	46,67	49,65	55,57 **	45,57
B32		46,21			
B35	48,67	46,48			51,03
B36					42,27
B37	43,72	45,88	46,22	49,23	44,46
B38	48,47		45,84		41,68
B39	46,73			51,58 **	44,83
B41	47,20	47,83		50,10	
Montenegrina	49,64	46,03	46,06	43,29	45,56
CV	6,34	7,26	10,45	9,56	8,86

*Diferença em relação à 'Montenegrina' significativa dentro da coluna segundo teste de Tukey ($p < 0,05$), médias entre parêntesis inferiores a 'Montenegrina';

** Diferença em relação à 'Montenegrina' significativa dentro da coluna segundo o teste de Tukey ($p < 0,01$), médias entre parêntesis inferiores a 'Montenegrina'.

TABELA 7. Massa média (g) dos frutos de uma população obtida através da autopolinização da tangerineira 'Montenegrina' em cinco anos de avaliação. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2008.

Genótipos	2003	2004	2005	2006	2007
A01	86,83			96,10	101,00
A02	96,58	93,68	81,09		75,50
A03	96,78	98,23	96,42	75,00	82,67
A04	95,94	96,04	78,08	136,00	75,25
A05	96,55	93,42	91,83	102,45	
A06				83,00	87,14
A07				119,00	
A08		107,13	71,32	104,45	93,67
A09	101,10	99,65	114,48	106,55	101,75
A10				102,00	
A11	90,28	114,54		76,00	
A12		129,83 **		116,00	62,00
A13		119,33	73,52	110,64	62,50
A14	106,42	66,37		132,00	85,50
A16		112,87	117,36	50,20	48,00
A17	85,00	113,15	75,07	59,40	
A18		87,51	78,64		

continuação TABELA 7. Massa média (g) dos frutos de uma população obtida através da autopolinização da tangerineira 'Montenegrina' em cinco anos de avaliação. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2008.

Genótipos	2003	2004	2005	2006	2007
A22	103,30	88,84	76,60	104,20	85,00
A23	96,15	94,56	92,74	140,30	93,33
A26	84,48	84,80		105,80	66,50
A27				116,70	97,00
A28		108,25			79,00
A29	91,08	90,98	78,01	78,20	61,50
A30	83,98	70,20			
A31	83,73	105,51	97,00	127,60	89,00
A33		83,73		68,20	69,50
A34		91,57	107,53	73,20	86,33
A35		93,99			49,25
A36	103,16	103,60	84,97	126,40	83,25
A37	85,46	99,27		79,73	92,67
A39				121,33	34,00
A40	90,60		116,05	77,90	65,50
A41	91,66	78,13	87,34	55,50	
B01				117,60	95,67
B03	(60,01)**				
B04	122,12	79,15	94,89	88,40	89,25
B05	100,27	96,80	76,06	107,00	65,50
B06	103,50	96,63	68,87	98,70	100,00
B09		77,27			
B11	100,98	123,54*	69,48		
B12	96,12	88,49		97,82	101,00
B15	114,78	81,95	56,27	68,10	67,33
B16			69,77	84,60	
B17			58,40	108,27	63,33
B18	109,82	89,45	77,22	111,30	84,00
B20		92,47		107,60	58,67
B22		105,75	64,35	86,60	100,50
B26				110,20	87,50
B27		93,60			
B29	87,33	95,17	79,72	88,20	
B30	95,23	85,52	85,33	68,70	
B31	95,18	88,93	101,17	104,90	73,00
B32		92,19			
B35	85,50	85,63			92,67
B36					65,33
B37	69,94	81,38	87,00	100,38	88,80
B38	85,83		72,64		58,00

continuação TABELA 7. Massa média (g) dos frutos de uma população obtida através da autopolinização da tangerineira 'Montenegrina' em cinco anos de avaliação. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2008.

Genótipos	2003	2004	2005	2006	2007
B39	76,78			97,80	57,33
B41	84,17	94,75		94,80	
Montenegrina	94,32	85,77	86,29	70,80	75,29
CV	17,90	19,06	27,28	24,18	23,67

*Diferença em relação à 'Montenegrina' significativa dentro da coluna segundo teste de Tukey ($p < 0,05$), médias entre parêntesis inferiores a 'Montenegrina';

** Diferença em relação à 'Montenegrina' significativa dentro da coluna segundo o teste de Tukey ($p < 0,01$), médias entre parêntesis inferiores a 'Montenegrina'.

A característica número médio de sementes viáveis por fruto não apresentou variação em nenhum dos anos avaliados na população.

No ano de 2006 a característica número médio de sementes variou significativamente entre 'Montenegrina' e as plantas A05, A12, A13, A26, A31, A37, B06, B12, B18, B29 e B31, sendo que todas estas apresentaram número médio de sementes inferior ao produzido pela tangerineira 'Montenegrina' (Tabela 8). Contudo, observou-se que na maioria destas ocorreu um maior tamanho de frutos neste mesmo ano (Tabelas 3 e 6), no entanto, não observou-se diferença em massa (Tabela 7). Segundo Brugnara (2006), em geral, se espera que frutos com menor número de sementes apresentem menor tamanho. Agustí (2000) lembra que além dos fatores hormonais, vários outros fatores têm influência sobre o tamanho final dos frutos e que o tamanho característico do fruto é determinado por fatores genéticos.

