



TESTE DE PATERNIDADE E AVALIAÇÕES AGRONÔMICAS DE POSSÍVEIS HÍBRIDOS DE TANGERINEIRA 'SUNKI'¹

PATERNITY TEST AND AGRONOMIC EVALUATION OF POSSIBLE HYBRIDS OF 'SUNKI' TANGERINE

Roberto Luis WEILER²
Eduardo Cesar BRUGNARA³
Marinês BASTIANEL⁴
Marcos Antonio MACHADO⁵
Maria Teresa SCHIFINO-WITTMANN⁶
Paulo Vitor Dutra de SOUZA⁷
Sergio Francisco SCHWARZ⁸

RESUMO

A produção de citros está espalhada em todos os continentes agricultáveis e no Brasil ela representa o maior volume de frutas produzidas. O porta-enxerto é extremamente importante no estabelecimento de um pomar de boa qualidade. Na Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, está localizada uma população de híbridos cítricos, implantada em 1990 e oriunda de polinização aberta, sendo o genitor feminino o tangeleiro 'Lee' [*Citrus clementina* Hort. ex Tan. x (*C. tangerina* Hort. ex Tan. x *C. paradisi* Macf.)]. Dentre os híbridos deste pomar foram selecionadas quatorze plantas com características morfológicas semelhantes as do porta-enxerto tangerineira 'Sunki' (*C. sunki* Hort. ex. Tan.). Para confirmar a paternidade dos híbridos foram utilizados marcadores moleculares do tipo microsatélites. A análise molecular permitiu identificar onze híbridos que não tiveram a 'Sunki' como parental masculino. Os demais híbridos, potenciais híbridos de tangerineira 'Sunki', genótipos 49, 77 e 92, tiveram maior taxa de poliembrionia, maior número de plântulas emergidas por semente e maior número de sementes produzidas por fruto quando comparadas com a tangerineira 'Sunki'.

Palavras-chave: *Citrus sunki*; porta-enxertos; poliembrionia; microsatélites.

ABSTRACT

Citrus production is spread all over the world. In Brazil citrus represent the major volume of fruit production. The rootstock is extremely important to establish a good-quality orchard. At the Estação Experimental Agronômica of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul was established placed a hybrid citrus plants orchard, originated from open-pollination with 'Lee' tangelo [*Citrus clementina* Hort. ex Tan. x (*C. tangerina* Hort. ex Tan. x *C. paradisi* Macf.)] as female parent. Amongst those hybrids, fourteen plants were selected with characteristics alike to those of the rootstock 'Sunki' tangerine (*Citrus sunki* Hort. ex. Tan.) In order to confirm hybrids paternity, single sequence repeat (SSR) markers were used. The molecular analysis allowed to identify eleven hybrids that did not have 'Sunki' tangerine as male parent. The hybrids 49, 77 and 92, potencialy hybrids of 'Sunki', stood out for higher poliembryony, higher number of emerged seedling per seed and higher number of seeds per fruit in comparison to 'Sunki'.

Key-words: *Citrus sunki*; rootstocks; poliembryony; SSR markers.

¹ Trabalho realizado durante a pesquisa orientada, disciplina obrigatória do curso de mestrado, no Programa de Pós-Graduação em de Fitotecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

² Engenheiro Agrônomo, Mestre em Fitotecnia, Departamento de Horticultura e Silvicultura, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (RS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: robertoluisw@yahoo.com.br

³ Engenheiro Agrônomo, Mestre em Fitotecnia, Departamento de Horticultura e Silvicultura, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (RS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: edubrugnara@ibest.com.br

⁴ Engenheira Agrônoma, Doutora em Agronomia, Centro APTA Citros Sylvio Moreira, Cordeirópolis, São Paulo, Brasil. E-mail: mbastianel@centrodecitricultura.br

⁵ Engenheiro Agrônomo, Doutor em Agronomia, Centro APTA Citros Sylvio Moreira, Cordeirópolis, São Paulo, Brasil. E-mail: marcos@centrodecitricultura.br

⁶ Bióloga, Doutora em Genética, Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (RS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: mtschiff@ufrgs.br

⁷ Engenheiro Agrônomo, Doutor em Agronomia, Departamento de Horticultura e Silvicultura, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (RS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: pvdsouza@ufrgs.br

⁸ Engenheiro Agrônomo, Doutor em Agronomia, Departamento de Horticultura e Silvicultura, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Av. Bento Gonçalves, 7712, CEP 91540-000 - Porto Alegre, Rio Grande do Sul. E-mail: schwarz@ufrgs.br. Autor para correspondência.

