



Ciência Rural

ISSN: 0103-8478

cienciarural@mail.ufsm.br

Universidade Federal de Santa Maria

Brasil

Weiler, Roberto Luis; Brugnara, Eduardo Cesar; Schwarz, Sergio Francisco; Bastianel, Marinês;

Machado, Marcos Antônio; Schifino-Wittmann, Maria Teresa

Caracterização molecular de uma progênie de tangerineira 'Clementina Fina' e 'Montenegrina'

Ciência Rural, vol. 40, núm. 7, julio, 2010, pp. 1523-1529

Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33117728011>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe , Espanha e Portugal  
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

## Caracterização molecular de uma progénie de tangerineira ‘Clementina Fina’ e ‘Montenegrina’

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

Roberto Luis Weiler<sup>I</sup> Eduardo Cesar Brugnara<sup>I</sup> Sergio Francisco Schwarz<sup>II</sup>  
Marinês Bastianel<sup>III</sup> Marcos Antônio Machado<sup>III</sup> Maria Teresa Schifino-Wittmann<sup>IV</sup>

### RESUMO

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

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

### ABSTRACT

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

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

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

### INTRODUÇÃO

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

<sup>I</sup>Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

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

<sup>III</sup>Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio, Centro APTA Citros Sylvio Moreira, Cordeirópolis, SP, Brasil.

<sup>IV</sup>Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Departamento Plantas Forrageiras e Agrometeorologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

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

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

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

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

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

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

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

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

## MATERIAIS E MÉTODOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

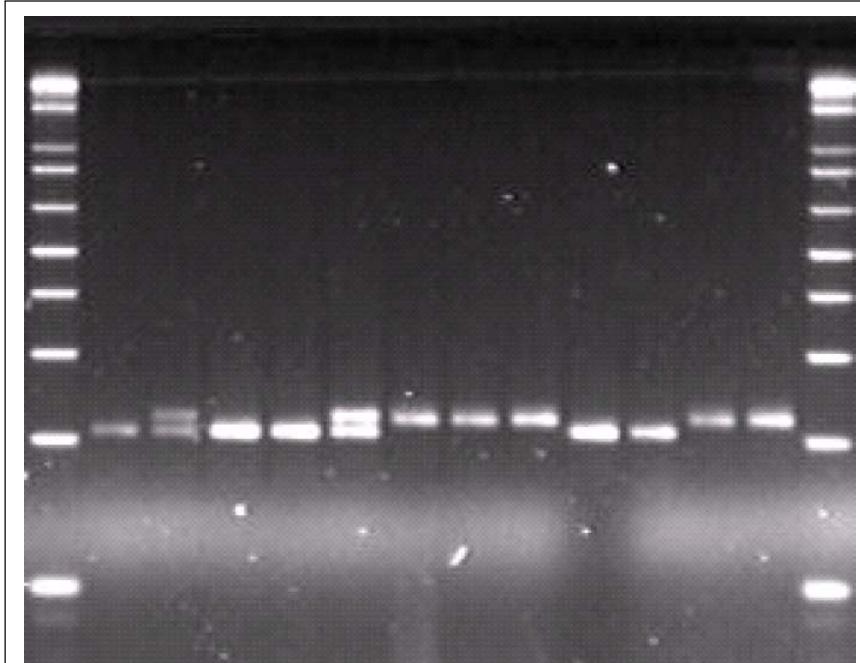


Figura 1 - Gel de agarose a 3%, onde em cada extremidade há uma coluna com marcador molecular de 100pb (Ladder). Da segunda até a décima terceira coluna, está demonstrada a variabilidade entre plantas híbridas da cultivar ‘Clementina Fina’ (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) e da cultivar ‘Montenegrina’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