A planta B03 destacou-se por ser a única que, no ano de 2003, apresentou frutos com altura, diâmetro e massa inferiores aos da 'Montenegrina', no entanto, a característica número médio de sementes por fruto não variou significativamente. O restante frutos produzidos na população,

onde se identificou diferença estatística, apresentaram em média maior tamanho e maior massa em todos os anos avaliados.

TABELA 8. Número médio de sementes por fruto em uma população obtida através da autopolinização da tangerineira 'Montenegrina' em cinco anos de avaliação. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2008.

Genótipos	2003	2004	2005	2006	2007
A01	9,6			8,2	8,5
A02	6,2	9,0	6,1		8,0
A03	10,0	10,8	7,9	7,0	4,0
A04	8,6	8,7	1,4	9,0	4,5
A05	6,5	9,3	7,0	(5,0)**	
A06				2,0	3,1
A07				7,0	
A08		8,7	4,0	7,1	2,3
A09	10,6	7,3	9,2	8,3	4,8
A10				3,0	
A11	7,8	10,0		2,0	
A12		12,0		(4,0)*	0,5
A13		11,0	6,0	(5,4)**	0,5
A14	13,0	8,6		6,0	2,0
A16		10,2	6,7	9,4	4,0
A17	9,6	11,5	7,5	7,6	
A18		9,0	7,2		
A22	9,0	10,7	7,4	7,8	2,7
A23	9,5	11,0	8,0	8,6	2,7
A26	10,5	9,7		(6,1)**	1,5
A27				6,9	2,0
A28		11,3			5,0
A29	8,8	9,0	8,1	8,6	5,0
A30	10,0	9,0			
A31	10,0	10,9	8,1	(6,3)*	4,5
A33		13,3		9,1	3,0
A34		13,2	8,0	9,8	5,3
A35		10,1			2,5
A36	11,0	12,3	1,7	7,9	5,3
A37	8,6	10,1		(6,0)**	4,0
A39				9,3	2,7
A40	13,5		3,7	8,9	9,0
A41	10,4	9,1	5,8	7,1	
B01				12,0	7,3
B03	9,9				
B04	13,6	9,5	7,6	14,4	4,5

continuação TABELA 8. Número médio de sementes por fruto em uma população obtida através da autopolinização da tangerineira 'Montenegrina' em cinco anos de avaliação. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2008.

Genótipos	2003	2004	2005	2006	2007
B05	10,7	5,8	7,1	7,9	4,5
B06	8,2	11,2	7,7	(5,6)**	5,3
B09		9,8			
B11	9,7	8,0	10,9		
B12	7,9	9,1		(6,5)*	3,8
B15	9,2	11,8	8,6	10,1	9,3
B16			3,9	8,9	
B17			7,3	6,8	0,7
B18	11,4	10,7	5,0	8,5	3,3
B20		8,2		(5,1)**	1,3
B22		11,7	7,8	7,3	4,5
B26				6,7	5,5
B27		9,3			
B29	8,7	10,9	7,4	(5,1)**	
B30	11,0	10,5	7,8	12,1	
B31	12,3	10,8	6,4	(6,2)*	3,3
B32		10,1			
B35	13,7	12,3			5,7
B36					2,7
B37	8,4	12,5	7,4	7,3	3,0
B38	7,0		5,0		1,0
B39	9,8			6,6	1,7
B41	12,3	13,5		7,2	
Montenegrina	9,9	10,3	8,3	11,1	5,4
CV	35,83	71,92	53,56	40,75	76,33

*Diferença em relação à 'Montenegrina' significante dentro da coluna segundo teste de Tukey ($p < 0,05$), médias entre parêntesis inferiores a 'Montenegrina';

** Diferença em relação à 'Montenegrina' significante dentro da coluna segundo o teste de Tukey ($p < 0,01$), médias entre parêntesis inferiores a 'Montenegrina'.

A característica morfológica quantidade de espinhos não foi quantificada por não existirem descritores morfológicos para quantidade de espinhos, no entanto, algumas plantas da população apresentam aparentemente uma maior quantidade destes (Figura 4). Além disto estas plantas também se destacam das demais plantas da população por não haverem produzido nenhum fruto até

o momento (incluindo safra de 2008) onde os frutos encontram-se em desenvolvimento, o que também é uma característica marcante de juvenilidade.



FIGURA 4. Ramos jovens com espinhos. EEA – UFRGS, Eldorado do Sul, 2008.

4.2 Avaliação físico-química dos frutos

As análises qualitativas dos frutos geraram dados que foram utilizados para se determinar a época de maturação de cada uma das plantas da população.

