

**FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA
MESTRADO PROFISSIONAL EM
CONTROLE DE DOENÇAS E PRAGAS DOS CITROS**

ANDRÉ LUÍS SANCHES

**Capacidade competitiva entre pólenes de citrandarin [*Citrus reshni*
hort. ex Tanaka x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] e laranjas doces.**

Dissertação apresentada ao Fundo de Defesa da
Citricultura como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Fitossanidade

Orientador: Dr. Nelson Arno Wulff

Coorientadora: Dra. Viviani Vieira Marques

**Araraquara- SP
Dezembro 2014**

ANDRÉ LUÍS SANCHES

Capacidade competitiva entre pólenes de citrandarin [*Citrus reshni* hort. ex Tanaka x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] e laranjas doces.

Dissertação apresentada ao Fundo de Defesa da
Citricultura como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Fitossanidade

Orientador: Dr. Nelson Arno Wulff

Coorientadora: Dra. Viviani Vieira Marques

**Araraquara- SP
Dezembro 2014**

ANDRÉ LUÍS SANCHES


Dissertação apresentada ao Fundo de Defesa da Citricultura - Fundecitrus, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitossanidade.

Araraquara, 18 de dezembro de 2014.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Nelson Arno Wulff (Orientador)
Fundo de Defesa da Citricultura – FUNDECITRUS, Araraquara/SP.



Prof. Dr. Fernando Alves de Azevedo
Instituto Agronômico de Campinas – IAC, Cordeirópolis/SP.



Prof. Dr. Eduardo Augusto Girardi
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas/BA.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, pela saúde, por iluminar o meu caminho e por todas as conquistas.

Agradeço aos meus pais, Vicente e Marly, minha inesgotável fonte de exemplo e inspiração.

Ao Juliano Ayres, gerente geral do Fundecitrus, por incentivar que eu fosse aluno do “Mestrado Profissionalizante em Controle de Pragas dos Citros”.

Aos amigos assistentes de laboratório do Fundecitrus: Eder A. Souza, Deividson F. Rodrigues, Jean M. Martins, Sidnei F. Alkmin, Tatiane M. M. Cardamoni..., Ana Cláudia Novaes, que colaboraram diretamente nas etapas desse projeto. Sem a ajuda deles, esse trabalho não poderia ser realizado.

Aos amigos Tiago Ap. Silva, Anélio Spinda e Miguel Mendes, do Fundecitrus, que colaboraram muito na realização desse trabalho.

Aos amigos Msc. Mateus de Almeida Santos e Msc. Roberta Borges dos Santos, do Fundecitrus, por toda ajuda que prestaram na condução dos experimentos.

Ao amigo Dr. Fabrício Jaciani do Fundecitrus, pela valiosa colaboração na coordenação e execução das atividades de laboratório, envolvendo marcadores microssatélites, fundamentais para obtenção dos resultados desse estudo.

Às amigas Elaine C. Martins (técnica de laboratório), Daniela A. B. Coletti (auxiliar de laboratório) e Camila G. Fassini (auxiliar de laboratório) do laboratório do Fundecitrus, por toda ajuda que prestaram durante a realização do trabalho.

Ao Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro, da UNESP - FCAV Campus de Jaboticabal, por permitir utilização de instalações e equipamentos do Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO).

À Dra. Agda Paula Facincani e à Msc. Renata Izabel Dozzi Tezza do Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) da UNESP – FCAV – Campus de Jaboticabal, por todo apoio na fase de obtenção e interpretação dos resultados de análise genômica.

Ao Msc. Tiago Lara Michelin Sanches, da Universidade de São Paulo (USP) de Ribeirão Preto, pela valiosa ajuda quanto à utilização do software “Gene Mapper”

Ao Dr. Marco Aurélio Takita, do Centro de Citricultura Sílvia Moreira, pela captura de imagens de grãos de pólen

Ao amigo Dr. Haroldo X. Linhares Volpe, por colaborar no enriquecimento do texto

À minha coorientadora, Dra. Viviane Vieira Marques, por sua dedicação no acompanhamento desse trabalho e por motivar o meu aprendizado.

Ao meu orientador, Dr. Nelson Arno Wulff, pela maneira sábia, sensata e participativa com que orienta todos os seus alunos de mestrado.

À Dra. Elsa Pons, de Valência, por sua brilhante colaboração na interpretação e organização dos resultados.

Ao Dr. Leandro Peña, por toda experiência que nos transmite.

À Dra. Marinês Bastianel, pesquisadora do Centro de Citricultura Sílvio Moreira, por colaborar quanto à utilização de plantas de Clementina Nules e fornecimento de botões florais de citrandarin.

Ao citricultor Sr. Pedro Fávero por permitir a utilização de plantas de sua propriedade para esse experimento.

À todos os professores do curso de mestrado do Fundecitrus.

Aos supervisores Marcos Marciano e encarregados da fazenda São Carlos da Citrosuco, por colaborarem no fornecimento de botões florais dos genótipos estudados, e ao supervisor da fazenda Maringá, Elisavan, sempre atencioso às nossas solicitações.

Ao gerente de produção agrícola da Agroterenas Msc Aprígio Tank Jr. e ao supervisor de pesquisa e desenvolvimento agrícola Msc Márcio Soares, por colaborarem no fornecimento de botões florais das variedades de laranja doce.

Ao gerente regional Paulo Henrique Carminati e ao supervisor Paulo Beloti, da fazenda Capim Verde da Sucocítrico Cutrale, pelo fornecimento de botões florais de laranja doce.

Ao amigo Dr. Hernane Barud pela ajuda em conseguir artigos relacionados à essa pesquisa.

À todos os amigos do Fundecitrus que de variadas formas colaboraram com essa trabalho, agradeço.

Capacidade competitiva entre pólenes de citrandarin [*Citrus reshni* hort. ex Tanaka x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] e laranjas doces.

Autor: André Luís Sanches

Orientador: Dr. Nelson Arno Wulff

Coorientadora: Dra. Viviani Vieira Marques

Resumo

Com o objetivo de avaliar a capacidade competitiva do pólen de citrandarin (*Citrus reshni* X *Poncirus trifoliata*) para fundamentar a estratégia de utilização de pólen competição como barreira de isolamento reprodutivo visando a contenção do fluxo transgênico em áreas de cultivo de laranja doce, foram conduzidos experimentos de polinizações simples e mistas com pólen de laranja doce em flores de tangerina Clementina Nules (monoembriônica). Das polinizações mistas realizadas em 2011, Pera com citrandarin e Pineapple com citrandarin, foram obtidas 1.051 plantas híbridas. Os híbridos trifoliados foram considerados filhos de citrandarin, uma vez que esse caráter está presente somente nesse doador de pólen. Para determinar a paternidade dos híbridos não trifoliados foi feita uma análise de paternidade com três marcadores microssatélites. O polimorfismo revelado pelos marcadores microssatélites mostrou que o pólen de citrandarin tem maior capacidade de formar embrião zigótico em Clementina Nules do que o pólen das laranjas doces testados. Em outro experimento, realizado em 2013, foram obtidos 1.193 híbridos de polinização mista de pólen de Pera com citrandarin. O teste Qui-quadrado mostrou frequências fenotípicas similares nas duas safras ($p > 0,05$). A fixação de frutos, acima de 50% nas polinizações simples e mistas e o número de sementes formadas confirmou compatibilidade sexual entre a planta receptora (Clementina) e os doadores de pólen (laranjas doces Pera e Pineapple e citrandarin). A germinação *in vitro* do pólen de citrandarin foi maior do que a germinação *in vitro* dos pólenes de laranja doce testados e a viabilidade do pólen de citrandarin foi maior que a viabilidade dos pólenes de laranja doce. Somando os resultados obtidos por avaliação de morfologia de folha e marcadores microssatélites, foi possível constatar que o pólen de citrandarin produziu maior número de embriões zigóticos que os pólenes de laranja doce, apresentando paternidade de 78,5% e 68,6 quando competiu com pólen de Pera e Pineapple, respectivamente. Esses resultados justificam a utilização do citrandarin como um doador de pólen eficiente em áreas de cultivo de laranja doce transgênica para contenção do fluxo transgênico mediado por pólen.

Palavras-chave: *Citrus* spp, *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., pólen competição, marcadores microssatélites, transgenia.

