

# Caracterização morfológica, determinação do nível de ploidia e viabilidade do pólen de uma progênie de tangerineira 'Clementina Fina' e 'Montenegrina'

Roberto Luis Weiler <sup>(1)</sup>; Eduardo Cesar Brugnara <sup>(1,2)</sup>; Divanilde Guerra <sup>(1)</sup>; Maria Teresa Schifino-Wittmann <sup>(1)</sup>; Sergio Francisco Schwarz <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Av. Bento Gonçalves, 7712, 91540-000 Porto Alegre (RS).

<sup>(2)</sup> Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Centro de Pesquisa para Agricultura Familiar, Caixa Postal 791, 88965-970 Chapecó (SC).

(\*) Autor correspondente: schwarz@ufrgs.br

Recebido: 16/set./2010; Aceito: 4/mar./2011

## Resumo

As plantas cítricas possuem ampla variação morfológica e citogenética. Neste contexto, análises dessas plantas podem auxiliar na identificação de materiais mais promissores para cruzamentos. Uma população de tangerineiras híbridas oriundas do cruzamento das tangerineiras 'Clementina Fina' (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) e 'Montenegrina' (*Citrus deliciosa* Ten.) foi avaliada segundo características morfológicas, época de maturação, número cromossômico e viabilidade de pólen. Foi possível distinguir as 94 plantas da progênie e os genitores através dos dados morfológicos. Verificou-se uma alteração no período de maturação dos frutos nas plantas híbridas. Todas as plantas avaliadas são diplóides com um número cromossômico de  $2n=18$ , bem como, alto grau de viabilidade de pólen, variando entre 79,0% e 98,1%.

Palavras-chave: *Citrus*, marcadores morfológicos, número cromossômico, viabilidade do pólen.

## Morphological characterization, determination of ploidy level and pollen viability of a progeny of tangerines 'Clementina Fina' and 'Montenegrina'

### Abstract

Citrus plants show morphological and cytogenetic variability and these characteristics can be useful to identify the materials for hybridization. A population of hybrid tangerines, originated from the cross between 'Clementina Fina' (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) as female and 'Montenegrina' (*Citrus deliciosa* Ten.) as male parents, was characterized using morphological traits, maturation period, chromosome number and pollen viability. It was possible to distinguish the 94 plants of the progeny and the parents by morphological traits. The time of fruit ripening of the hybrid extended from the beginning of April until the end of August. All plants analyzed are diploid with a chromosome number of  $2n = 18$  and presented high pollen viability, varying from 79.0% to 98.1%.

Key words: *Citrus*, morphological markers, chromosome number and pollen viability.

## 1. INTRODUÇÃO

A citricultura é o principal cultivo frutícola mundial. Em 2007, a produção mundial foi de, aproximadamente, 110 milhões de toneladas, sendo o Brasil responsável por cerca de 19%, com aproximadamente 21 milhões de toneladas (FAO, 2009). As tangerinas são responsáveis por cerca de 6% da produção nacional (IBGE, 2008), sendo o Rio Grande do Sul o terceiro maior Estado produtor.

Apesar de serem muito utilizados comercialmente, os citros possuem taxonomia muito complexa, prin-

cipalmente com relação ao número de espécies que constituem o gênero *Citrus* e gêneros relacionados. A dificuldade de se obter um sistema de nomenclatura para o gênero *Citrus* deve-se, principalmente, à facilidade de hibridação interespecífica e intergenérica, resultando em híbridos férteis ou parcialmente férteis; à frequência com que ocorre poliembrião neste grupo e à ocorrência da apomixia em muitas espécies (DAVIES e ALBRIGO, 1994).

As plantas cítricas pertencem à família Rutaceae, subfamília Aurantioideae, geralmente são diplóides, com  $2n=2x=18$  cromossomos, mas também ocor-

rem triploídes,  $2n=3x=27$  cromossomos, e tetraploídes,  $2n=4x=36$  cromossomos (KOLLER, 1994; GUERRA et al., 1997). Desta subfamília, o gênero *Citrus* é o mais importante economicamente, com alta diversidade de espécies, cultivares e clones. A variabilidade genética em *Citrus* é relacionada, além do alto número de unidades taxonômicas (espécies e híbridos), à ocorrência frequente de mutações somáticas que resultam em variações, a partir das brotações onde ocorreram (COLETTA FILHO et al., 1998). Os estudos com grão de pólen podem contribuir, por exemplo, para a taxonomia (RODRIGUES et al., 1999), mas são especialmente importantes para determinação da fertilidade masculina (AGARWAL, 1989).

Caracteres como a estrutura da planta, flores, frutos e folhas são utilizados por diversos autores para descrever e caracterizar variedades distintas de tangerineiras e híbridos (DOMINGUES et al., 1999). A caracterização morfológica consiste na adoção de descritores botânicos herdáveis, facilmente visíveis e mensuráveis, que, a princípio, são expressos em todos os ambientes (IBPGR, 1988). Esse tipo de análise é mais simples e de menor custo, embora com limitações relacionadas aos caracteres que representam herança aditiva, os quais são altamente influenciados pelo ambiente, e às cultivares com grande semelhança fenotípica (OLIVEIRA et al., 2000). Mesmo assim essa técnica é utilizada internacionalmente, conseguindo, em certos casos, discriminar até mesmo materiais vegetais, que não são passíveis de discriminação através de marcadores bioquímicos ou moleculares.

A citogenética compreende o estudo relativo ao cromossomo isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, no que diz respeito à morfologia, organização, função e replicação bem como sua variação e evolução (GUERRA, 1988).