O início da coleta de frutos ocorreu na primeira quinzena de julho quando os frutos apresentavam IM inferior a 8,0.

Algumas plantas não produziram frutos e/ou os frutos produzidos não foram suficientes para que se realizasse a avaliação.

Considerando-se os limites desejáveis de IM (entre 8,0 e 16,0) e o rendimento de suco superior a 40% observou-se que a maior parte das plantas da população concentrou a época ideal de colheita de frutos da segunda quinzena de julho até a primeira quinzena de setembro, sendo o fim da colheita determinado pela ausência de frutos e não por estes se apresentarem sobremaduros a exceção das plantas A05 e A22 que ultrapassaram os padrões ideais de maturação na segunda quinzena de setembro (Figuras 5 e 6).

A evolução da maturação dos frutos não expressa uma informação conclusiva para a distinção entre os indivíduos de origem nucelar e os de origem zigótica na população.

Mês		Julho		Agosto		Setembro		Outubro									
Quinzena		1ª	2ª	1ª	2ª	1ª	2ª	1ª	2ª								
Genótipos	n																
Montenegrina	5																
A01	4																
A02	5																
A03	5																
A04	5																
A05	3																
A06	1																
A08	3																
A09	5																
A11	3																
A12	3																
A13	4																
A14	4																
A16	4																
A17	4																
A18	2																
A22	5																
A23	5																
A27	3																
A28	2																
A29	5																
A30	3																
A31	5																
A33	2																
A34	3																
A35	2																
A36	5																
A37	4																
A39	2																
A40	5																
A41	4																

FIGURA 5. Maturação de frutos das plantas da Fila A de uma progênie de autopolinização da tangerineira 'Montenegrina'. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2003 a 2007. (n = Número de anos de avaliação)

Mês		Julho		Agosto		Setembro		Outubro	
Quinzena		1ª	2ª	1ª	2ª	1ª	2ª	1ª	2ª
Genótipos	n								
Montenegrina	5	■		■		■			
B01	2		■	■					
B03	1	■							
B04	5	■		■					
B05	5	■		■		■			
B06	5	■		■		■			
B09	1	■	■	■					
B11	3	■		■		■			
B12	4	■	■	■		■			
B15	5	■	■	■		■			
B16	3	■		■					
B17	4	■		■		■			
B18	5	■	■	■		■			
B20	3	■	■	■		■			
B22	4	■		■		■			
B26	2	■	■	■					
B27	2	■		■					
B29	4	■	■	■		■			
B30	4	■		■		■			
B31	5	■	■	■		■			
B32	3	■	■	■		■			
B35	3	■	■	■					
B36	1	■	■						
B37	5	■	■	■		■			
B38	4	■		■					
B39	5	■		■		■			
B41	3	■		■					
		■ IM < 8,0 e % de Suco < 40,0							
		■ IM < 8,0 e % de Suco > 40,0							
		■ IM entre 8,0 e 16 e % de Suco > 40,0							
		■ IM entre 8,0 e 16 e % de Suco < 40,0							

FIGURA 6. Maturação de frutos das plantas da Fila B de uma progênie de autopolinização da tangerineira 'Montenegrina'. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2003 a 2007. (n = Número de anos de avaliação)

4.3 Similaridade fenotípica

Com os dados morfológicos quantitativos: diâmetro da copa, altura da planta, área média de folha, comprimento médio do limbo da folha, largura média do limbo da folha e a relação entre a largura média do limbo e o

comprimento médio do limbo; e morfológicos qualitativos: hábito de crescimento, forma da copa e cor das folhas, foi elaborado um dendograma para agrupamento das plantas da população e da planta mãe ('Montenegrina') através da similaridade fenotípica (Figura 7).

A similaridade média entre as plantas foi de 0,5 e a população foi dividida em dois grupos, o maior deles contendo a tangerineira 'Montenegrina' e outras 56 plantas (A01, A03, A04, A05, A06, A09, A11, A12, A13, A16, A18, A21, A22, A23, A24, A25, A26, A27, A28, A29, A30, A31, A33, A35, A36, A37, A39, A41, B01, B02, B04, B06, B07, B11, BB12, B16, B17, B19, B20, B21, B22, B24, B26, B27, B28, B29, B30, B31, B32, B33, B34, B36, B37, B38, B39 e B41) e o menor contendo apenas dez plantas (A02, A08, A14, A34, A40, B05, B15, B18, B35 e B40) (Figura 7). A planta A17 não participou do dendograma, pois esta morreu antes da coleta dos dados morfológicos.

A avaliação do dendograma indicou grande variabilidade fenotípica, e uma similaridade média baixa, o que não seria o esperado uma vez que a maioria das plantas da população possui origem nucelar, ou seja, são clones de 'Montenegrina'. Brugnara (2006) encontrou uma similaridade fenotípica de 0,6 entre híbridos de 'Montenegrina' e 'King' e entre híbridos de 'Montenegrina' e 'Caipira'.