INTRODUÇÃO

A citricultura é o principal cultivo frutícola mundial, encontrando-se dispersa em todos os continentes agricultáveis do mundo. As principais áreas de produção comercial encontram-se entre as latitudes 20° e 40° N e S, sendo o Brasil responsável por cerca de 20% da produção mundial de citros (FAO, 2008).

Os porta-enxertos aportam à planta cítrica a capacidade de adaptação aos fatores abióticos como salinidade, pH, excessos ou déficits de água no solo, tolerância ao frio, resistência ou tolerância frente aos nematóides, fungos, vírus e viróides. Ademais, influem de forma decisiva nas características da variedade copa, como vigor e tamanho da planta, produção, qualidade e época de maturação dos frutos (Castle, 1987).

No Brasil, cerca de 80% dos pomares estão plantados sobre o porta-enxerto limoeiro 'Cravo' (*Citrus limonia* Osb.), preferido pela sua característica de induzir grande vigor, maior tolerância a estresse hídrico e alta produtividade (Pompeu Júnior, 2005). O Rio Grande do Sul é o único Estado do Brasil onde predomina o porta-enxerto *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., utilizado em mais de 90% do total de mudas produzidas (Schäfer & Dornelles, 2000). No Estado de Sergipe, o limoeiro 'Rugoso' (*C. jambhiri* Lush.) divide com o 'Cravo' a primazia na maioria dos pomares (Soares Filho et al., 2008). A falta de diversificação de porta-enxertos acarreta vulnerabilidade dos pomares, com o aparecimento de novas moléstias, como ocorrido no caso da tristeza dos citros na década de 40 (Schäfer et al., 2004) e, mais recentemente, a morte súbita na região sudeste do Brasil (Jesus Júnior & Bassanezi, 2004).

Nas espécies cítricas apomíticas, os processos sexual e apomítico ocorrem simultaneamente em um mesmo óvulo (Koltunow, 1993), de forma que o embrião zigótico e os nucelares competem por nutrientes e espaço (Morais-Lino et al., 2008). Os embriões apomíticos são originários de células do tecido nucelar, parede interna do saco embrionário; daí os mesmos também serem denominados embriões nucelares (Frost & Soost, 1968). Os embriões nucelares iniciam seu desenvolvimento independentemente da fertilização, mas para que estes tenham seu desenvolvimento pleno até embriões maduros e viáveis em condições naturais de germinação, há a exigência de que o óvulo seja fertilizado (Koltunow et al., 1995).

O porta-enxerto tangerineira 'Sunki' (*C. sunki* Hort. ex. Tan) é originário do sudeste da China e é indicado como porta-enxerto para laranjeiras, tangerineiras e pomeleiros por suas características desejáveis, como: indução de boa formação de copa, tolerância a tristeza, xiloporose e declínio e tolerância a solos salinos (Castle, 1987; Pompeu Júnior, 2005). Esta variedade está sendo utilizada na citricultura brasileira como alternativa ao limoeiro 'Cravo', visando evitar a morte súbita dos citros (Jesus Júnior & Bassanezi, 2004). Por outro lado, a tangerineira 'Sunki' apresenta propriedades

indesejáveis como suscetibilidade à gomose e à exocorte (Pompeu Júnior, 2005), semente de tamanho reduzido e pequeno número de sementes viáveis por fruto.

O presente estudo teve como objetivos identificar dentro de uma população, híbridos que tenham como genitor masculino a tangerineira 'Sunki' e determinar o comportamento destes quanto ao tamanho e rendimento de sementes dos frutos, poliembrião e germinação das sementes, servindo como subsídio para novas variedades porta-enxerto para uso na citricultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Na Estação Experimental Agrônômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA/UFRGS), localizada no município de Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul (30°29'S e 51°06'W), mantém-se uma população segregante obtida a partir da polinização aberta do tangeleiro 'Lee' [*Citrus clementina* Hort. ex Tan. x (*C. tangerina* Hort. ex Tan. x *C. paradisi* Macf.)], no ano de 1990.