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

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

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

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

## CONCLUSÃO

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

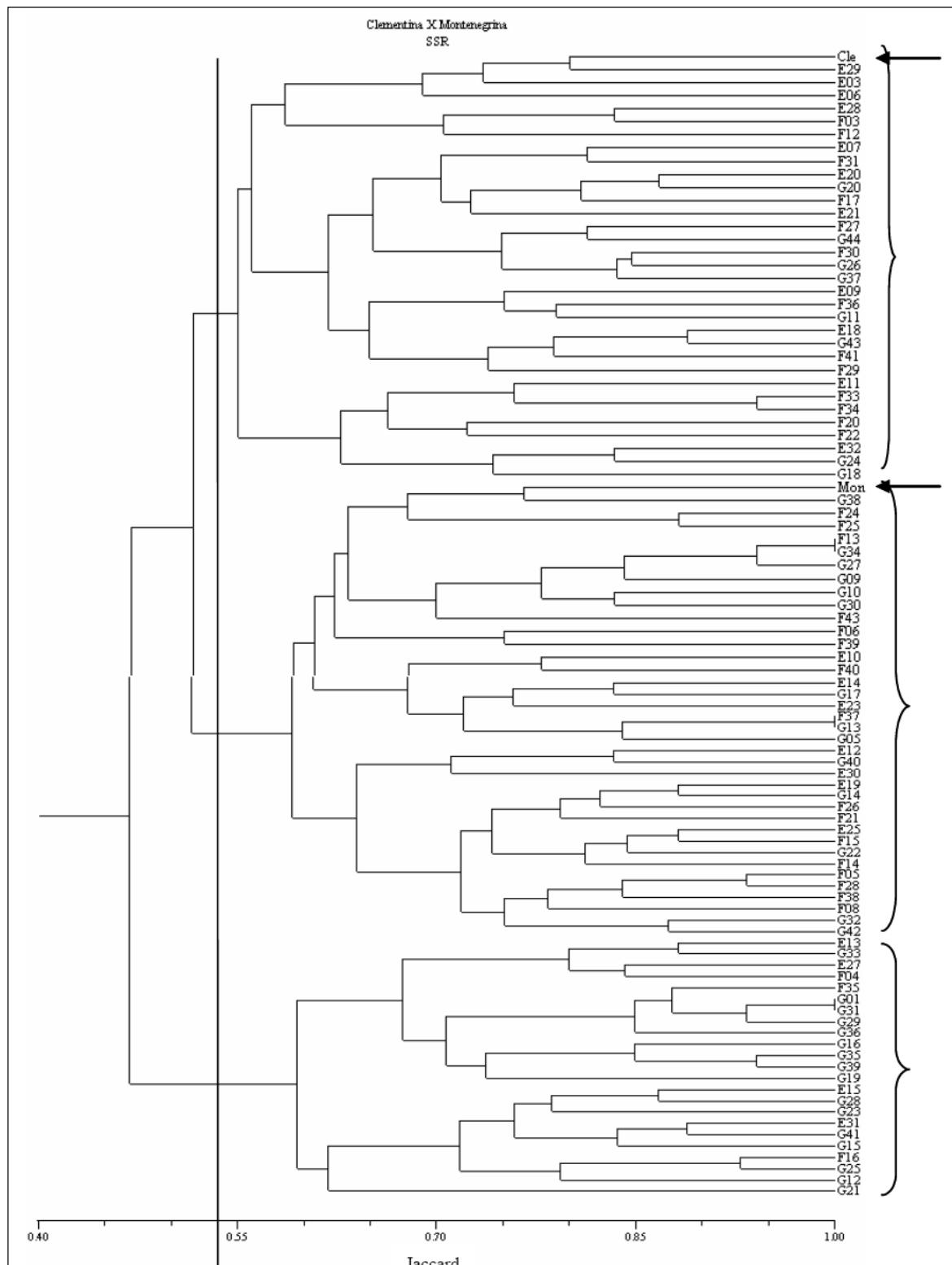


Figura 2 - Dendrograma com 96 plantas (progênie e genitores) oriundas do cruzamento entre a cultivar 'Clementina Fina' e a cultivar 'Montenegrina' (destacados por setas), gerado por meio do programa NTSYS, utilizando 12 pares de primers microsatélites.