Os dois grupos formados não apresentam diferenças perceptíveis visualmente e, observando as características morfológicas utilizadas na elaboração do dendograma não foi possível afirmar qual foi a característica ou grupo de características responsáveis pela separação das plantas em dois grupos distintos.

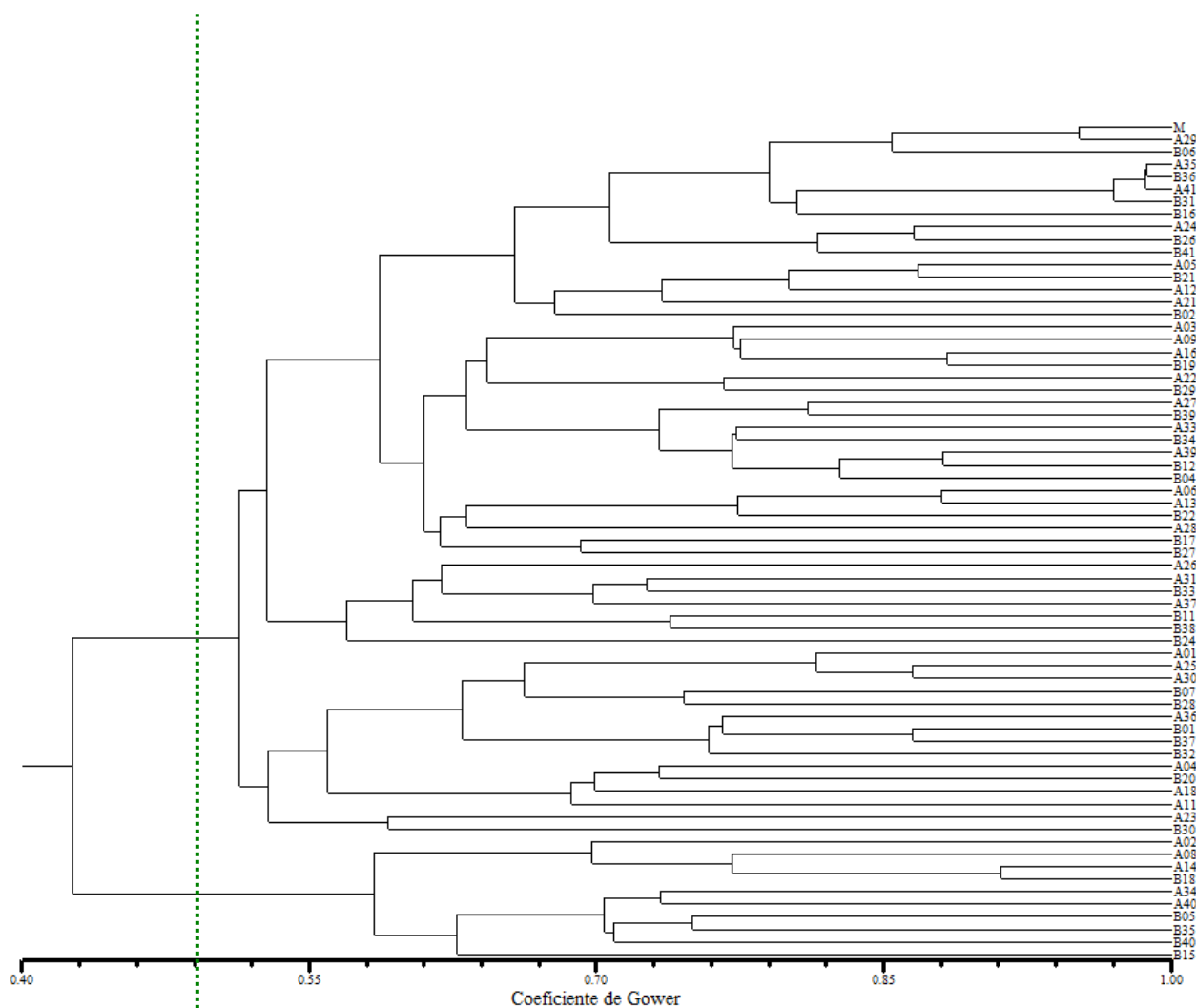


FIGURA 7. Árvore de similaridade fenotípica (dendograma) entre as plantas de uma população obtida pela autofecundação da tangerineira 'Montenegrina'. Linha de corte na similaridade média (0,502).

Tais variações encontradas podem ser decorrentes de ação do ambiente sobre as plantas. Como forma de testar a resistência desta população aos fungos de solo, as mesmas foram manejadas sem controle fitossanitário para este fim, estando susceptíveis às doenças. Como a presença de inóculo não é uniforme na área, algumas plantas podem estar sendo afetadas em graus distintos, o que pode acarretar em diferenças na expressão de características morfológicas.

4.4 Análise molecular

Dos 18 *primers* de microssatélite testados para análise molecular 12 apresentaram polimorfismos de DNA, sendo heterozigotos para a tangerineira ‘Montenegrina’ (Tabela 9), no entanto, apenas sete se mostraram eficientes para identificar as plantas híbridas na população (Tabela 10).