O clima do local é do tipo Cfa, ou seja, temperado sem estação seca definida (Köppen, 1948). As temperaturas médias anuais mínimas e máximas da região são 14 °C e 24,2 °C, respectivamente, com uma temperatura média anual de 19,6 °C. A precipitação pluviométrica média anual é de 1.398 mm e a umidade relativa do ar média anual de 79% (Mota et al., 1971).

Da população total de cerca de 250 plantas, quatorze foram selecionadas pela sua semelhança à tangerineira 'Sunki' quanto à forma (achatada) e tamanho (pequeno) dos frutos, hábito de frutificação (em pencas), sabor do fruto e aroma dos óleos essenciais da casca do fruto.

Para confirmação da paternidade dos híbridos foram realizados testes moleculares usando marcadores de DNA do tipo microssatélites no Laboratório de Biotecnologia do Centro APTA Citros Sylvio Moreira – IAC (Centro de Citricultura), Cordeirópolis/ SP, em julho e agosto de 2005.

A extração de DNA foi feita de folhas maceradas com nitrogênio líquido, utilizando a metodologia descrita por Shillito & Saul (1988), com adaptações desenvolvidas pelo Laboratório de Biotecnologia do Centro de Citricultura, utilizando-se sarcosyl 1% no tampão de extração e na etapa final, sem extração com fenol, adicionando-se a enzima RNAase para digestão do RNA, sendo a mistura mantida a uma temperatura de 37 °C por cerca de 1 h.

A quantificação de DNA foi feita em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídio, e sua concentração foi determinada por comparação com marcadores com concentração conhecida. O DNA foi mantido a uma concentração de 100 ng mm⁻³ e deixado em congelador a -20 °C.

As reações de amplificação foram feitas utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), desenvolvidos no Centro de Citricultura a partir da biblioteca de DNA genômico da laranjeira doce cv. Pêra (*Citrus sinensis* [L.] Osb.) (Novelli et al., 2006).

Um total de nove pares de *primers* foram utilizados para análise das plantas: CCSM 06 (AG)_n, CCSM 10 (AG)_n, CCSM 49 (CAA)₉, CCSM 52 (CA)₂₇, CCSM 72 (TC)₁₂, CCSM 101 (AG)₁₂, CCSM 140 (TC)₁₉, CCSM 150 (AG)₁₁N(AG)₈, CCSM 170 (GA)₂₁. As seqüências dos *primers* são apresentadas na Tabela 1. As reações foram preparadas num volume de 25 mm³, contendo 1,5 unidades da enzima Taq polimerase; 10 mmol dm⁻³ de dNTP mix (dATP, dTTP, dCTP, dGTP); 2,5 mm³ de tampão 10X (10 mmol dm⁻³ de Tris – HCl 9 pH 8,3), 50 mm³ de MgCl₂, 60 ng de cada *primer* (Direto e Reverso), 100 ng de DNA genômico e H₂O autoclavada, e realizadas em termocicladores MJ Research programados para 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 65-56 °C por 30 s e 72 °C por 5 s. A

temperatura de anelamento se iniciou a 65 °C, decrescendo até 0,3 °C a cada ciclo seguido por 3 ciclos de anelamento a 56 °C. A visualização foi feita em gel de agarose a 3,0% preparado com tampão TAE (0,04 mol dm⁻³ de Tris-acetato, 1 mmol dm⁻³ de EDTA pH 8,3), corados com brometo de etídio (0,5 µg cm⁻³) e com migração no gel por cerca de 2 h a 120 V em cubas horizontais. A visualização também foi feita em géis de poliácridamida 8% corados com nitrato de prata. Os géis de poliácridamida foram utilizados quando a diferença no tamanho dos alelos foi muito pequena (menos de 15 pb), ou quando a amplificação em gel de agarose mostrava dúvidas quanto à nitidez de bandas.

TABELA 1 – *Primers* utilizados na população analisada, suas seqüências, número (NAA) e tamanho (TAA) dos alelos amplificados e conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) de cada loco.