Pollen competition capacity between citrandarin [*Citrus reshni* hort. ex Tanaka x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] and sweet oranges

Author: André Luís Sanches

Advisor: Dr. Nelson Arno Wulff

Co-advisor: Dra. Viviani Vieira Marques

Abstract

A strategy in which pollen competition may act as a barrier of reproductive isolation to minimize unintended transgenic flow from sweet orange was tested. Citrandarin pollen was tested in mixed pollinations with either Pera or Pineapple sweet orange pollen onto Nules Clementine (*Citrus clementina* hort. ex. Tan.) flowers (monoembryonic and self-incompatible), as well as in single pollinations to confirm pollen viability. Manual mixed pollination generated 1.051 hybrids in crosses made in 2011. Trifoliolate hybrids were assigned as citrandarin offspring because only this parent presents this character. Parents of non-trifoliolate hybrid progeny were assigned based on the analysis of three-microsatellite marker profiles. Polymorphism based on microsatellites revealed that most of the progeny generated was offspring from the citrandarin. An additional experiment was accomplished in 2013, with citrandarin and Pera sweet orange as either mixed or single pollen donors and Nules Clementine as receptor, from which 1.193 plants were obtained with mixed pollens. The Chi-square test revealed the same trend on phenotypic frequencies for both experiments. Results from paternity assignment using leaf morphology and microsatellite markers showed that citrandarin was parent of more zygotic embryos than Pera and Pineapple sweet oranges, 78.5% and 68.6%, respectively, indicating a higher pollination capacity for citrandarin. Sexual compatibility between maternal receptor and pollen donors was confirmed due to successful fruit set and seed set in single and mixed pollinations. In addition, pollen germination as well as pollen viability *in vitro* of citrandarin was higher than those shown by sweet orange pollen. Taken together, these results support the utilization of citrandarin as an efficient pollen competitor in transgenic sweet orange orchards to reduce pollen mediated transgenic flow.

Keywords: *Citrus* spp., pollen competition, microsatellite markers, transgenic.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1	A CULTURA DOS CITROS	2
2.2	REPRODUÇÃO EM CITROS	3
2.3	MELHORAMENTO GENÉTICO EM CITROS E BIOTECNOLOGIA	5
2.4	LIBERAÇÃO DE ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS NO AMBIENTE E BIOSSEGURANÇA	7
2.5	ESTRATÉGIAS DE CONTENÇÃO DO FLUXO GÊNICO	8
2.6	OBJETIVOS	14
3	MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1	PLANTAS RECEPTORAS	15
3.2	PLANTAS DOADORAS DE PÓLEN	15
3.3	OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DO PÓLEN	16
3.4	ESTUDO DE VIABILIDADE DE PÓLEN	17
3.4.1	COLORAÇÃO POR CARMIM ACÉTICO	17
3.4.2	GERMINAÇÃO <i>in vitro</i>	18
3.5	POLINIZAÇÕES CONTROLADAS	18
3.6	EXTRAÇÃO DE SEMENTES, GERMINAÇÃO E AVALIAÇÃO FENOTÍPICA	19
3.7	ANÁLISE DE PATERNIDADE ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES	22
3.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	23
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1	VIABILIDADE DE PÓLEN <i>in vitro</i>	24
4.2	VIABILIDADE DE PÓLEN <i>in vivo</i>	26
4.3	AVALIAÇÃO FENOTÍPICA	30
4.4	AVALIAÇÃO POR MARCADORES MICROSSATÉLITES	31
5	CONCLUSÕES	38
	REFERÊNCIAS	39
	APÊNDICES	44
	ANEXOS	76

1-INTRODUÇÃO

A produção mundial de alimentos passa por desafios como mudanças climáticas, crescimento populacional, competição por terras agricultáveis e os elevados custos para se controlar pragas e doenças, entre outros. Os alimentos devem ser produzidos com o menor impacto possível ao meio ambiente e usando cada vez menos fontes de energia não renováveis. As plantas geneticamente modificadas (GM) encaixam-se nesse cenário como uma importante ferramenta.

A tecnologia para produzir plantas geneticamente modificadas completou 30 anos recentemente. Um tema sempre provocador de controvérsias e discussões, ganhou a atenção da sociedade científica ao longo desses anos pela publicação de inúmeros trabalhos. Assuntos como a interação das plantas GM com o meio ambiente, a preservação da biodiversidade e a interação das plantas GM com humanos e animais são frequentemente objeto de estudo.

O uso de plantas GM na agricultura demanda avaliações de risco ecológico. Nas plantas o fluxo gênico ocorre não apenas pela migração de indivíduos (dispersão de sementes), mas também pela dispersão de gametas (pólen). A segurança de plantas GM é crucial para sua adoção.

Uma possível consequência da liberação de planta GM é o fluxo gênico não intencional para plantas sexualmente compatíveis, sejam agricultáveis ou selvagens. Pode-se citar o exemplo do algodão, onde as variedades “crioulas” nativa no Brasil são sexualmente compatíveis com o algodão GM, o que poderia levar a uma descaracterização genética dessas variedades caso medidas de contenção do fluxo gênico não fossem adotadas. No caso dos citros no Brasil, não haveria o problema de fluxo transgênico para parentes selvagens, pois os cítricos foram introduzidos no Brasil e não relativos selvagens. Entretanto, poderia ocorrer a transferência do transgene para variedades não GM, originando embriões GM indesejáveis em frutos de plantas não GM, mesmo as sementes não sendo consumidas.

Estratégias para minimizar o efeito dos transgenes em fase de pré ou pós- hibridação tem sido estudadas para diversas culturas GM (como por exemplo: macho esterilidade, florescimento atrasado e o uso de genes que reduzem *fitness*, acapacidade de uma população manter ou aumentar o número de indivíduos nas gerações subsequentes).

A polinização cruzada em citros é realizada predominantemente por abelhas (>95%). A taxa de polinização cai rapidamente com a distância, mas a distância na qual a polinização é zero é impossível de ser determinada com acurácia. O que se propõe nesse trabalho é estudar

um mecanismo de isolamento genético para áreas de liberação planejada de citros GM, através do qual o fluxo transgênico mediado por pólen fique limitado, sendo sua justificativa fundamentar a utilização da competição de pólen como barreira de isolamento reprodutivo.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- A CULTURA DOS CITROS

O Brasil detém 50 % da produção mundial de suco de laranja, exporta 98 % do que produz e participa com 79 % no mercado mundial. A citricultura gera, entre empregos diretos e indiretos, um contingente de 230 mil posições. Na safra de 2009/ 2010 a produção brasileira foi de 397 milhões de caixas de laranja de 40,8 Kg (Neves et al., 2010).

Para atingir essa dimensão, ao longo de décadas a citricultura brasileira enfrentou diversos problemas de ordem fitossanitária, especialmente os causados por patógenos. Alguns desses problemas foram contornados, à exemplo do vírus da tristeza dos citros (CTV) onde a utilização de porta-enxerto tolerante e a pré-imunização possibilitaram a reestruturação da citricultura nacional (Müller et al, 2005). Posteriormente houve epidemias de cancro cítrico, clorose variegada dos cítricos e morte súbita dos citros, com diferentes intensidades de danos, que exigiram pesquisas científicas e a implementação de técnicas de manejo. No entanto, outras doenças ainda são um grande desafio para os produtores e para a ciência. Entre estas doenças, destaca-se o Huanglongbing (HLB), associada à bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Coletta-Filho et al., 2004) e *Ca. Liberibacter americanus* (Teixeira et al., 2005), que infectam os vasos do floema (Bové & Ayres, 2007), considerada a mais séria e devastadora doença dos citros (Hall et al., 2012).

As ações para minimizar os efeitos dessas doenças, principalmente os ocasionados pelo HLB, elevam significativamente o custo da produção, inviabilizando a atividade para muitos citricultores (Coletta-Filho et al., 2004), podem causar seleção de populações do inseto vetor resistentes aos ingredientes ativos comumente utilizados (Tiwari et al., 2011), contaminação do meio ambiente e destruição da entomofauna benéfica, afetando negativamente o manejo integrado de pragas em citros (Miranda et al., 2011), além de aumentar a exposição do homem e contribuir com o aumento de resíduos de agrotóxicos no suco e fruta, ultrapassando as doses diárias aceitáveis de acordo com o *Codex Alimentarius* (Caldas & Souza, 2000).