TABELA 9. Qualidade de amplificação obtida com a utilização de *primers* de microssatélite desenvolvidos para *Citrus sinensis*, quando utilizados em tangerina ‘Montenegrina’.

<i>Primers</i>	Amplificação (A – houve amplificação, F –amplificou fraco ou NA - não amplificou)	HO - homozigotos ou HE - heterozigotos para a mãe ‘Montenegrina’	Identificação de homozigotos na progênie (S – sim ou N – não)
01	A	HO	-
03	NA	-	-
12	A	HE	N
19	A	HE	S
25	A	HO	-
46	A	HE	N
49	NA	-	-
54	A	HE	S
60	A	HE	S
62	A	HE	S
63	A	HE	N
67	A	HE	S
90	A	HE	S
129	A	HE	S
146	F	-	-
147	A	HE	N
150	A	HE	N
156	F	-	-

Quando se deu início ao trabalho, ainda não haviam sido desenhados *primers* específicos para *Citrus deliciosa*. Os *primers* utilizados foram sintetizados a partir de DNA genômico de laranja doce cv. Pêra (*Citrus sinensis* [L.] Osb.), ou seja, não eram específicos para a tangerineira ‘Montenegrina’. Isto explica os resultados obtidos com a amplificação dos mesmos, onde alguns amplificaram de maneira muito fraca e outros não amplificaram.

O padrão de bandas obtido com a amplificação de cada locus para as 67 plantas da progênie foi avaliado de forma comparativa com a amplificação obtida com o DNA da planta mãe ('Montenegrina'). Na progênie, as plantas que apresentavam padrão de bandas heterozigoto, assim como a mãe, podem ser consideradas de origem nucelar ou de origem zigótica (autofecundação). As plantas que se apresentaram homozigotas para um dos alelos foram consideradas de origem zigótica obrigatória (Figura 8). No entanto, nenhum dos marcadores co-dominantes é capaz de detectar mais do que 50% dos indivíduos zigóticos, pois indivíduos heterozigotos provenientes do cruzamento são geneticamente idênticos aos indivíduos oriundos de embriões nucleares (Ruiz *et al.* 2000).

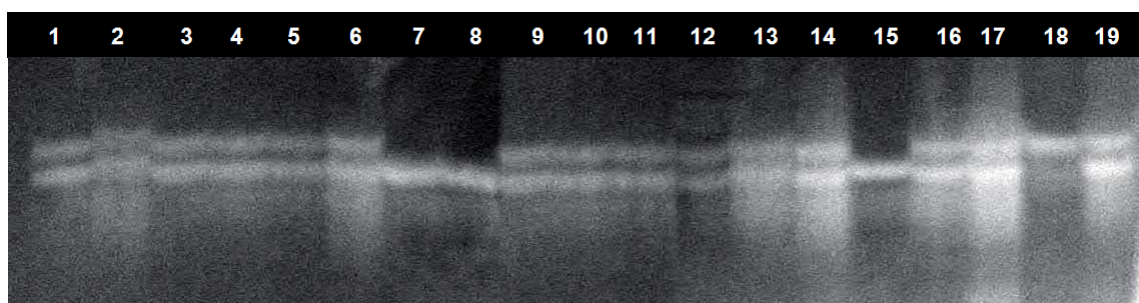


FIGURA 8. Amplificação obtida com o locus 62 com DNA da planta mãe 'Montenegrina' (1), plantas nucleares ou de origem zigótica não identificada (2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17 e 19) e plantas de origem zigótica (7, 8, 15 e 18) em gel de poliacrilamida 6%.

Sete dos 12 locus que foram heterozigotos para a planta mãe permitiram a identificação de indivíduos homozigotos na população. Tais indivíduos a campo são identificados como B02, B21, B28 e B33 (Tabela 11).

A planta B28 já havia sido previamente identificada por Schwarz (comunicação pessoal) como de origem zigótica, pois a mesma foi identificada através da técnica de Citometria de Fluxo a mesma foi identificada como sendo uma planta triplóide, e, assim sendo, só poderia ter origem zigótica.

TABELA 10. Identificação de indivíduos zigóticos obtidos através da autopolinização da tangerineira 'Montenegrina'. N = origem não identificada. EEA – UFRGS, Eldorado do Sul, 2008.

Loci	Indivíduos Zigóticos				Indivíduos Homozigotos		
	B02	B21	B28	B33	'Caí'	'Mont.' 03	'Mont.' 05
19	Z	N	Z	Z	N	N	N
54	Z	Z	Z	N	N	N	N
60	N	N	N	Z	N	N	N
26	Z	Z	Z	Z	N	N	N
67	Z	Z	Z	Z	N	N	N
90	N	N	N	Z	Z	Z	Z
129	Z	Z	N	N	N	N	N

O tamanho dos fragmentos observados foi semelhante ao tamanho obtido com a amplificação utilizando-se *Citrus sinensis* L. Obseck, cultivar Pêra, na descrição dos mesmos.

