



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

**NÚMERO DE SEMENTES EM FRUTOS E FREQUÊNCIA DE HÍBRIDOS OBTIDOS
DE CRUZAMENTOS COM A TANGERINA
IAC 2019MARIA**

FERNANDA ROVERSSI

**Araras
2022**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

**NÚMERO DE SEMENTES EM FRUTOS E FREQUÊNCIA DE HÍBRIDOS
OBTIDOS DE CRUZAMENTOS COM A TANGERINA
IAC 2019MARIA**

FERNANDA ROVERSSI

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIÂNGELA CRISTOFANI-YALY

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE EM PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

Araras

2022

Roverssi, Fernanda

Número de sementes em frutos e frequência de híbridos obtidos de cruzamentos com a tangerina IAC 2019Maria / Fernanda Roverssi -- 2022.
71f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras
Orientador (a): Mariângela Cristofani Yaly
Banca Examinadora: Evandro Henrique Schinor,
Fernando Alves de Azevedo, Mariângela Cristofani Yaly
Bibliografia

1. Triploidia . 2. Melhoramento genético . 3.
Poliembrionia. I. Roverssi, Fernanda. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Helena Sachi do Amaral - CRB/8
7083



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias

Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Fernanda Roverssi, realizada em 25/02/2022.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Mariângela Cristofani-Yaly (IAC)

Prof. Dr. Fernando Alves de Azevedo (IAC)

Prof. Dr. Evandro Henrique Schinor (UFSCar)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Mariângela Cristofani-Yaly, pela oportunidade, orientação, ensinamentos e paciência por todos esses anos.

À Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini, pela sua disponibilidade e carinho ao solucionar meus problemas.

À Fundação de Apoio Institucional ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FAI), e ao Diretor da UFSCar - Campus Araras, Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujihara pela bolsa de extensão.

Ao programa de pós-graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associado, pelo meu aprendizado de qualidade que foram capazes de proporcionar, apesar das dificuldades que estamos vivendo devido à pandemia.

Aos pesquisadores, Dr. Rodrigo Rocha Latado, Prof. Dr. Evandro Henrique Schinor e Dra. Maiara Curtolo, pela sua disponibilidade, por todos os ensinamentos e paciência ao longo desse período.

Ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira – Instituto Agrônomo de Campinas, Cordeirópolis – SP (IAC) pela disponibilidade de recursos.

Aos meus colegas do Centro, Thais Magni Cavichioli, Laura Yuki Shimamura, Maria Eduarda Barbosa, Anita, Cícera e toda equipe do Centro, por toda ajuda e apoio e por todos os bons momentos.

Agradeço aos meus pais, Divanir Roverssi e Silvana Sothero de Godoy Roverssi, por todo apoio, dedicação, incentivo e carinho que me deram.

E a todos que aqui não citei, mas que contribuíram diretamente ou indiretamente para a execução desse trabalho.

Muito obrigada a todos!

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	03
3 REVISÃO DA LITERATURA	04
3.1 O gênero <i>Citrus</i>	04
3.2 Importância econômica das tangerinas.....	05
3.3 Tangerina IAC 2019Maria.....	06
3.4 Frutos apirênicos.....	07
3.5 Poliembrionia.....	09
3.6 Ploidia.....	11
3.7 Melhoramento genético convencional em citros.....	12
3.8 Marcadores SSR- <i>Simple Sequence Repeats</i>	13
4 MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1 Material vegetal.....	15
4.2 Análise da viabilidade e germinação do pólen.....	16
4.3 Avaliar a influência da polinização sobre o número de sementes na tangerina IAC 2019Maria.....	17
4.4 Porcentagem de frutos colhidos e número de sementes por fruto....	17
4.5 Identificação de embriões zigóticos.....	18
4.6 Análise da ploidia por citometria de fluxo.....	19
4.7 Análises estatísticas.....	20
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.1 Análise da viabilidade e germinação do pólen.....	21
5.2 Influência da polinização sobre a porcentagem de frutos colhidos na tangerina IAC 2019Maria.....	23
5.3 Influência da polinização sobre o número de sementes na tangerina IAC 2019Maria.....	24
5.4 Seleção de marcadores SSR informativos para as populações de	

tangerina IAC 2019Maria.....	26
5.5 Identificação de embriões zigóticos.....	28
5.6 Análises da ploidia de plantas híbridas de tangerina IAC 2019Maria por citometria de fluxo.....	38
6 CONCLUSÕES.....	42
7 LITERATURA CITADA.....	43
APÊNDICE.....	54

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Descrição e parâmetros de variabilidade de 27 locos microssatélites em 180 acessos de tangerinas e híbridos.....	19
Tabela 2. Porcentagem média de grãos de pólen germinados e não germinados de tangerina IAC 2019Maria, laranja Pera e tangerina Ponkan. (Cordeirópolis, 2019).....	21
Tabela 3. Porcentagem média de grãos de pólen viáveis e inviáveis de tangerina IAC 2019Maria, laranja Pera e tangerina Ponkan. (Cordeirópolis, 2019).....	22
Tabela 4. Número de polinizações feitas (NPF), número de frutos fixados e colhidos (NFC) e porcentagem de frutos colhidos (PFC) por tratamento em tangerinas IAC 2019Maria (Cordeirópolis, 2019)	23
Tabela 5. Número médio de sementes por fruto (NMS), porcentagem de sementes viáveis (PSV) e abortadas (PSA) por fruto de tangerina IAC 2019Maria obtidos de autopolinização e polinização controlada e aberta (Cordeirópolis, 2019)	25
Tabela 6. Caracterização de plantas de cinco populações de cruzamentos, número de plantas obtidas por cruzamento (NP), número de plantas zigóticas (NZ), número de plantas nucelares (NN), e porcentagem de plantas zigóticas obtidas por cruzamento (PZ).....	29
Tabela 7. Porcentagem de plantas zigóticas identificadas por par de primers SSRs separadamente: (1) CCSM-EST-159, (2) CCSM-EST-161, (3) CCSM-EST-164, (4) CCSM-EST-191, (5) CCSM-EST-234.....	35
Tabela 8. Leituras de suspensões nucleares de folhas das plantas híbridas triploide e tetraploides, e plantas-controle diploide e triploide de cruzamentos de tangerina IAC 2019Maria, coradas com o fluorocromo DAPI e avaliadas por citometria de fluxo.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Frutos colhidos de cruzamentos controlados de tangerina IAC 2019Maria: A) Fruto proveniente de autopolinização; B) Fruto originado de polinização cruzada com pólen de laranja Pera; C) Fruto originado de polinização com tangerina Ponkan.....	25
Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 3%. Amplificação de DNA de Tangerina IAC 2019Maria (M); Laranja Pera (LP); Tangerina Ponkan (TP) utilizando marcador SSR: A) CCSM-EST-159; B) CCSM-EST-161; C) CCSM-EST-191; D) CCSM-EST-164; E) CCSM-EST-234 e F) CCSM-40.	27
Figura 3. Genotipagem em gel de agarose a 3%, com quatro pares de primers, de híbridos de tangerina IAC 2019Maria autopolinizada: A) CCSM-EST-161; B) CCSM-EST-164; C) CCSM-EST-191; D) CCSM-EST-234.....	30
Figura 4. Genotipagem em gel de agarose a 3%, com cinco pares de primers, dos híbridos de tangerina IAC 2019Maria em polinização aberta: A) CCSM-EST-159; B) CCSM-EST-161; C) CCSM-EST164; D) CCSM-EST-191; E) CCSM-EST-234.....	31
Figura 5. Genotipagem em gel de agarose a 3%, com cinco pares de primers, dos híbridos de tangerina IAC 2019Maria X tangerina Ponkan: A) CCSM-EST-159; B) CCSM-EST-161; C) CCSM-EST164; D) CCSM-EST-191; E) CCSM-EST-234.....	32
Figura 6. Genotipagem em gel de agarose a 3%, com cinco pares de primers, dos híbridos de tangerina IAC 2019Maria X laranja Pera: A) CCSM-EST-159; B) CCSM-EST-161; C) CCSM-EST-164; D) CCSM-EST-191; E) CCSM-EST-234.....	33
Figura 7. Genotipagem com quatro pares de primers em gel de agarose a 3%, dos híbridos de sementes abortadas de tangerina IAC 2019Maria X laranja Pera: A) CCSM-EST-159; B) CCSM-EST-164; C) CCSM-EST-191; D) CCSM-EST-234.....	34
Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 3%. Amplificação de DNA de Tangerina IAC 2019Maria (M); Laranja Pera (LP); e seis híbridos utilizando marcador SSR: A) CCSM-EST-60; B) CCSM-EST-64; C) CCSM-EST-89; D) CCSM-EST-169.....	34

Figura 9. Genotipagem com cinco pares de primers dos híbridos de tangerina IAC 2019Maria (CCSM-EST-60; CCSM-EST-64; CCSM-EST-89; CCSM-EST-169).....	35
Figura 10. Histogramas de amostras de folhas de plantas de: A) tangerina IAC 2019Maria controle diploide (2x); B) híbrido 05 triploide (3x); C) híbrido de autopolinização 62 tetraploide (4x) e D) híbrido 72 tetraploide (4x).....	39

NÚMERO DE SEMENTES EM FRUTOS E FREQUÊNCIA DE HÍBRIDOS OBTIDOS DE CRUZAMENTOS COM A TANGERINA IAC 2019MARIA

Autora: FERNANDA ROVERSSI

Orientadora: Profa. Dra. MARIÂNGELA CRISTOFANI-YALY

RESUMO

No Programa de Melhoramento de Citros do Centro Citricultura Sylvio Moreira do Instituto Agrônômico (IAC) foi desenvolvida uma cultivar, a tangerina IAC 2019Maria, proveniente do cruzamento entre tangor Murcott IAC [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *C. reticulata* Blanco] e laranja Pera IAC [*C. sinensis* (L.) Osbeck]. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o número de sementes em frutos da cultivar de tangerina IAC 2019Maria e identificar embriões zigóticos e possíveis plantas triploides provenientes dos cruzamentos entre tangerina IAC 2019Maria e laranja Pera IAC e tangerina Ponkan (*C. reticulata* Blanco), tangerina IAC 2019Maria em polinização aberta e de autopolinização. Para isso, as flores de IAC 2019Maria foram autopolinizadas, polinizadas com pólenes de laranja Pera e tangerina Ponkan e sem polinização. O pólen das variedades tangerina IAC 2019Maria, tangerina Ponkan e laranja Pera foram avaliados quanto a sua viabilidade, os embriões foram identificados utilizando marcadores moleculares microssatélites e a ploidia foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados do tratamento sem polinização sugerem que a variedade não produz frutos partenocárpicos, mas é autocompatível e, neste caso, há uma redução no número de sementes por fruto. As análises de viabilidade dos pólenes mostram que todas as variedades apresentaram valores altos de porcentagem média de pólenes viáveis. Os resultados da genotipagem utilizando marcadores microssatélites, mostraram que 100% de todas as populações consistem em embriões zigóticos, sugerindo que a tangerina IAC 2019Maria é uma planta com baixa taxa de poliembrião, que pode ser amplamente utilizada em programas de melhoramento para obtenção de híbridos. As análises da ploidia das plantas híbridas do cruzamento com laranja Pera e autopolinização permitiram identificar uma planta triploide de semente abortada do cruzamento com laranja Pera, e duas tetraploides, uma de autopolinização e outra do cruzamento com laranja Pera.

NUMBER OF SEEDS IN FRUITS AND FREQUENCY OF HYBRIDS OBTAINED FROM CROSSINGS WITH IAC 2019MARIA MANDARIN

Author: FERNANDA ROVERSSI

Adviser: Prof. Dr. MARIÂNGELA CRISTOFANI-YALY

ABSTRACT

In the Citrus Breeding Program of the Sylvio Moreira Citriculture Center of the Agronomic Institute (IAC), a cultivar was developed, the IAC 2019Maria mandarin, from the cross between the tangor Murcott IAC [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *C. reticulata* Blanco] and Pera IAC sweet orange [*C. sinensis* (L.) Osbeck]. The present study aimed to evaluate the number of seeds in fruits of the tangerine cultivar IAC 2019Maria and to identify zygotic embryos and possible triploid plants from crosses between IAC 2019Maria mandarin and Pera IAC sweet orange [*C. sinensis* (L.) Osbeck] and Ponkan mandarin (*C. reticulata* Blanco), IAC 2019Maria mandarin in open pollination and self pollination. For this, the flowers of IAC 2019Maria were self-pollinated, pollinated with pollens of Pera Sweet orange and Ponkan mandarin, and only emasculated. The pollen of the varieties tangerine IAC 2019Maria, Ponkan mandarin and Pera Sweet orange were evaluated for their viability and germination, and the embryos were identified using microsatellite molecular markers and ploidy was evaluated by flow cytometry. The results of the treatment without pollination suggest that the variety does not produce parthenocarpic fruits, but is self-compatible and, in this case, there is a reduction in the number of seeds per fruit. Pollen viability analyzes showed that all varieties had high values of average percentage of viable pollens. The genotyping results using microsatellite molecular markers, showed that, 100% of all populations consist of zygotic embryos, suggesting that the IAC 2019Maria mandarin is a low polyembryonic plant, which can be widely used in breeding programs. The analysis of the ploidy of the plants allowed the identification of a triploid plant obtained from aborted seed from crossing with Pera sweet orange and two tetraploids, one from crossing with Pera orange and one from self-pollination.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de citros, principalmente em se falando do fruto processado como as laranjas. No entanto, quando se trata dos frutos de mesa para consumo *in natura*, como as tangerinas, o Brasil ainda fica atrás da China, Espanha e Turquia (FAO, 2021). Isso pois, o mercado internacional tem valorizado muito o consumo e desenvolvimento de frutos sem sementes, característica cujas principais variedades de tangerina do país não atendem (OLIVEIRA; SCIVITTARO, 2011).

O Centro de Citricultura Sylvio Moreira, do Instituto Agronômico (IAC) possui um dos principais bancos de germoplasma de citros do país que vem auxiliando o programa de melhoramento genético, de onde a cultivar tangerina IAC 2019Maria, um híbrido F₁, foi obtida a partir do cruzamento entre tangor Murcott IAC (genitor feminino) e laranja Pera IAC (genitor masculino).

No entanto, o melhoramento convencional de citros, com base na hibridação sexual, é um processo bastante lento devido barreiras como: o longo período de juvenilidade de plantas provenientes de sementes, que pode levar de sete anos a mais para atingir a maturidade; e pela poliembrionia, descrita como a produção de vários embriões por sementes, o que dificulta a identificação de indivíduos zigóticos em cruzamentos controlados; entre outras dificuldades (OLIVEIRA *et al.*, 2014;

SOARES FILHO *et al.*, 2013). Nesse sentido, técnicas como a identificação de híbridos utilizando marcadores moleculares tem se tornado um dos recursos utilizados para auxiliar os programas de melhoramento genético de citros (OLIVEIRA, 2013).

Contudo, a utilização de variedades monoembriônicas como mães, permitiriam a aceleração dos processos do melhoramento genético, tornando necessário a caracterização de novas variedades como boas plantas-mães, por apresentarem apenas um embrião, em sua maioria, zigótico, o que facilitaria a identificação de híbridos em programas de melhoramento.

Além disso, outro fator relevante para a citricultura é o desenvolvimento de frutos sem sementes para o mercado internacional de frutas frescas, onde a ausência de sementes em frutos pode ser obtida utilizando-se de híbridos triploides, a partir dos quais são selecionadas variedades partenocárpicas para copa (SOARES FILHO *et al.*, 2013). Essa identificação de plantas triploides pode ser realizada analisando sua ploidia pelo método de citometria de fluxo (LATADO *et al.*, 2007).

Dessa forma o presente trabalho terá como principal contribuição a identificação de possíveis híbridos de tangerina IAC 2019Maria e possíveis variedades triploides, visto que a citricultura atual é baseada em baixa variabilidade genética e há um aumento de interesse em variedades sem sementes.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

Caracterizar a cultivar IAC 2019Maria quanto ao número de sementes e determinar o nível de ploidia dos híbridos obtidos dos cruzamentos de tangerina IAC 2019Maria com a tangerina Ponkan, a laranja Pera IAC, via autopolinização e polinização aberta.

Objetivos específicos

- a) Avaliar a influência da polinização cruzada, polinização aberta, autopolinização e impedimento de polinização sobre a frutificação e formação de sementes de tangerina IAC 2019Maria;
- b) Avaliar se há autoincompatibilidade na cultivar IAC 2019Maria;
- c) Identificar embriões zigóticos (híbridos) provenientes dos cruzamentos de tangerina IAC 2019Maria com a tangerina Ponkan, laranja Pera IAC, autopolinização e polinização aberta utilizando marcadores moleculares microssatélites e SSRs (*Simple Sequence Repeats*) em estágio de plântulas;
- d) Avaliar pelo método de citometria de fluxo, o nível de ploidia dos híbridos provenientes de sementes obtidas dos cruzamentos de tangerina IAC 2019Maria com a tangerina Ponkan, laranja Pera IAC, autopolinização e polinização aberta, visando à obtenção de plântulas triploides.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1. O gênero *Citrus*

As plantas cítricas pertencem às espécies do gênero *Citrus*, da família Rutaceae, subfamília Aurantioideae, e dentre as variedades principais se encontram as laranjas doces, as tangerinas, os limões, as limas ácidas e os pomelos (DONADIO; STUCHI; CYRILLO, 1998). De forma geral o gênero *Citrus* é composto por plantas de porte médio, que apresentam flores brancas e frutos do tipo baga com vesículas contendo suco (ARAUJO; ROQUE, 2005).

Segundo Donadio, Mourão Filho e Moreira (2005) tanto a laranja doce [*C. sinensis* (L.) Osbeck] como a tangerineira (*C. reticulata* Blanco) são, provavelmente, originárias da Indochina e sul da China. Estudos mais recentes de Wu *et al.* (2018), baseados em análises genômicas, filogenéticas e biogeográficas de citros e relacionados, propõe que o centro de origem das espécies cítricas foi o sopé sudeste do Himalaia, em uma região que inclui a área leste de Assam, norte de Mianmar e oeste de Yunnan.