A citogenética assume papel importante em programas de melhoramento genético de plantas, pois através dos estudos citogenéticos é possível determinar o número cromossômico, nível de ploidia, comportamento cromossômico na meiose e na mitose, fertilidade do grão de pólen, auxiliando na identificação de materiais que possam ser utilizados em cruzamentos dirigidos (SYBENGA, 1993; 1998).

Na primavera de 1993, foram realizados cruzamentos entre as tangerineiras cv. Clementina Fina (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) e cv. Montenegrina (*Citrus deliciosa* Ten.), através de polinização dirigida. As sementes obtidas dos cruzamentos foram colhidas e cultivadas em 1994 através de semeadura *in vitro* em laboratório. Não foram realizados testes para confirmação de paternidade, pois a tangerineira Clementina Fina é monoembriônica, sendo os cruzamentos controlados com emasculação na fase que as flores estavam em botão com mais de 8 mm de diâmetro (em pré-antese), polinização com pólen do genitor masculino desejado e ensacamento individual de cada flor por dez dias para evitar contaminação com polens de ou-

tras plantas trazidos pelo vento ou por insetos. O pólen utilizado veio de flores que haviam sido ensacadas antes de sua abertura e foi coletado no momento da polinização a partir de flores plenamente abertas. No ano de 1995 as respectivas mudas foram para o campo, no total de 94 plantas. As plantas permaneceram de “pé franco”, ou seja, não foram enxertadas, para que o porta-enxerto não fosse responsável por imprimir as suas características e mascarar as características dos híbridos.

O presente trabalho teve como objetivo determinar as características morfológicas e citogenéticas da população de 94 plantas de tangerineiras híbridas de ‘Clementina Fina’ (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.), como genitor feminino e ‘Montenegrina’ (*Citrus deliciosa* Ten.), como genitor masculino.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

As 94 plantas utilizadas neste estudo, mais as plantas genitoras ‘Clementina Fina’ (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) e ‘Montenegrina’ (*Citrus deliciosa* Ten.), estão localizadas no município de Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil, à latitude de 30°29’S e longitude de 51°06’W. Para a caracterização morfológica dos híbridos, as plantas foram analisadas, em 2005, quanto a formato, altura, densidade de ramos, diâmetro do tronco, comprimento e formato dos espinhos, de acordo com o descrito no International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR, 1988) (Figura 1). As folhas, no total de 20 por planta, coletadas cinco em cada quadrante, foram analisadas quanto ao tipo, cor, comprimento de pecíolo em relação ao limbo, pecíolo alado, forma do pecíolo, forma do limbo, formato da margem, comprimento total (limbo mais pecíolo) e largura. As características avaliadas nos frutos foram forma, formato da base, formato do ápice, superfície da casca, aderência do epicarpo ao mesocarpo, visibilidade das glândulas de óleo, cor do mesocarpo (albedo), aderência entre gomos, número de sementes, número de gomos por fruto, peso, altura e diâmetro. Foram avaliados 10 frutos por planta, sendo coletados cinco frutos de cada lado das plantas da linha.

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o sistema de taxonomia numérica e multivariada ‘Numerical Taxonomic and Multivariate Analysis System’ (NTSYS) – versão 2.1 (ROHLF, 2000). Foi utilizada a metodologia de análise de medições qualitativas e quantitativas misturadas proposta por GOWER (1971), através do programa ‘Multiv’ dados são transformados para então serem transportados para o programa (NTSYS). Um dendograma foi construído pelo método de agrupamento através da média aritmética ‘Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average’ (UPGMA).

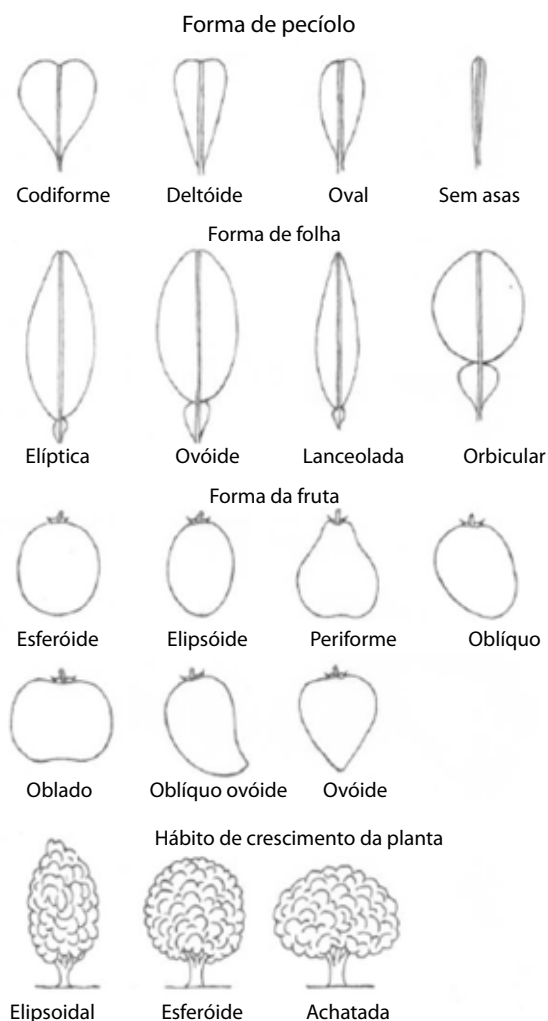
Avaliou-se a época de maturação dos frutos das plantas que produziram (80 plantas) de 2003 a 2005. Foram