Primer	Seqüências dos <i>primers</i> 5' ->3'	Seqüências dos <i>primers</i> 5' ->3'	NAA	TAA (pb)	PIC
CCSM 06	atctgtgtgaggactgaa	cctctattaatgtgcctg	2	230-270	0,34
CCSM 10	gactggattagattctctg	atggatgtgttatctcactc	1	240	0,36
CCSM 49	accgatcagcagaagagg	ttgctgttgcctctgttg	2	80-95	0,45
CCSM 52	ccaagcttcccgggtaccgc	agtgtgtcggaaattcggc	4	60-95	0,72
CCSM 72	cacatgctagctgattcg	aaaatgcaatcacaacc	2	80-90	0,12
CCSM 101	tgtgattactgattattg	ctactgtatgtgctcct	1	110	0,44
CCSM 140	gtgattagatgtgtgagg	attatggatgattgtaatac	1	90	0,34
CCSM 150	tcagacaatgtgttagagag	tcggtgtcactctgtatc	2	130-170	0,40
CCSM 170	agttgagtactgtgtgcgaa	ctaattggctgagagagttgc	2	170-195	0,41

Foi calculado o Conteúdo de Informação de Polimorfismo (PIC), para cada loco, o que fornece uma estimativa do poder discriminante (ou o poder de discriminação) do marcador. Para calcular o PIC, obteve-se as freqüências alélicas através de contagem direta no gel de revelação e aplicou-se na equação $PIC = 1 - \sum p_i^2$, onde p_i é a freqüência do alelo i na população.

A seleção dos possíveis filhos da tangerineira 'Sunki' foi feita por exclusão dos híbridos que não apresentaram o alelo desta variedade. Neste caso, a tangerineira 'Sunki' possivelmente homocigota para um alelo A e o tangeleiro 'Lee' homocigoto para um alelo B, como observado na Figura 1 e 2, obrigatoriamente sua F1 precisa apresentar heterocigose naquele loco, apresentando AB. Desta forma, plantas que não apresentaram ambos os alelos AB, foram consideradas filhas de outro pai e não da 'Sunki'. Paralelamente, plantas da progênie que apresentaram alelos diferentes dos presentes em 'Sunki' e 'Lee' foram eliminados do grupo de possíveis filhos da 'Sunki'. Para exclusão de uma planta foram utilizadas concomitantemente pelo menos dois *primers*.

Em junho de 2004 e de 2005, frutos das plantas selecionadas pela morfologia foram colhidos. A colheita foi realizada em dois anos, pelo fato de nem todas as plantas apresentarem o número suficiente de frutos para as análises em cada safra, já que as plantas são mantidas em pés de francos e nenhum tipo de raleio de frutos foi realizado tentando diminuir o efeito da alternância de produção, justamente para avaliar o comportamento fisiológico das mesmas.

Destes frutos foi medido o diâmetro, a altura, a massa, e feita a contagem do número de sementes (sementes chochas foram desprezadas). As sementes foram extraídas e mantidas por quatro dias submersas no próprio suco para fermentação e extração da mucilagem. Após esse procedimento, foram lavadas em água e secas à sombra. Quando secas, as sementes foram tratadas com oxicleto de cobre para controlar ataque de fungos, foram embaladas em sacos plásticos e mantidas em geladeira (4 °C). Em janeiro de 2005 as sementes dos frutos colhidos em 2004 foram postas a germinar, o mesmo se procedendo em outubro de 2005 com as sementes colhidas naquele ano.

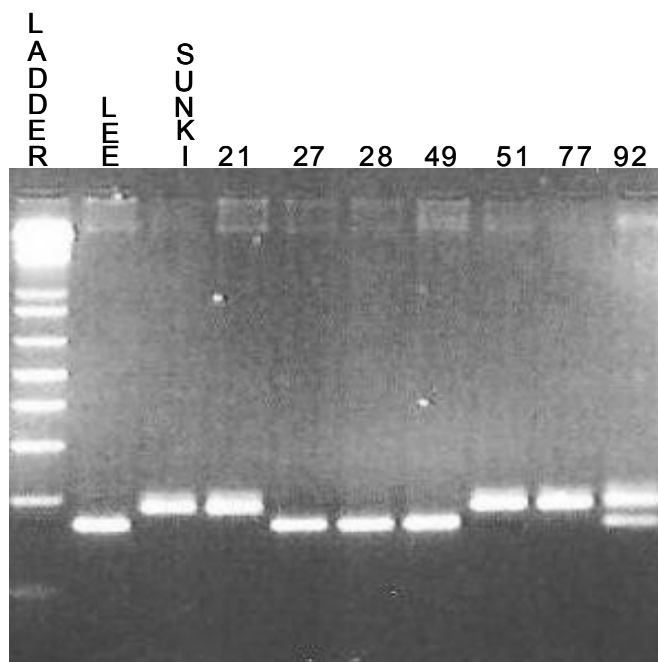


FIGURA 1 – Foto do gel amplificado com o *primer* CCSM 170: na primeira canaleta o marcador Ladder de 100 pb, na seqüência o genitor feminino 'Lee', a tangerineira 'Sunki' e as plantas 21, 27, 28, 49, 51, 77, 92 do estudo.