O gênero *Citrus* e seus gêneros associados (*Fortunella*, *Microcitrus*, *Clymenia*, *Oxanthera*, *Eremocitrus* e *Poncirus*) pertencem à família Rutaceae e estão amplamente distribuídos no Sudeste Asiático, abrangendo o Arquipélago de Bismarck, o arquipélago do sudeste da Índia, Nova Guiné, Nova Caledônia, nordeste da Austrália, ilhas polinésias ocidentais e Malásia. Apesar das grandes diferenças

morfológicas e fisiológicas, *Poncirus*, *Citrus*, *Fortunella*, *Eremocitrus* e *Microcitrus* são sexualmente compatíveis (Wu *et al.*, 2018).

Dentro do gênero *Citrus* é observada uma grande complexidade na classificação desse grupo, assim, diferentes sistemas taxonômicos têm sugerido um número variável de espécies, variando de 11 até 162 espécies (ARAUJO; ROQUE, 2005). Segundo os mesmos autores, isso ocorre porque os *Citrus* apresentam grande intercompatibilidade sexual, possibilitando a origem de híbridos naturais (ARAUJO; ROQUE, 2005).

De forma geral os citros apresentam uma grande variedade de gêneros, no entanto os plantios comerciais são restritos a poucas variedades, fato que afeta não só a competitividade do setor, como também a vulnerabilidade das plantas ao ataque de fitopatógenos, assim, ampliar a base genética torna-se necessária para a sustentabilidade da produção (BASTOS *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Existem dois sistemas taxonômicos principais, a saber, as 10 espécies de Swingle (Swingle, 1967) e as 162 espécies de Tanaka (Tanaka, 1977). Na maioria dos estudos, os citros são categorizados como uma das três espécies básicas, *C. reticulata* (tangerinas), *C. maxima* (toranja) e *C. medica* (cidra). A maioria das cultivares comerciais se originaram a partir dessas três espécies básicas ou seus híbridos (Wu *et al.*, 2018). As três espécies básicas (tangerina, toranja e cidra) provavelmente se originaram de lugares diferentes, conforme indicado por informações atualizadas de sequenciamento de genoma completo sobre evolução e origens cítricas. A cidra e a toranja são provavelmente originadas de uma região do noroeste de Yunnan (China), nordeste da Índia e norte de Mianmar (Wu *et al.*, 2018), enquanto a tangerina provavelmente se originou em Mangshan, nas Montanhas de Nanling (centro-sul da China).

De forma geral os citros apresentam uma grande variedade de gêneros, no entanto os plantios comerciais são restritos a poucas variedades, fato que afeta não só a competitividade do setor, como também a vulnerabilidade das plantas ao ataque de fitopatógenos, assim, ampliar a base genética torna-se necessária para a sustentabilidade da produção (BASTOS *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

3.2. Importância econômica das tangerinas

Segundo dados da FAO (2022), as tangerinas são o segundo maior grupo de citros produzido mundialmente, com uma produção aproximada de 38,6 milhões de

toneladas em 2020. Desta produção, 73,1% é proveniente da Ásia, sendo a China a maior produtora de tangerinas, com uma produção de 23 milhões de toneladas.

O Brasil atualmente ocupa o quarto lugar na produção mundial de tangerinas, ficando atrás da China, Espanha, Turquia. Em 2019 o Brasil produziu cerca de 1 milhão de toneladas em uma área colhida de 55,5 mil hectares (FAO, 2022). Dados do IBGE (2020), apontam que só o estado de São Paulo foi responsável por produzir cerca de 337 mil toneladas em uma área de 10,6 mil hectares.

A tangerina é muito apreciada para o consumo *in natura*, pois o fruto tem casca fina fácil de remover, a polpa é dividida em segmentos fáceis de separar (SEBRAE, 2019). Segundo Donadio, Stuchi e Cyrillo (1998) as tangerinas apresentam várias representantes no grupo citros, dentre essas há presença de diversos híbridos e variedades como os tangores e os tangelos. No Brasil, as tangerinas são o terceiro maior grupo de citros produzidos, sendo as variedades predominantes a tangerina Ponkan e o tangor Murcott (BASTOS *et al.*, 2014; FAO, 2022). Outras variedades, como a mexerica-do-Rio (*C. deliciosa* Tenore) e tangerina Cravo, apresentam pouca expressão, com relação à área de plantio (Pio *et al.*, 2005).

3.3. Tangerina IAC 2019Maria

Um dos principais bancos de germoplasma de citros do país se encontra no Centro de Citricultura Sylvio Moreira, do Instituto Agrônomo (IAC) localizado em Cordeirópolis, SP. O Centro de Citricultura Sylvio Moreira vem desenvolvendo um programa de melhoramento genético de onde foi obtida a cultivar tangerina IAC 2019Maria, sendo ela um híbrido proveniente do cruzamento entre tangor Murcott IAC [*C. sinensis* (L.) Osbeck x *C. reticulata* Blanco] (genitor feminino) e laranja Pera IAC (*C. sinensis* (L.) Osbeck) (genitor masculino). O genitor feminino é um híbrido de laranja doce e tangerina que apresenta resistência à clorose variegada dos citros (CVC), causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, e leprose dos citros, cujo vírus, '*Citrus Leprosis Virus*' (CiLV) é transmitido por ácaros *Brevipalpus phoenicis*. Sendo, todavia, suscetível à mancha marrom de alternaria (MMA), causada pelo fungo *Alternaria alternata*, enquanto o genitor masculino é resistente à MMA, mas suscetível à CVC e leprose dos citros.

A mancha marrom de alternária afeta severamente os pomares brasileiros de tangerinas, causando sérias preocupações aos citricultores, devido aos prejuízos em

plantios comerciais de variedades suscetíveis, como a tangerina Ponkan e o tangor Murcott (AZEVEDO *et al.*, 2010).

O cruzamento dos genitores, realizado em 1997, resultou em 350 híbridos, identificados através de marcadores moleculares e caracterizados fenotipicamente em campo, dentre os quais foi selecionada a cultivar IAC 2019Maria. Foram avaliadas as características: produção de frutos, vigor vegetativo, características físico-químicas dos frutos, resistência à MMA em seis diferentes locais do estado de São Paulo: Botucatu, Capão Bonito, Colina, Cordeirópolis, Itapetininga e Matão.

A cultivar IAC 2019Maria caracteriza-se por apresentar árvores de porte médio (3,5 m), com produção média de 93 kg/planta e frutos de maturação precoce, com colheita entre abril-junho. Os frutos apresentam formato achatado, semelhantes ao tangor Murcott, coloração laranja intensa da casca e da polpa, com valores médios de massa de 169 g, 50% de rendimento em suco, teor de sólidos solúveis de 10 °Brix, acidez de 0,83 e ratio de 12,9.

A IAC 2019Maria é a primeira cultivar de tangerina totalmente brasileira, desenvolvida em 20 anos de pesquisa no IAC, sendo a primeira cultivar de citros do IAC protegida no Sistema Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e licenciada para viveiristas. Dada a sua resistência à MMA, seu cultivo gera menos impacto ambiental, por diminuir a necessidade de pulverização com fungicidas e reduzir os custos de produção (CCSM/IAC, 2000).

3.4. Frutos apirênicos

Mesmo o Brasil sendo um dos maiores produtores mundiais de citros, a sua produção é focada principalmente no processamento de suco de laranja, não se destacando nos mercados internacionais de fruta fresca como as tangerinas (OLIVEIRA; SCIVITTARO, 2011). Parte disso se deve a não produção de variedades de frutos apirênicos, ou seja, frutos sem sementes. Um exemplo é o tangor Murcott, que apresenta cerca de 20 sementes por fruto (PIO *et al.*, 2005).

Frutas com sementes como uvas (*Vitis vinifera* L.), melancia (*Citrullus lanatus* Thunb.) e frutas cítricas já foram muito aceitas pelos consumidores, mas nas últimas décadas o interesse por frutos sem sementes tem aumentado (VARDI; LEVIN; CARMI, 2008). Além da importância no mercado de frutas frescas, a ausência de sementes também é relevante para a indústria de sucos, visto que as sementes

podem estar associadas a compostos aromáticos desfavoráveis e amargor (OLLITRAULT *et al.*, 2007).

Segundo Barry (2004), os consumidores de frutas frescas têm dado ênfase à ausência de sementes como requisito de qualidade. Pio (1992) relata alguns requisitos de qualidade que as frutas cítricas voltadas para o consumo *in natura* precisam apresentar, como: bom aspecto, coloração e espessura da casca, tamanho, gomos de paredes delicadas e suco com adequado equilíbrio de acidez total titulável e de sólidos solúveis totais, aroma característico, pequeno número de sementes, resistência ao transporte e boa conservação. Desses fatores, a capacidade de descascamento e ausência de sementes contribuem para facilidade de consumo (GOLDENBERG *et al.*, 2018).

Segundo critérios comerciais, para uma variedade de tangerina ser considerada 'sem sementes' esta não deve ter mais do que cinco sementes no total de uma amostra aleatória de 25 frutos. Com o passar do tempo esta definição tem variado, novos critérios de comercialização têm definido não mais do que quatro sementes em uma amostra aleatória de 100 frutos, sem nenhum fruto contendo mais do que duas sementes. No entanto, há uma grande variabilidade genética entre as tangerinas em se tratando do número de sementes, podendo variar de 25 sementes por fruto até a ausência completa de sementes (GOLDENBERG *et al.*, 2018; GOLDENBERG *et al.*, 2014). Para Oliveira e Scivittaro (2011), o mercado internacional considera como sem sementes os lotes que apresentam uma média de até duas sementes por fruto.

Dada esta demanda, várias pesquisas vêm sendo feitas buscando maneiras de se reduzir o número de sementes por fruto, seja por métodos clássicos, em campo ou por técnicas biotecnológicas em laboratórios. Vardi, Levin e Carmi, (2008) citam quatro abordagens para obtenção de citros sem sementes. Segundo os autores, a primeira abordagem citada é a esterilidade masculina, uma vez que muitos cultivares de citros tem potencial para gerar frutos sem sementes na ausência de polinização, nesse sentido outra abordagem seria a esterilidade feminina como a destruição do óvulo ou do estigma por genes suicidas. A estenospermocarpia, se trata de outra abordagem que se refere a frutas com sementes parcialmente formadas resultadas do aborto do embrião, e a última abordagem se refere ao aumento da expressão ou aumento da sensibilidade a giberelina (GA) no ovário ou óvulo.

Para Gidoni e Carmi (2007), a mutagênese por radiação gama é o método principal utilizado para obter ausência de sementes em citros, apesar de ainda necessitar da capacidade partenocárpica dos citros. No entanto a mutagênese não é direcionada a uma característica específica, tornando necessária a triagem laboriosa de grandes populações para obter plantas que apresentem os fenótipos desejados (VARDI; LEVIN; CARMI, 2008).

Azevedo e Pio (2002), estudando a influência da polinização em tangor Murcott, observaram que, quando flores desta variedade foram polinizadas com laranjas Valência e Natal, ocorreu incremento no número de sementes, em relação à polinização feita com tangerina Ponkan, laranja Pera e autopolinização. Enquanto Azevedo *et al.* (2013) notaram que flores de clementina Nules isoladas originaram frutos partenocárpicos e sem semente, no entanto quando fertilizadas pelas variedades tangelo Nova, tangor Ortanique e Murcott, tangerina Ponkan e laranjas Pera, Natal e Valência houve a formação de frutos com sementes.

Assim, visto a crescente demanda por variedades de citros sem sementes, é indispensável conhecer a compatibilidade e taxa de polinização cruzada das principais variedades cultivadas no país, isso permitirá o correto planejamento de pomares, evitando o plantio de variedades que possam produzir frutos sem sementes próximo a pomares de variedades compatíveis (AZEVEDO; PIO, 2001).

3.5. Poliembrionia

De forma geral, as espécies do gênero *Citrus* se reproduzem sexualmente, por autopolinização, e polinização cruzada, mas também assexuadamente através da apomixia nucelar, podendo dar origem a dois tipos de embriões: o sexual e o apomítico. O embrião sexual tem origem na união do gameta masculino com a oosfera, enquanto na reprodução assexuada ocorre com a formação de dois ou mais embriões de divisões mitóticas sucessivas de células do nucelo (tecido vegetal materno presente no óvulo maduro) resultando em sementes poliembrionicas (MACHADO *et al.*, 2005). Segundo Bruck e Walker (1985) a formação dos embriões nucleares ocorre simultaneamente à formação dos embriões sexuais.

Apomixia é o termo que foi utilizado no passado como definição de qualquer forma de reprodução assexuada, incluindo a propagação vegetativa. No entanto, atualmente este termo é utilizado para a reprodução assexuada que ocorre no óvulo

das plantas angiospérmicas (KOLTUNOW, 1993). Nesse processo de reprodução assexual os embriões são formados somente de células do tecido do óvulo, sem que ocorra a fusão de gametas, dando origem a clones geneticamente idênticos a planta mãe (MACHADO *et al.*, 2005).

A poliembria é a consequência desse processo apomítico em citros, onde muitas espécies desse grupo apresentam sementes com mais de um embrião, podendo este ser de origem apomítica (nucelar) ou sexual (zigótico), ou de ambas. Os embriões nucleares podem sofrer diferenciação em tempos diferentes, dando origem a embriões de tamanho e vigor diferentes, essa competição interna por nutrientes, com diferentes fases de desenvolvimento favorece os embriões apomíticos em detrimento dos zigóticos. Apesar disso, os embriões sexuais têm vantagens como o fato de a célula ovo iniciar a divisão antes das células iniciais nucleares e o fato de o embrião zigótico estar posicionado de forma mais favorável no ápice do saco embrionário próximo aos vasos (MACHADO *et al.*, 2005).

Cristofani *et al.* (2001), descrevem três formas de poliembria em citros; a poliembria nucelar, dando origem a um número variável de plântulas idênticas à planta matriz; a poliembria por clivagem, originada pela suposta bipartição do embrião sexual, e a poliembria decorrente da existência de mais de um gametófito normal no óvulo.

Para Machado *et al.* (2005) a taxa de poliembria pode ser influenciada por fatores como compatibilidade genética, taxa de fecundação, estado nutricional da planta, fotoperíodo, temperatura e vigor genético do embrião zigóticos. Em *Citrus* pode-se classificar as espécies quanto ao grau de embria em monoembriônicas, mediamente a altamente poliembriônicas.

Segundo Moreira, Gurgel e Arruda (1947) a poliembria pode ser avaliada pela contagem de embriões germinados, ou pela contagem de embriões nas sementes antes de iniciado o processo de germinação. Para Soares Filho *et al.* (2013) quanto mais baixo for o grau de poliembria do parental feminino, maior será a formação de híbridos do cruzamento.

Em relação às sementes que podem ser encontradas em *Citrus*, Chapot (1975) afirma que é possível encontrar os seguintes tipos sementes: a) sementes com um embrião zigótico, e um ou vários nucleares. Onde o número de nucleares pode variar de um a vinte, ou mais. Pelo aborto do embrião zigótico, podem-se encontrar os casos b e c; b) sementes com apenas embriões nucleares: como

ocorre com o tangelo Sampson; c) sementes com apenas um único embrião nucelar, as outras sementes sendo poliembriônicas: normalmente encontrado nas cidras; d) sementes com embriões nucleares e sementes que podem conter ambos, um zigótico e um ou mais nucleares: comum nas laranjas-doces e limões; e) sementes com apenas um embrião zigótico, monoembriônicas, nunca apresentando embriões nucleares: como é o caso das tangerinas Temple e Clementina, e de toranjas.

Cristofani-Yaly (comunicação pessoal, 2022) analisando a taxa de poliembrionia em 28 sementes de tangerina IAC 2019Maria verificou uma média de 1,11 embrião por semente, variando de 1 a 2 embriões por semente.

3.6. Ploidia

De modo geral as espécies de citros são diploides, com nove pares de cromossomos, ($2n = 18$), mas também ocorrem variedades triploides ($2n = 3x = 27$) e tetraploides (GUERRA *et al.*, 1997; GMITTER *et al.*, 1990; SPIEGEL-ROY; GOLDSCHMIDT, 1996). No melhoramento de citros as variedades triploides são de grande interesse, pois geralmente existe a possibilidade de seus frutos serem partenocárpicos, característica desejável para a obtenção de frutos sem sementes (OLIVEIRA, 2013). Variedades para uso comercial, como Garbi e Safor, vêm sendo selecionadas a partir de híbridos triploides (SOARES FILHO *et al.*, 2013). Assim, a seleção de linhagens triploides foi e continua sendo uma forma muito interessante de desenvolver cultivares sem sementes (KHAN, 2007).

Segundo Otto e Whitton (2000) a triploidia é considerada um beco sem saída evolutivo, isso porque os triploides têm fertilidade muito baixa e tendem a produzir gametas aneuploides, devido a problemas de pareamento cromossômico e segregação durante a meiose.

Uma maneira de obter frutos sem sementes é a produção de triploides por cruzamentos entre genótipos diploides e tetraploides (REFORGIATO RECUPERO; RUSSO; RECUPERO, 2005), ou de diploides ($2x$) com diploides ($2x$) (ESEN; SOOST, 1971). Latado *et al.* (2007), utilizaram meio contendo colchicina no cultivo de sementes para obtenção de plantas autotetraploides para futuro cruzamento com variedades diploides, visando à obtenção de triploides sem sementes. Vários autores utilizaram a citometria de fluxo para avaliar a ploidia em citros (LATADO *et al.*, 2007; POVEDANO *et al.*, 2012; ROCHA, 2014).

A otimização de tecnologias para resgate de embriões e a análise de ploidia por citometria de fluxo tem permitido o estabelecimento de grandes programas de melhoramento utilizando triploides para obter cultivares sem sementes (NAVARRO *et al.*, 2003).

Estudos de Esen e Soost (1971, 1973) mostram que híbridos triploides podem ser obtidos de cruzamentos convencionais de pais diploides de cultivares monoembriônicas, obtidos de sementes pequenas e anormais, de mais difícil germinação. Embriões triploides também foram observados em sementes imaturas de cultivares poliembriônicas (GERACI, 1978).