considerados dentro do padrão de comercialização, os que tinham, no mínimo, 40% de suco do volume total, e relação entre a quantidade de sólidos solúveis totais e a acidez total titulável (SST/ATT) entre 8 e 16 (SARTORI et al., 1998). Os frutos foram coletados quinzenalmente a partir da data em que iniciavam a mudança de cor da casca. As análises de suco foram feitas em até três dias após a data de colheita, sendo os frutos mantidos em câmara de conservação à temperatura em torno de 4 °C. O suco foi extraído com espremedor elétrico e a massa de suco determinada pela diferença entre a massa total de cada amostra de frutos e a massa do bagaço. A porcentagem de suco foi determinada relacionando a massa de suco extraído com a massa de cada amostra. O teor de SST foi obtido por refratometria (modelo 2WAJ ABBE REFRACTOMETER). A leitura obtida foi expressa em porcentagem (%) de sólidos solúveis totais no suco. A acidez total titulável (ATT) foi avaliada por titulação com hidróxido de sódio (NaOH), até pH 8,1, empregando-se uma amostra de 6 ml de suco diluído em água destilada (50 ml). Utilizou-se um medidor de pH (Digimed DM-20), provido de um termocompensador. O cálculo do teor de acidez foi realizado utilizando-se a seguinte fórmula  $A = (V \times N \times 0,064 \times 100) / G$  (AOAC, 2002), em que A = acidez total em gramas % de ácido cítrico; V = volume de hidróxido de sódio gasto na titulação, em ml; N = normalidade do NaOH; 0,064 = fator para expressar a acidez em ácido cítrico, em mEq; G = massa da amostra. A relação SST/ATT foi obtida a partir das determinações anteriormente realizadas para sólidos solúveis totais (SST) e para acidez titulável total (ATT).

Para o desenvolvimento das análises citogenéticas foram coletados botões florais entre 2 e 9 mm, os menores para análise de número cromossômico em células-mãe-de-pólen e os maiores para estimar a viabilidade dos grãos de pólen (RODRIGUES et al., 1999), das 52 plantas da progênie que floresceram em 2004. A fixação foi feita imergindo os botões florais imediatamente, no campo, em solução à base de três partes de álcool etílico absoluto e uma parte de ácido acético glacial. Os frascos foram mantidos em temperatura ambiente por 24 horas; após esse período o material foi transferido para álcool 70% e mantido sob refrigeração até a análise.

Para a determinação do número cromossômico, a partir dos botões florais com diâmetro de 2 a 3 mm, as anteras foram separadas, partidas e coradas com carmim propiônico 2%, esmagando-se o material com espátula, colocando-se a lamínula e pressionando-a a fim de permitir bom espalhamento dos cromossomos. As fases que tiveram especial atenção para as configurações cromossômicas foram a metáfase I e disjunção em anáfase I e II.

Para a análise de viabilidade dos grãos de pólen, foram utilizados botões florais com diâmetro superior a 8 mm e as lâminas, confeccionadas com as anteras de dois botões, as quais foram coradas com carmim propiônico 2%. Fo-



**Figura 1.** Exemplos de descritores morfológicos utilizados nas avaliações de uma população de híbridos oriunda do cruzamento entre as tangerineiras ‘Clementina Fina’ e ‘Montenegrina’. (Adaptado de IBPGR, 1988).

ram avaliadas quatro lâminas por planta, com contagem mínima de 1000 grãos de pólen por planta, considerando-se como férteis os grãos cheios e bem corados, e como estéreis os enrugados e/ou incolores. Avaliou-se também a incidência de grãos de pólen maiores, chamados de macropolens, os quais poderiam ser indícios de gametas não reduzidos (2n).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quanto às características morfológicas, observou-se 41% das plantas o formato elipsóide, 54% esferóide e 5% eram achatadas (‘Clementina Fina’ e ‘Montenegrina’ - formato esferóide); quanto à densidade de ramos, em 8% das plantas tinham ramos esparsos e 92% ramos densos (‘Clementina Fina’ e ‘Montenegrina’ - ramos densos). A altura variou de 1,30 (plantas E07) a 4,10 m (planta G01)

(‘Clementina Fina’ - 3,2 m e ‘Montenegrina’ - 2,4 m), e quanto à circunferência do tronco, as plantas tinham de 15,0 (planta F04) a 46,5 cm (planta F31) (‘Clementina Fina’ - 34 cm e ‘Montenegrina’ - 28 cm).

O comprimento médio dos espinhos variou de 1,0 a 4,59 cm (plantas E29 e G35 respectivamente); nas plantas E17, F04 e G14 não havia espinhos, mesmo sendo de “pé franco”. Em todas as plantas com espinhos, os mesmos tiveram formato retilíneo.

Analisando o tipo de folha, em todas as plantas notaram-se folhas simples, o que é uma característica das tangerineiras, além de pecíolo curto em relação ao comprimento da folha, e não alado. Para cor, 14% das plantas tinham folhas com coloração verde clara, 54% verde e 32% verde escuras (‘Clementina Fina’ - verde-clara e ‘Montenegrina’ - verde).

Quanto ao formato das folhas, em 76% das plantas observaram-se folhas elipsóides, 9% ovóides, 2% circulares e 13% lanceoladas (‘Clementina Fina’ - elipsóide e ‘Montenegrina’ - lanceolada). Quanto à borda, 66% das plantas tinham folhas com as bordas dentadas, 7% lisas e 27% com as bordas onduladas (‘Clementina Fina’ - ondulada e ‘Montenegrina’ - dentada). Quanto ao comprimento, as médias das folhas variaram de 4,57 até 14,48 cm (‘Clementina Fina’ - 7,87 cm e ‘Montenegrina’ - 7,24 cm). Quanto à largura foram encontradas folhas com média de 1,61 até 4,39 cm, nas plantas E07 e G36 respectivamente (‘Clementina Fina’ - 2,97 cm e ‘Montenegrina’ - 2,42 cm).