Visualmente as plantas identificadas como híbridas (Figuras 9 e 10) são morfológicamente diferentes do que seria o esperado para a tangerineira 'Montenegrina' (Figura 11), apresentando uma maior quantidade de espinhos que as demais plantas da população, além de possuir ramos bastante retorcidos, tornando-se plantas mais compactas. No entanto, dentro da população em estudo, tais diferenças não foram suficientemente significativas nas avaliações morfológicas para que se pudesse observar diferença estatística.

A abundante presença de espinhos é indicativo de juvenildade o que poderia ser uma justificativa para a ausência de produção de frutos por estas plantas até o momento.



FIGURA 9. Plantas B02 e B21 identificadas como híbridas por marcadores de microssatélites na população obtida por autopolinização da tangerineira 'Montenegrina'. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2008.



FIGURA 10. Plantas B28 e B33 identificadas como híbridas por marcadores de microssatélites na população obtida por autopolinização da tangerineira 'Montenegrina'. EEA-UFRGS, Eldorado do Sul, RS, 2008.

Embora se espere que não existam grandes variações em viveiros comerciais de produção de mudas de citros, pois a propagação nestes é realizada de maneira clonal (através da enxertia), foram identificados diferenças

moleculares entre tangerineiras provenientes de diferentes viveiros e também entre tangerineiras 'Montenegrina' e a tangerineira 'Caí'(Tabela 11).

Segundo Soost & Cameron (1968) as mutações espontâneas em gemas de ramos são freqüentes em citros e alteram caracteres herdáveis. Bretó *et al.* (2001) estudaram o surgimento de várias cultivares comerciais de tangerineiras, num período de 50 anos, a partir da tangerineira 'Clementina Fina', propagada exclusivamente por métodos vegetativos, justificado pela ocorrência de *retrotransposons* identificados por SSR.

A utilização de marcadores de microssatélite não específicos foi eficiente na identificação dos indivíduos zigóticos, obtidos com a autopolinização da tangerineira 'Montenegrina', provavelmente devido à existência de ancestrais comuns entre a tangerineira 'Montenegrina' e laranjeira 'Pêra' e a possível conservação de sítios de microssatélite entre espécies relacionadas. Federici *et al.* (1997) avaliaram relações filogenéticas entre plantas do gênero *Citrus* e espécies relacionadas utilizando técnicas de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) e RAPD (*Randon Amplified Polymorphic DNA*) e encontraram grandes semelhanças genéticas, reafirmando a possibilidade origem comum entre várias espécies cítricas.

A identificação das plantas de origem zigótica na população proveniente da autopolinização da tangerineira 'Montenegrina' permitirá a continuação dos trabalhos necessários para a obtenção de novos cultivares, como teste de resistência a doenças, comportamento quando utilizados como porta-enxerto e sobre os porta-enxerto comumente utilizados para tangerineira 'Montenegrina'. Além disso, permitirá a retirada das plantas de origem nucelar da área onde se encontra a população, reduzindo o custo de manutenção do pomar e liberando espaço para implantação de novos experimentos.

5 CONCLUSÕES GERAIS

As avaliações morfológicas das plantas e dos frutos, assim como as avaliações físico-químicas dos frutos, não foram eficientes na identificação das plantas de origem zigótica da população.

Os marcadores moleculares de microsatélites permitiram a identificação de quatro indivíduos zigóticos em uma população proveniente de autopolinização da tangerineira 'Montenegrina'.

A presença de polimorfismos moleculares evidencia a existência de variações a nível molecular entre a tangerineira 'Montenegrina' e a tangerineira 'Caí' e entre a tangerineira 'Montenegrina' e entre exemplares da tangerineira 'Montenegrina' oriundas de diferentes viveiros.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUSTÍ, M.; ALMELA, V. **Aplicación de fitorreguladores em citricultura**. Barcelona : AEDOS, 1991. 236p.

ANDRADE-RODRÍGUEZ, M.; MONTER, A.V.; ESPINOSA, M.A.g.; CASTAÑEDA, G.C.; VELÁZQUEZ, A.G. Polyembryony and RAPD markers for identification of zygotic and nucellar seedling in citrus. **Agrociencia**, Texcoco, México, v.39, n.4, p.371-383, 2005.

ARAÚJO, E.F.; QUEIROZ, L.P.; MACHADO, M.A. What is citrus? Taxonomic implications from a study of cp-DNA evolution in the tribe Citreae (Rutaceae subfamily Aurantioideae). **Organisms Diversity & Evolution**, Berlin, v.3, p.55-62, 2003.

BALLVÉ, R.M.L.; MEDINA FILHO, H.M.; BORDIGNON, R. Identification of reciprocal hybrids in citrus by the 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.(edit.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 141p.