3.7. Melhoramento genético convencional em citros

O melhoramento genético convencional de citros é baseado na hibridação sexual controlada e/ou seleção de mutantes espontâneos ou induzidos ou híbridos naturais. A hibridação sexual controlada pode ser realizada pelo fato de os gêneros de citros serem compatíveis sexualmente, sendo importante na geração de variabilidade (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Dentre os métodos de hibridação sexual, a polinização aberta é o mais simples, no entanto apresenta desvantagens, como a possibilidade de autofecundação e perda de identidade do genitor masculino. Dessa forma, o método mais eficiente de hibridação é a polinização controlada, pois permite controlar a identidade dos dois genitores, reduzindo as chances de autofecundação e cruzamentos indesejados (MACHADO *et al.* 2005).

No entanto, o melhoramento genético de citros via hibridação é limitado por algumas dificuldades como a poliembrião que dificulta a identificação de híbridos, a alta heterozigosidade e longo período de juvenilidade, onde a planta originada por sementes é incapaz de florescer no início do seu desenvolvimento, levando a demora da frutificação (OLIVEIRA *et al.*, 2014; SOARES FILHO *et al.*, 2013).

Citros originados de sementes retêm características juvenis por um longo período, dentre essas características se encontram o crescimento vertical vigoroso, abundância de espinhos, caule angular, capacidade de formação de raízes adventícias em estacas e demora para iniciar o florescimento (MACHADO *et al.*, 2005).

Segundo Oliveira *et al.* (2014), as plantas cítricas têm alta heterozigosidade, em função da polinização cruzada, mutações e embrião celular, tendo assim pouca

informação sobre o controle genético das características. Outro problema diz respeito à esterilidade, que está relacionada à incompatibilidade, sendo classificada em gamética ou zigótica, sendo a autoincompatibilidade a incapacidade de formar frutos de autopolinização, mesmo a variedade sendo fértil (FROST; SOOST, 1968; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Em vista destes problemas várias técnicas de biotecnologia são utilizadas para auxiliar o melhoramento e citros, como resgate de embriões, seleção de plantas zigóticas utilizando marcadores (OLIVEIRA, 2013).

3.8. Marcadores SSR- *Simple Sequence Repeats*

A identificação dos embriões zigóticos, geralmente é feita com base em marcadores morfológicos, isso quando o genitor masculino apresenta um marcador morfológico dominante, no entanto quando nenhum dos parentais apresenta uma característica morfológica dominante é necessário utilizar outros métodos, como o uso de polimorfismos de DNA (MACHADO *et al.*, 2005).

Entre os métodos baseados em DNA, a análise com marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic*) é uma das mais utilizadas no melhoramento (BASTIANEL *et al.*, 1998). Para outros autores, a identificação por marcadores moleculares como microssatélites SSRs (*Simple Sequence Repeats*) mostrou a eficiência na sua utilização (CRISTOFANI *et al.*, 2001; RUIZ; BRETO; ASINS, 2000).

Para Ferreira e Grattapaglia (1995) os microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats* – Repetições de Sequências Simples) apresentam maior quantidade e informações sobre polimorfismos. Os SSR são codominantes e multialélicos e são altamente heterozigotos (ZANELLA *et al.*, 2017). Os microssatélites são sequencias curtas repetidas em tandem (1-6 nucleotídeos). As repetições mono, di, tri e tetra nucleotídeos são as mais comuns, mas repetições de 5 e 6 nucleotídeos também são classificadas como microssatélites. Essas regiões são flanqueadas por sequencias altamente conservadas e geralmente mostram altos níveis de polimorfismo, codominância, são multialélicos e são capazes de fornecer um elevado nível de informação por locos, além da facilidade de execução e reprodutibilidade (ELLEGRÉN, 2004).

Estes marcadores moleculares vêm sendo muito utilizados em programas de melhoramento e para certificação genética na citricultura, auxiliando na identificação,

diferenciação e caracterização de variedades e híbridos (CRISTOFANI *et al.*, 2001; CRISTOFANI *et al.*, 2003; DEZOTTI *et al.*, 2017; NOVELLI *et al.*, 2006; PALMIERI *et al.*, 2007).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material vegetal

O experimento foi desenvolvido no Centro de Citricultura Sylvio Moreira, do Instituto Agrônomo (IAC), em Cordeirópolis (SP), situado nas coordenadas: 22°32' de latitude sul e 47°27' de longitude oeste, com altitude de 639 m, e clima do tipo Cwa, segundo a classificação de Köppen. O solo é do tipo latossolo vermelho escuro-distrófico típico, textura argilosa (PIO; MINAMI; FIGUEIREDO, 2001).

As plantas de tangerina IAC 2019Maria [tangor Murcott IAC [*C. sinensis* (L.) Osbeck x *C. reticulata* Blanco] e laranja Pera IAC [*C. sinensis* (L.) Osbeck]] com quatro anos de idade, enxertadas em limão Cravo (*C. limonia*). As plantas utilizadas para polinização aberta encontravam-se no campo, plantadas em espaçamento de 6,0 x 3,5 m com delineamento em blocos casualizados, quatro repetições e uma planta por parcela. Enquanto as plantas para polinização cruzada e autopolinização se encontravam em estufa telada, com irrigação por gotejamento.

As plantas híbridas provenientes de cinco populações de cruzamentos de tangerina IAC 2019Maria com laranja Pera, tangerina Ponkan, autopolinização e polinização aberta, foram usadas como material vegetal para a identificação das plantas zigóticas e poliploides. As plantas foram cultivadas em sacos de 4 L com substrato comercial e mantidas em condições de estufa telada, com irrigação por gotejamento.

4.2. Análise da viabilidade e germinação do pólen

As análises de viabilidade polínica foram realizadas em dois testes, a análise da viabilidade de pólen por coloração com carmin acético e a análise da germinação do pólen *in vitro*.

Para as análises foram coletados 50 botões florais fechados (pouco antes da antese), dos genótipos: laranja Pera, tangerina Ponkan e tangerina IAC 2019Maria, segundo o método descrito por Cameron e Frost (1968). Os botões florais das plantas de cada genótipo foram coletados às 08:00 h e foram mantidos em placas de Petri com papel filtro (após a retirada de suas pétalas), e armazenados sob iluminação de 16 horas, até a abertura das anteras (LATADO *et al.*, 2004).

Nas análises de coloração com carmin acético as anteras foram coletadas com auxílio de pinça, transferidas para tubos de plástico contendo 0,5 mL de solução 3:1 (álcool absoluto:ácido acético glacial) e armazenadas a 4°C, até o momento das análises. A viabilidade de pólen foi avaliada por meio da coloração com carmin acético a 2,5% sobre lâminas de vidro, seguida de observação em microscópio ótico (DOMINGUES; TULMANN NETO; TEÓFILO SOBRINHO, 2000; LATADO *et al.*, 2004). Para esta avaliação foram considerados viáveis os grãos de pólen que apresentavam-se circulares, com superfície uniforme e coloração vermelho-intenso, enquanto os grãos inviáveis apresentavam menor tamanho, superfície irregular, formato não uniforme e coloração amarelo-claro. Foram calculadas as porcentagens médias de grãos de pólen viáveis de cada tratamento, em três repetições (DOMINGUES; TULMANN NETO; TEÓFILO SOBRINHO, 2000; LATADO *et al.*, 2004).

A germinação do pólen *in vitro* foi avaliada utilizando meio de cultura semi-sólido com adaptações nas metodologias utilizadas por Pio *et al.* (2004) e Salles *et al.* (2006). O meio foi preparado com 10% de sacarose, 0,03% de ácido bórico, 0,15% de cloreto de cálcio e 1,2% de ágar para 500 mL. Após a solidificação e o resfriamento do meio de cultura, os grãos de pólen foram espalhados sobre a superfície do meio com auxílio de um pincel e, em seguida, as placas foram colocadas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas. Após 24 horas de incubação, as placas de Petri foram divididas em quatro campos e, em cada campo, foi feita uma amostragem aleatória para contar o número de grãos de pólen

germinados e não-germinados, contando-se 100 grãos de pólen por repetição, com quatro repetições. Foram considerados germinados os grãos de pólen que apresentaram o comprimento do tubo polínico igual ou superior ao diâmetro do próprio grão de pólen (SALLES *et al.*, 2006).

4.3. Influência da polinização sobre o número de sementes na tangerina IAC 2019Maria

Nos meses de agosto a outubro de 2018, foram realizados cinco tipos de polinização na tangerina IAC 2019Maria para avaliar a quantidade de sementes, sendo estes: polinização cruzada com tangerina Ponkan; polinização com laranja Pera IAC; autopolinização; impedimento de polinização e polinização aberta.

As polinizações foram realizadas manualmente. Primeiramente foram coletados botões florais ainda fechados, sendo mantidos em placas de Petri com papel filtro e armazenados em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, até a abertura das anteras. Após isto, os botões florais fechados, antes da antese, apresentando estigmas receptivos, com umidade suficiente para uma polinização efetiva foram emasculados e o pólen dos botões florais armazenados foi pincelado sobre o estigma das flores de tangerina IAC 2019Maria, em seguida as flores foram ensacadas em sacos de papel (CAMERON; FROST, 1968; AZEVEDO *et al.*, 2013).

Na autopolinização os botões florais fechados foram mantidos intactos e foram marcados e ensacados. Já para o impedimento de polinização, os botões foram emasculados e ensacados, e para a polinização aberta, as flores foram apenas deixadas livres para ocorrência de polinização natural (FERRARO; PIO; AZEVEDO, 2006).

4.4. Porcentagem de frutos colhidos e número de sementes por fruto

Todos os frutos resultantes de polinizações, ou não, foram colhidos em maio de 2019. A porcentagem de frutos colhidos foi obtida por meio da contagem direta do número de frutos colhidos por tratamento. O número de sementes dos frutos foi obtido por meio de contagem direta, após a abertura dos frutos.

As sementes extraídas dos frutos tiveram o tegumento removido manualmente e foram esterilizadas em álcool 70% e depois em solução de hipoclorito de sódio (2% do princípio ativo) a 25%, posteriormente lavadas três vezes com água destilada autoclavada em ambiente estéril para serem inseridas em tubos

contendo meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). As sementes foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 24°C. As plântulas germinadas foram transplantadas em tubetes com substrato comercial e cultivadas em casa de vegetação.

4.5. Identificação de embriões zigóticos

Para a extração do DNA foi utilizada metodologia descrita por Murray e Thompson (1980), com adaptações feitas por Machado *et al.* (1996). O DNA extraído foi dissolvido em 80 µL de H₂O MilliQ com 10ug/µL de RNase.

Foram utilizados 27 pares de primers SSR, desenvolvidos a partir de informações de sequências expressas ESTs de citros – CitEST (PALMIERI *et al.*, 2007), e de sequências genômicas (NOVELLI *et al.*, 2006).

A amplificação do DNA (PCR) foi feita utilizando 100 ng de DNA em um volume total de 15 µL, contendo 0,3 µL de cada primer a 10µM (forward e reverse), 1,5 µL de tampão de reação (Buffer 10X contendo: 100mM Tris-HCL, 500Mm KCL, 1% Trion-X-100, 16mM MgCl₂), 0,3 µL de Taq-polimerase (5 U/µl), 1,2 µL de dNTPs (10mM de cada), 1,5 µL do DNA e água destilada autoclavada para completar o volume. A amplificação foi realizada em termocicladores Vereti 96 Well Thermal Cycler, e para os primers SSR ESTs, foi utilizado o programa para 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos, havendo neste período, a diminuição de 0,3°C a cada ciclo e 72°C por 30 segundos, e 3 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e 72°C por 7 minutos. Para os primers genômicos, as condições de amplificação são de 32 ciclos com 94°C por 5 segundos, 94°C por 1 minuto, 55°C por 30 segundos, 72° por 1 minuto e 72°C por 4 minutos. O DNA amplificado foi visualizado em gel de agarose 3% com brometo de etídeo. Ao final, para a visualização do gel, foi utilizado fotodocumentador para as análises.

A identificação das plântulas zigóticas foi feita pela comparação dos padrões de bandas dos indivíduos da progênie e dos parentais. Os *primers* utilizados foram descritos anteriormente por Dezotti *et al.* (2017) e podem ser verificados na tabela 1.

Tabela 1. Descrição e parâmetros de variabilidade de 27 locos microssatélites em 180 acessos de tangerinas e híbridos.

SSR	Repetição	Sequências do primer		Nº de alelos	Tamanho estimado (bp)	Heterozigiosidade		PIC
		Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')			Observada (Ho)	Esperada (Hexp)	
CCSM4	(AG) _n	ttctctcatcttgactcc	ccgatcttaacgacgtatcaa	2	50 a 150	0.269	0.234	0.206
CCSM18	(AG) _n	aacagtgatgaagaggaag	gtgattgctgggtgctgt	2	200 a 300	0.077	0.283	0.242
CCSM24	(GA) ₂₆	atgacagaagctcg	ccacttaacactctctct	2	< 150	0.365	0.461	0.354
CCSM29	(TGA) ₁₅ (TTA) ₉	cgltgattgtccga	cacactcacaatgttcac	2	100 a 200	0.241	0.310	0.261
CCSM40	(GCAACA) ₁₀	acaagagtcgcaacaatc	gacaacagtgccaataacc	2	100 a 200	0.046	0.098	0.093
CCSM-EST-6	(AG) ₁₀	cgccatttgcttaggcttt	gaacctccagagttccctc	2	600 a 700	0.277	0.412	0.327
CCSM-EST-11	(TC) ₁₂	ttcatggcagcttgagttc	agtcatggaagcctaaatgg	2	200 a 300	0.185	0.169	0.154
CCSM-EST-50	(ATAG) ₅	gtttgtctgctttgtgctg	caaacacctctaaagcccaa	3	100 a 200	0.190	0.498	0.411
CCSM-EST-60	(ATC) ₈	ctggaggaacagcagagg	cgaaatggaatcaaaggcat	2	100 a 200	0.457	0.360	0.294
CCSM-EST-64	(GAA) ₁₀ (n) ₂₁ (GAA) ₇	atctgcagggaacaaacag	tcactctcactactcgcca	2	200 a 300	0.347	0.287	0.245
CCSM-EST-66	(AT) ₁₆	atggcttcacagactctcc	tgcatatcctgaagactttat	2	200 a 300	0.195	0.176	0.160
CCSM-EST-68	(GAA) ₈	tgccgttgagtttgattga	gactgtgttctgatgcccga	2	< 150	0.000	0.475	0.361
CCSM-EST-71	(CAG) ₆	atgttcaccatcagcagcag	ccccaaaaataaagctgcaa	2	300 a 500	0.994	0.501	0.375
CCSM-EST-89	(ATA) ₇	acttatctgcacccgacga	gaggctcgaagtcaaggag	2	200 a 400	0.309	0.398	0.318
CCSM-EST-128	(CAA) ₇	cagagcagaagcctaaatca	ccactcgtctcgtccttag	2	400 a 500	0.259	0.226	0.200
CCSM-EST-143	(CTCCGT) ₄	tcaagcaatctccagtgacg	gaaagcctggagctctttt	2	< 100	0.233	0.433	0.339
CCSM-EST-144	(GTCACG) ₄	ttgtgagacacatggcgaat	cttcaagaatcgctgtctcc	2	< 100	0.029	0.029	0.028
CCSM-EST-145	(ACCTTA) ₄	ctcgatcatcagccatcaga	caggatcggaatttgagga	2	80 a 100	0.246	0.216	0.192
CCSM-EST-159	(TTCTTG) ₄	tgggtcattgatgtgtgct	cacagatgcagaaggggatt	2	< 100	0.663	0.444	0.345
CCSM-EST-161	(TTTTTA) ₄	gaggaggacgaatgaaagca	gaacagaagagctggccaat	2	200 a 300	0.102	0.097	0.092
CCSM-EST-164	(TC) ₁₁	gagaagcccgtctgcaactta	acgagagcggaaacaagaga	2	< 150	0.693	0.478	0.363
CCSM-EST-165	(AG) ₁₅ CCAT(GGC) ₇	ctctgatattcccaagccg	aagcagttatcgggatctg	2	200 a 300	0.273	0.236	0.208
CCSM-EST-169	(ATGATC) ₄	acgtcgtatagatcctgtgct	catacaccacaacacggtcca	2	200 a 300	0.244	0.215	0.191
CCSM-EST-175	(TTC) ₇	cctctcctcctcctcagat	gggaattggaacagcagta	2	250 a 350	0.000	0.011	0.011
CCSM-EST-191	(CAG) ₉	gaggagtggtatgcaaga	tcgagattcaattgtctcac	3	100 a 200	0.388	0.468	0.402
CCSM-EST-209	(AAT) ₁₂	gaagctcggccataatcaaa	gacgagaggtccagaatcag	2	200 a 300	0.301	0.494	0.371
CCSM-EST-234	(GGC) ₇	aatgctgggcaataactc	ttcaatcggcccaaacctc	3	200 a 300	0.286	0.359	0.305

Fonte: Dezotti *et al.* (2017)

4.6. Análise da ploidia por citometria de fluxo

As plantas provenientes de cada cruzamento tiveram sua ploidia avaliada pelo método de citometria de fluxo citado por Latado *et al.* (2007). Amostras de folhas jovens dos parentais e dos híbridos foram coletadas, lavadas em água corrente, acondicionadas em ambiente úmido e fresco, entre 4 e 15°C, até a realização das análises.

A ploidia das plantas foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o equipamento citômetro de fluxo PAS II-III (Partec GmbH, Alemanha), equipado com lâmpada HBO 100 W e filtros kg1, BG 38 e CG 435.

Aproximadamente 1 cm² de cada uma das folhas jovens (limbo foliar) foi macerado levemente em placa de Petri contendo 1000 µL de tampão de extração de núcleos (Partec GmbH, Alemanha), com auxílio de uma lâmina de aço afiada. Foi adicionado ao homogeneizado 50 µL da solução de coloração *Cy-Stayn UV* (Partec GmbH, Alemanha), que usa o 4-6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) como fluorocromo, e mais 300 µL de água destilada.

A solução contendo os núcleos, e o excedente de tecido vegetal, foi filtrada em filtro de malha 30 μ m (diâmetro), sendo analisada em seguida no equipamento, onde se procedeu a leitura dos picos de volume nuclear das plantas-controle e dos híbridos. As amostras foram avaliadas com o software *CyView* (Partec GmbH, Alemanha) e a seguinte calibração: *Gain* = 600 e *Low level* (LL) = 0,70 resultando em histogramas. As amostras cujos coeficientes de variação se situaram acima de 5% foram descartadas de acordo com o padrão estabelecido no software (LATADO *et al.*, 2007).