Quanto aos frutos, 40% eram de formato esférico e 60% achatado (‘Clementina Fina’ - esférico e ‘Montenegrina’ - achatado); 35% com base achatada, 35% convexa e 30% mamiliforme (‘Clementina Fina’ - mamiliforme e ‘Montenegrina’ - convexo); em 56% dos frutos analisados ápices eram retilíneos e 44% convexos (‘Clementina Fina’ - retilíneo e ‘Montenegrina’ - convexo); 58% tinham casca lisa, 40% levemente rugosa e 2% rugosa (‘Clementina Fina’ e ‘Montenegrina’ - casca lisa); 45% dos frutos possuía aderência mínima do mesocarpo ao endocarpo, 38% moderada e 17% firme, (‘Clementina Fina’ - moderada e ‘Montenegrina’ - mínima) implicando esta variável na facilidade de descascar a tangerina; em 45% dos frutos as glândulas de óleo da casca estavam quase imperceptíveis, 42% visíveis e 13% salientes (‘Clementina Fina’ e ‘Montenegrina’ - glândulas de óleo da casca quase imperceptíveis).

Em todas as plantas avaliadas o mesocarpo (albedo) era da cor branca; 45% dos frutos tinham mínima aderência entre gomos, 50% aderência moderada e 5% alta (‘Clementina Fina’ - aderência moderada e ‘Montenegrina’ - aderência mínima); o número médio de gomos por fruto variou de 8,4 a 12,0 para as plantas F43 e F39 respectivamente (‘Clementina Fina’ - 9,5 e ‘Montenegrina’ - 9,2); o número médio de sementes ficou entre 1,0 e 33 sementes por fruto para as plantas E 21 e F38 respectiva-

mente (‘Clementina Fina’ - 9,2 e ‘Montenegrina’ - 10,4). É importante destacar que as plantas não estão isoladas de outros pomares podendo ocorrer polinização cruzada. A massa média dos frutos ficou entre 42,6 e 165,8 g, para as plantas G22 e E14 respectivamente (‘Clementina Fina’ - 97,3 g e ‘Montenegrina’ - 81,7 g); o diâmetro dos frutos ficou entre 3,71 e 7,20 cm, para as plantas F15 e F20 respectivamente (‘Clementina Fina’ - 6,32 cm e ‘Montenegrina’ - 5,26 cm) e a altura dos frutos ficou entre 2,82 e 6,23 cm, para as plantas F15 e F30 respectivamente (‘Clementina Fina’ - 5,24 cm e ‘Montenegrina’ - 4,35 cm).

A partir de todos os dados morfológicos analisados, foi construído um dendograma de similaridade (Figura 2). Neste agrupamento observa-se que as plantas E09, E19, E18, E28, G30, G36, G39 e F25 foram as que ficaram mais próximas morfológicamente ao genitor masculino ‘Montenegrina’, com uma similaridade de 36 a 45%. A planta E20 é a que mais se assemelha ao genitor feminino ‘Clementina Fina’, mesmo assim somente com uma similaridade em torno de 37%. As plantas F06, G01 e G14 formaram um grupo que se distingue de todas as outras plantas, tendo uma similaridade com o restante do grupo de apenas 25%. A similaridade média do grupo foi muito baixa, em torno de 35%. Foi possível uma distinção de todas as plantas através de marcadores morfológicos.

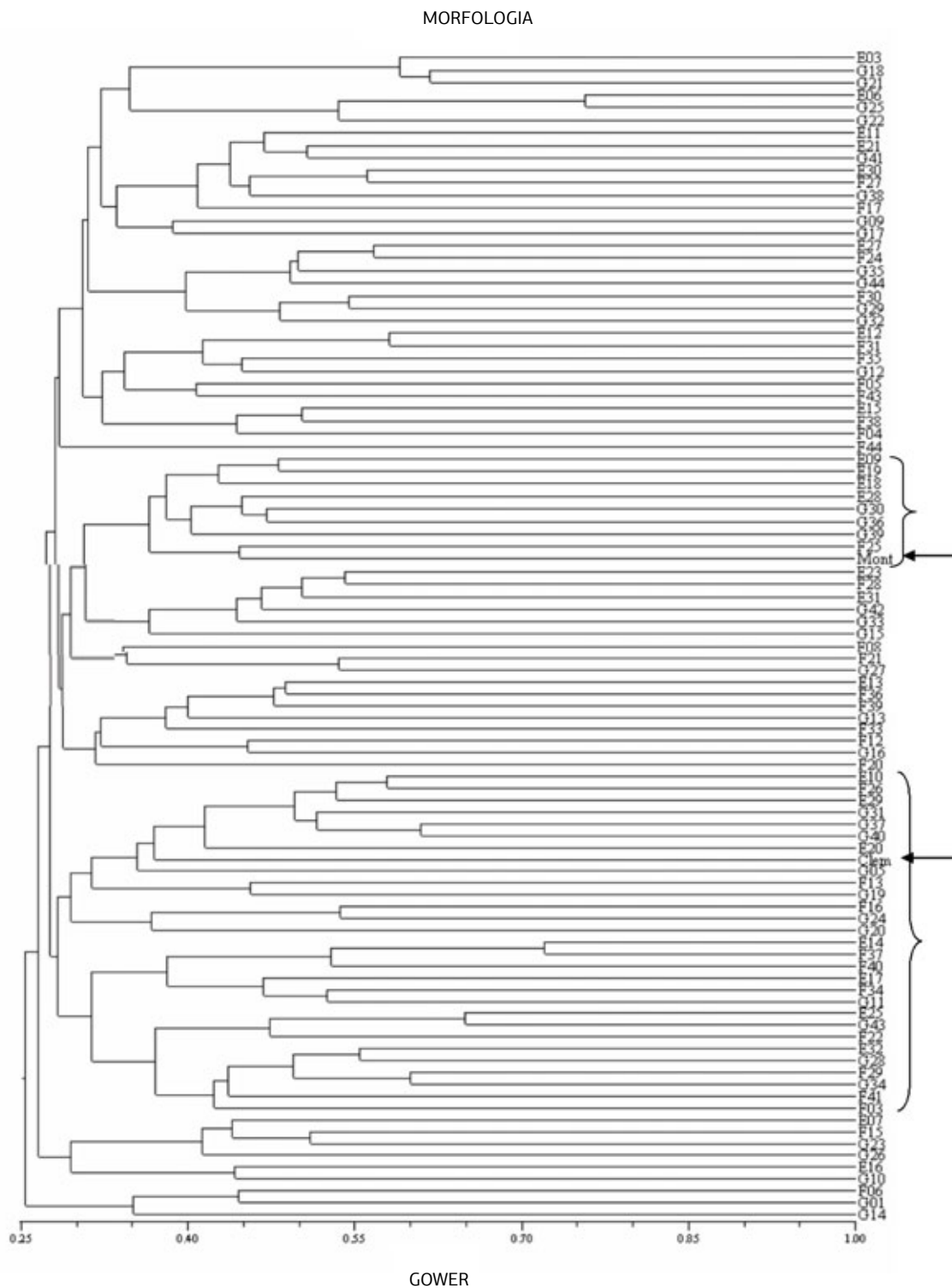
A distinção de plantas por características morfológicas é essencial para uma nova cultivar ou cultivar essencialmente derivada ser submetida à proteção. Para fins de proteção varietal, a nova cultivar deve atender a três requisitos básicos, ou seja, ser distinta, homogênea e estável (DHE) (BERNET et al., 2003, CARVALHO et al., 2009), atendendo aos requisitos dispostos na Lei n° 9.456, de 25 de abril de 1997. A distinção dos genótipos é realizada por meio de marcadores morfológicos, sendo avaliados marcadores fenotípicos conforme os descritos neste trabalho.