BASTIANEL, M.; DORNELLES, A.L.C.; SCHWARZ, S.F.; KOLLER, O.C. Resgate *in vitro* de embriões de tangerineiras (Citrus SP.) **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.30, n.3, p.181, 1997.

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.

BARKLEI, N.A.; ROOSE, M.L.; KRUEGER, R.R.; FEDERIEI, C.T. Assessing genetic diversity and structure in a citrus germoplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.112, p.1519-1531, 2006.

BETZE, L.; PENNER, G. Microsatellite markers. In: MILACH, S.C.K.(edit.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: Milach, S.C.K., 1998. 141p.

BRETÓ, M.P.; RUIZ, C.; PINA, J.A.; ASÍNS, M.J. The Diversification of *Citrus Clementina* Hort. Ex Tan., a Vegetative Propagated Crop Species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, USA, v.21. n.2, p.285-293, 2001.

BRUGNARA, E.C. **Caracterização morfológica, citogenética e molecular de híbridos de tangerineira 'Montenegrina'**. 2006, 84 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

CAMERON, J.W.; FROST, H.B. Genetics, breeding, and nucellar embryony. In: REUTHER, W.L.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J. (eds.). **The Citrus Industry**. Berkeley : University of California Press, 1968. v.2, p.325-370.

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

CARVALHO, S.A.; NOVELLI, V.M.; MACHADO, M.A. Descrição de variação morfológica em folhas de laranjeira 'valência' detectada em borbulheira e viveiro de citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.25, n.1, p.81-85, 2004

CASTLE, W.S. Citrus rootstocks. In: **ROOTSTOCKS for fruit crops**. New York : J. Wiley and Sons, 1987. p. 361-399.

CERVERA, M.T.; GUSMÃO, J.; STEENACKERS, M.; VANGYSEL, A.; VANMONTAGU, M.; BOERJAN, W. Application of AFLP based molecular markers to breeding of *Populus* spp. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.20, n.1, p.47-52, 1996.

CHAPOT, H. The citrus plant. In: HÄFLIGER, E. (ed.). **Citrus**: Basle, Switzerland : CIBA GEIGY AGROCHEMICALS, Techn, 1975. p.14-20.

COLETTA FILHO, H.D.; MACHADO, M.L.P.N.; TARGON, M.C.P.Q.D.G.; MOREIRA ; POMPEU Jr., J. Analysis of the genetic diversity among mandarins (*Citrus* spp.) using RAPD markers. **Euphytica**, Berlin, v.102, p.133-139, 1998.

CRISTOFANI, M. **Mapas de ligação de *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux e localização do gene de resistência ao vírus da tristeza**. Piracicaba: ESALQ, 1997. 152f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Gaithersburg-MD, v.12, p.13-15, 1990.

DONADIO, L.C.; FIGUEIREDO, J.O.; PIO, R.M. **Variedades Cítricas Brasileiras**. Jaboticabal: FUNEP-UNESP, 1995. 228p.

FAO. **Agricultural Data – FAOSTAT**. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>> Acesso em: ab 2008.

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

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: EMBRAPA – CENARGEM, 1996. 220p.

FROST, H.B.; KRUG, C.A. Diploid - tetraploid periclinal chimeras as bud variants in citrus. **Genetics**, New York, v.27, p.619-634, 1942.

FROST, H.B.; SOOST, R.K. Seed reproduction: Development of gametes and Embryos. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBER, H.J. (Eds). **The Citrus Industry**. Berkeley: **University of California Press**, v.2, p.290-324, 1968.

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.

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.

GMITTER JR., F.G.; XIAO, S.Y.; HUANG, S.; HU, X.L.; GARNSEY, S.M. & DENG, Z. A localized linkage map of the virus tristeza virus resistance gene region. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.92, p.688-695, 1996.

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

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

GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S.R.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W.M.; SUZUKI, D.T. **Introdução à Genética**. 8.ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2006.

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. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.20, n.3, p.489-496, 1997.

IBGE. **Áreas destinadas 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, 2008.

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

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

JOÃO, P.L.; CONTE, A. **Levantamento da fruticultura comercial do Rio Grande do Sul: 2006**. Porto Alegre: EMATER/RS-ASCAR, 2007. 83p.

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

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

KOLTUNOW, A.M. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **Plant Cell**, Rockville, v.5, p.1245-1267, 1993.

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

MILACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre, 1998. p.17-28. Capítulo: Principais tipos de marcadores moleculares e suas características.

MEHRA, P.N.; BAWA, K.S. Chromosomal evolution in tropical hardwoods. **Evolution**, Chicago, v.23, n.3, p.466-481, 1969.

MESTRE, P.F.; ASSÍNS, M.J.; PINA, J.A.; CARBONELL, E.A.; NAVARRO, L. Molecular markers flanking citrus tristeza virus resistance gene from *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.94, p.458-464, 1997a.

MESTRE, P.F.; ASSÍNS, M.J.; CARBONELL, E.A.; NAVARRO, L. New gene(s) involved in the resistance of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. to citrus tristeza virus **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.95, p.691-695, 1997b.