A ploidia das plantas híbridas foi determinada em comparação com amostras de folhas das plantas-controle diploides e das triploides. Somente as amostras identificadas como sendo poliploides e as dos controles, diploide e triploide, foram analisadas na forma de três repetições por planta (ROCHA, 2014). A cultivar tangerina IAC 2019Maria foi utilizada como controle diploide (2x), a cultivar lima ácida Tahiti (*C. latifolia* Tanaka) foi utilizada como controle triploide (3x).

4.7. Análises estatísticas

Para realizar a contagem e estimar a porcentagem de grãos de pólen viáveis e germinados, foi utilizado microscópio óptico invertido.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância e, quando houve diferença significativa, as médias foram comparadas pelos testes de Scott Knott, com 5% de probabilidade de erro, utilizando-se programa SASM-Agri (CANTERI *et al.*, 2001).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise da viabilidade e germinação do pólen

No teste de germinação, a laranja Pera apresentou a maior média de grãos de pólen germinados, mas não diferiu significativamente da tangerina Ponkan, enquanto a variedade tangerina IAC 2019Maria apresentou menor média de pólen germinados e diferiu das demais. No entanto a média de grãos de pólen não germinados não diferiu significativamente para a tangerina Ponkan e tangerina IAC 2019Maria, está também presente a maior média de pólen não germinados, já a laranja Pera teve a menor média de pólen não germinados, diferindo significativamente das demais (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem média de grãos de pólen germinados e não germinados de tangerina IAC 2019Maria, laranja Pera e tangerina Ponkan. (Cordeirópolis, 2019).

Variedade	Média de germinados	Média de não germinados
Tangerina IAC 2019Maria	10 b	90 a
Tangerina Ponkan	24 a	76 a
Laranja Pera	30,7 a	60,7 b

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p > 0,05$).

Analisando os resultados da germinação do pólen, pode-se sugerir que a baixa taxa de fixação dos frutos obtidos por autopolinização está associada à baixa

porcentagem de germinação do pólen da IAC 2019Maria, visto que a variedade apresentou média 10% de germinação e 6% de frutos fixados por autopolinização.

No entanto, a baixa porcentagem de grãos de pólen germinados pode estar ligada a fatores do teste *in vitro*. Salles *et al.* (2006), em seu experimento, avaliaram níveis de sacarose e pH na germinação do pólen e concluíram que em pH até 6,5 houve aumento de grãos germinados para as variedades Pera e Natal, enquanto a Valência apresentou melhores resultados em pH 5, sugerindo que o pH ideal é importante para a germinação do pólen que garante mais possibilidades de frutificação e produção, assim como a concentração de sacarose a 100 g L^{-1} também foi a mais ideal. Segundo Stanley e Linskens, (1974) o açúcar utilizado no meio de cultura proporciona equilíbrio osmótico entre o pólen e a solução de germinação e fornecer energia para auxiliar o processo de desenvolvimento do tubo polínico.

Apesar da baixa porcentagem de germinação, as análises da viabilidade por carmin das variedades tangerina IAC 2019Maria, tangerina Ponkan e laranja Pera, mostraram que a laranja Pera apresenta maior porcentagem de grãos de pólen viáveis, já a tangerina Ponkan apresentou a menor porcentagem (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem média de grãos de pólen viáveis e inviáveis de tangerina IAC 2019Maria, laranja Pera e tangerina Ponkan. (Cordeirópolis, 2019).

Tratamento	Média de viáveis	Média de inviáveis
Laranja Pera	92 a	7,7 b
Tangerina IAC 2019Maria	88 a	12 b
Tangerina Ponkan	78 b	22 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p > 0,05$).

Os resultados da análise mostram que as variedades laranja Pera e tangerina IAC 2019Maria apresentam maior média de porcentagem de pólen viáveis, não havendo diferenças significativas entre elas, já a tangerina Ponkan apresentou a menor média de pólen viáveis e diferiu significativamente das demais. Consequentemente a tangerina Ponkan também apresentou a maior média de pólen inviáveis e diferiu significativamente das outras variedades IAC 2019Maria e laranja Pera que apresentaram menor média de pólen inviáveis.

Latado *et al.* (2004) obtiveram uma porcentagem média variável de 8,1% a 68,9%, em clones mutantes de laranjeira Pêra enquanto Domingues, Tulmann Neto

e Teófilo Sobrinho (2000) encontraram valores entre 28,1% e 57,3%, na avaliação de diferentes clones de laranja Pera. Neste experimento todas as variedades apresentaram valores altos de porcentagem média de pólen viáveis, podendo-se sugerir que todas têm pólen viável e podem ser utilizadas como genitor masculino em programas de melhoramento.

5.2. Influência da polinização sobre a porcentagem de frutos colhidos na tangerina IAC 2019Maria

Dos tratamentos realizados neste trabalho, a polinização com laranja Pera apresentou maior número de frutos fixados 85 (52%), enquanto os demais tratamentos ficaram abaixo deste valor (Tabela 4).

As flores autopolinizadas produziram 43 frutos (6%), e o tratamento sem polinização resultou em apenas um fruto fixado, resultado semelhante a Azevedo e Pio (2002). Enquanto as polinizações com tangerina Ponkan resultaram em 8 frutos (16%).

Tabela 4. Número de polinizações feitas (NPF), número de frutos fixados e colhidos (NFC) e porcentagem de frutos colhidos (PFC) por tratamento em tangerinas IAC 2019Maria (Cordeirópolis, 2019).

Tratamentos	NPF	NFC	PFC
Autopolinização	763	43	6%
Sem polinização	312	1	0,3%
Polinização - Laranja Pera	163	85	52%
Polinização - Tangerina Ponkan	51	8	16%
Total	1294	137	

Conforme os resultados mostram, as polinizações com laranja Pera apresentam a maior porcentagem de frutos fixados, com 52%. Já as flores emasculadas tiveram o menor número de frutos fixados, com apenas 1, conforme a tabela 4, resultados semelhantes foram observados em outros trabalhos. Azevedo e Pio (2002), notaram em seu trabalho com tangor Murcott, que em flores sem polinização não houve a fixação dos frutos, indicando que aquela variedade não produzia frutos partenocárpicos. Assim pode-se sugerir que esta variedade também não apresente esta capacidade de produzir frutos sem que haja polinização. Uma possível explicação para esse resultado é de que a ausência de polinização causaria a redução dos níveis de giberelina nos ovários, levando a provável queda dos frutos,

pois este está relacionado a divisão e crescimento celular (BEN-CHEIKH *et al.*, 1997; RIVAS *et al.*, 2010). Em seu estudo Bermejo *et al.* (2015), verificaram que os níveis de giberelina são maiores em ovários polinizados de Murcott do que naqueles não polinizados.

No caso da autopolinização (43 frutos), este resultado pode ter se dado pelo fato de que uma baixa quantidade de grãos de pólen atingiu o estigma, ou também, pela inviabilidade do pólen, sendo que este pode ter se tornado inviável antes do estigma estar receptível (WALLACE; LEE, 1999).

5.3. Influência da polinização sobre o número de sementes na tangerina

IAC 2019Maria

O número médio de sementes em tangerina IAC 2019Maria originadas de polinização com tangerina Ponkan (21,4) foi mais elevado em relação a polinização com laranja Pera (16,2) e a autopolinização (14,8), mostrando que na polinização cruzada ocorreu maior formação de sementes do que na polinização com o pólen da própria flor. No entanto, quanto à viabilidade das sementes, a diferença se mostrou mais evidente por tratamento.

Em relação à polinização aberta, esta apresentou a maior média de sementes por fruto (22,9), mas a viabilidade destas esteve aproximadamente a 50%. Os frutos originados de polinização com laranja Pera apresentaram maior porcentagem de sementes viáveis (74%) e menor porcentagem de sementes abortadas (26%). Os frutos de polinização com tangerina Ponkan também tiveram maior porcentagem de sementes viáveis (68%) e menor de sementes abortadas (32%). Já os frutos de autopolinização continham mais sementes abortadas (67%) e menos sementes viáveis (33%), Wallace e Lee (1999) e Azevedo e Pio (2002) também relataram que a polinização cruzada exerce influência na formação de sementes em tangor Murcott (Tabela 5 e Figura 1).

Tabela 5. Número médio de sementes por fruto (NMS), porcentagem de sementes viáveis (PSV) e abortadas (PSA) por fruto de tangerina IAC 2019Maria obtidos de autopolinização e polinização controlada e aberta (Cordeirópolis, 2019).

Tratamentos	NMS	PSV (%)	PSA (%)
Polinização com laranja Pera	16,2	74	26
Autopolinizada	14,8	33	67
Polinização aberta	22,9	47	53
Polinização com tangerina Ponkan	21,4	68	32

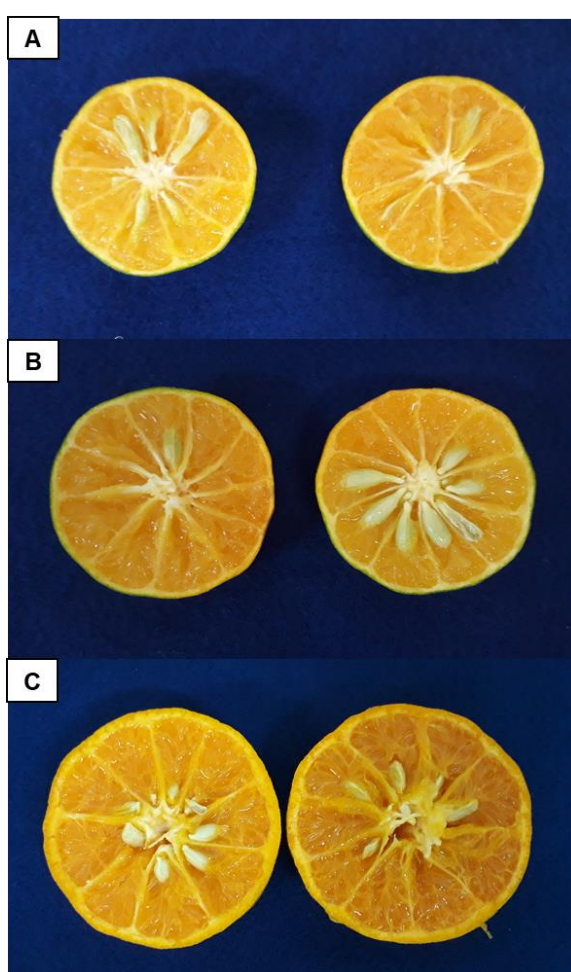


Figura 1. Frutos colhidos de cruzamentos controlados de tangerina IAC 2019Maria: A) Fruto proveniente de autopolinização; B) Fruto originado de polinização cruzada com pólen de laranja Pera; C) Fruto originado de polinização com tangerina Ponkan.

Este resultado em autopolinização pode ter ocorrido devido à pouca quantidade de pólen no estigma das flores conforme Wallace e Lee (1999), ou ainda pela autoincompatibilidade. Carvalho *et al.* (1997) consideraram em seu estudo com

tangerina Sunki que a autopolinização possivelmente impossibilitou a compatibilidade pós-zigótica, fazendo com que as sementes tivessem seu desenvolvimento cessado.

Qin, *et al* (2015), analisando a ausência de sementes em citros 'Huami Wuhegonggan' (HMWG) (*C. sinensis* x *C. reticulata*), verificaram que o aborto embrionário foi a maior causa da ausência de sementes e não a autoincompatibilidade, no entanto a baixa viabilidade e frequência de germinação do pólen, e consequente baixa fertilidade pode ter contribuído para a ausência de sementes. Já em toranjas 'Zigui shatian' (*C. grandis* Osbeck) a sua autoesterilidade se deve ao desenvolvimento irregular de embriões pós-zigóticos e não à autoincompatibilidade evidenciado pela presença de sementes murchas (CHAI *et al.*, 2011).

5.4. Seleção de marcadores SSR informativos para as populações de tangerina IAC 2019Maria

Para selecionar os *primers* mais informativos foram feitos testes com todos 27 os pares de *primers* (Tabela 2). Destes, foram selecionados 9 pares de SSR que se apresentaram mais informativos para o experimento, apresentando maior número de bandas polimórficas que permitissem visualizar a diferença entre os indivíduos.

Foram considerados informativos para a população de autopolinização de tangerina IAC 2019Maria os pares de *primers* que permitiram a visualização de dois ou mais alelos (bandas) na planta mãe, sendo possível determinar os indivíduos híbridos de autopolinização pela ausência de uma das bandas presentes no genitor feminino.

Para os indivíduos provenientes dos cruzamentos, os pares de *primers* considerados informativos, foram aqueles que apresentaram dois ou mais alelos para pelo menos um dos genitores. A exemplo, o *primer* CCSM-EST-159 (Figura 2-A) permite a visualização de apenas um alelo para tangerina IAC 2019Maria, não sendo informativo para a população de autopolinização, mas em tangerina Ponkan e laranja Pera foi possível visualizar dois alelos em cada um dos indivíduos, mostrando polimorfismo claro entre os genitores. Já o *primer* CCSM-EST-164 (Figura 2-D) apresentou padrão dos mesmos dois alelos para tangerina IAC 2019Maria e laranja Pera, permitindo a identificação dos indivíduos híbridos pela ausência de uma das bandas presentes em ambos os genitores.

Os pares de *primers* SSR considerados não informativos foram aqueles que se apresentaram monomórficos para ambos os parentais, não permitindo a visualização de diferenças claras entre ele, a exemplo, o *primer* genômico CCSM40 (Figura 2-F), apresentou-se monomórfico para a população de tangerina IAC 2019Maria x laranja Pera, além disso, por apresentar padrão de apenas uma banda (um alelo) para tangerina IAC 2019Maria, não foi considerado informativo para a população originada de autopolinização.

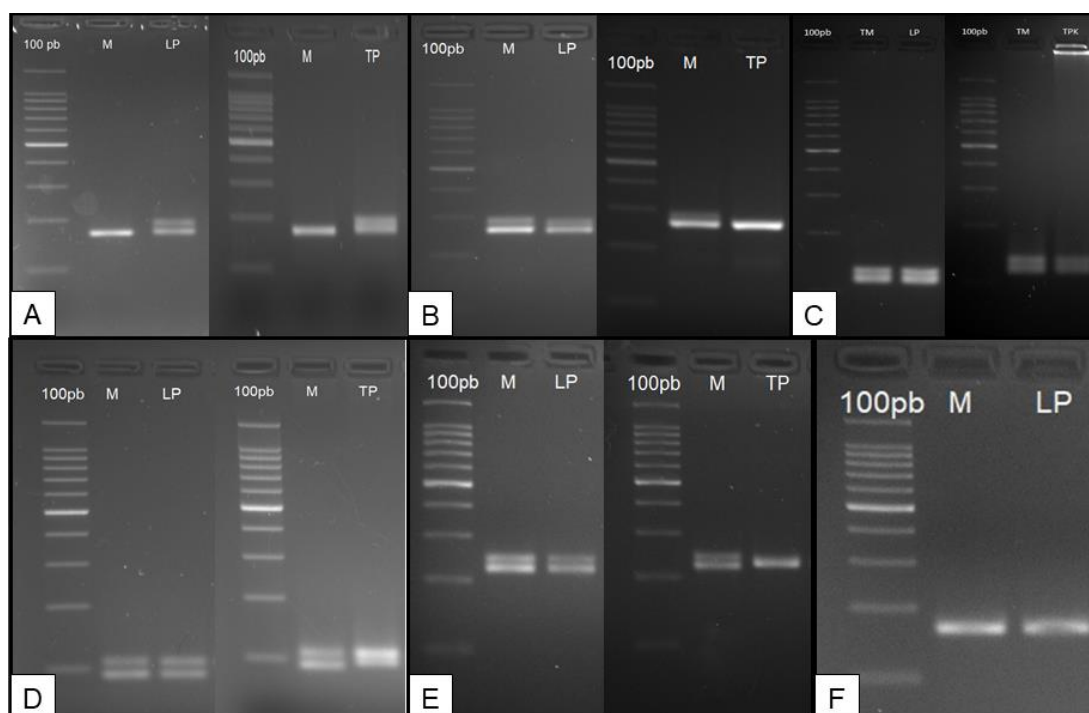


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 3%. Amplificação de DNA de Tangerina IAC 2019Maria (M); Laranja Pera (LP); Tangerina Ponkan (TP) utilizando marcador SSR: A) CCSM-EST-159; B) CCSM-EST-161; C) CCSM-EST-191; D) CCSM-EST-164; E) CCSM-EST-234 e F) CCSM-40.

Os *primers* CCSM-EST-159, CCSM-EST-161, CCSM-EST-164, CCSM-EST-191, CCSM-EST-234, amplificaram alelos informativos que apresentaram polimorfismo claro entre a tangerina IAC 2019Maria e tangerina Ponkan e laranja Pera (Figura 2-A, B, C, D e E) e para tanto foram utilizados para a genotipagem das populações. Os *primers* CCSM-EST-169, CCSM-EST-60, CCSM-EST-64, e CCSM-EST-89 também foram informativos e foram utilizados para confirmar as plantas nucleares.

Em relação aos pares de *primers* SSR mais informativos, o CCSM-40 permitiu a visualização de apenas um alelo para essa população, já os *primers* CCSM-EST-159 e CCSM-EST-191 permitiram a visualização de dois alelos na população,

enquanto os *primers* CCSM-EST-161, CCSM-EST-164, CCSM-EST-234 permitiram visualizar três alelos diferentes nas populações. A tangerina Ponkan por exemplo apresentou para o par de *primers* CCSM-EST-234 apenas uma banda de peso molecular diferente das duas bandas ou dois alelos da tangerina IAC 2019Maria e da laranja Pera. Para o par de *primers* CCSM-EST-161 das duas bandas presentes no parental feminino, apenas uma estava presente na tangerina Ponkan. Enquanto o par de *primers* CCSM-EST-164 permitiu a visualização de duas bandas na tangerina Ponkan, sendo uma em comum com o parental feminino e outra de peso molecular diferente.