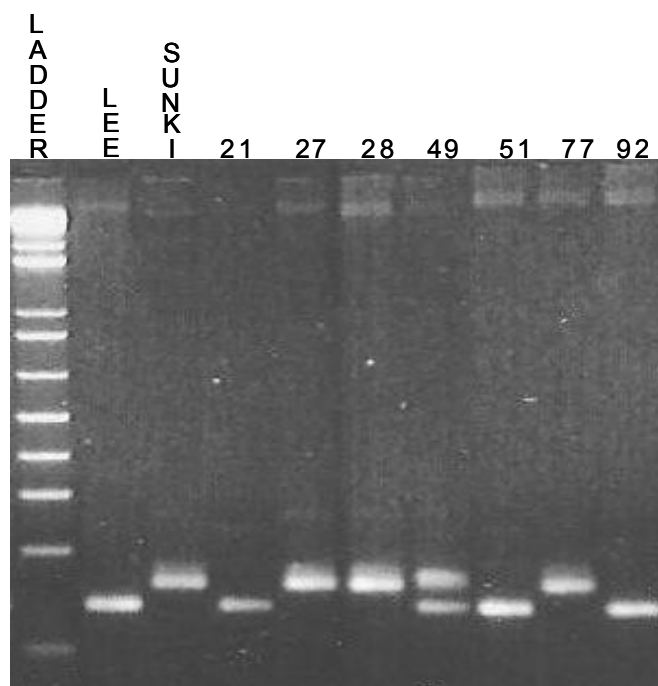


FIGURA 2 – Foto do gel amplificado com o *primer* CCSM 150: na primeira canaleta o marcador Ladder de 100 pb, na seqüência o genitor feminino 'Lee', a tangerineira 'Sunki' e as plantas 21, 27, 28, 49, 51, 77, 92 do estudo.

Para cada planta a ser avaliada foram postas a germinar 200 sementes em bandejas de isopor de 200 alvéolos (uma semente por alvéolo) diretamente em substrato composto de casca de arroz carbonizada, casca de acácia-negra (material semidecomposto após extração de tanino), areia e Argissolo Vermelho Distrófico na proporção de

0,33:0,22:0,22:0,22, respectivamente, a uma profundidade de cerca de 1,5 cm, e mantidas em sistema de irrigação do tipo *floating* por 62 dias em casa de vegetação do Laboratório de Biotecnologia em Horticultura da Faculdade de Agronomia da UFRGS. Ao fim do 62º dia fez-se a contagem do número de sementes germinadas e do número de

plantas emergidas por semente germinada (NPE). Arrancaram-se as plantas para contagem com o intuito de evitar erros devidos a bifurcação de plantas.

Para contagem do número de embriões por semente (NES), 50 sementes de cada genótipo, tomadas ao acaso, foram descascadas cuidadosamente, com auxílio de pinça de relojoaria e agulha histológica, e os embriões foram contados ao microscópio estereoscópico de 20 aumentos. O número de sementes por fruto, assim como, o número de embriões e número de plântulas emergidas por semente foram comparados com os de 'Sunki', referentes ao mesmo ano, pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir de nove pares de *primers* de microssatélites polimórficos entre 'Lee' e 'Sunki' foram avaliados 9 locos e 17 alelos. Os *primers* utilizados amplificaram de 1 a 4 alelos por *primer*, destacando-se o CCSM 52 que apresentou o maior PIC: 0,72. O número de alelos amplificados por *primer*, o tamanho dos fragmentos e o PIC são apresentados na Tabela 1. Os valores de PIC encontrados foram, em geral, mais altos que os observados por Corazza-Nunes et al. (2002) em *C. paradisi* Macf. e *C. maxima* (Burm.) Merr., e semelhantes aos encontrados por NOVELLI et al. (2006) em *C. sinensis* L. Osb., com exceção do CCSM 72, que teve um PIC de apenas 0,12, e do CCSM 52, que teve um valor bastante elevado. Essas diferenças são esperadas já que tratam-se de populações e *primers* diferentes.