2.2- REPRODUÇÃO EM CITROS

As espécies do gênero *Citrus* reproduzem-se sexuadamente, por meio de autopolinização e polinização cruzada, e assexuadamente, por apomixia nucelar (Machado et al., 2005)

Tendo como centro de origem regiões tropicais e subtropicais da Ásia e do arquipélago Malaio, de onde se dispersaram para outras regiões do mundo, existe uma grande complexidade na classificação do gênero *Citrus*. A taxonomia da subfamília Aurantioideae foi marcada pela proposição de novos gêneros, segregados de *Citrus*, como *Poncirus*, *Fortunella* e *Microcitrus*. As espécies de *Citrus* importantes comercialmente são derivadas de *Citrus medica* (L.), *C. grandis* (L.) Osbeck [*C. maxima* (Burm.) Merr., segundo Swingle & Reece, 1967] e *C. reticulata* Blanco (Araújo & Roque, 2005). Os Kunquats (*Fortunella*), o trifoliata (*Poncirus*) e outros gêneros relativos à subfamília Aurantioideae, família Rutaceae, são nativos do sudeste do continente asiático, com ramos filogenéticos que se estendem do centro da China ao Japão, e do leste da Índia à Nova Guiné, Austrália e África Tropical (Donadio et al., 2005).

As variedades cítricas de interesse comercial são propagadas vegetativamente, através da enxertia de borbulhas de uma planta matriz em um porta-enxerto, sendo esse produzido através de sementes, onde se selecionam as plantas oriundas de embriões nucleares que reproduzem as mesmas características da planta mãe.

A poliembrião é uma característica marcante em *Citrus*. Sendo o desenvolvimento de dois ou mais embriões na semente. Em um número limitado de casos, os embriões adicionais são produzidos pela fissão do zigoto e originam gêmeos idênticos e não reproduzem a planta mãe, sendo designados de embriões sexuais ou zigóticos. Na maioria dos casos, entretanto, a maioria dos embriões são desenvolvidos assexuadamente pela divisão mitótica do nucelo. Tais embriões são chamados de nucleares ou apomíticos. A reprodução pela embrião nucelar, condicionada por um gene dominante, preserva toda heterozigotidade originada por hibridação ou mutação, o que é importante para o melhoramento de *Citrus* (Domingues et al., 1999).

Embora existam exceções, a polinização é necessária para a formação dos embriões nucleares, não se sabendo, no entanto, o quanto a fecundação é importante para isso (Cameron & Frost, 1968). A significância da polinização para a produção de frutos difere grandemente entre as variedades cítricas. Os principais fatores envolvidos são: i) quantidade de pólen funcional; ii) as facilidades para a polinização; iii) a relação entre pólen e formação de sementes e, iv) a habilidade de algumas variedades produzirem frutos sem sementes

(partenocarpia) com ou sem polinização (Frost & Soost, 1968). Distefano et al. (2011), estudando as interações pólen e pistilo e o início da frutificação em citros partenocárpico (mandarina), observou que evidentes mudanças ocorrem no pistilo durante o desenvolvimento do tubo polínico. Entretanto, foi observado que essas mudanças parecem acontecer da mesma forma e ao mesmo tempo em flores não polinizadas. Além disso, o início da frutificação ocorreu primeiro que a fertilização, permitindo concluir que a habilidade partenocárpica de flores não polinizadas produzirem frutos em citros leva a uma desconexão entre reprodução e processo de frutificação. Moreira & Gurgel (1941) verificaram que nas espécies ou grupos de citros em que há alta poliembrionia (mais de 40%) existe também alta porcentagem de pólen viável (calamondim, laranjas Pineapple e seleta e os pomelos Foster e Mac-Carty). Porém, a recíproca não é verdadeira, pois a baixa ou nenhuma poliembrionia pode estar ligada com alta fertilidade do pólen.

Soares Filho et al. (2000), estudando a poliembrionia e a frequência de híbridos em citros, constataram uma associação negativa entre o grau de poliembrionia e a frequência de embriões de maior tamanho, sendo essa evidência muito mais acentuada quando se considera os embriões zigóticos. Com os resultados obtidos inferiram que a frequência de híbridos apresenta uma associação negativa com o grau de poliembrionia dos parentais femininos.

A presença de vários embriões numa mesma semente pode dificultar a sobrevivência dos embriões zigóticos, devido à competição que os embriões de origem sexuada estabelecem sobre e com os de origem assexuada (Soares Filho et al., 2002).

Algumas espécies e variedades são estritamente monoembriônicas por não possuírem apomixia, como as tangerinas Wilking (*C. reticulata* Blanco), King (*C. reticulata* Blanco), Temple (*C. temple* hort. ex Yu. Tanaka) e Clementina (*C. reticulata* hort. ex Tanaka), os pomelos Wheeny (*C. paradisi*) e Sukega (*C. paradisi* x *C. sinensis* (L.) Osbeck), as toranjas (*C. maxima*) e as cidras (*C. medica*). As laranjas doces (*C. sinensis* (L.) Osbeck), apresentam um número médio de 1,44 a 4,88 embriões por semente, uma poliembrionia classificada de média a alta (Machado et al., 2005).

A clementina Nules ou Clemenules (*Citrus clementina* hort ex Tanaka) é um cultivar de clementina originado por mutação da clementina Fine, encontrada em 1953 em Nules, província de Castellon, é a clementina mais cultivada na Espanha (Saunt, 2000). É uma variedade não apomítica (Aleza et al., 2010), com alta taxa de partenocarpia, o seu próprio pólen é incompatível não promovendo a fertilização dos óvulos, porém seus frutos podem apresentar sementes caso suas flores sejam polinizadas por pólen oriundo de outras variedades compatíveis (Azevedo et al., 2013). Sendo assim, é adequada para ser utilizada como parental

feminino em experimentos onde o objetivo é avaliar características de progênie oriunda de cruzamento.

A utilidade dos marcadores microssatélites em estudos genéticos e de melhoramento de plantas decorre de dois fatores principais: a) seu elevado nível de polimorfismo e b) a facilidade para genotipagem (Powell et al, 1996). A capacidade para se distinguir indivíduos proximamente relacionados é importante para várias espécies de plantas cultivadas, muitas das quais tem base genética estreita. Comparando marcadores SSR com marcadores isoenzimáticos, Ruiz et al. (2000) concluíram que, na maioria dos casos, microssatélites são mais eficientes para identificar a origem sexual de plântulas, dado seu alto nível de polimorfismo. Cristofani et al. (2001) concluíram que marcadores SSR's são mais eficientes que RAPS's na identificação de híbridos.

2.3 - MELHORAMENTO GENÉTICO EM CITROS E BIOTECNOLOGIA

O melhoramento genético convencional de citros é limitado por suas características genéticas e reprodutivas. As espécies cítricas têm um complexo sistema reprodutivo, com muitos casos de incompatibilidade cruzada e autoincompatibilidade, ocorrência de apomixia, apresentam elevada heterozigotidade e muitas delas têm longo período juvenil. Somado a isso, o modo de herdabilidade da maioria das características de importância econômica é desconhecido. A quase totalidade do conhecimento adquirido na herdabilidade de características dos citros se deve aos esforços do melhoramento convencional de porta-enxertos e copas. A dominância ou recessividade de características morfológicas tem sido consideradas e discutidas de acordo com a segregação dos fenótipos (Gmitter Júnior et al, 2010). Nesse contexto, a transformação genética oferece uma importante alternativa para o melhoramento genético de citros (Penã et al., 2007). Como não há fonte de resistência ao HLB nos cítricos, a introdução de material genético de outros gêneros ou famílias de plantas que possam conferi-la é objeto de grande interesse.

A grande vantagem do uso da técnica do DNA recombinante em relação ao melhoramento convencional é que esse último fica restrito apenas ao cruzamento entre espécies filogeneticamente próximas, devido a barreiras que impedem a hibridação natural entre espécies distantes. Com o uso de técnicas biotecnológicas isso deixou de ser limitação, a introgressão e expressão de genes pode ser feita entre espécies de reinos distintos, como é o caso da introgressão de genes de bactérias, um organismo procarioto, em plantas, organismos eucariotos (Borém & Miranda, 2009). A transgenia em citros reduz o tempo de obtenção de

variedades melhoradas, restringe a adição de genes indesejáveis em programas de melhoramento e conseqüentemente, elimina os efeitos da heterozigidade dos cruzamentos sexuais (Machado et al., 2005).

As espécies cítricas foram inicialmente consideradas recalcitrantes à transformação genética. Segundo Peña et al., 2007, quando seu grupo começou a trabalhar com transformação genética em 1993, houve a necessidade de desenvolver procedimentos como o uso de *Agrobacterium tumefaciens* como vetor para transformação, o estabelecimento de condições apropriadas de infecção e co-cultivo e meio de cultura adequado, uso de fonte de material vegetal em boas condições fisiológicas, determinação das células competentes para transformação em explantes de citros, o uso de genes marcadores apropriados e a rápida produção de uma planta transgênica inteira através da enxertia dos brotos transgênicos regenerados em vigorosos porta- enxertos primeiro *in vitro* e depois em casa de vegetação, que foram cruciais para a regeneração de plantas de citros transgênicas em alta eficiência.