Para os parentais masculinos, o *primer* CCSM-EST-159 também permitiu a visualização de dois alelos, sendo apenas um em comum com a tangerina IAC 2019Maria, para os demais *primers*, o padrão de alelos da laranja Pera e tangerina IAC 2019Maria foi o mesmo.

5.5. Identificação de embriões zigóticos

Dos cruzamentos realizados foram obtidas cinco populações, sendo elas: População originada de autopolinização de tangerina IAC 2019Maria; População de plantas originada de tangerina IAC 2019Maria em polinização aberta (genitor masculino desconhecido); População de plantas de tangerina IAC 2019Maria X tangerina Ponkan; População de plantas originadas de tangerina IAC 2019Maria X laranja Pera e plantas de sementes abortadas de tangerina IAC 2019Maria X laranja Pera (Tabela 6).

Indivíduos cujo padrão de bandas diferiu da planta mãe (tangerina IAC 2019Maria) foram considerados híbridos e foram destacados com cores diferentes para cada par de *primer* nos apêndices A, B, C, D e E. Os indivíduos cujos padrões de bandas apresentaram polimorfismo claro em relação à planta mãe foram destacados em verde na coluna dos embriões zigóticos. Os resultados da genotipagem das populações F₁ se encontram na tabela 6 e 8. Como é possível verificar todos os indivíduos analisados foram considerados híbridos por apresentarem polimorfismo claro em relação a planta mãe (tangerina IAC 2019Maria).

Tabela 6. Caracterização de plantas de cinco populações de cruzamentos, número de plantas obtidas por cruzamento (NP), número de plantas zigóticas (NZ), número de plantas nucelares (NN), e porcentagem de plantas zigóticas obtidas por cruzamento (PZ).

Populações	NP	NZ	NN	PZ
Tangerina IAC 2019Maria X Tangerina Ponkan	11	11	0	100%
Tangerina IAC 2019Maria (Polinização aberta)	21	21	0	100%
Tangerina IAC 2019Maria autopolinizada	33	33	0	100%
Tangerina IAC 2019Maria x Laranja Pera	258	258	0	100%
Tangerina IAC 2019Maria x Laranja Pera (sementes abortadas)	11	11	0	100%
TOTAL	334	334	0	100%

Do tratamento de autopolinização, foram feitas 763 polinizações, sendo obtidos 43 frutos com cerca de 172 sementes, das quais foram obtidas 33 plantas, sendo que neste experimento todas as plantas (100 %) foram identificadas como híbridos (Figura 3, Tabela 6 e Apêndice A).

A eletroforese em gel de agarose das amostras de tangerina IAC 2019Maria autopolinizada (Figura 3), demonstra que todos os indivíduos, com exceção da planta 86, certamente são indivíduos híbridos identificados por estes pares de *primers*. Visto que a planta 86 não apresentou polimorfismos para esses *primers*, ela foi novamente testada com outros pares de SSR da tabela 2, e utilizando-se os pares de microssatélites CCSM-EST- 64 e CCSM-EST- 89 foi possível identificá-la como zigótica (Figura 8-A e C). Cristofani *et al.* (2001), em seus estudos verificaram que com apenas um par de *primers* SSR foi suficiente para identificar híbridos em polinização cruzada, no entanto para autopolinização ele detecta somente 50% de híbridos.

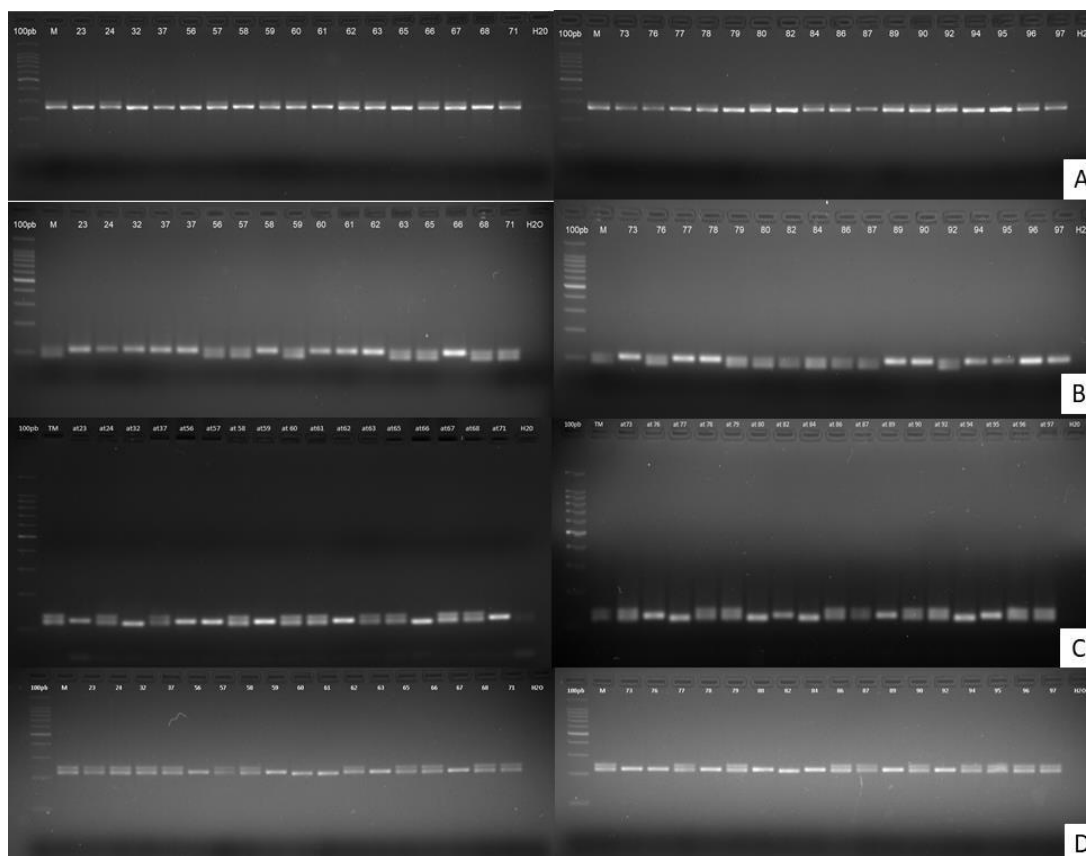


Figura 3. Genotipagem em gel de agarose a 3%, com quatro pares de *primers*, de híbridos de tangerina IAC 2019Maria autopolinizada: A) CCSM-EST-161; B) CCSM-EST-164; C) CCSM-EST-191; D) CCSM-EST-234.

Das polinizações abertas em tangerina IAC 2019Maria, foram obtidos 21 frutos e cerca de 319 sementes e 21 plantas, as quais foram todas identificadas como híbridos (Tabela 6, Figura 4 e Apêndice B) pela genotipagem com 5 pares de *primers*, os resultados podem ser visualizados abaixo na revelação dos géis de agarose 3%, apresentados na figura 4.

Assim como as autopolinizadas, as plantas cujo padrão de bandas diferiu da planta mãe foram consideradas como híbridos, pois não se tem conhecimento do parentam masculino para comparação. A exemplo, na figura 4-A o padrão de alelos para a tangerina IAC 2019Maria foi de apenas um, dessa forma, quando houve a visualização de mais de um alelo nos indivíduos da população, estes foram considerados híbridos, cujo segundo alelo foi possivelmente herdado do genitor masculino desconhecido. Enquanto, com os demais pares de *primers*, os embriões zigóticos foram identificados pela ausência de uma das bandas.

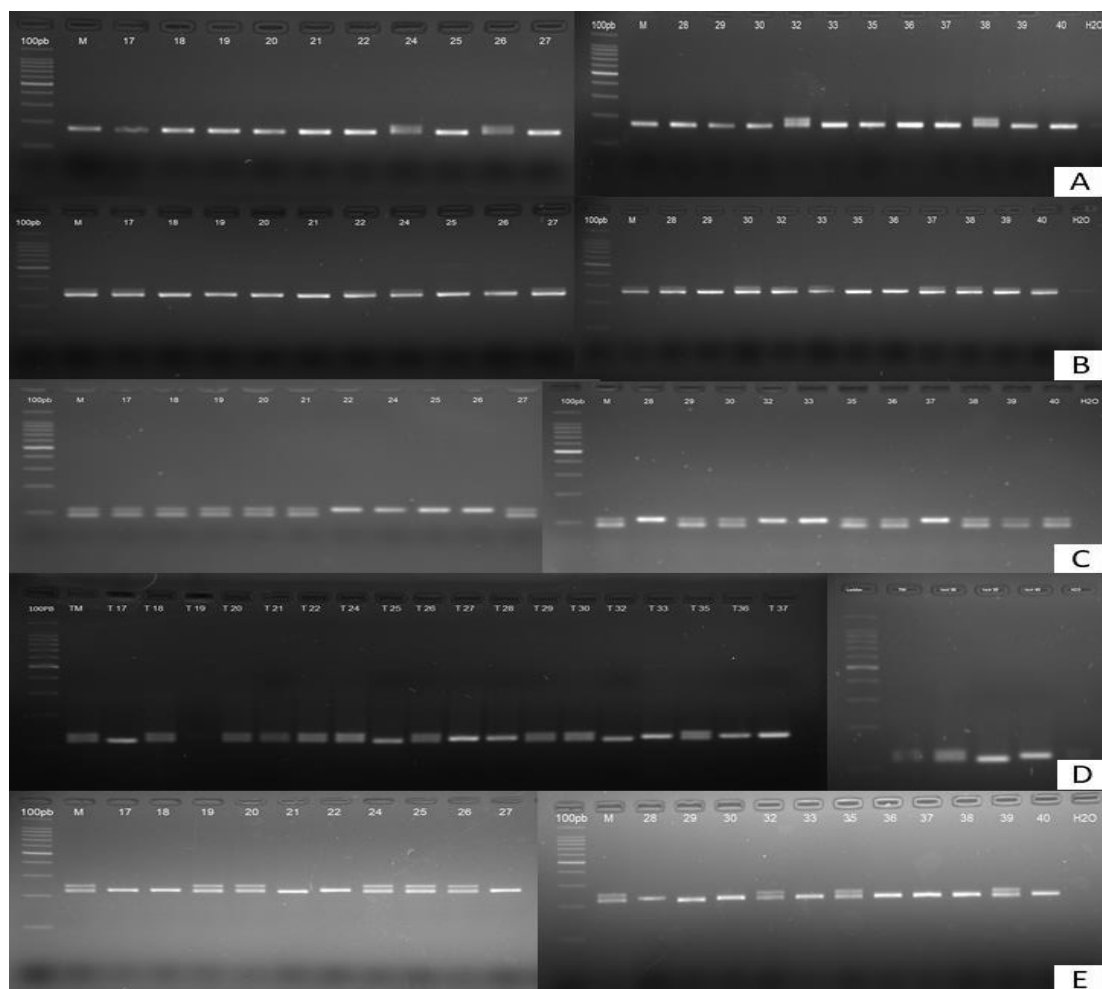


Figura 4. Genotipagem em gel de agarose a 3%, com cinco pares de *primers*, dos híbridos de tangerina IAC 2019Maria em polinização aberta: A) CCSM-EST-159; B) CCSM-EST-161; C) CCSM-EST164; D) CCSM-EST-191; E) CCSM-EST-234.

Nos cruzamentos de tangerina IAC2019Maria com tangerina Ponkan foram realizadas 51 polinizações, onde foram obtidos 8 frutos com 116 sementes com 11 plantas, sendo que 100% das plantas analisadas pelos cinco pares de *primers* se mostraram híbridas, a análise foi realizada considerando como zigóticas aquelas que apresentaram bandas (alelos) que herdaram do parental masculino (tangerina Ponkan) ou pela ausência de alelos maternos (Tabela 6, Figura 5 e Apêndice C).

A exemplo da necessidade de se utilizar mais de um marcador para se identificar os embriões zigóticos, utilizando quatro marcadores, todos os indivíduos, com exceção do indivíduo 6, foram identificados como híbridos, no entanto ao utilizar o marcador CCSM-EST-164 foi possível verificar o terceiro alelo proveniente do genitor masculino na planta 6 (Figura 5-C).

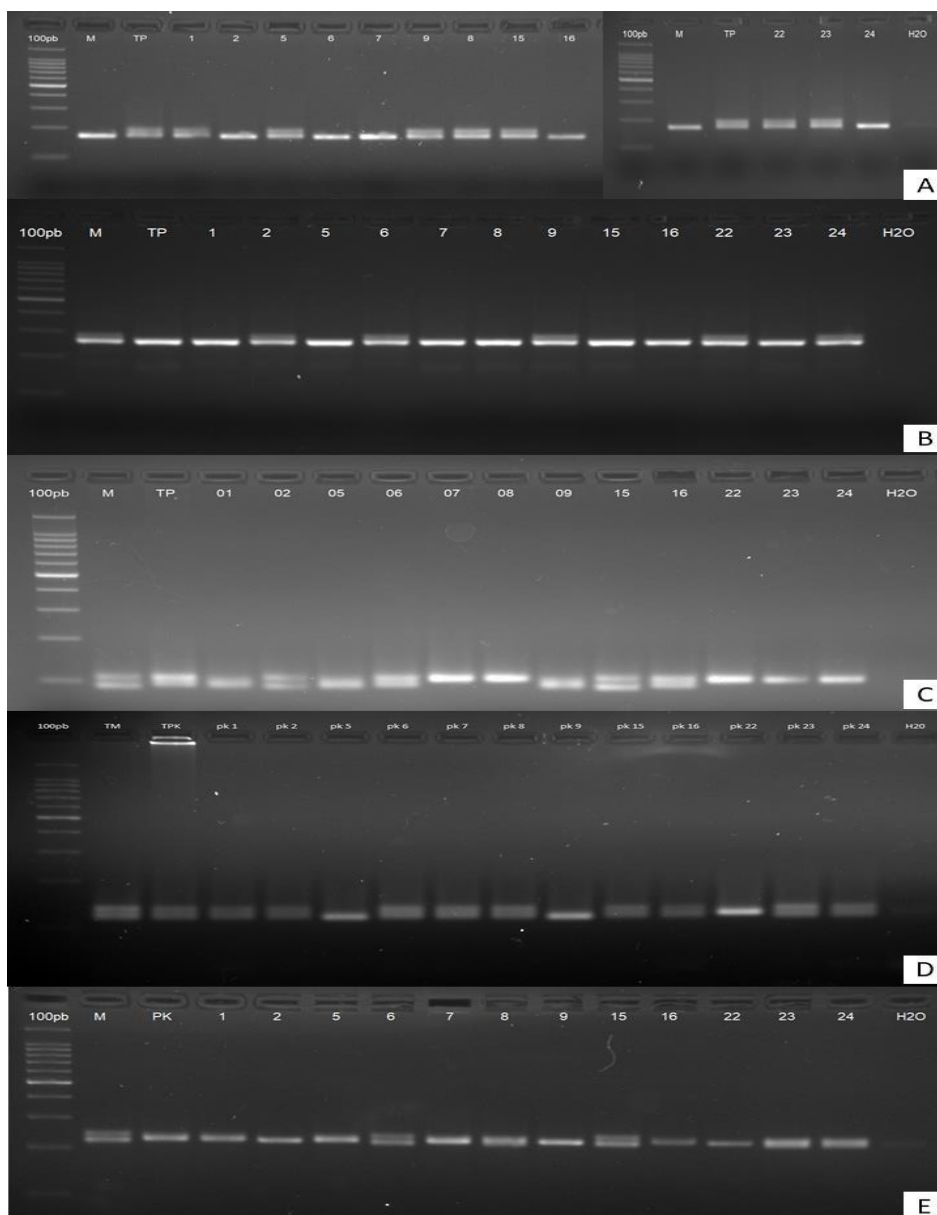


Figura 5. Genotipagem em gel de agarose a 3%, com cinco pares de *primers*, dos híbridos de tangerina IAC 2019Maria X tangerina Ponkan: A) CCSM-EST-159; B) CCSM-EST-161; C) CCSM-EST164; D) CCSM-EST-191; E) CCSM-EST-234.

Dos cruzamentos entre tangerina IAC2019Maria e laranja Pera IAC, foram realizadas 163 polinizações, das quais foram obtidos 85 frutos com aproximadamente 961 sementes e 258 plantas, sendo que 100% das plantas analisadas foram identificadas como embriões zigóticos (Tabela 6, Figura 6, Apêndice E).

Das sementes obtidas neste cruzamento 348 eram abortadas e também foram postas para germinar, dando origem a 11 plantas, destas, apenas uma foi considerado uma possível planta nucelar (planta 5 figura 7), a partir dos 4 pares de

primers utilizados, onde nenhum permitiu a visualização de diferenças entre ela e a planta mãe, mas ao genotipa-la com o *primer* CCSM-EST-169 foi possível visualizar a presença de uma banda compartilhada somente com o genitor masculino (Figura 8-D e 9) comprovando 100% de plantas zigóticas deste cruzamento.

Os resultados da eletroforese em gel das amostras de tangerina IAC 2019Maria x laranja Pera, (Figura 6 e 8) permitem verificar que 100% das plantas são híbridas, pois das 258 plantas testadas com os cinco pares de SSR, apenas 4 não foram identificadas como zigóticas, sendo necessário genotipá-las com outros pares de *primers* SSR. Como é possível verificar na figura 8 e 9 as plantas 51, 427 e 05 foram certificadas pelo marcador CCSM-EST-169. A planta 388 e a 86 de autopolinização foram certificadas pelos marcadores CCSM-EST-64 e CCSM-EST-89. O marcador CCSM-EST-60 permitiu confirmar que as plantas 361 e 427 eram híbridas.