MINHAS, P.P.S.; UPPAL, D.K.; SCARMA, S.C. Segregation of vegetative characters in F1 population of crosses of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) cultivars. **The Indian Journal Horticulture**, New Delhi, v.48, n.1, p.22-26, 1991.

MOHAN, M.; NAIR, S.; BHAGWAT, A. *et al.* Genome mapping, molecular marker and marker-assisted selection in crop plants. **Molecular Breeding**, (cidade?, n.3, p.87-103, 1997.

MOORE, G.A.; CASTLE, W.S. Morphological and isozymic analysis of open-pollinated Citrus rootstock populations. **The Journal of Heredity**, Washington, v.79, n.1, p.59-63, 1988.

MOORE, G.A.; TOZLU, I.; WEBER, C.A. ; GUY, C.L. Mapping quantitative trait loci for salt tolerance and cold tolerance in *Citrus grandis* (L.) Osb. X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. hybrid populations. **Acta Horticulturae**, Leuven, v.535, p.37-45, 2000.

MOREIRA, S.; GURGEL, J.T.A. A fertilidade do pólen e sua correlação com o número de sementes em espécies formadas pelo gênero "Citrus". **Bragantia**, Campinas, v.1, p.660-771, 1941

MOREIRA, C.S.; PIO, R.M. Melhoramento de citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F.; POMPEU, Jr. J *et al.* **Citricultura Brasileira**, Campinas, v.1, p.116-152, 1991.

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

NIJS, A.P.M.; VAN DIJK, G.E. Apomixis. In: HAYWARD, M.O.; BOSEMARK, N.O.; ROMAGOSA, li. (Ed) **Plant breeding**: principles and prospect. London: Chapman and Hall, 1994. p.229-245.

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

OLIVEIRA, R.P.; RADMANN, E.B.; AUGUSTIN, E. Genetic characterization of new varieties and hybrids of citrus table fruit through isoenzymes. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 3, n. 1, p. 77-82, 2003.

PARKER, P.G.; SNOW, A.A.; SCHUG, M.D. BOOTON, G.C.; FUREST, P.A. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. **Molecular Ecology**, Oxford, v.79, p.361-382, 1998.

PINTO, L.R. **Análise da Estrutura Genética das Populações de Milho (*Zea mays* L.) BR-105 e BR-106 e respectivos sintéticos IG-3 e IG-4 por meio de microssatélites**. Piracicaba : ESALQ, 2001. N. de fls? Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

PIO, R.M. A qualidade e as exigências do mercado de tangerinas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.25, n.3, 2003.

RAGHUVANSHI, S.S. Cytological evidence bearing on evolution in *Citrus*. In: INTERNACIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1968, Riverside. **Proceedings...** Riverside, CA: University of California, 1969. v.1, p.207-214.

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

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

RUIZ, C. M.; BRETO, P.; 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.

ROOSE, M.L.; JARRELL, D.C.; KUPPER, R.S. Genetic mapping in a *Citrus x Poncirus* F2 population. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 7, Acireali, Italy, 1992. **Proceedings...** Acireale, Italy: International Society of Citriculture, 1992. v.1, p.210-213.

SAMBROOK, J.; FRISCH, E.F.; MANIATS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. Não paginado.

SARTORI, I.A.; SHÄFER, 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.

SIVIERO, A.; CRISTOFANI, M.; FURTADO, E. L.; MACHADO, M. A. Herança da resistência a gomose em *Poncirus Trifoliata* e *Citrus Sunki*. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, São Paulo, v.28, n.1, 80p, 2002.

SOOST, R.K.; CAMERON, J.W. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (eds.). **Advances in fruit breeding.** West Lafayette, Indiana: Purdue University Press, 1975. p.507-540.

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**, Berkeley : University of California, 1967. v. I, p. 90-196.

TAN, M.; SONG, J.; DENG, X. Production of two mandarin x trifoliolate orange hybrid populations via embryo with verification by SSR analysis. **Euphytica**, Springer, Dordrecht, v.157, p.155-160, 2007.

TANKSLEY, S.D.; MEDINA FOLHO, H.; RICK, C.M. The effect of isozymes selection on metric characters in an interspecific backcross of tomato-basis of an early screening procedure. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.60, p.291-296, 1981.

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

TUSA, N.; ABBATE, L.; FERRANTE, S.; LUCRETTI, S.; SCARANO, M.T. Identification of zygotic and nucellar seedlings in *Citrus* interploid crosses by means of isozymes, flow cytometry and ISSR-PCR. **Cellular & Molecular Biology Letters**, Wrocław, Polandv.7, p.703-708, 2002.

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* Tem.)**. 2006. 67f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, Oxford, v.11, p.1-16, 2002.

ZHAO, X.; KOCHERT, G. Phylogenetic distribution and genetic mapping of a (GGC)_n microsatellite from rice (*Oryza sativa* L.) **Plant Molecular Biology**, Local de publicação(cidade), v.21, p.607-614, 1993.