A transformação genética de explantes oriundos de tecido juvenil tem sido feita para variedades como laranja Pineapple, lima, laranja azeda, alemow, limão e tangerina Cleópatra, utilizando-se segmentos internodais (1 cm) cortados transversalmente, de estacas de plantas germinadas de sementes e cultivadas em casa de vegetação (18- 27° C) e para citrange Carrizo os explantes usados são segmentos de epicótilo de plântulas de 8 semanas de germinação, cultivadas *in vitro*. *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA 105 carregando um plasmídeo binário é usada como vetor para transformação. O T-DNA do plasmídeo binário deve conter a parte do gene ou os genes de interesse, um gene marcador seletivo como o *nptII* e eventualmente um gene marcador repórter como o *uidA*. Após o co-cultivo com a bactéria, os explantes são colocados em meio seletivo (canamicina no caso do gene de seleção *nptII*) para separação dos brotos transgênicos. Pequenas partes dos brotos emergidos dos explantes são testados para atividade histoquímica GUS e então porções apicais são enxertadas no topo de epicótilos de plântulas decapitadas de citrange Troyer cultivadas *in vitro*. Essa microenxertia é feita colocando-se o broto em contato com o anel vascular ou, quando maior que 0,4 cm são inseridos numa incisão lateral ao longo do comprimento do epicótilo. As culturas são mantidas à 25° C com 16 h de fotoperíodo à 45 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As copas desenvolvem 2 a 4 folhas expandidas em 3 a 4 semanas após a enxertia. Uma nova enxertia (sobre-enxertia) da planta cultivada *in vitro* em vigorosos porta-enxertos é feita em casa de vegetação, permitindo rápida aclimatação e desenvolvimento da planta (Peña et al., 2007).

Para as espécies lenhosas, a transformação genética tem aplicações limitadas caso o tecido maduro não possa ser transformado geneticamente. Plantas regeneradas de tecidos juvenis terão características juvenis e vários anos serão necessários antes de serem avaliadas as características hortícolas e comerciais das plantas transformadas. As espécies cítricas apresentam períodos juvenis que variam de 5 a 13 anos em áreas subtropicais, onde as plantas têm crescimento vigoroso, desenvolvem espinhos nas axilas das folhas e não há florescimento. Para aumentar a capacidade de regeneração de explantes maduros, borbulhas de plantas adultas foram enxertadas em porta-enxertos vigorosos. A regeneração de segmentos de estacas do primeiro, segundo e terceiro fluxo das novas plantas enxertadas foram comparadas com a regeneração de segmentos de estacas de plantas juvenis. Os resultados indicaram que os explantes do primeiro e segundo fluxo produziram similar frequência de regeneração, significativamente maiores que os do terceiro fluxo. O primeiro fluxo de plantas adultas foi selecionado como fonte de tecido para experimento de transformação genética. Após 14 a 18 meses na casa de vegetação, as plantas transgênicas e controles usualmente começam florescer, confirmando sua natureza madura. Além disso, enquanto as plantas juvenis mostram pronunciada quantidade de espinhos, as plantas transgênicas maduras são quase sem espinhos, similares às plantas maduras das quais os explantes foram retirados para transformação. Esses resultados confirmam a manutenção do estágio ontogênico das plantas maduras revigoradas assim como das plantas transgênicas. Os eventos transgênicos mantêm seu estado epigenético maduro mesmo após o processo de transformação, indução de *callus* e rediferenciação necessários para mudar as células a um competente estágio para transformação. Transformar e regenerar tecido maduro significa fazer um *by pass* no estágio juvenil. Esse processo diminui o tempo para obtenção das características hortícolas (Peña et al., 2007).

2.4- LIBERAÇÃO DE ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS NO AMBIENTE E BIOSSEGURANÇA

A liberação do plantio de plantas transgênicas é regulada por órgãos governamentais responsáveis por avaliações do potencial de impacto no meio ambiente. Um dos mais importantes componentes da avaliação de risco é a probabilidade do fluxo gênico (Chandler & Dunwell, 2008).

O fluxo gênico de plantas geneticamente modificadas para outros cultivares ou seus parentes selvagens ou mesmo para plantas invasoras parentes é uma das maiores

preocupações em relação ao risco ecológico associado à liberação de plantios comerciais de transgênicos (Messeguer, 2003). Em casos como girassol, abóbora e rabanete, cultura e planta daninha representam diferentes formas da mesma espécie e o fluxo gênico para as plantas selvagens ocorre se essas formas crescem uma próxima da outra (Snow et al., 2002). No Brasil, a lei nº 11.105 de 24 de março de 2005 e o Decreto nº 5.591 de 22 de novembro de 2005 normatizam e disciplinam o uso das técnicas de engenharia genética em construção, cultivo, manipulação, transporte, comercialização, consumo, liberação e descarte de OGMs, visando proteger a vida e a saúde do homem, dos animais e das plantas, bem como o meio ambiente. A existência de uma legislação específica possibilitou ainda a criação de uma comissão específica para assuntos de biossegurança nacional, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio (Borém & Miranda, 2009).

2.5- ESTRATÉGIAS DE CONTENÇÃO DO FLUXO GÊNICO

Existem várias formas de se medir diretamente o fluxo gênico, sendo a mais comum delas a observação da movimentação de sementes e pólen, a qual dá uma estimativa da dispersão gênica. Os fatores que determinam o provável estabelecimento de híbridos entre plantas cultivadas e espécies relacionadas em ambientes agrícolas ou habitat natural são: i) produção de sementes híbridas viáveis; ii) estabelecimento de plantas híbridas originadas de sementes no solo, e iii) capacidade do híbrido de se propagar vegetativa ou sexuadamente. A fertilidade do macho e da fêmea com estabilidade meiótica e pareamento de cromossomos, a persistência e disseminação de propágulos vegetativos no ambiente agrícola e a natureza de competição com outras plantas são alguns exemplos da capacidade propagativa do híbrido (Eastham & Sweet, 2002). A estrutura genética de populações de plantas é determinada em grande parte pelo movimento do pólen dentro e entre populações e padrões de polinização vão levar à conectividade de população e fluxo gênico (Craft, 2010). O potencial para o fluxo gênico mediado por pólen depende da distribuição geográfica das diferentes espécies compatíveis (selvagens ou cultivadas) presente na área de estudo.

Com exceção do sudeste asiático, nas demais regiões do planeta onde se cultiva citros não haveria parentes selvagens para se preocupar com o escape do transgene para essas plantas. Entretanto, a polinização cruzada entre citros transgênico e variedades convencionais é possível se eles são cultivados em áreas próximas. Com relação às sementes, embora não sejam consumidas, a presença de um embrião transgênico na semente de frutos de plantas não transgênicas poderia afetar negativamente sua comercialização, especialmente se pomares de

cultivo orgânico forem expostos (Pons et al., 2011). O escape do transgene via pólen e seu posterior desenvolvimento em embrião zigótico no fruto de uma planta cítrica não transgênica levanta questões quanto à sua disseminação. O fluxo do transgene mediado por pólen é uma questão a ser avaliada à luz da biologia dos citros, uma cultura exótica e cultivada há séculos no Brasil.

No caso de área de liberação de citros geneticamente modificado, o escape transgênico através de sementes tem uma possibilidade de sucesso muito baixa. Mesmo que sementes com embriões híbridos fossem levadas pelo homem ou pelos animais junto com os frutos e viessem a germinar numa mata ou ambiente agrícola, não formariam plantas adultas aptas a se reproduzirem sexualmente porque: (i) é prática agrícola habitual a eliminação de plantas cítricas de ocorrência espontânea nos pomares, (ii) a propagação de variedades de copa de citros não se dá por sementes, (iii) embriões híbridos são menos vigorosos que os nucelares, sendo assim, a capacidade de formarem plantas híbridas é menor. As variedades de laranja doce foram há muito tempo selecionadas e domesticadas pelo homem, sendo incapazes de, por si só, estabelecerem novas plantas através de sementes em matas.

De Jong et al. (2005), estudando o efeito da distância da fonte de pólen na formação de sementes em quatro espécies dióicas, comparando a polinização manual com a polinização aberta, observaram que a formação das sementes nas flores de polinização aberta decresceu significativamente com o distanciamento do doador de pólen coespecífico. Wallace et al. (2002) com o propósito de investigar o fluxo de pólen em plantas receptoras de tangerina Imperial, usando isoenzimas para determinação do parental, observaram que o tamanho do fruto e o número de sementes diminuiu significativamente com o aumento da distância do polinizador, a tangerina Ellendale.