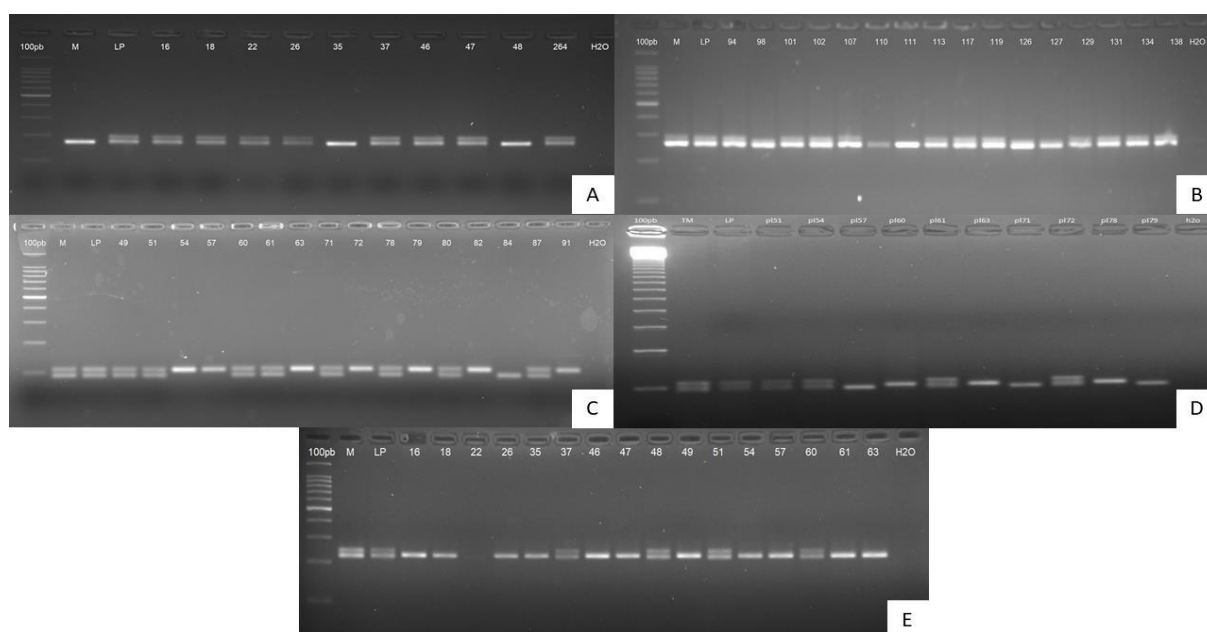


Figura 6. Genotipagem em gel de agarose a 3%, com cinco pares de *primers* SSR, dos híbridos de tangerina IAC 2019Maria X laranja Pera: A) CCSM-EST-159; B) CCSM-EST-161; C) CCSM-EST-164; D) CCSM-EST-191; E) CCSM-EST-234.

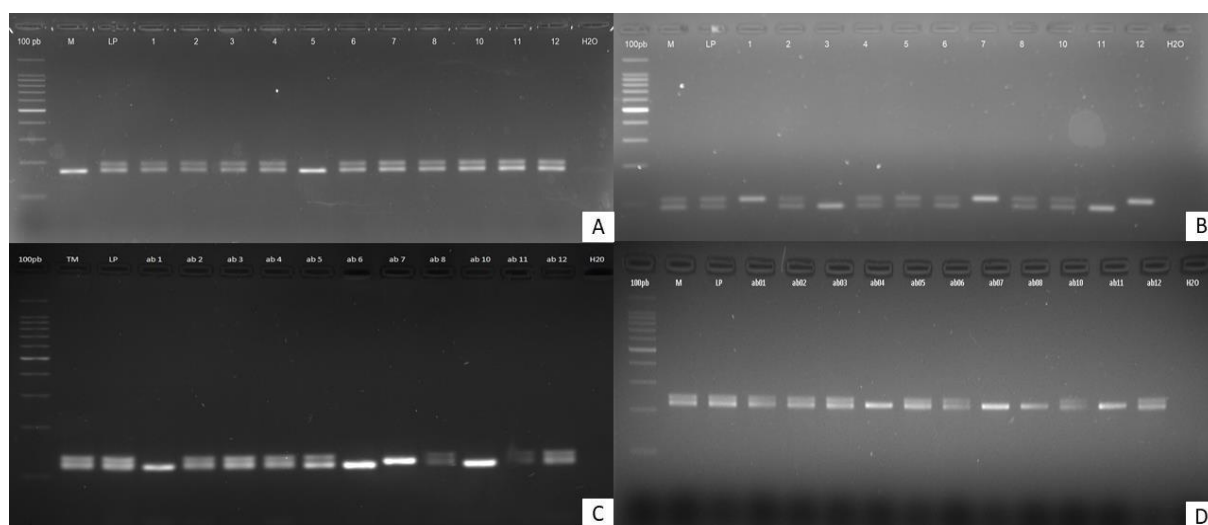


Figura 7. Genotipagem com quatro pares de *primers* SSR em gel de agarose a 3%, dos híbridos de sementes abortadas de tangerina IAC 2019Maria X laranja Pera: A) CCSM-EST-159; B) CCSM-EST-164; C) CCSM-EST-191; D) CCSM-EST-234.

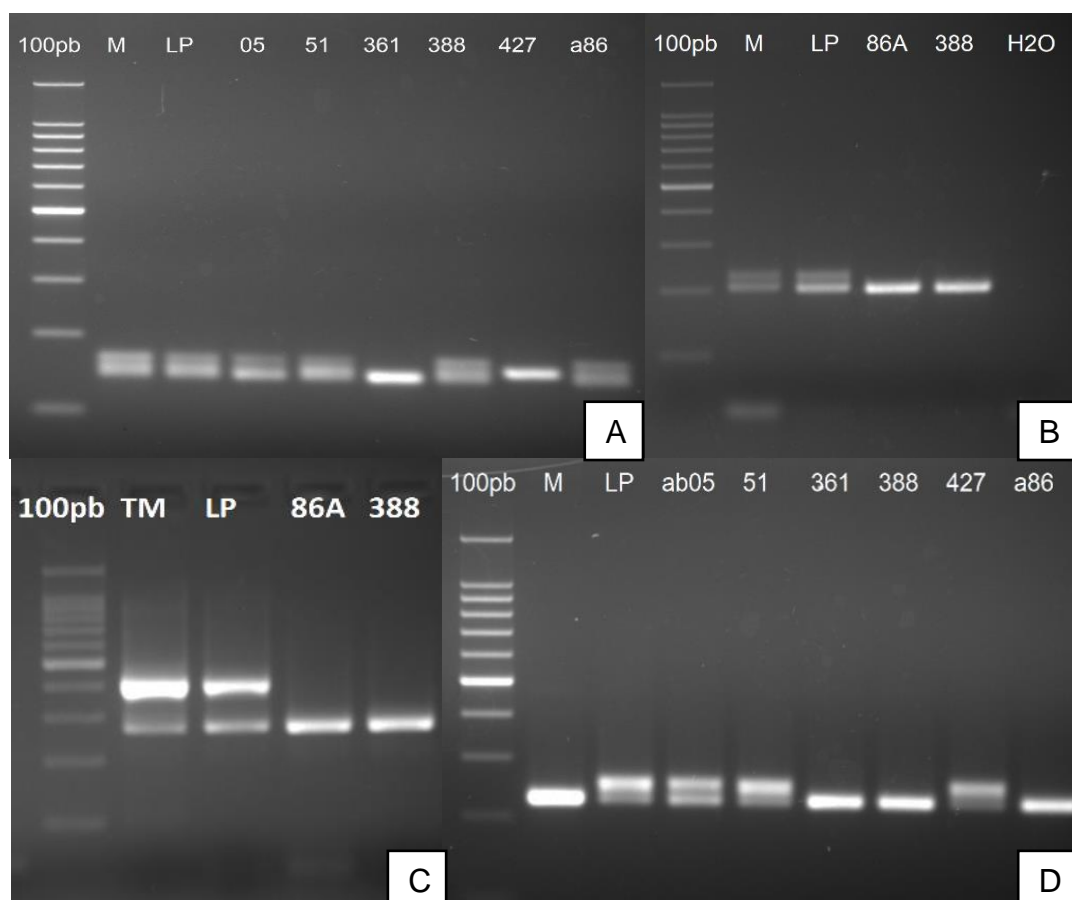


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 3%. Amplificação de DNA de Tangerina IAC 2019Maria (M); Laranja Pera (LP); e seis híbridos utilizando marcador SSR: A) CCSM-EST-60; B) CCSM-EST-64; C) CCSM-EST-89; D) CCSM-EST-169.

Híbridos	CCSM-EST-60	CCSM-EST-64	CCSM-EST-89	CCSM-EST-169	Embrião Zigótico
Híbrido 51					
Híbrido 361					
Híbrido 388					
Híbrido 427					
Autopolinizada 86					
Semente abortada 05					

Figura 9. Genotipagem dos híbridos de tangerina IAC 2019Maria com cinco marcadores SSR (CCSM-EST-60; CCSM-EST-64; CCSM-EST-89; CCSM-EST-169).

Para evitar erros equivocados e confirmar os resultados, todos os indivíduos foram testados com mais de um par de *primers*, pois indivíduos que apresentam mesmo padrão que a planta mãe por um marcador podem apresentar-se polimórficos por outro marcador. Como é possível verificar na tabela 7 e nas figuras 3, 4, 5, 6 e 7 nenhum dos pares de *primers* utilizados foi capaz de identificar todos os híbridos individualmente, assim a comparação entre eles foi necessária para genotipar corretamente a população.

Tabela 7. Porcentagem de plantas zigóticas identificadas por marcadores SSRs separadamente: (1) CCSM-EST-159, (2) CCSM-EST-161, (3) CCSM-EST-164, (4) CCSM-EST-191, (5) CCSM-EST-234.

Populações	1	2	3	4	5
Tangerina IAC 2019Maria X Tangerina Ponkan	58%	58%	83%	25%	83%
Tangerina IAC 2019Maria (Polinização aberta)	19%	38%	38%	48%	62%
Tangerina IAC 2019Maria autopolinizada		41%	47%	47%	41%
Tangerina IAC 2019Maria x Laranja Pera	89%	42%*	54%*	46%	53%
Tangerina IAC 2019Maria x Laranja Pera (sementes abortadas)	91%		45%	36%	36%

*Porcentagem de embriões zigóticos identificados em 57 indivíduos de Tangerina IAC 2019Maria x Laranja Pera.

A eficiência de cada *primer* variou para cada população, com o *primer* CCSM-EST-159 foi possível identificar 89% dos híbridos de toda a população de tangerina IAC 2019Maria e 91% em plantas de sementes abortadas. Já na população de polinização aberta apenas 19% das plantas foram identificadas como zigóticas e em cruzamentos com Ponkan 58%. No trabalho de Dezotti *et al.* (2017) este *primer* foi o único marcador específico identificado para a tangerina IAC 2019Maria (TM x LP 281).

O marcador SSR CCSM-EST-161, apresentou alelos informativos para 58% de Tangerina IAC 2019Maria X Tangerina Ponkan, 38% em polinização aberta, 41% em autopolinizada e 42% em cruzamentos com laranja Pera. Já o marcador CCSM-

EST-164 variou de 83% a 38%. O par de *primers* CCSM-EST-234 também variou muito de 83% a 36%. Enquanto o marcador CCSM-EST-191 não foi tão informativo para as populações, identificando menos de 50% em todos os cruzamentos.

A partir desses resultados pode-se verificar que houve uma frequência de 100% de híbridos identificados em todas a progênie analisada. Em comparação com métodos isoenzimáticos, Ruiz, Breto e Asins (2000), utilizando marcadores microsatélites para a seleção de plântulas nucelares e zigóticas em cruzamentos, concluíram que estes são mais eficientes para identificação de plântulas de origem sexual, dado seu alto nível de polimorfismo.

Marcadores moleculares microsatélites SSR e SSR-EST tem mostrado grande potencial para identificação e diferenciação de indivíduos e vem sendo muito utilizados em pesquisas de melhoramento de plantas cítricas.

Para Bressan (2008), utilizando marcadores SSR, nenhum dos marcadores co-dominantes foi capaz de detectar mais de 50% dos indivíduos zigóticos, no entanto os *primers* utilizados não eram específicos para a população proveniente de tangerina Montenegrina.

Já Schäfer, Bastianel e Dornelles (2004) e Cristofani *et al.* (2001), encontraram em seus trabalhos respectivamente 3,23% de embriões zigóticos em *Poncirus trifoliata*, 6% entre laranja Caipira e Azeda e 9,3% entre laranja Caipira e limão Cravo.

Rao *et al.* (2008) utilizando marcadores SSR-EST identificaram 77,8% de plântulas nucelares e 22,2% de plântulas zigóticas, em híbridos de tangerina (*C. reticulata* Blanco) e toranja (*C. maxima* Merr.). Chai *et al.* (2013) utilizando 212 marcadores SSR-EST derivados de toranja (*C. grandis* Osbeck), verificaram que 52 (53%) marcadores foram polimórficos e segregantes entre os genitores e a progênie. Carrillo-Medrano *et al.* (2018) utilizando marcadores SSR em híbridos de limão Galego (*C. aurantiifolia*) foram capazes de identificar os híbridos com apenas quatro marcadores. Enquanto Kaur *et al.* (2020) realizaram cruzamentos com a tangerina Kinnow (*C. nobilis* × *C. deliciosa*) e tangerina Mukaku Kishu (*C. kinokuni*), variedade sem sementes, a fim de se obter ausência de sementes em Kinnow. Para identificar os híbridos os autores utilizaram 134 pares de microsatélites, onde 4 deles foram adequados, detectando 104 híbridos, mostrando a eficiência dos SSR, nos programas de melhoramento na ausência de características morfológicas para detecção de híbridos.

Para Morgante e Olivieri (1993) os marcadores SSR são codominantes, multialélicos, geralmente apresentando altos níveis de polimorfismo e possuem reprodutibilidade.

Soares Filho *et al* (2000) em seu estudo com tangerina Sunki verificaram um baixo grau de poliembrião (15,9%) e alta frequência de híbridos (53,6%), sugerindo que a frequência de híbridos expressa uma relação negativa em relação ao grau de poliembrião do parental feminino, ou seja, quanto maior a frequência de híbridos, menor o grau de poliembrião. Além disso, estes autores citam que o menor número de embriões por sementes induz um aumento no tamanho do embrião, facilitando a sua germinação e desenvolvimento, devido a maior disponibilidade de nutrientes nos cotilédones.

A associação inversa entre grau de poliembrião e número de híbridos obtidos foi verificada em outros trabalhos (SOARES FILHO *et al.*, 2000; SOARES FILHO *et al.*, 2002; SOARES FILHO *et al.*, 2014).

Soares Filho *et al.* (2002), notaram em seu experimento que em variedades com alto grau de poliembrião, o cultivo *in vitro* favoreceu a sobrevivência dos híbridos.

A poliembrião da tangerina IAC 2019Maria foi avaliada considerando-se o número médio de embriões por semente e a porcentagem de poliembrião (SOARES-FILHO *et al.*, 2002).

Segundo Cristofani-Yaly (comunicação pessoal) a média de embriões por sementes de tangerina IAC 2019Maria foi de 1,11 variando de 1 a 2 embriões por semente. A porcentagem de poliembrião nesse caso foi de 10,7%. Soares-Filho *et al.* (2000), observando poliembrião das variedades Clementina e Sunki, obtiveram média de 1 e 1,3 embriões por semente, e porcentagem de poliembrião de 1,4% e 15,9%, classificando-as respectivamente como monoembriônica e baixa poliembrião. Soares-Filho *et al.* (2000) constataram uma associação inversa entre o grau de poliembrião e a frequência de embriões de maior tamanho, principalmente em relação aos embriões zigóticos de sementes com baixo grau de poliembrião. O fato de serem maiores facilita a sua germinação pela maior quantidade de reservas de nutrientes disponíveis.

Observando os resultados obtidos pela identificação de embriões zigótico por marcadores SSR e contagem de embriões por semente, pode-se afirmar que a

tangerina IAC 2019Maria apresentou baixa poliembrião neste experimento, contendo em média 1,11 embrião por semente e progênie de 100% de plantas híbridas.

5.6. Análises da ploidia de plantas híbridas de tangerina IAC 2019Maria por citometria de fluxo

Os resultados obtidos por histogramas pela técnica de citometria de fluxo, permitiram a identificação da ploidia das plantas obtidas de cruzamentos de tangerina 2019Maria com tangerina Ponkan e laranja Pera, autopolinização e polinização aberta (Figura 10).

Os valores relativos médios de volume nuclear das amostras das plantas-controle diploides (genitores) se encontravam entre 35 e 37, enquanto o valor médio da planta-controle triploide foi de 53 (Tabela 8).

Dessa forma as amostras que possuíam histogramas com picos entre 50 e 60 foram consideradas como sendo triploides. Enquanto as plantas que apresentaram picos acima de 60 foram consideradas tetraploides.

Tabela 8. Leituras de suspensões nucleares de folhas das plantas híbridas triploide e tetraploides, e plantas-controle diploide e triploide de cruzamentos de tangerina 2019Maria, coradas com o fluorocromo DAPI e avaliadas por citometria de fluxo.

Genótipo	Leitura média	Ploidia estimada
Tangerina IAC 2019Maria	37	2x
Lima ácida Tahiti	53	3x
Híbrido de autopolinização 62	71	4x
Híbrido 72 (TM x LP)	70	4x
Híbrido 05 (semente abortada)	55	3x

Nas análises de citometria de fluxo, o valor mínimo e máximo apresentado pelas plantas híbridas diploide foi de 31 e 44 e média de 37. Dessa forma pode-se afirmar que uma planta haploide (x) teria valor aproximado de 18, diploide (2x) 37, triploide (3x) 55 e tetraploide (4x) 74.

Da população de plantas resultantes de autopolinização, 33 indivíduos foram analisados pela citometria de fluxo mostraram que apenas uma planta (3%), o híbrido 62 (Tabela 8), apresentou valor médio de 71, sendo considerada uma planta tetraploide (4x).

Enquanto nas 11 plantas provenientes de sementes abortadas de tangerina IAC 2019Maria x laranja Pera, apenas o híbrido 05 foi considerado um triploide (3x),

pois apresentou média de 55. Já as análises dos histogramas das 11 plantas provenientes dos cruzamentos de tangerina IAC 2019Maria x tangerina Ponkan e polinização aberta, apresentaram somente plantas diploides (2x).

Já a população de 258 plantas de tangerina IAC 2019Maria x laranja Pera apresentou apenas um indivíduo poliploide (0,4%), a planta 72, que foi considerada uma tetraploide com valor médio de 70.