Segundo DOMINGUES et al. (1999) caracteres como a estrutura da planta, flores, frutos e folhas são utilizados para descrever e caracterizar variedades distintas de tangerineiras e híbridos. Estas características foram eficientes na avaliação de 37 cultivares de tangerineiras em trabalho desenvolvido por KOEHLER-SANTOS et al. (2003).

A caracterização morfológica é uma análise simples e de menor custo, embora com limitações relacionadas aos caracteres que têm herança quantitativa, os quais são altamente influenciados pelo ambiente e pelas cultivares com grande semelhança fenotípica (OLIVEIRA et al., 2002). Mesmo assim essa técnica é utilizada internacionalmente, conseguindo, em certos casos, discriminar até mesmo materiais vegetais, que não são passíveis de discriminação através de marcadores bioquímicos ou moleculares. Os resultados constantes deste estudo permitiram a distinção de todas as plantas, e em se tratando de material com boas características permitiria a sua distinção para fins de proteção varietal.

Com os dados das análises qualitativas dos frutos foi determinada a época de maturação das 80 plantas da progênie que produziram nos anos de 2003, 2004 e 2005 (Tabela 1). Observou-se que na época de maturação dos 80 híbridos de 'Clementina Fina' e 'Montenegrina' uma amplitude de datas de colheita entre a primeira quinzena

de abril e a primeira quinzena de agosto. SARTORI et al. (1998) identificaram que o genitor masculino 'Montenegrina' possui uma época de colheita entre agosto e outubro e o genitor feminino 'Clementina Fina', entre abril e maio. Portanto, a época de maturação da progênie se aproximou mais ao do genitor feminino, fato interessante



**Figura 2.** Dendrograma com 96 plantas (94 progênies e genitores) oriundas do cruzamento entre as tangerineiras 'Clementina Fina' e 'Montenegrina', gerado através do programa NTSYS, utilizando marcadores morfológicos. As setas no dendrograma indicam o genitor feminino 'Clementina Fina' e o genitor masculino 'Montenegrina' e as chaves indicam as plantas nos mesmos grupos dos genitores.

**Tabela 1.** Época de maturação de frutos de 80 plantas oriundas do cruzamento das tangerineiras ‘Clementina Fina’ e ‘Montenegrina’ as quais produziram frutos nos anos de 2003, 2004 e 2005

Planta	Anos de avaliação	Época de maturação dos frutos (em quinzenas)									
		1ª abril	2ª abril	1ª maio	2ª maio	1ª junho	2ª junho	1ª julho	2ª julho	1ª agosto	
E05*	2004										
E06	2003-2004-2005										
E09	2003-2004										
E10	2004-2005										
E11*	2004-2005										
E12	2003-2004-2005										
E13	2003-2004-2005										
E14	2003-2004-2005										
E15	2004-2005										
E16*	2003										
E18	2004-2005										
E19	2003-2004-2005										
E20	2003-2004-2005										
E21	2004-2005										
E23	2003-2004-2005										
E25	2003-2004										
E27	2003-2004										
E28	2003-2004										
E30	2003-2004-2005										
E31	2003-2004-2005										
E32	2004										
F05	2003-2004										
F08	2004-2005										
F09*	2003										
F12	2004-2005										
F13	2003-2004										
F15	2003-2004-2005										
F16*	2004-2005										
F17*	2003-2004-2005										
F20	2003-2004-2005										
F21	2004										
F22	2003-2004-2005										
F23*	2004										
F24	2004-2005										
F25	2004										
F27	2003-2004-2005										
F28	2003-2004-2005										
F30	2003-2004-2005										
F31	2003-2004-2005										
F33	2003-2004										
F35	2004-2005										
F36*	2005										