Os dados gerados permitiram identificar que onze dos quatorze híbridos pré-selecionados (21, 27, 28, 51, 93, 99, 154, 196, 232, 276 e 292)

não são filhos da tangerineira 'Sunki'. Naturalmente, o procedimento não permitiu inferir que as plantas número 49, 77 e 92 sejam filhas da 'Sunki', já que alelos iguais aos encontrados neste pai podem ter sido herdados de outros pais durante a polinização da 'Lee', que não foi controlada. Análise mais conclusiva poderia ser feita se a totalidade dos possíveis genitores masculinos pudesse ser acessada, mas, vários desses acessos (ou genótipos) já não se encontram mais na coleção de citros da EEA/UFRGS. Grattapaglia et al. (2004) usaram marcadores microssatélites para testar paternidade em eucalipto e a técnica se mostrou eficiente na identificação dos genitores masculinos da progênie avaliada, apontando a existência de pais não identificados que, provavelmente, não pertenciam à população em estudo.

É desejável que um porta-enxerto tenha o máximo possível de sementes por fruto, sendo necessário um menor número de frutos para obter o número almejado de plantas. Os genótipos dos possíveis filhos da tangerineira 'Sunki' avaliados apresentaram um número maior de sementes por fruto comparado com o porta-enxerto 'Sunki', que apresentou 3,40 e 4,45 sementes por fruto nos anos 2004 e 2005, respectivamente, número semelhante ao obtida por Soares Filho et al. (2000), de 5,1 sementes por fruto. No caso do genótipo 49, avaliado neste trabalho, apresentou uma média de 10,35 sementes por fruto (Tabela 2). Algumas seleções da tangerineira 'Sunki', como 'Maravilha' e 'Tropical', apresentam número de sementes por fruto igual a 7,7 e 18,7, respectivamente (Soares Filho et al., 2003). A polinização cruzada pode ser um fator de variação do número de sementes por fruto, o que, juntamente com as causas genéticas, pode explicar as diferenças citadas.

TABELA 2 - Características dos frutos de 4 genótipos de *Citrus* sp. da Estação Experimental Agrônômica da UFRGS, 2004/05

Ano	Planta	Massa (g)	Nº Sementes Viáveis/ Fruto
2004	77	38,80	08,70**
	Sunki	16,93	03,40
2005	49	36,28	10,35**
	92	30,54	06,35*
	Sunki	11,60	04,45

** Diferença em relação à Sunki significativa dentro do ano (Teste de Kruskal-Wallis - $p < 0,0001$)

* Diferença em relação à Sunki significativa dentro do ano (Teste de Kruskal-Wallis - $p = 0,0334$)

Obs. As plantas 49 e 92 não foram avaliadas no ano de 2004, assim como a planta 77 não foi avaliada no ano de 2005, pois nestes anos não houve produção destes híbridos por causa da alternância de produção, pois cada híbrido é representado por um indivíduo.

As sementes de todos os híbridos avaliados neste estudo apresentaram um NES maior que o porta-enxerto 'Sunki'. A tangerineira 'Sunki' apresentou número máximo de três embriões em uma mesma semente, enquanto que o híbrido 92 apresentou oito. Para porta-enxertos é desejável alta taxa de poliembrião, pois possibilita a obtenção de várias plantas a partir de uma mesma semente e de constituição genética idêntica

à planta de origem (embriões de origem nucelar). A porcentagem de sementes poliembriônicas na tangerineira 'Sunki' foi 22% e 18% para os anos 2004 e 2005, respectivamente. Os híbridos 49 e 92 apresentaram 98% de sementes poliembriônicas (Tabela 3). Diferenças na poliembrião entre e dentre variedades podem ocorrer por causas ambientais, como a polinização artificial (Ramos & Pasqual, 1992), e genéticas (Moreira & Gurgel,

1941; Soares Filho et al., 2003). Soares Filho et al. (2000) determinaram o número de embriões em 'Sunki', que variou de 1 a 13, com média de 1,3. Essa média é muito semelhante à de 1,24, obtida neste trabalho, porém, bastante distante do número máximo de três embriões por semente aqui identificado (Tabela 3). Em estudo posterior,

Soares Filho et al. (2003) avaliaram diferentes seleções de tangerineira 'Sunki', obtendo resultados semelhantes ao encontrado no presente trabalho ao avaliarem material que denominaram de Sunki comum, com média de 1,3 embriões por semente e número máximo de 4 embriões por semente.