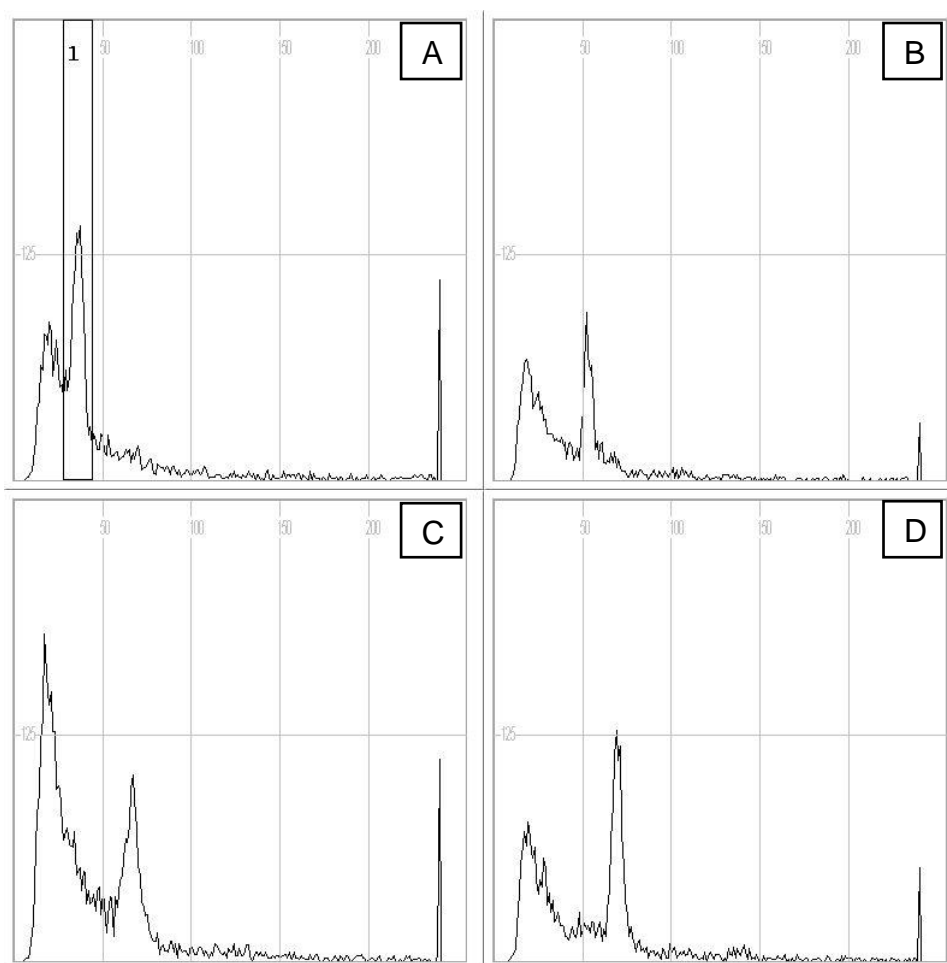


Figura 10. Histogramas de amostras de folhas de plantas de: A) tangerina IAC 2019Maria controle diploide (2x); B) híbrido 05 triploide (3x); C) híbrido de autopolinização 62 tetraploide (4x) e D) híbrido 72 tetraploide (4x).

Dos 334 híbridos obtidos dos cruzamentos e avaliados por citometria de fluxo, 331 (99,1%) foram considerados diploides e 3 (0,9%) foram considerados poliploides, sendo dois tetraploides e um triploide. O triploide foi obtido a partir de uma semente abortada (menor) do cruzamento tangerina IAC 2019Maria x laranja Pera.

Quanto aos tetraploides, o híbrido 62 foi obtido a partir de autopolinização, mostrando que a tangerina IAC 2019Maria contribuiu com dois gametas 2x. O

híbrido 72 teria herdado um gameta 2x de cada um dos parentais (tangerina IAC 2019Maria x laranja Pera).

Vários autores relataram baixa frequência de obtenção natural de plantas triploides em progênies de *Citrus* obtidas de cruzamentos 2x x 2x (CAMERON; FROST, 1968; ESEN; SOOST, 1971; ROCHA, 2014).

Resultados semelhantes foram obtidos em outros trabalhos, Rocha (2014) utilizando o mesmo método observou valores semelhantes em sua pesquisa, com valor médio de volume nuclear de 34 para diploides, 51 para triploides e 68 para tetraploides, e um total de 6,2% de plantas triploides em toda a população.

Para Esen e Soost (1971) a porcentagem de híbridos triploides obtido de cruzamentos entre citros diploides variou entre 24,0 e 0,41% das plantas dependendo do genitor feminino utilizado.

Esen e Soost (1971) sugerem que a triploidia é produto da união de um gameta diploide (2x) e um monoploide (x), situação em que teoricamente qualquer um dos pais pode contribuir com o gameta com um número não reduzido (2x). No entanto, os autores demonstram que a não disjunção ocorre no genitor feminino. Fato que se comprova com a obtenção de uma planta tetraploide a partir de autopolinização como é o caso na planta 62.

Aleza *et al.* (2010) encontraram híbridos triploides em sementes que eram de 52 a 62% menores do que as sementes normais. Para Esen e Soost (1971) o tamanho das sementes com embriões triploides foi reduzido de 1/3 a 1/6 do tamanho das sementes diploides, este fato está possivelmente relacionado como um menor desenvolvimento do endosperma pentaploide ou devido a finalização mais precoce do seu desenvolvimento. Além disso, a porcentagem de triploides varia dependendo dos pais das sementes. Como visto neste experimento a planta 05 (3x) foi obtida a partir de uma semente de menor tamanho em relação às demais, fato que se correlaciona com o proposto pelos autores.

Aleza *et al.* (2010) obtiveram frequências de 58 a 98,4% de plantas triploides, em populações híbridas de tangerinas, usando método de seleção prévia e germinação *in vitro* somente das sementes de menor tamanho.

Para Aleza *et al.* (2009) as plantas tetraploides de genótipos não apomíticos de citros são de grande interesse para programas de melhoramento de triploides, isso porque as plantas tetraploides têm de grande valor como parentais femininos

para programas de produção de triploides por permitir a produção de grandes populações. Segundo Navarro *et al.* (2003), os cruzamentos $4n \times 2n$ apresentaram maior eficiência a produção de plantas triploides, demonstrando a necessidade de obtenção de plantas tetraploides.

No presente estudo, 0,9% (3 plantas) das 334 plantas avaliadas foram consideradas poliploides, demonstrando que cruzamentos com a tangerina IAC2019Maria tem potencial para obtenção de mais indivíduos poliploides.

6 CONCLUSÕES

A tangerina IAC 2019Maria, dentro das condições em que este experimento foi realizado, não foi capaz de produzir frutos partenocárpicos. Quando polinizada com as variedades Pera e Ponkan houve um acréscimo na quantidade de frutos fixados e no número de sementes por fruto.

A tangerina IAC 2019Maria foi autocompatível quando autopolinizada e apresentou menor número de sementes nesta situação. Desta forma, seu plantio isolado pode ser uma estratégia para produção de frutos com menor número de sementes.

As combinações de *primers* SSR permitiram verificar que 100% das plantas obtidas eram híbridas, e juntamente com os resultados da contagem de embriões por sementes é possível sugerir que a tangerina IAC 2019Maria é uma planta com baixa poliembrionia, que pode ser amplamente utilizada em programas de melhoramento para obtenção de híbridos.

Por meio da técnica de citometria de fluxo, foi possível identificar três híbridos poliploides, sendo um triploide e dois tetraploides, em todas as populações analisadas.

7 LITERATURA CITADA

ALEZA, P.; JUÁREZ, J.; CUENCA, J.; OLLITRAULT, P.; NAVARRO, L. Recovery of citrus triploid hybrids by embryo rescue and flow cytometry from 2x× 2x sexual hybridisation and its application to extensive breeding programs. **Plant cell reports**, Berlin, v. 29, n. 9, p. 1023-1034, 2010.

ALEZA, P.; JUÁREZ, J.; OLLITRAULT, P.; NAVARRO, L. Production of tetraploid plants of non apomictic citrus genotypes. **Plant cell reports**, Berlin, v. 28, n. 12, p. 1837-1846, 2009.

ARAUJO, E. F.; ROQUE, N. Taxonomia dos citros. *In*: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citrus**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, 2005. p.127-143.

AZEVEDO, F. A. D.; BORGES, R. D. S.; FÁVERO, M. A. B.; GIORGI NETO, R. O.; SCHINOR, E. H.; BASTIANEL, M. A polinização cruzada determina a formação de sementes em frutos de clementina Nules. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, p. 88-92, 2013.

AZEVEDO, F. A.; PIO, R. M. Influência da polinização sobre o número de sementes do tangor 'Murcote'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 468-471, 2002.

AZEVEDO, F. A.; PIO, R. M. O papel da polinização na citricultura. **Citricultura Atual**, Cordeirópolis, v. 4, n. 23, p. 4-5, 2001.

AZEVEDO, F. A.; POLYDORO, D. A.; BASTIANEL, M.; KUPPER, K. C.; STUART, R. M.; COSTA, F. P.; PIO, R. M. Resposta de diferentes genótipos de tangerinas e seus híbridos à inoculação *in vitro* e *in vivo* de *Alternaria alternata*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.32, p.1-10, 2010.

BARRY, G. H. The quest for seedless Citrus fruit. *In*: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, n. 10., 2004, Agadir. **Proceedings of the International Society of Citriculture**. Agadir, 2004. p. 346.

BASTIANEL, M.; SCHWARZ, S. F.; COLETA FILHO, H. D.; LIN, L. L.; MACHADO, M.; KOLLER, O. C. Identification of zygotic and nucellar tangerine seedlings (*Citrus* spp.) using RAPD. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 21, p. 123-127, 1998.

BASTOS, D. C.; FERREIRA, E. A.; PASSOS, O. S.; DE SÁ, J. F.; ATAÍDE, E. M.; CALGARO, M. Cultivares copa e porta-enxertos para a citricultura brasileira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 35, n. 281, p. 36-45, 2014.

BEN-CHEIKH, W.; PEREZ-BOTELLA, J.; TADEO, F. R.; TALON, M.; PRIMO-MILLO, E. Pollination increases gibberellins levels in developing ovaries of ceded varieties of citrus. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 114, n. 2, p. 557-564, 1997.

BERMEJO, A.; PRIMO-MILLO, E.; AGUSTÍ, M.; MESEJO, C.; REIG, C.; IGLESIAS, D. J. Hormonal Profile in Ovaries of Mandarin Varieties with Differing Reproductive Behaviour. **Journal of Plant Growth Regulation**, [S.l.] v. 34, n. 3, p. 584–594, 2015.

BRESSAN, J. R. **Identificação precoce de indivíduos zigóticos em populações provenientes de autopolinização em tangerineira 'Montenegrina'**. 2008. 68f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, 2008.

BRUCK, D. K.; WALKER, D. B. Cell determination during embryogenesis in *Citrus jambhiri*. I. Ontogeny of the epidermis. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 146, n. 2, p. 188-195, 1985.

CAMERON, J. W.; FROST, H. B. Genetics, breeding and nucellar embryony. *In*: REUTHER, W.; BATCHELOR, L. D.; WEBBER, H. J. (Eds.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, p.359-360, 1968.

CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; DAS VIRGENS FILHO, J. S.; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V. SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, Ponta Grossa, v.1, n.2, p.18-24, 2001.

CARRILLO-MEDRANO, S. H.; GUTIERREZ-ESPINOSA, M. A.; ROBLES-GONZÁLEZ, M. M.; CRUZ-IZQUIERDO, S. Identification of Mexican lemon hybrids using molecular markers SSR. **Revista mexicana de ciências agrícolas**, Texcoco, v. 9, n. 1, p. 11-23, 2018.

CARVALHO, M. R. T. D.; BORDIGNON, R.; BALLVÉ, R.; LIZANA, M.; PINTO-MAGLIO, C. A. F.; MEDINA FILHO, H. P. Aspectos biológicos do reduzido número de sementes da tangerina'Sunki'. **Bragantia**, Campinas, v. 56, n. 1, p. 69-77, 1997

CCSM/IAC, centro de referência em pesquisa e difusão de tecnologia citrícola. **O Agrônomo**, Campinas, v.52, n.2-3, p.5-10, 2000.

CHAI, L.; BISWAS, M. K.; YI, H.; GUO, W.; DENG, X. Transferability, polymorphism and effectiveness for genetic mapping of the Pummelo (*Citrus grandis* Osbeck) EST-SSR markers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdã, v. 155, p. 85-91, 2013.

CHAI, L. J.; GE, X. X.; BISWAS, M. K.; XU, Q.; DENG, X. X. Self-sterility in the mutant 'Zigui shatian' pummelo (*Citrus grandis* Osbeck) is due to abnormal post-zygotic embryo development and not self-incompatibility. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, [S.l.] v. 104, n.1, p. 1-11, 2011.

CHAPOT, H. The citrus plant *In*: **CITRUS.CIBA-GEIGY AGROCHEMICALS**, ed. Basle, Switzerland, 1975. p.6-13.

CRISTOFANI, M.; FIGUEIREDO, J. O.; TARGON, M. L. P. N.; MACHADO, M. A. Differentiation of lemon varieties by microsatellites. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 24, n. 1, p. 165-175, 2003.

CRISTOFANI, M.; NOVELLI, V.; OLIVEIRA, A. C.; OTAVIANO, A. R.; SOUZA, A. A.; MACHADO, M. A. Identificação de híbridos de cruzamentos interespecíficos em citros utilizando marcadores RAPD e SSR. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 22, p. 231-341, 2001.

DEZOTTI, A. L.; SORATTO, T. A. T.; BASTIANEL, M.; NOVELLI, V. M.; CRISTOFANI-YALY, M. Seleção de marcadores específicos para caracterização de variedades do grupo das tangerinas e híbridos. **Revista Científica UNAR**, Araras, v. 14, n. 1, p. 21-39, 2017.

DOMINGUES, E. T.; TULMANN NETO A.; TEÓFILO SOBRINHO, J. Viabilidade de pólen em clones de laranja Pêra e outras variedades assemelhadas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p.85-89, 2000.

DONADIO, L. C.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MOREIRA, C. S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. *In*: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citrus**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, 2005. p.1-18.

DONADIO, L. C; STUCHI, E. S.; CYRILLO, F. D. L. **Tangerinas ou mandarinas?** Jaboticabal: Funep, 1998. 40 p.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, Londres, v. 5, n. 6, p. 435-445. 2004.

ESEN, A.; SOOST, R. K. Precocious development and germination of spontaneous triploid seeds in Citrus. **Journal of Heredity**, Washington, v. 64, n. 3, p. 147–154, 1973.

ESEN, A.; SOOST, R. K. Unexpected triploids in Citrus: their origin, identification and possible use. **Journal of Heredity**, Washington, v. 62, n. 6, p. 329–333, 1971.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nation. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>. Acesso em: 20 jan. 2022.

FERRARO, A. E.; PIO, R. M.; AZEVEDO, F. A. D. Influência da polinização com variedades de laranja-doce sobre o número de sementes de tangelo Nova. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 244-246, 2006.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1995. 220 p.

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 Press. 1968. v.2, p.290-324.

GERACI, G. Percentage of triploid offspring of cross-pollinated diploid polyembryonic citrus. *In*: **Proceedings of the Third International Citrus Congress**. International Society of Citriculture, Sydney, v. 1, p. 57–58, 1978.

GIDONI, D.; CARMI, N. Mutagenesis for Seedlessness in Citrus. **Israel Journal of Plant Sciences**, [S. l.], v. 55, n. 2, p. 133-135, 2007.

GMITTER, F. G.; LING, X. B.; DENG, X. X. Induction of triploid Citrus plants from endosperm calli *in vitro*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 80, n. 6, p. 785-790, 1990.

GOLDENBERG, L.; YANIV, Y.; KAPLUNOV, T.; DORON-FAIGENBOIM, A.; PORAT, R.; CARMI, N. Genetic diversity among mandarins in fruit-quality traits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 62, n. 21, p. 4938-4946, 2014.

GOLDENBERG, L.; YANIV, Y.; PORAT, R.; CARMI, N. Mandarin fruit quality: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 98, n. 1, p. 18-26, 2018.

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**, Ribeirão Preto, v. 20, n.3, p. 489-496, 1997.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção Agrícola Municipal: culturas temporárias e permanentes. Disponível em:< <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sp/pesquisa/15/12046>>. Acesso em: 12 jan. 2022.

KAUR, K.; KUMAR, K.; KAUR, K.; ARORA, P. K.; SINGH, K. Microsatellites assisted rapid identification of mandarin hybrids and assessment of their phenotypic variability. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, Nova Delhi, v. 90, n. 12, p. 2307-2312, 2020.

KHAN, I. A. **Citrus genetics, breeding and biotechnology**. Wallingford: Cabi Publishing, 2007. p. 370.

KOLTUNOW, A. M. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 5, n. 10, p.1425- 1437, 1993.

LATADO, R. R.; BUENO FILHO, J. S. S.; POMPEU JUNIOR, J.; TULMANN NETO, A. Correlações entre viabilidade de pólen e características de frutos em mutantes de laranjeira 'Pêra'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.10, p.961-965, 2004.

LATADO, R. R.; CRISTOFANI-YALY, M.; CARVALHO, C. R.; MACHADO, M. A. Plantas autotetraploides de citros sob tratamento *in vitro* com colchicina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 10, p. 1429-1435, 2007.

MACHADO, M. A.; COLLETA FILHO, H. D.; TARGON, M. L. N. P.; POMPEU JR, J. Genetic relationship of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. **Euphytica**, Wageningen, v.92, n.3, p.321-326, 1996.

MACHADO, M. A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A. M.; OLIVEIRA, A. C. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. *In*: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JR., J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, 2005. p. 223-277.

MOREIRA, S; GURGEL, J. T. A.; ARRUDA, L. F. de. Poliembrionia em citrus. **Bragantia**, Campinas, v. 7, n. 3, p. 69-106, 1947.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. PCR-amplified microsatellite as markers in plant genetics. **The plant journal**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 175-182, 1993.

MURASHIGE, T; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, [S. l.], v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v. 8, n. 19, p. 4321-4325, 1980.