Free (1960) classificou os tipos de visitas às flores de abelhas produtoras de mel em pomares de pêssigo, pera, ameixa, damasco e cereja, como sendo: a) raspam sobre as anteras para obter pólen e não tentam coletar néctar; b) ficam com os membros sobre os estames e inserem seu aparato bucal e a parte frontal do seu corpo entre os estames para alcançar o nectário, invariavelmente tocando as anteras devido à disposição dos estames; c) comportam-se como em b), mas raspam sobre as anteras procurando por pólen depois; d) comportam-se como em b), raspando as anteras à procura por pólen primeiro. Nesse trabalho é relatado que, devido à dificuldade de manter contínua a observação sobre uma abelha, especialmente seguindo ela de árvore para árvore, não foi possível obter informação precisa do número de árvores que a abelha visita numa única viagem, mas cálculos indicam que, na média, as abelhas provavelmente visitam duas ou mais plantas.

Levin & Kerster (1969) estudando o efeito do espaçamento entre plantas em nove espécies de angiospermas com diferente morfologia reprodutiva, pigmentação e aroma, sobre o comportamento de quatro espécies de abelhas quando buscam por alimento, encontraram que a distância média de voo dos polinizadores tem forte correlação positiva com o espaçamento entre plantas (coeficiente de correlação variando de 0,9 a 0,99). Os autores atribuem as altas correlações encontradas ao fato de que a distância de voo das abelhas buscando por alimento são controladas quase que exclusivamente pelo modelo de distribuição espacial das plantas e isso é altamente determinístico. Esse trabalho assume dois modelos de dispersão de pólen. O primeiro modelo chamado de faixa curta assume que 80% do pólen de uma planta é depositado na próxima planta visitada, 15% na segunda e 5% na terceira. O segundo modelo, chamado de faixa longa, assume que 50% do pólen de uma planta é depositado sobre a próxima planta, 25% na segunda planta, 12,5% na terceira planta, 6,5% na quarta planta e 6% na quinta planta. Para se deduzir o fluxo de distribuição de pólen do padrão de voo da abelha, a dinâmica da distribuição de pólen e a aleatoriedade de direção de voo da abelha devem ser levados em consideração, como sugere a fórmula: dispersão média de pólen = \sum (proporção de pólen depositado na n ésima planta $\times \sqrt{n}$). Segundo os autores a dispersão de pólen e gene é mais restrita em plantios densos e menos restrita em plantios esparsos.

Souza et al. (2003) estudando a biologia floral e o efeito de insetos visitantes na produção de laranja da variedade Pêra, observaram que a flor teve duração média de 25 horas, o inseto mais frequente nas flores foi a abelha *Apis mellifera* coletando principalmente néctar (94,4 %) do que pólen (5,6%), a porcentagem de fecundação das flores foi maior (57,4%) nas visitadas pelos insetos do que as não visitadas (botões protegidos por tela). As flores visitadas pelos insetos produziram frutos maiores, mais pesados, mais doces e com maior número médio de sementes que as flores não visitadas.

No grupo das laranjas, devido à grande variação entre as cultivares, fica difícil fazer uma afirmação generalista quanto aos benefícios da polinização cruzada por abelhas. Na laranja Valência houve aumento no tamanho do fruto e número de sementes devido a polinização por abelhas. Já para o grupo das mandarinas, onde muitas variedades são auto-incompatíveis, as que requerem polinização cruzada por abelhas são aquelas que apresentam fraca partenocarpia (Stanford, 1992). Snow (1994) considera que a seleção sexual em plantas é ainda uma questão aberta e que estudos que comprovem correlação (positiva ou negativa) entre a qualidade dos descendentes e o sucesso reprodutivo paternal são necessários. Em sua revisão intitulada “Seleção pós polinização e contribuição genética masculina em plantas”,

são abordados o contexto ecológico para seleção sexual e eventos como interação entre macho/ fêmea e escolha feminina. Quando misturas de pólen são depositadas nos estigmas, a seleção sexual pode ocorrer por conta de diferenças entre machos (grãos de pólen) nas taxas de crescimento do tubo polínico, sucesso de fertilização e taxas de sobrevivência do embrião. Nessa revisão ambos eventos pré e pós fertilização são considerados porque seu efeito pode influenciar o sucesso reprodutivo masculino e, na prática, é sempre difícil distinguir um do outro. Portanto, estender a definição de sucesso de cruzamento para incluir taxa de sobrevivência do embrião é problemático porque embriões representam uma nova geração e qualquer abortamento não aleatório é baseado no fenótipo da progênie e não no dos seus pais. Se o genótipo parental influenciar a chance de aborto, esses eventos podem ser análogos para competição entre machos e/ ou escolha feminina.

Marshall & Folsom (1991) ressaltam que, se flores recebem, de diferentes fontes, mais grãos de pólen que o número de óvulos que elas têm, nem todo grão de pólen estará apto a formar semente, então seleção durante a fecundação pode ocorrer. Essa seleção pode envolver discriminação entre seu próprio pólen e o de outras flores, assim como discriminação entre doadores compatíveis, entre parentes proximamente ou distantemente relacionados e entre espécies. Esses autores citam que misturas de dois ou mais tipos de pólen de outras flores foram aplicados para várias espécies cultivadas: milho, cebola, feijão, alfafa e abóbora. Em todos esses casos, as fecundações aconteceram de forma não aleatória.

Após a polinização e antes da formação do zigoto, uma barreira reprodutiva pode surgir da redução da habilidade paterna de pólen heteroespecífico comparado com pólen coespecífico. Esse sucesso de fertilização diferencial é sempre forte ou exclusivamente observado quando pólen de ambas espécies competem por fertilização. Uma vez formado o zigoto, sementes híbridas podem ser mal formadas, abortadas ou estéreis (Rahmé et al., 2009).

Klips (1999) avaliou a competição de pólen como um mecanismo de isolamento reprodutivo entre duas espécies simpátricas de hibiscos (Malvaceae), fazendo polinização manual com cargas puras de pólen coespecífico, heteroespecífico e com cargas mistas, verificou que nos tratamentos com polinizações mistas a produção de sementes híbridas foi muito menor que o esperado. *H. moscheotus* produziu 7,4% (Chi- quadrado = 72,5; $P < 0,001$) e *H. laevis* 8,8% (Chi- quadrado = 102,3 $P < 0,001$). Para ambas as espécies, a maioria dos frutos oriundos de polinização mista não produziram sementes híbridas.

Chacoff & Aizen (2007) conduziram um experimento com o objetivo de avaliar a dependência de polinizador para três variedades de grapefruit (*Citrus paradisi* Macf) no noroeste da Argentina e concluíram que a polinização animal e o desenvolvimento do tubo

polínico são importantes fatores para a produção de frutos e que a germinação de grãos de pólen vindos de outras plantas da mesma variedade 24 horas após sua chegada no estigma é maior do que a germinação de grãos de pólen da própria planta, indicando que sob condições naturais, onde ocorre a polinização mista, os grãos de pólen vindos de outras plantas competem com o grão de pólen da própria planta na formação de sementes.

Pons et al. (2011) analisaram pela primeira vez a possibilidade de citros não transgênico cultivado próximo a um campo de liberação de citros transgênico, servir como barreira de isolamento genético. Esse experimento teve como bordadura para o campo de citros transgênico uma fileira de plantas de Clementina Nules (monoembriônica e auto-incompatível) utilizada com a finalidade de monitorar o fluxo transgênico mediado por pólen (FTMP). A determinação do FTMP nas sementes das plantas de Clementina Nules foi feita durante sete anos consecutivos. As porcentagens de sementes transgênicas em frutos de Clementina Nules (plantas receptoras) foram baixas, variando de 0,17% a 2,86%. A análise da expressão do gene GUS e a morfologia da folha de uma sub parcela das plântulas originados de plantas receptoras de polinização aberta revelou a ocorrência de muitos híbridos trifoliados negativos para o gene GUS. Como o Citrange Carrizo, um híbrido trifoliado pertencente ao bloco de plantas transgênicas e sexualmente compatível com a Clementina Nules, não contribuiu muito para a formação de descendentes trifoliados, tais resultados sugeriram que outros doadores de pólen trifoliados de campos vizinhos competiram com árvores do campo transgênico por polinização das plantas receptoras e limitaram o FTMP.