TABELA 3 - Média de embriões por semente e frequência relativa de sementes com 1 a 8 embriões em 4 genótipos de *Citrus* sp. da Estação Experimental Agronômica da UFRGS, 2004/05.

Ano	Planta	Embriões por semente								
		Média	Frequência relativa (%)							
			1	2	3	4	5	6	7	8
2004	77	2,86**	4	40	28	24	2	2	0	0
	Sunki	1,22	78	22	0	0	0	0	0	0
2005	49	4,06 **	2	10	24	28	20	12	4	0
	92	4,02 **	2	14	26	22	16	16	2	2
	Sunki	1,26	78	18	4	0	0	0	0	0

** Diferença em relação à Sunki significativa dentro do ano (Teste de Kruskal-Wallis - $p < 0,0001$)

Os genótipos 49, 77 e 92 tiveram germinação superior ao da 'Sunki', sendo que esta teve 79,5% e 78% de germinação nos anos de 2004 e 2005, respectivamente. Já no genótipo 77 a germinação foi de 94,5% (Tabela 4). Ocorrem diferenças entre genótipos no tempo necessário

para germinação das sementes, conforme observado por Soares Filho et al. (2003) e Schäfer et al. (2005). Porém, considera-se 62 dias tempo suficiente para que sementes de citros germinem em temperaturas superiores a 20 °C.

TABELA 4 - Porcentagem de germinação (G), número médio de plântulas emergidas por semente (NPE) e frequência relativa de sementes com emergência de 1 a 8 plântulas em 4 genótipos de *Citrus* sp. da Estação Experimental Agronômica da UFRGS, 2004/05.

Ano	Planta	G (%)	NPE								
			Média	Frequência relativa (%)							
				1	2	3	4	5	6	7	8
2004	77	94,5	1,78**	39,17	47,08	11,64	2,11	0	0	0	0
	Sunki	79,5	1,07	93,00	7,00	0	0	0	0	0	0
2005	49	89,0	1,38 **	64,04	33,71	2,35	0	0	0	0	0
	92	89,0	1,65 **	48,88	38,76	10,67	1,69	0	0	0	0
	Sunki	78,0	1,01	98,72	1,28	0	0	0	0	0	0

** Diferença em relação à Sunki significativa dentro do ano (Teste de Kruskal-Wallis - $p < 0,0001$)

Das sementes que originaram mais de uma planta certamente emergiu pelo menos uma plântula de origem nucelar, que é um clone. Segundo Frost & Soost (1968) embriões apomíticos geralmente são mais vigorosos. Neste caso, seria possível selecionar os clones através da eliminação das plântulas menos vigorosas. Contudo, Soares Filho et al. (2000) observaram pronunciada concentração de embriões zigóticos na classe de maior tamanho em sementes com baixa a moderada poliembrião.

Os híbridos 49, 77 e 92 destacaram-se por superarem a tangerineira 'Sunki' em todos os parâmetros de propagação avaliados, ou seja, número de sementes por fruto, número de embriões por semente e número de plântulas emergidas por semente. Espera-se dos híbridos aqui selecionados, que além de sua melhor aptidão à propagação

clonal em relação a tangerineira 'Sunki', tenham herdado desta as características de indução de boa formação de copa, tolerância à tristeza, xiloporose, declínio e morte súbita, o que será avaliado no futuro.

CONCLUSÕES

Nas condições do presente experimento conclui-se, que:

Da população de híbridos avaliada, as plantas 21, 27, 28, 51, 93, 99, 154, 196, 232, 276 e 292 não têm a tangerineira 'Sunki' como parental masculino.

Os híbridos 49, 77 e 92 apresentam melhor aptidão para propagação clonal via sementes que a tangerineira 'Sunki'.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Centro APTA Citros Sylvio Moreira pelo auxílio na análise molecular, à

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas concedidas.