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

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

## AGRADECIMENTO

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

## REFERÊNCIAS

- BASTIANEL, M. et al. Caracterização de genótipos de *Citrus* spp. através de marcadores RAPD. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.5, p.763-768, 2001. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782001000500004&script=sci\\_arttext&tlang=e](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782001000500004&script=sci_arttext&tlang=e)>. Acesso em: 15 dez. 2009. doi: 10.1590/S0103-84782001000500004.
- BEHROUZ, G. et al. Assessment of genetic variability in some Iranian sweet oranges (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) and mandarins (*Citrus reticulata* Blanco) using SSR markers. **International Journal of Agriculture and Biology**, Pakistan, v.7, n.2, p.167-170, 2005. Disponível em: <[http://www.fspublishers.org/ijab/past-issues/IJABVOL\\_7\\_NO\\_2/4.pdf](http://www.fspublishers.org/ijab/past-issues/IJABVOL_7_NO_2/4.pdf)>. Acesso em: 10 dez. 2010. doi: 1560-8530/2005/07-2-167-170.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa-MG: UFV, 2009. 532p.
- BRUCKNER, C.H. **Fundamentos do melhoramento de fruteiras**. Viçosa-MG: UFV, 2008. 202p.
- BRUCKNER, C.H. **Melhoramento de fruteiras tropicais**. Viçosa-MG: UFV, 2002. 422p.
- FAO. **Agricultural Data – FAOSTAT**. Acesso em: 15 out. 2009. Online. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>>.
- IWAMASA, M.; NITO, N. Cytogenetics and the evolution of modern cultivated Citrus. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 6., 1988, Tel Aviv. **Proceedings...** Tel Aviv: International Society of Citriculture, 1988. V.1, p.265-275.
- JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. **Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles**, Lancaster, v.37, p.547-579, 1901.
- KOEHLER-SANTOS, P. et al. Characterization of mandarin citrus germplasm from Southern Brazil by morphological and molecular analyses. **Revista Pab Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.7, p.797-806, 2003. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-04X2003000700003&script=sci\\_arttext&tlang=en](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-04X2003000700003&script=sci_arttext&tlang=en)>. Acesso em: 10 dez. 2009. doi: 10.1590/S0100-204X2003000700003.
- KOLLER, O.C. **Citricultura: laranja, limão e tangerina**. Porto Alegre: Rigel, 1994. 446p.
- MACHADO, M.A. et al. Genetic relationships of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. **Euphytica**, Wageningen, v.92, p.321-326, 1996. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/k68733676970054q/?p=952ce3374d224a0d8b649 d8cf59f21d2&pi=5>>. Acesso em: 20 dez. 2009. doi: 10.1007/BF00037115.
- MESSMER, M.M. et al. Relationships among early european maize inbreds: I. Comparision of pedigree and RFLP data. **Crop Science**, Madison, v.33, p.944-950, 1993.
- NOVELLI, V.M. et al. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for the sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.29, n.1, p.90-96, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sciabstract&pid=S1415-7572006000100018&lng=en&nrm=iso&tlang=en>>. Acesso em: 15 dez. 2009. doi: 10.1590/S1415-47572006000100018.
- OLIVEIRA, A.C. et al. Identification of citrus hybridus through the combination of leaf apex morfology and SSR markers. **Euphytica**, Wageningen, v.128, p.397-403, 2002. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/ln85862361341187/?p=842d8fc6013d4402ba77473 bdf894867 &pi=12>>. Acesso em: 15 dez. 2009. doi: 10.1023/A:1021223309212.
- OLIVEIRA, R.P.; RADMAN, E.B. Similaridade genética de cultivares de citros de mesa. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas-BA, v.27, n.2, p.332-334, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-29452005000200037&script=sciabstract&tlang=pt>>. Acesso em: 18 dez. 2009. doi: 10.1590/S0100-29452005000200037.
- RAO, M.N. et al. Characterizations of zygotic and nucellar seedlings from sour orange-like citrus rootstock candidates using RAPD end EST-SSR markers. **Tree Genetics and Genomes**, Florida, v.4, n.1, p.113-124, 2008. Disponivel em: <<http://www.springerlink.com/content/1737vp535195111r/>>. Acesso em: 15 dez. 2009. doi: 10.1007/s11295-007-0092-2.
- ROHLF, J.F. **NTSYS – Numerical Taxonomy and multivariate analysis system**. Versão 2.1. New York: Exeter Software, 2000, 83p.
- SHILLITO, R.D.; SAUL, M.W. Protoplast isolation and transformation. In: SHAW, C.H. (Ed.). **Plant molecular biology**: a practical approach. Oxford, IRL, 1988. p.161-186.
- THOMAS, M.R. et al. Sequence-tagged Site Markers in Grapevine and *Citrus*. **Journal of the Japanese Society Horticultural Science**, Tokyo, v.67, n.6, p.1189-1192, 1998. Disponível em: <<http://www.jjshs.jst.go.jp/jnlpdf.php?cdjournal=jjshs1925&cdvol=67&noissue=6&startpage=1189&lang=en&from=jnlabstract>>. Acesso em: 20 dez. 2009. doi:10.2503/jjshs.67.1189.