Para identificar o doador de pólen não transgênico que competiu com os genótipos transgênicos no campo experimental de Pons et al. (2011), sob condições de polinização aberta, foram analisados em dois anos consecutivos, por marcadores microsátélites, o DNA de plântulas obtidas de sementes das plantas receptoras. Os resultados das análises mostraram que os doadores de pólen com maior efetividade na paternidade dessas plântulas foram cinco híbridos de uma coleção porta-enxertos, totalizando 477 plantas, localizada próximo ao bloco dos transgênicos.

Para esclarecer o mecanismo de isolamento pelo qual outros doadores de pólen limitaram o FTMP no estudo de Pons et al. (2011), a capacidade de competição de pólen foi avaliada. Um dos híbridos do campo de porta-enxertos que apresentou a maior taxa de fecundação em polinização aberta, o híbrido citrandarin entre tangerina Cleópatra e *Poncirus trifoliata* (L.), foi comparada, em polinizações mistas, com o pólen de um genótipo de laranja Pineapple transgênica altamente compatível com Clementina Nules, em dois anos consecutivos. Polinizações simples com pólen de Pineapple transgênica e não transgênica

foram feitas como controle. As plântulas progênes desses cruzamentos foram testadas para expressão do gene GUS. A polinização simples com pólen de Pineapple transgênica revelou 86% de seedlings GUS positivos, bem próximo do esperado para a herança do transgene. Por outro lado, somente 5% de plântulas GUS positivos do cruzamento em polinização mista foi obtido, indicando que o híbrido tangerina Cleópatra X *Poncirus trifoliata* (L.) reduziu fortemente o sucesso de paternidade do genótipo transgênico. As polinizações simples de flores de Clementina Nules resultaram em similar “pegamento de fruto” e formação de sementes, indicando que o caráter transgênico não afetou a fecundação.

A Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) estabeleceu, através da resolução normativa nº 10 de 02 de outubro de 2013, condições de isolamento para a liberação planejada no meio ambiente de laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) geneticamente modificada. Essas condições envolvem: (1) a disposição de duas linhas de cultivo de um genótipo de citros polinizador não transgênico ao redor da área que contenha laranja doce geneticamente modificada, para atuar como fonte de pólen alternativo para as abelhas e que compita eficazmente com o pólen de laranja doce GM por fertilização; (2) a disposição de uma segunda bordadura ao redor do genótipo superpolinizador, composta por duas linhas de cultivo de um genótipo não geneticamente modificado receptor de pólen, auto incompatível e monoembriônico, permitindo assim o monitoramento do fluxo transgênico e servindo como barreira para minimizar o escape do pólen GM; (3) a disposição de uma terceira bordadura, ao redor das bordaduras anteriores, composta por no mínimo duas linhas de cultivo de laranja doce para minimizar o escape do pólen GM e também servir de monitoramento do fluxo transgênico; (4) o estabelecimento de uma distância mínima de três quilômetros de colmeias destinadas a apicultura comercial ou doméstica pré-existentes à época da instalação do experimento, sendo que após a instalação do experimento os apicultores deverão ser informados que deverão respeitar a distância mínima de 1 km entre o apiário e a área experimental; (5) para obtenção de sementes de porta enxertos para viveiros comerciais deverá ser respeitada uma distância mínima de 1 km entre as plantas fontes de sementes e a área experimental; (6) respeitar a distância de pelo menos 100 metros de áreas de preservação natural; (7) obrigatoriedade em se realizar um monitoramento em um raio de 100 metros da área experimental a partir da última linha de bordadura, visando a eliminação de plantas cítricas espontâneas. Os preceitos estabelecidos nessa resolução normativa não se aplicam quando a planta cítrica for formada pelo porta-enxerto transgênico enxertado com uma copa não transgênica (Brasil, 2013).

2.6. OBJETIVOS

Considerando o benefício que variedades geneticamente modificadas podem trazer à citricultura mundial e a necessidade do estabelecimento de medidas que minimizem o fluxo transgênico mediado por pólen em áreas de cultivo de citros transgênico, esse trabalho tem o objetivo de:

- 1- Testar a superioridade do pólen de um citrandarin (*Citrus reshni* hort. ex Tanaka X *Poncirus trifoliata* (L). Raf. seleção Rubidoux) sobre pólen de variedades de laranja doce, na formação de embriões zigóticos em frutos de clementina Nules por meio de polinizações controladas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PLANTAS RECEPTORAS

Como parental feminino utilizou-se plantas de Clementina Nules.

A polinização foi realizada em duas floradas distintas. Para a florada da safra 2011/2012, foram polinizadas plantas de Clementina Nules do banco ativo de germoplasma do Centro de Citricultura Silvio Moreira, em Cordeirópolis – SP, com nove anos de plantio, enxertadas parte em limão Cravo e outra parte em *Poncirus trifoliata* L. Para a florada da safra 2013/2014, foram utilizadas como parental feminino plantas de Clementina Nules da fazenda Nossa Sra. Aparecida, no município de Botucatu- SP, enxertadas em *Poncirus trifoliata* L, com oito anos de plantio. O número de flores polinizadas em cada safra para cada tratamento encontra-se nos apêndices (Tabela 19).

3.2 PLANTAS DOADORAS DE PÓLEN

Utilizou-se o pólen do citrandarin [*Citrus reshni* hort. ex Tanaka x *Poncirus trifoliata* (L) Raf.]. seleção Rubidoux, referenciado como acesso 1600 no CCSM e pólen de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) das variedades: Pera, Valência, Hamlin e Pineapple.



Figura 1. (A) flores de citrandarin acesso 1600 (*Citrus reshni* hort. ex Tanaka X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. seleção Rubidoux), (B) planta no campo, enxertada em limoeiro Cravo.

3.3 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DO PÓLEN

Os diferentes tipos de pólen utilizados nas polinizações foram obtidos de botões florais de plantas doadoras coletados em seu máximo estágio de desenvolvimento e ainda fechados para garantir que não houvesse mistura com pólenes de outras variedades que não fossem objeto do estudo, possivelmente trazido por abelhas ou pelo vento.

Esse experimento foi realizado em duas etapas distintas, uma na florada da safra 2011/2012 e outra na florada da safra 2013/2014.

Nos anos de 2011 e 2013 foram coletados botões florais do citrandarin acesso CCSM 1600 em plantas do banco de sementes da fazenda São Carlos, em Gavião Peixoto – SP, da empresa Citrosuco. De talhões comerciais dessa mesma fazenda foram coletados os botões florais de laranjeira Pera, Valência e Hamlin. Para a laranjeira Pineapple os botões florais foram coletados na fazenda Capim Verde em Taquaral – SP, da empresa Sucocítrico Cutrale S/A. No ano de 2013 manteve-se os locais de coleta de botões florais para extração de pólen, mas também foram coletados botões florais do citrandarin 1600 no banco ativo de germoplasma do Centro de Citricultura Silvio Moreira, em Cordeirópolis – SP, devido a pequena quantidade de árvores disponíveis desse genótipo na fazenda São Carlos.

Os botões foram coletados semanalmente e levados ao laboratório, abertos sobre folha de papel em uma mesa onde ficaram expostos à temperatura ambiente por 24 horas para deiscência das anteras. As anteras foram então removidas com uma pinça, colocadas em placas de petri e levadas em estufa a 35° C onde ficavam por mais 12 horas para secagem.

Para que houvesse proporcionalidade no número de grãos pólen nos tratamentos com cargas mistas, após o processo de secagem procedeu-se uma padronização, conforme protocolo descrito no Anexo I.

Depois da padronização, as anteras foram colocadas em recipientes plásticos de 80 ml com tampa, agitados em “vortex” para homogeneização da mistura e desprendimento dos grãos de pólen das anteras, onde foram levados ao campo para as polinizações. Esse procedimento foi repetido em todas as semanas em que houve polinização, garantindo assim que o pólen utilizado estivesse com boa condição de germinação.

3.4 ESTUDO DE VIABILIDADE DE PÓLEN

Durante as polinizações realizadas em 2013 foi feito um estudo concomitante da viabilidade de pólen. Utilizaram-se duas técnicas para estudo da viabilidade de pólen, (i) a coloração por carmim acético a 2,5% e (ii) germinação *in vitro*.