REFERÊNCIAS

1. CASTLE, W. S. Citrus rootstocks. In: ROM, R.C.; CARLSON, R.F. (Ed.) **Rootstocks for fruits crops**. New York: John Wiley, 1987. p. 361-399.
2. CORAZZA-NUNES, M. J. et al. Assessment of genetic variability in grapefruits (*Citrus paradisi* Macf.) and pummelos (*C. maxima* (Burm.) Merr.) using RAPD and SSR markers. **Euphytica**, v. 126, n. 2, p. 169-176, 2002.
3. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) **Dados agrícolas de FAOSTAT**. Roma, 2008. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 07 julho 2008.
4. FROST, H. B.; SOOST, R. K. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L. D.; WEBBER, H. J. (Ed.). **The Citrus Industry**. Berkeley: University of California, 1968. v.2, p. 290-324.
5. GRATTAPAGLIA, D.; RIBEIRO, V. J.; REZENDE, G. D. Retrospective selection of elite parent trees using paternity testing with microsatellite markers: an alternative short term breeding tactic for Eucalyptus. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 109, n. 1, p. 192-199, 2004.
6. JESUS JÚNIOR, W. C. de; BASSANEZI, R. B. Análise da dinâmica e estrutura de focos da morte súbita dos citros. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 399-405, 2004.
7. KÖEPPEN, W. **Climatologia**. Cidade do México: Fondo de Cultura Econômica, 1948. 478 p.
8. KOLTUNOW, A. M. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **The Plant Cell**, v. 5, n. 10, p. 1425-1437, 1993.
9. KOLTUNOW, A. M. et al. Anther, ovule, seed and nucellar embryo development in *Citrus sinensis* cv. Valencia. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, n. 10, p. 1567-1582, 1995.
10. MORAIS-LINO, L. S. et al. Adequação de nutrientes do meio MT para o cultivo de embriões imaturos de tangerineira 'Cleópatra'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 1-6, 2008.
11. MOREIRA, S.; GURGEL, J. T. A. A fertilidade do pólen e sua correlação com o número de sementes em espécies e formas do gênero *Citrus*. **Bragantia**, v. 1, n. 11-12, p. 669-711, 1941.
12. MOTA, F. S.; BEIRSDORF, M. I. C.; GARCEZ, J. R. B. **Zoneamento agroclimático do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**: normais agroclimáticos. Porto Alegre: Ministério da Agricultura - Instituto de Pesquisa Agropecuária do Sul, 1971. 80 p. (Circular, 50).
13. NOVELLI, V. M. et al. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for the sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 90-96, 2006.
14. POMPEU JÚNIOR, J. Porta-enxertos. In: MATTOS JÚNIOR, D. de; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônomo/ Fundag, 2005. p. 61-104.
15. RAMOS, J. D.; PASQUAL, M. Alterações na poliembrião e identificação do híbrido em sementes de limão 'Cravo' obtidas de cruzamentos com *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, n. 3, p. 423-427, 1992.
16. SCHÄFER, G.; BASTIANEL, M.; DORNELLES, A. L. C. Diversidade genética de porta-enxertos baseada em marcadores moleculares RAPD. **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1437-1442, 2004.
17. SCHÄFER, G.; DORNELLES, A. L. C. Produção de mudas cítricas no Rio Grande do Sul: diagnóstico da região produtora. **Ciência Rural**, v. 30, n. 4, p. 587-592, 2000.
18. SCHÄFER, G. et al. Substratos na emergência de plântulas e expressão da poliembrião em porta-enxertos de citros. **Ciência Rural**, v. 35, n. 2, p. 471-474, 2005.
19. SHILLITO, R. D.; SAUL, M. W. Protoplast isolation and transformation. In: SHAW, C.H. (Ed.) **Plant Molecular biology**: a practical approach. Oxford: IRL Press, 1988. p. 161-185.
20. SOARES FILHO, W. S. et al. 'Maravilha': uma nova seleção de tangerina 'Sunki'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 2, p. 268-271, 2003.
21. SOARES FILHO, W. S. et al. Potencial de obtenção de novos porta-enxertos em cruzamentos envolvendo limoeiro 'Cravo', laranja 'Azeda', tangerineira 'Sunki' e híbridos de *Poncirus trifoliata*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 223-228, 2008.
22. SOARES FILHO, W. S. et al. Poliembrião e frequência de híbridos em *Citrus* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 4, p. 857-864, 2000.

Recebido em 26/08/2008
Aceito em 13/08/2009