Continua

Tabela 1. Conclusão

Planta	Anos de avaliação	Época de maturação dos frutos (em quinzenas)									
		1ª abril	2ª abril	1ª maio	2ª maio	1ª junho	2ª junho	1ª julho	2ª julho	1ª agosto	
F37	2003-2004-2005	■									
F38	2004					■					
F39*	2003-2004-2005	■									
F41	2003-2004								■		
F43	2003-2004		■								
F44	2003							■			
G01	2003-2004-2005					■					
G05	2004				■						
G09*	2005	■									
G11	2004-2005			■							
G12*	2005	■									
G13*	2005	■									
G15	2003-2004-2005			■							
G16	2004-2005	■									
G17*	2004	■									
G18	2003-2004-2005				■						
G19	2003-2004-2005					■					
G20*	2003-2004-2005	■									
G21	2003-2004-2005		■								
G22	2003-2004-2005		■								
G24*	2005	■									
G25*	2004-2005	■									
G26	2003-2004-2005		■								
G27	2003-2004-2005										
G29	2003-2005			■							
G30	2003-2004-2005										
G31	2003-2004-2005		■								
G32	2004										
G33	2003-2004-2005			■							
G34	2003-2004-2005						■				
G36	2004-2005				■						
G37*	2003-2004-2005	■									
G38*	2004-2005	■									
G39	2003-2004-2005				■						
G40	2004-2005					■					
G43	2003-2004			■							
G44	2004						■				

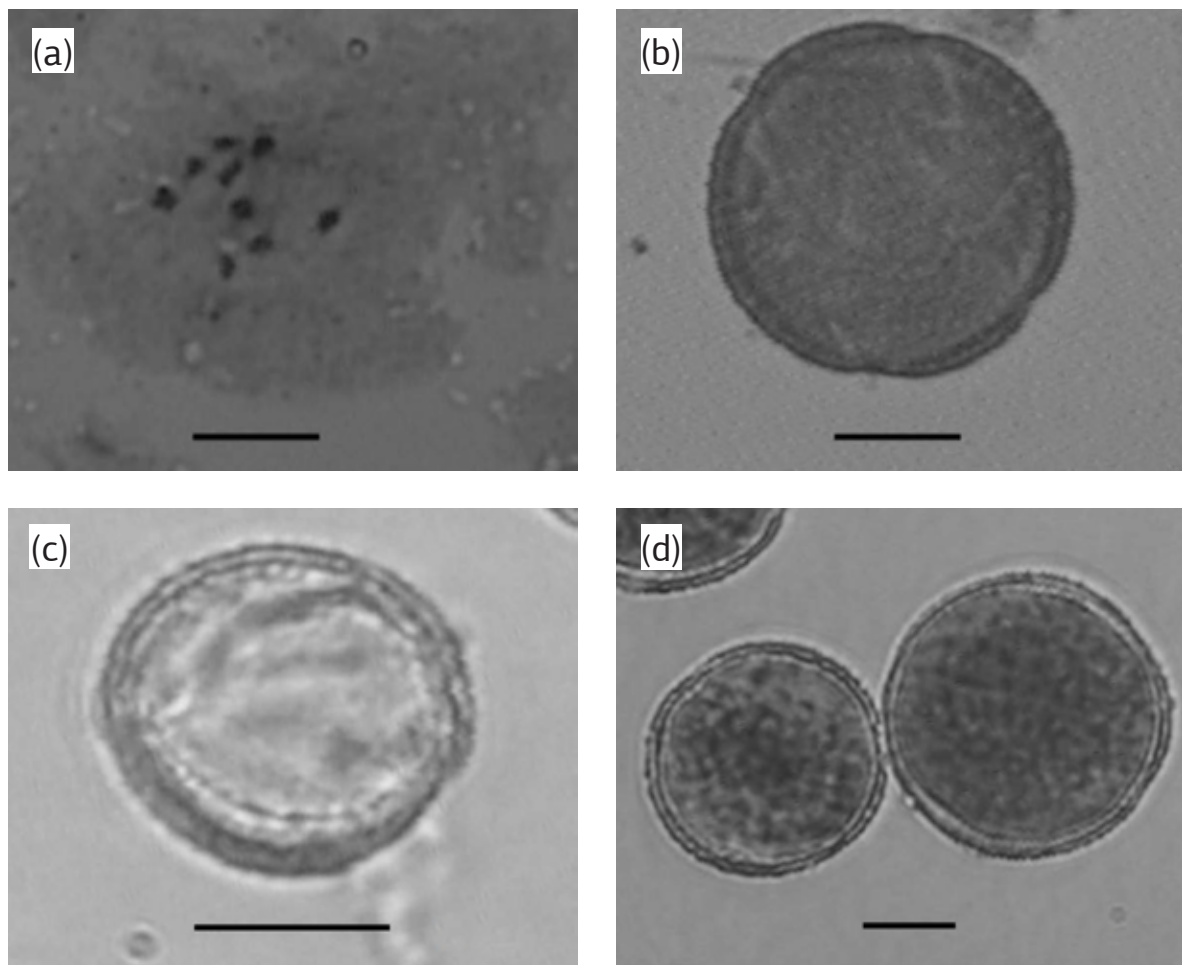
■ Período com frutos aptos para colheita e comercialização (40% de suco e SST/AT entre 8 e 12).  
□ Período sem frutos aptos para colheita e comercialização.  
■\* Plantas com frutos que não atingiram índices de maturação próprios para a comercialização.

para o objetivo de obtenção de frutos aptos à comercialização em épocas distintas da tangerineira 'Montenegrina', já que o procurado neste cruzamento eram híbridos com as características desta, mas com menos sementes e época de maturação distinta, tendo chances de sucesso no mercado consumidor.