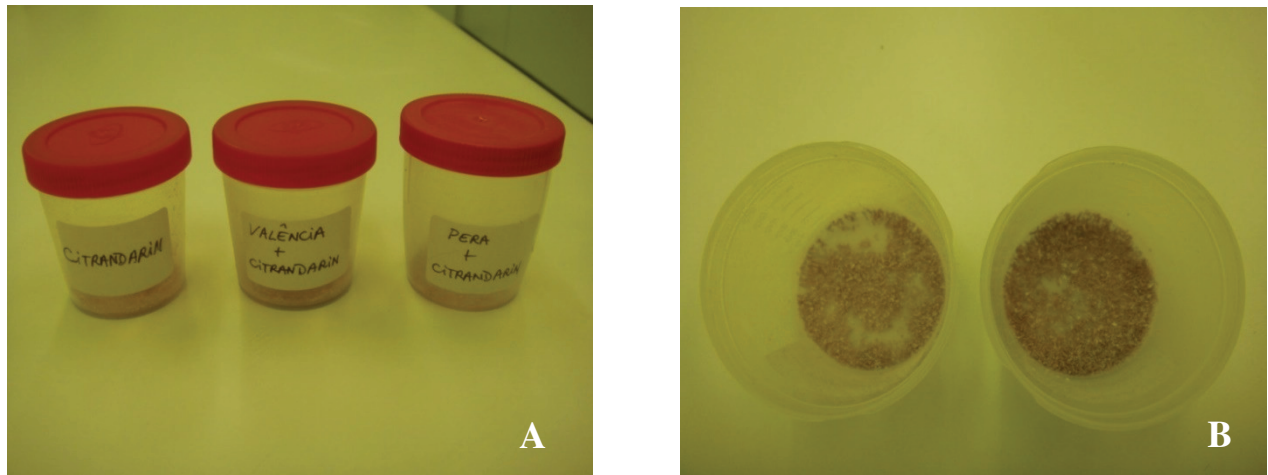


Figura 2. (A) Potes preparados com anteras (puro e mistura) para polinização no campo, (B) anteras de citrandarin (esquerda) e mistura de anteras da variedade Pera com citrandarin (direita).

3.4.1 COLORAÇÃO POR CARMIM ACÉTICO

Depois que o pólen passou pelo processo de secagem em estufa, uma pequena porção de anteras foi transferida para tubos plásticos, contendo 0,5 ml de solução 3:1 (álcool absoluto: ácido acético glacial) e agitada em “vortex”, obtendo-se assim uma suspensão de pólen.

A viabilidade foi avaliada por meio de coloração por carmim acético a 2,5% sobre lâminas de vidro, seguida de observação em microscópio óptico de acordo com metodologia estabelecida por Moreira e Gurgel (1941). Os grãos de pólen viáveis apresentam bordas circulares, com superfície uniforme e coloração vermelho intensa enquanto os inviáveis apresentam menor tamanho, superfície irregular, formato não uniforme e coloração amarelo claro (Latado et al., 2004).

De acordo com Moreira & Gurgel (1941), o pólen pode ser classificado em quatro grupos. O primeiro são os grãos funcionais, fortemente coloridos pelo carmim acético e que germinam em soluções com sacarose. Os outros três grupos são os grãos incompletamente preenchidos, os grãos vazios e os grãos pequenos e deformados que são inviáveis.

3.4.2 GERMINAÇÃO *in vitro*

Avaliou-se também a germinação do grão de pólen *in vitro*. Para isso, preparou-se um meio de cultura contendo 15% de sacarose e 1% de agarose, pH ajustado para 6,5 e vertido sobre lâminas de vidro e solidificados a temperatura ambiente. Os grãos de pólen foram colocados sobre o meio com auxílio de um pincel. As lâminas foram acondicionadas sobre papel toalha molhado em bandeja refratária coberta com filme PVC formando uma câmara úmida e incubadas em BOD a 28° C por 24 h.

A contagem dos grãos de pólen germinados e não germinados foi feita em microscópio óptico, percorrendo vários campos por lâmina até chegar ao número de 600, contando-se preferencialmente naqueles campos onde havia maior concentração de pólen germinado. O pólen tende a germinar mais onde ocorre agregação (Pons, comunicação pessoal).

3.5 POLINIZAÇÕES CONTROLADAS

No ano de 2011, a ocorrência de florada nas plantas receptoras ocorreu no período entre as duas últimas semanas de outubro e as duas primeiras semanas de novembro. Para o ano de 2013, a florada ocorreu entre os meses de agosto e setembro. Nesses dois anos, as floradas das plantas doadoras de pólen e da Clementina Nules coincidiram, o que possibilitou trabalhar com o pólen recém coletado. As polinizações foram realizadas em quatro dias, distribuídos em quatro semanas na campanha de 2011 e em cinco dias, distribuídos em cinco semanas na campanha de 2013.

Para serem manualmente polinizados, foram escolhidos botões florais das plantas receptoras no máximo estágio de desenvolvimento, porém ainda fechados, para garantir que em seus estigmas não houvesse sido depositado nenhum grão de pólen. Os botões eram abertos e retirados estames e anteras. Com auxílio de um pincel, cargas de pólen foram depositadas no estigma das flores. As flores polinizadas foram identificadas com etiquetas

plásticas e cobertas com saquinho de papel por uma semana para evitar a visita de insetos e deposição de pólen que não fosse de interesse do estudo.



Figura 3. (A) Botão floral no estágio para ser polinizado, (B) botão floral sem as pétalas sendo polinizado.

3.6 EXTRAÇÃO DE SEMENTES, GERMINAÇÃO E AVALIAÇÃO FENOTÍPICA

Entre a segunda e a terceira semana de junho de 2012 os frutos obtidos das polinizações controladas de outubro e novembro de 2011 já haviam iniciado maturação e foram colhidos. As sementes foram extraídas e lavadas, separadamente fruto por fruto. Fez-se o tratamento com hipoclorito de sódio a 1% por 10 min e tratamento térmico em água à 52° C por 10 min. As sementes foram então secas ao ar, à temperatura ambiente por 24 h, embaladas e etiquetadas em sacos plásticos com polvilhamento de fungicida captana e posteriormente armazenadas em câmara fria até a sementeira.

As sementes foram germinadas em tubetes plásticos de 12,5 X 2,5 cm, com substrato fibra de coco, em casa de vegetação. A germinação das plântulas ocorreu na segunda quinzena de agosto de 2012.

A avaliação visual do fenótipo das plantas oriundas das polinizações controladas de 2011 foi feita em dezembro de 2012, quatro meses após a germinação, quando as plântulas já tinham tamanho maior ou igual a 15 cm classificando-as em: (i) trifoliadas, (ii) monofoliadas e (iii) plântulas que apresentavam folhas mono e bifoliadas (miscelânea). Nessa ocasião, foram coletadas amostras de folha de todas as plantas monofoliadas e plantas com folha mono e bifoliada (miscelânea) provenientes dos cruzamentos onde houve mistura de pólen de laranja doce com citrandarin, para a extração do DNA genômico, segundo protocolo de Murray & Thompson (1980). Foram coletadas também, folhas de pelo menos cinco plantas dos tratamentos onde não houve mistura de pólen (tratamento controle), com a finalidade de servirem de controle de polimorfismo nas análises por marcador molecular, sendo para o tratamento com pólen de citrandarin selecionadas cinco plantas tipicamente trifoliadas e para os tratamentos com pólen de laranjeira doce selecionadas cinco plantas tipicamente monofoliadas.

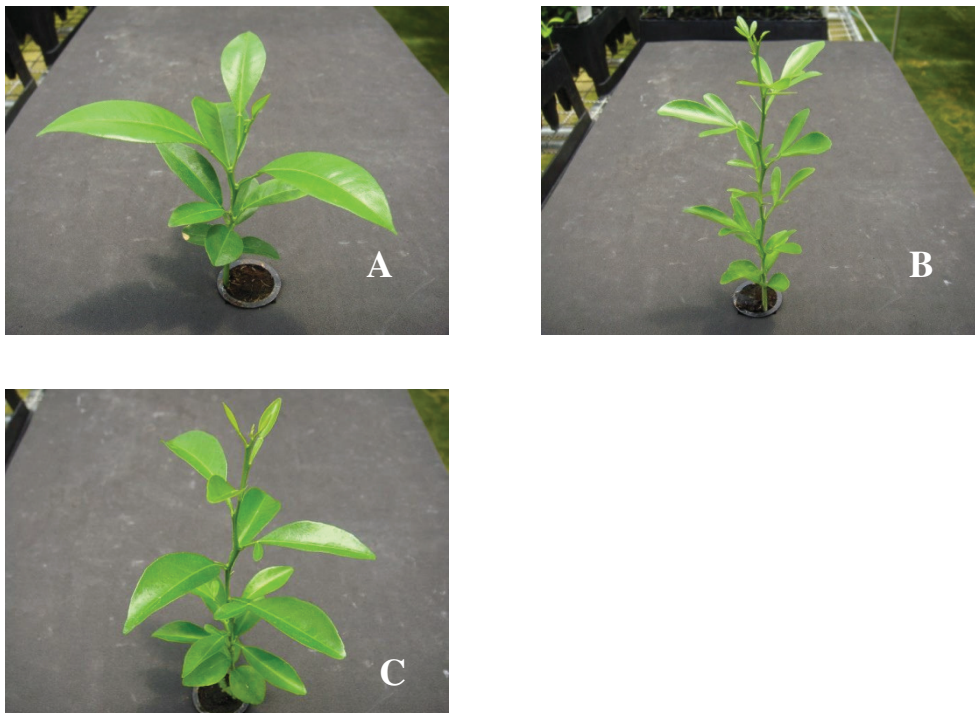


Figura 4. (A) Planta com folha monofoliada, (B) planta com folha trifoliada, (C) planta com folha mono e bifoliada.