NAVARRO, L.; JUÁREZ, J.; ALEZA, P.; PINA, J. A. Recovery of triploid seedless mandarin hybrids from $2n \times 2n$ and $2n \times 4n$ crosses by embryo rescue and flow cytometry. In: VASIL, I. K. (ed.) **Plant Biotechnology 2002 and Beyond**. Dordrecht: Springer, 2003. p. 541–544.

NOVELLI, V. M.; CRISTOFANI, M.; SOUZA, A. A.; MACHADO, M. A. Development and characterization of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 1, p. 90-96, 2006.

OLIVEIRA, R. P. Biologia molecular. In: CUNHA SOBRINHO, A. P. da P.; MAGALHÃES, A. F. J.; SOUZA, A. S.; PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. dos S I. (Ed.). **Cultura dos citros**. Brasília: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2013. v. 1, cap. 6, p. 161-172.

OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B. **Cultivo de citros sem sementes**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2011. p.377. (Sistema de produção, 21).

OLIVEIRA, R. P.; SOARES FILHO, W. D. S.; MACHADO, M. A.; FERREIRA, E. A.; SCIVITTARO, W. B.; GESTEIRA, A. D. S. Melhoramento genético de plantas cítricas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 35, n. 281, p. 22-29, 2014.

OLLITRAULT, P.; FROELICHER, Y.; DAMBIER, D.; LURO, F.; YAMAMOTO, M. Seedlessness and Ploidy Manipulation. In: KHAN, I. A. (Ed.). **Citrus genetics, breeding and biotechnology**. Wallingford: Cabi Publishing, 2007.

OTTO, S. P.; WHITTON, J. Polyploid incidence and evolution. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 34, n. 1, p. 401-437, 2000.

PALMIERI, D. A.; NOVELLI, V. M.; BASTIANEL, M.; CRISTOFANI-YALY, M.; ASTÚAMONGE, G.; CARLOS, E. F.; OLIVEIRA, A. C.; MACHADO, M. A. Frequency and distribution of microsatellites from ESTs of citrus. *CitrusEST. Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 30, n. 3, p. 1009-1018, 2007.

PIO, L. A. S.; SANTOS, F. C.; RUFIN, J. C. M.; RAMOS, J. D.; ARAÚJO, A. G. Germinação *in vitro* de pólen de citros sob diferentes concentrações de cálcio e boro. *Revista Brasileira de Agrociência*, Pelotas, v. 10, n. 3, p. 293-296, 2004.

PIO, R. M. **Caracterização e avaliação de frutos de oito variedades do grupo das tangerinas**. 1992. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1992.

PIO, R. M.; FIGUEIREDO, J. O.; STUCHI, E. S.; CARDOSO, S. A. B. Variedades copas. *In: MATTOS JUNIOR.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. Citrus*. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, 2005. p. 37-60.

PIO, R. M.; MINAMI, K.; FIGUEIREDO, J. O. Características do fruto da variedade Span Americana (*Citrus reticulata* Blanco): uma tangerina do tipo 'Poncã' de maturação precoce. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 325-329, 2001.

POVEDANO, L.; HENRIQUE, F. H.; TULMANN NETO, A.; LATADO, R. R. Obtenção de plantas tetraploides de citros visando a produção de frutos triploides sem sementes. *Citrus Research & Technology*, Cordeirópolis v. 33, n. 2, p. 65-74, 2012.

QIN, Y. H.; XU, C.; YE, Z. X. DA SILVA, J. A. T.; HU, G. B. Seedless mechanism of a new citrus cultivar 'Huami Wuhegongan' (*Citrus sinensis* x *C. reticulata*). *Pakistan Journal of Botany*, Karachi, v. 47, n. 6, p. 2369-2378, 2015.

RAO, M. N.; SONEJI, J. R.; CHEN, C.; HUANG, S.; GMITTER JR, F. G. Characterization of zygotic and nucellar seedlings from sour orange-like citrus rootstock candidates using RAPD and EST-SSR markers. *Tree Genetics & Genomes*, [S. l.] v. 4, n. 1, p. 113-124, 2008.

REFORGIATO RECUPERO, G.; RUSSO, G.; RECUPERO S. New promising citrus triploid hybrids selected from crosses between monoembryonic diploid female and tetraploid male parents. **HortScience**, Alexandria, v. 40, n. 3, p. 516–520, 2005.

RIVAS, F.; MARTÍNEZ-FUENTES, A.; MESEJO, C.; REIG, C.; AGUSTÍ, M. Efecto hormonal y nutricional del anillado en frutos de diferentes tipos de brotes de cítricos. **Agrociencia Uruguay**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 8-14, 2010.

ROCHA, S. **Caracterização foliar e de estômatos de híbridos triploides espontâneos de Citros**. 2014. 46f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agrônômico – IAC, Campinas, 2010.

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

SALLES, L. A.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; JUNQUEIRA, K. P.; SILVA, A. B. D. Sacarose e pH na germinação *in vitro* de grãos de pólen de citros. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 1, p. 170-174, 2006.

SCHÄFER, G.; BASTIANEL, M.; DORNELLES, A. L. C. Identificação de plântulas zigóticas de trifoliata com o uso de marcadores moleculares RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, p. 167-172, 2004.

SEBRAE – Serviço brasileiro de apoio às micro e pequenas empresas. Disponível em <<http://www.sebrae.com.br>>. Acesso em: 10 fev. 2019.

SOARES FILHO, W. D. dos S.; MOREIRA, C. D. S.; CUNHA, M. A. P. D.; CUNHA SOBRINHO, A. P. D.; PASSOS, O. S. Poliembrião e frequência de híbridos em *Citrus* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 4, p. 857-864, 2000.

SOARES FILHO, W. D. dos S.; SOUZA, U.; LEDO, C. A. D. S.; SANTANA, L. G. L.; PASSOS, O. S. Poliembrião e potencial de obtenção de híbridos em citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. 4, p. 950-956, 2014.

SOARES FILHO, W. dos S.; CUNHA SOBRINHO, A. P.; PASSOS, O. S.; SOUZA, A. S. Melhoramento genético. *In*: CUNHA SOBRINHO, A. P.; MAGALHÃES, A. F. J.; SOUZA, A. S.; PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. S. (Ed.). **Cultura dos Citros**. Brasília: Embrapa, 2013. v. 1, cap. 4, p. 61-102.

SOARES FILHO, W. dos S.; MEDRADO, A. C. M.; CUNHA SOBRINHO, M. A. P.; PASSOS, O. S. Frequência de híbridos em cruzamentos controlados de citros: cultivo de sementes versus cultivo *in vitro* de embriões. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 7, p. 981-988, 2002.

SPIEGEL-ROY, P.; GOLDSCHMIDT, E. E. **The biology of citrus**. New York: Cambridge university press. 1996. 230 p.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. **Pollen: biology, biochemistry and management**. New York: Springer-Verlag, 1974. 172 p

SWINGLE, W. T.; REECE, P. C. in *The Citrus Industry*, revised 2nd edn, History, World Distribution, Botany, and Varieties Vol. 1 (eds Reuther, W. et al.) 190–430 (Univ. California, 1967).

TANAKA, T. Fundamental discussion of Citrus classification. **Studia Citrologica**, [S. l.], v. 14, p. 1-6, 1977.

VARDI, A.; LEVIN, I.; CARMI, N. Induction of seedlessness in citrus: from classical techniques to emerging biotechnological approaches. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, [S. l.], v. 133, n. 1, p. 117-126, 2008.

WALLACE, H. M.; LEE, L. S. Pollen source, fruit set and xenia in mandarins. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Austrália, v.74, n.1, p. 82-86, 1999.

WU, G. A.; TEROL, J.; IBANEZ, V.; LÓPEZ-GARCÍA, A.; PÉREZ-ROMÁN, E.; BORREDÁ, C.; DOMINGO, C.; TADEO, F. R.; CARBONELL-CABALLERO, J.; ALONSO, R.; CURK, F.; DU, D.; OLLITRAULT, P.; ROOSE, M. L.; DOPAZO, J.; GMITTER JR, F. G.; ROKHSAR, D. S.; TALON, M. Genomics of the origin and evolution of Citrus. **Nature**, [S. l.], v. 554, n. 7692, p. 311-316, 2018.

ZANELLA, C. M.; TURCHETTO, C.; PALMA-SILVA, C.; SPERB-LUDWIG, F. Microssatélites: Metodologias de identificação e análise. *In*: TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. **Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. p 94-117.

APÊNDICE

Apêndice A. Genotipagem das plantas de tangerina IAC 2019Maria autopolinizada com quatro pares de *primers* (CCSM-EST-161; CCSM-EST-164; CCSM-EST-191; CCSM-EST-234).

Tangerina IAC 2019Maria autopolinizada	CCSM-EST-161	CCSM-EST-164	CCSM-EST-191	CCSM-EST-234	Embrião Zigótico
Híbrido 23					
Híbrido 24					
Híbrido 32					
Híbrido 37					
Híbrido 57					
Híbrido 58					
Híbrido 59					
Híbrido 60					
Híbrido 61					
Híbrido 62					
Híbrido 63					
Híbrido 65					
Híbrido 66					
Híbrido 67					
Híbrido 68					
Híbrido 71					
Híbrido 73					
Híbrido 76					
Híbrido 77					
Híbrido 78					
Híbrido 79					
Híbrido 80					
Híbrido 82					
Híbrido 84					
Híbrido 87					
Híbrido 89					
Híbrido 90					
Híbrido 92					
Híbrido 94					
Híbrido 95					
Híbrido 96					
Híbrido 97					

Apêndice B. Genotipagem das plantas de tangerina IAC 2019Maria em polinização aberta com cinco pares de *primers* (CCSM-EST-159; CCSM-EST-161; CCSM-EST-164; CCSM-EST-191; CCSM-EST-234).

Tangerina IAC 2019Maria (Polinização aberta)	CCSM-EST-159	CCSM-EST-161	CCSM-EST-164	CCSM-EST-191	CCSM-EST-234	Embrião Zigótico
Tangerina IAC 2019Maria (Polinização aberta) - 17						
Tangerina IAC 2019Maria (Polinização aberta) - 18						
Tangerina IAC 2019Maria (Polinização aberta) - 19						
Tangerina IAC 2019Maria (Polinização aberta) - 20						
Tangerina IAC 2019Maria (Polinização aberta) - 21						
Tangerina IAC 2019Maria (Polinização aberta) - 22						
Tangerina IAC 2019Maria (Polinização aberta) - 24						
Tangerina IAC 2019Maria (Polinização aberta) - 25						
Tangerina IAC 2019Maria (Polinização aberta) - 26						
Tangerina IAC 2019Maria (Polinização aberta) - 27						
Tangerina IAC 2019Maria (Polinização aberta) - 28						
Tangerina IAC 2019Maria (Polinização aberta) - 29						
Tangerina IAC 2019Maria (Polinização aberta) - 30						
Tangerina IAC 2019Maria (Polinização aberta) - 32						
Tangerina IAC 2019Maria (Polinização aberta) - 33						
Tangerina IAC 2019Maria (Polinização aberta) - 35						
Tangerina IAC 2019Maria (Polinização aberta) - 36						
Tangerina IAC 2019Maria (Polinização aberta) - 37						
Tangerina IAC 2019Maria (Polinização aberta) - 38						
Tangerina IAC 2019Maria (Polinização aberta) - 39						
Tangerina IAC 2019Maria (Polinização aberta) - 40						

Apêndice C. Genotipagem das plantas de tangerina IAC 2019Maria X tangerina Ponkan com cinco pares de *primers* (CCSM-EST-159; CCSM-EST-161; CCSM-EST-164; CCSM-EST-191; CCSM-EST-234).

Tangerina IAC 2019Maria X Tangerina Ponkan	CCSM-EST-159	CCSM-EST-161	CCSM-EST-164	CCSM-EST-191	CCSM-EST-234	Embrião Zigótico
Híbrido 1						
Híbrido 2						
Híbrido 5						
Híbrido 6						
Híbrido 7						
Híbrido 8						
Híbrido 9						
Híbrido 15						
Híbrido 16						
Híbrido 22						
Híbrido 23						
Híbrido 24						

Apêndice D. Genotipagem das plantas de sementes abortadas de tangerina IAC 2019Maria X laranja Pera com quatro pares de *primers* (CCSM-EST-159; CCSM-EST-164; CCSM-EST-191; CCSM-EST-234).

Tangerina IAC 2019Maria x Laranja Pera (sementes abortadas)	CCSM-EST-159	CCSM-EST-164	CCSM-EST-191	CCSM-EST-234	Embrião Zigótico
Híbrido 1					
Híbrido 2					
Híbrido 3					
Híbrido 4					
Híbrido 6					
Híbrido 7					
Híbrido 8					
Híbrido 10					
Híbrido 11					
Híbrido 12					

Apêndice E. Genotipagem das plantas de tangerina IAC 2019Maria X laranja Pera com cinco pares de *primers* (CCSM-EST-159; CCSM-EST-161; CCSM-EST-164; CCSM-EST-191; CCSM-EST-234).

Tangerina IAC 2019Maria x Laranja Pêra	CCSM-EST-159	CCSM-EST-161	CCSM-EST-164	CCSM-EST-191	CCSM-EST-234	Embrião Zigótico
Hibrido 16	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 18	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 22	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 26	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 35	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 37	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 46	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 47	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 48	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 49	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 54	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 57	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 60	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 61	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 63	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 71	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 72	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 78	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 79	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 80	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 82	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 84	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 87	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 91	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 94	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 98	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 101	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 102	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 107	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 110	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 111	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 113	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 117	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 119	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 126	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 127	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 129	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 131	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 134	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 138	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 139	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 148	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 154	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 155	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 157	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 166	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 167	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 168	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 171	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 172	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 173	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 179	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 180	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 181	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 183	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green
Hibrido 184	Blue	Orange	Red	Yellow	Pink	Green

Hibrido 187						
Hibrido 188						
Hibrido 202						
Hibrido 206						
Hibrido 207						
Hibrido 208						
Hibrido 209						
Hibrido 210						
Hibrido 211						
Hibrido 213						
Hibrido 214						
Hibrido 215						
Hibrido 217						
Hibrido 218						
Hibrido 219						
Hibrido 220						
Hibrido 221						
Hibrido 225						
Hibrido 226						
Hibrido 227						
Hibrido 228						
Hibrido 229						
Hibrido 230						
Hibrido 231						
Hibrido 232						
Hibrido 233						
Hibrido 234						
Hibrido 237						
Hibrido 238						
Hibrido 239						
Hibrido 240						
Hibrido 241						
Hibrido 242						
Hibrido 243						
Hibrido 244						
Hibrido 245						
Hibrido 246						
Hibrido 250						
Hibrido 251						
Hibrido 252						
Hibrido 255						
Hibrido 256						
Hibrido 257						
Hibrido 258						
Hibrido 259						
Hibrido 260						
Hibrido 261						
Hibrido 262						
Hibrido 264						
Hibrido 266						
Hibrido 267						
Hibrido 268						
Hibrido 269						
Hibrido 270						
Hibrido 274						
Hibrido 275						
Hibrido 277						
Hibrido 279						
Hibrido 280						
Hibrido 281						
Hibrido 282						
Hibrido 283						
Hibrido 285						
Hibrido 286						
Hibrido 287						
Hibrido 288						
Hibrido 289						
Hibrido 290						
Hibrido 291						
Hibrido 292						
Hibrido 293						
Hibrido 294						

Hibrido 295						
Hibrido 297						
Hibrido 298						
Hibrido 299						
Hibrido 300						
Hibrido 301						
Hibrido 302						
Hibrido 303						
Hibrido 304						
Hibrido 305						
Hibrido 306						
Hibrido 307						
Hibrido 308						
Hibrido 309						
Hibrido 310						
Hibrido 311						
Hibrido 312						
Hibrido 314						
Hibrido 315						
Hibrido 316						
Hibrido 317						
Hibrido 318						
Hibrido 319						
Hibrido 320						
Hibrido 321						
Hibrido 322						
Hibrido 323						
Hibrido 324						
Hibrido 326						
Hibrido 327						
Hibrido 328						
Hibrido 329						
Hibrido 330						
Hibrido 331						
Hibrido 332						
Hibrido 333						
Hibrido 334						
Hibrido 335						
Hibrido 337						
Hibrido 338						
Hibrido 339						
Hibrido 341						
Hibrido 343						
Hibrido 344						
Hibrido 345						
Hibrido 346						
Hibrido 347						
Hibrido 348						
Hibrido 349						
Hibrido 350						
Hibrido 351						
Hibrido 352						
Hibrido 353						
Hibrido 354						
Hibrido 355						
Hibrido 356						
Hibrido 357						
Hibrido 358						
Hibrido 359						
Hibrido 360						
Hibrido 362						
Hibrido 363						
Hibrido 364						
Hibrido 365						
Hibrido 367						
Hibrido 368						
Hibrido 369						
Hibrido 370						
Hibrido 371						
Hibrido 372						
Hibrido 373						
Hibrido 374						

Híbrido 375						
Híbrido 376						
Híbrido 377						
Híbrido 379						
Híbrido 380						
Híbrido 381						
Híbrido 382						
Híbrido 383						
Híbrido 384						
Híbrido 385						
Híbrido 386						
Híbrido 387						
Híbrido 389						
Híbrido 390						
Híbrido 391						
Híbrido 392						
Híbrido 393						
Híbrido 394						
Híbrido 395						
Híbrido 396						
Híbrido 397						
Híbrido 398						
Híbrido 399						
Híbrido 400						
Híbrido 401						
Híbrido 402						
Híbrido 403						
Híbrido 404						
Híbrido 405						
Híbrido 406						
Híbrido 407						
Híbrido 409						
Híbrido 410						
Híbrido 411						
Híbrido 412						
Híbrido 414						
Híbrido 418						
Híbrido 419						
Híbrido 420						
Híbrido 421						
Híbrido 422						
Híbrido 423						
Híbrido 426						
Híbrido 428						
Híbrido 429						
Híbrido 430						
Híbrido 431						
Híbrido 432						
Híbrido 434						
Híbrido 437						
Híbrido 438						
Híbrido 439						
Híbrido 440						
Híbrido 442						
Híbrido 443						
Híbrido 444						
Híbrido 446						
Híbrido 447						
Híbrido 448						
Híbrido 449						
Híbrido 450						
Híbrido 1						
Híbrido 2						
Híbrido 3						
Híbrido 4						
Híbrido 5						
Híbrido 6						