Nas análises para a determinação do nível de ploidia, das 52 plantas da progênie que produziram flores em 2004 e seus genitores, observou-se que todas as plantas são diplóides, com número cromossômico  $x=9$ , (Figura 3a), corroborando com os resultados obtidos por GUERRA et al. (1997) que caracterizaram como diplóides 51 plantas de *Citrus*, *Poncirus trifoliata* e sete híbridos interespecíficos. O número básico de cromossomos de todas as espécies de *Citrus*, bem como dos gêneros *Poncirus* e *Fortunella* é nove, sendo a condição diplóide predominante, embora o número básico de nove cromossomos apareça em algumas variedades, não somente multiplicado por dois, nos diplóides, mas também em maior número, nos poliplóides. A identificação de plantas poliplóides é útil devido ao grande potencial delas no melhoramento de plantas frutíferas (BORÉM, 2005).

Em estudo desenvolvido por CHEN et al. (2008), através de cruzamentos entre *C. sinensis* e *P. trifoliata*, foi observado que 24% da progênie era triplóide, enquanto em cruzamentos recíprocos estes resultados não foram observados, podendo ser um indicativo que os gametas  $2n$  (não reduzidos) se originaram do parental *C. sinensis* e que estes ocorrem possivelmente na primeira divisão meiótica.

Com relação à viabilidade dos grãos de pólen, foram analisados botões florais das 52 plantas que floresceram em 2004. Todas as plantas analisadas estavam com alta viabilidade de pólen e com grãos bem corados (Figura 3b). Todas as plantas tinham grãos de pólen inviáveis (Figura 3c), porém, em baixas percentagens. Em apenas uma (E11) a viabilidade estava entre 70% e 80%, sete (E06; E21; E31; F08; G24; G30; e G37) entre 80% e 90%, e o restante das plantas, ou seja, em 44 havia mais de 90% de viabilidade (Tabela 2), indicando que todos os híbridos analisados podem ser utilizados em futuros cruzamentos como genitores masculinos. CAVALCANTE et al. (2000) observaram variação de 9% a 98% na viabilidade do pólen em uma população de tangeleiro 'Lee'. BRUGNARA et al. (2008) observaram valores de zero a 98% de fertilidade



**Figura 3.** Determinação do nível de ploidia e da viabilidade dos grãos de pólen. a) Diacinese em célula mãe de pólen da planta E19, com 9 bivalentes; b) Grão de pólen viável da planta E19; c) Grão de pólen inviável da planta E06; d) Grão de pólen normal e grão de pólen 'gigante' da planta E06. (Escala = 10 $\mu$ m).



**Tabela 2.** Porcentagem de fertilidade de grãos de pólen de 52 plantas híbridas decorrentes do cruzamento dirigido das tangerineiras 'Clementina Fina' e 'Montenegrina'

Fertilidade		Fertilidade		Fertilidade		Fertilidade	
Planta	Pólen (%)	Planta	Pólen (%)	Planta	Pólen (%)	Planta	Pólen (%)
E11	79,0	F35	92,0	E18	94,9	G34	96,2
G30	83,9	E25	92,2	G40	95,1	G21	96,3
E21	86,2	G05	92,2	E14	95,2	G16	96,4
F08	87,3	G39	92,5	G19	95,2	F25	96,4
E31	88,5	G36	92,7	G18	95,4	G25	96,5
G24	88,9	G01	93,1	F30	95,5	G22	96,6
E06	89,4	G31	93,4	E20	95,5	F28	96,8
G37	89,9	G13	93,9	F12	95,5	F27	96,9
E19	90,6	E30	94,2	E15	95,6	G20	97,0
F24	90,8	G26	94,5	F31	95,7	F16	97,0
F15	90,9	F20	94,5	E23	95,9	F05	97,8
F17	91,3	F29	94,6	G15	96,0	F22	98,0
G27	91,6	E28	94,9	F39	96,1	G12	98,1

do pólen em progênies dos cruzamentos de tangerineira 'Montenegrina' (*C. deliciosa* Ten.) com a tangerineira 'King' (*C. nobilis* Lour.) e com a laranja 'Caipira' (*C. sinensis* (L.) Osb.).

Os estudos com grãos de pólen podem contribuir, por exemplo, para a taxonomia (RODRIGUES et al., 1999), mas são especialmente importantes para determinação da fertilidade masculina (AGARWAL, 1989). Portanto, como os índices de fertilidade de pólen destas plantas foram elevados, muitas delas poderiam efetivamente ser utilizadas como genitores masculinos em cruzamentos dirigidos. Nestas avaliações foi possível a observação eventual de macropólen corados (grãos de pólen gigantes), em frequência menor que 0,1%, (Figura 3d). Supõe-se que estes sejam grãos não reduzidos, podendo ser muito úteis na produção de plantas poliplóides em cruzamentos (CAVALCANTE et al., 2000). Conforme SIMIONI et al. (2004) plantas que produzem grãos de pólen com 30% a 40% de incremento no tamanho, quando comparados com grãos considerados normais, servem como um indicativo de grãos de pólen não reduzidos. A utilização de plantas boas produtoras de gametas não reduzidos no melhoramento pode levar à geração de plantas com níveis de ploidia mais elevados, o que pode ser muito vantajoso para algumas características como, por exemplo, maior robustez das plantas (SCHIFINO-WITTMANN e DALL'AGNOL, 2001).

#### 4. CONCLUSÃO

Através dos marcadores morfológicos utilizados é possível distinguir todos os híbridos das tangerineiras 'Clementina Fina' e 'Montenegrina'.

A época de maturação de frutos dos híbridos avaliados se estende do início de abril até o início de agosto, e a maioria destes aproxima-se mais da época de maturação do genitor feminino tangerineira 'Clementina Fina'.

Todos os híbridos avaliados e os genitores são diplóides, com número cromossômico  $2n = 18$ , e todos os híbridos avaliados podem ser utilizados como genitores masculinos devido à elevada viabilidade de pólen.

#### AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul por disponibilizar a Estação Experimental Agrônômica para os trabalhos de campo. Ao Laboratório de Citogenética e Eletroforese do Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia da UFRGS. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

#### REFERÊNCIAS

AGARWAL, P.K. Cytogenetical investigations in Rutaceae V. Cytomorphology of the three intergeneric hybrids of *Citrus* and *Poncirus*. *Cytologia*, v.54, p.705-708, 1989.

AOAC INTERNATIONAL. Official methods of analysis of AOAC International. AOAC International: Washington, 2002.

BERNET, G.P.; BRAMARDI, S.; CALVACHE, D.; CARBONELL, E.A.; ASINS, M.J. Applicability of molecular markers in the context of protection of new varieties of cucumber. *Plant Breeding*, v.122, p.146-152, 2003.

- BORÉM, A. Melhoria de espécies cultivadas. Viçosa: UFV, 2005. 969p.
- BRUGNARA, E.C.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; WEILER, R.L.; SCHWARZ, S.F. Ploidia e fertilidade de pólen em progênies de citros. *Bragantia*, v.67, p.599-602, 2008.
- CARVALHO, S.I.C.; BIANCHETTI, L.B.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. Registro e proteção de cultivares pelo setor público: a experiência do programa de melhoramento de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças. *Horticultura Brasileira*, v.27, p.135-138, 2009.
- CAVALCANTE, H.C.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; DORNELLES, A.L.C. Meiotic behaviour and pollen fertility in an open-pollinated population of 'Lee' mandarin [*Citrus clementina* x (*C. paradise* x *C. tangerina*)]. *Scientia Horticulturae*, v.86, p.103-114, 2000.
- CHEN, C.; LYON, M.T.; O'MALLEY, D.; FEDERICI, C.T.; GMITTER, J.; GROSSER, J.W.; CHAPARRO, J.X.; ROOSE, M.L.; GMITTER, F.J. Origin and frequency of 2n gametes in *Citrus sinensis* X *Poncirus trifoliata* and their reciprocal crosses. *Plant Science*, v.174, p.1-8, 2008.
- COLLETA FILHO, H.D.; MACHADO, M.A.; TARGON, M.L.P.N. Analysis of the genetic among mandarins (*Citrus spp.*) using RAPD markers. *Euphytica*, v.102, p.133-139, 1998.
- DAVIES, F.R.; ALBRIGO, L.G. *Crop Production Science in Horticulture 2: Citrus*. Ed. CABI: Wallingford, 1994. 254p.
- DOMINGUES, E.T.; SOUZA, V.C.; SAKURAGUI, C.M.; POMPEU JÚNIOR, J.; PIO, R.M.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; Souza, J.P. Caracterização morfológica de tangerinas do banco de germoplasma de citros do centro de citricultura Sylvio Moreira/IAC. *Scientia Agricola*, v.56, p.197-206, 1999.
- FAO. Dados agrícolas de FAOSTAT. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>, 2009.
- GOWER, J.C. A general coefficient of similarity and some of its properties. *Biometrics*, v.27, p.857-871, 1971.
- GUERRA, M. Introdução à citogenética geral. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 142p.
- GUERRA, M.; PEDROSA, A.; BARROS E SILVA, A.E.; CORNELIO, M.T.M.; SANTOS, K.; SOARES FILHO, W.S.F. Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a citrus germplasm Bank. *Brazilian Journal of Genetics*, v.20, p.489-496, 1997.
- IBGE Anuário Estatístico Brasileiro. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2008/default.shtm>, 2008.
- IBPGR. *Descriptors for Citrus*. Rome, 1988.
- KOEHLER-SANTOS, P.; DORNELLES, A.L. C.; FREITAS, L.B. Characterization of mandarin citrus germplasm from Southern Brazil by morphological and molecular analyses. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.38, p.797-806, 2003.
- KOLLER, O.C. *Citricultura: laranja, limão e tangerina*. Porto Alegre: Rigel, 1994. 446p.
- OLIVEIRA, A.C.; MACHADO, M.A. Resgate in vitro de embriões de Tangor 'Murcote' (*Citrus reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osbeck) e Laranja 'Pera' (*C. sinensis* (L.) Osbeck) e identificação de híbridos através de marcadores morfológicos e Moleculares. *Genetic Molecular Biology*, v.23, p.515, 2000.
- OLIVEIRA, A.C.; NOVELLI, V.M.; GARCIA, A.N.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A. Identification of citrus hybrids through the combination of a leaf apex morphology and SSR markers. *Euphytica*, v.128, p.397-403, 2002.
- RODRIGUES, J.C.V.; MACHADO, M.A.; CARVALHO, A.S.; Microscopia eletrônica de varredura de pólen de algumas espécies de *Citrus* e gêneros correlatos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.20, p.382-386, 1999.
- ROHLE, F.J. *NTSYS pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system*. New York: Exeter Software, 2000.
- SARTORI, I.A.; SCHÄFER, G.; SCHWARZ, S.F.; KOOLER, O.C. Épocas de maturação de tangerinas na Depressão Central do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.20, p.313-322, 1998.
- SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; DALL'AGNOL, M. Gametas não-reduzidos no melhoramento de plantas. *Ciência Rural*, v.31, p.169-175, 2001.
- SIMIONI, C.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; DALL'AGNOL, M.; GUERRA, D. Selection for increasing 2n gametes production in red clover. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v.4, p.477-483, 2004.
- SYBENGA, J. *Cytogenetics in Plant Breeding*. Springer: Berlin, 1993. 469p.
- SYBENGA, J. Forty years of cytogenetics in plant breeding: a personal view. In: LELLEY, T. (Ed.). *Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement*. Vienna: Universitäts Verlag, 1998. p.22-32.