Depois da avaliação visual do fenótipo, todas as plântulas trifoliadas oriundas de cruzamentos com cargas mistas de pólen tiveram sua paternidade atribuída ao citrandarin, uma vez que o citrandarin tem fenótipo trifoliado e esse caráter é dominante sobre o caráter

“monofoliado” (Gmitter Júnior. et al, 2010). A planta receptora Clementines e as laranjas doce doadoras de pólen nesse estudo (Pera, Valência, Hamlin e Pineapple) são todas monofoliadas.

Entre a última semana de maio e a segunda semana de junho de 2014 foram colhidos os frutos obtidos das polinizações controladas de 2013. Os processos de extração de sementes e germinação foram idênticos aos realizados em 2012. A avaliação visual do fenótipo das plantas ocorreu em outubro de 2014, quatro meses após a germinação, adotando-se a mesma classificação empregada em 2012. A coleta de amostras para a extração de DNA e análise com marcadores moleculares para os cruzamentos das polinizações de 2013 não foi incluído neste estudo.

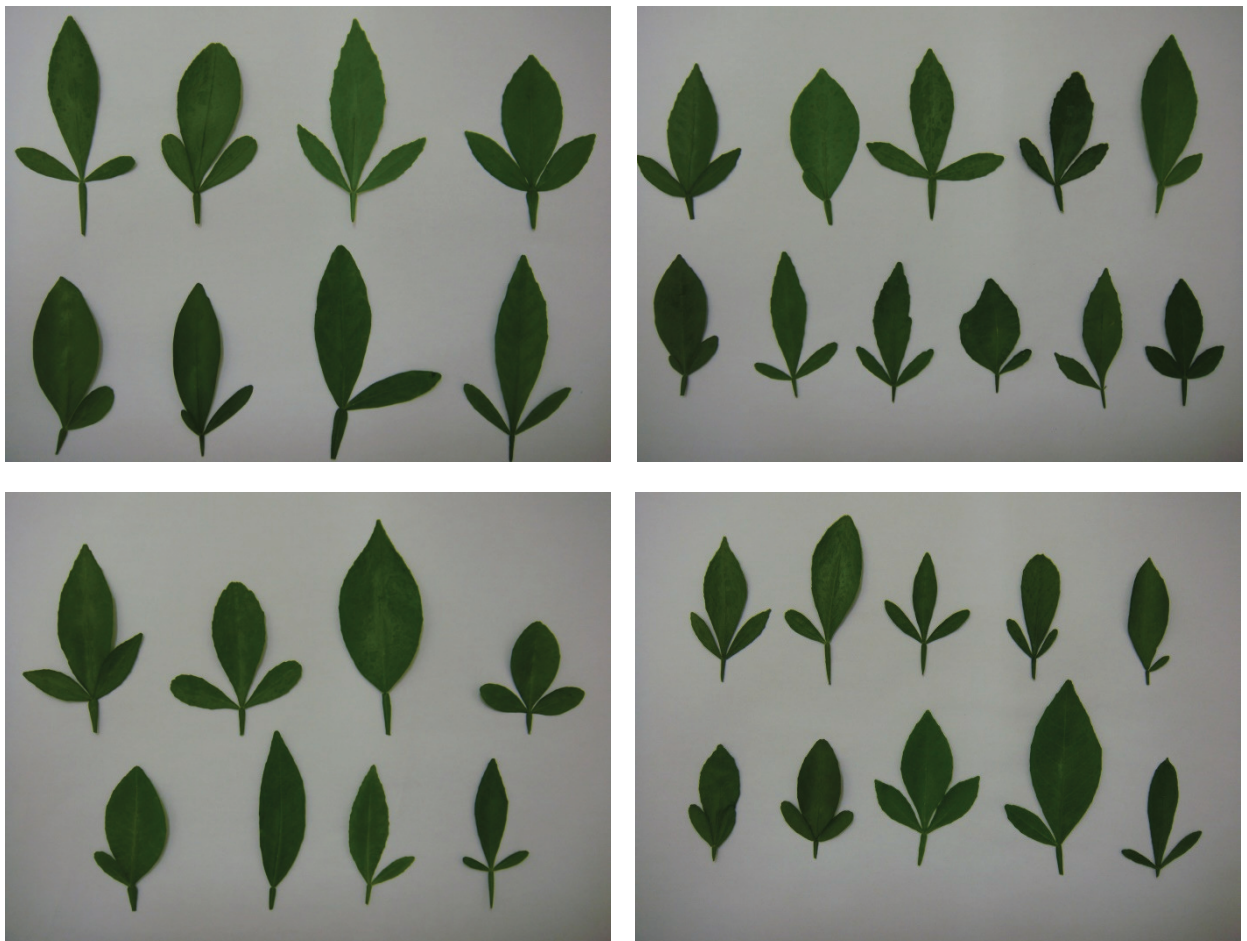


Figura 5. Variabilidade morfológica de folhas de híbridos obtidos de polinizações mistas em Clementina Nules com pólen de citrandarin (acesso CCSM 1600) e laranja doce (safra 2013-2014).

3.7 ANÁLISE DE PATERNIDADE ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES

A necessidade de submeter as plantas monofoliadas oriundas dos cruzamentos de polinizações mistas à análise por marcador molecular se deve ao fato do citrandarin ser um híbrido, e por segregação gênica, o caráter trifoliado pode não ser transmitido aos seus descendentes. A determinação da paternidade dos híbridos progênie de polinizações mistas com fenótipo monofoliado ou miscelânea (mono e bifoliado), foi feita mediante genotipagem com marcadores moleculares de simples sequência repetida (SSR). Nesse trabalho, foram submetidos à análise de paternidade os híbridos não trifoliados oriundos das polinizações mistas (Pera + citrandarin e Pineapple + citrandarin) e os híbridos não trifoliados das polinizações simples com pólen de citrandarin, da safra 2011- 2012. Por não existir um único marcador com diferenciação alélica total entre os três doadores de pólen (citrandarin, Pineapple e Pera), foi realizada uma análise de paternidade multilocus. Dos dez marcadores SSR utilizados por Pons et al. (2011), foram selecionados três que apresentaram melhor polimorfismo para os quatro parentais utilizados nesse estudo: CIR07C07 (Froelicher et al. (2008); CIR07C07f 5'-TATCCAGTTTGTAATGAG-3' e CIR07C07r 5'-TGATATTTGATTAGTTTG-3'), mest86 e mest107 (Luro et al., dados não publicados; mest86f 5'- CCAACTGACACTAATCCTCTTCC-3' e mest86r 5'-CCTCTCTGGCTTCTGGATTG-3'; mest107f 5'-GCTGAGATGGGGATGAAAGA-3' e mest107r 5'-CCCCATCCTTTCAACTTGTG-3').

Para a amplificação dos fragmentos de DNA em termociclador Eppendorf modelo Mastercycler, utilizaram-se pares de oligonucleotídeos marcados com fluorescência no oligonucleotídeo forward, o do sentido sense no anelamento ao DNA molde (Applied Biosystems® ou Macrogen). O oligonucleotídeo para o SSR CIR07C07 foi marcado com o fluoróforo FAM, o oligonucleotídeo para o SSR mest86 foi marcado com o fluoróforo NED e para o SSR mest107, o oligonucleotídeo foi marcado com o fluoróforo HEX. As reações de PCR com os oligonucleotídeos CIR07C07 e mest 107 foram preparadas para um volume final de 20 µL com 1 U de enzima DNA polimerase de alta fidelidade), tampão 1 X, 0,2 mM de dNTPs, 5 mM de MgCl₂, 2 µM de cada *primer*, e 90 ng de DNA genômico. Para o oligonucleotídeo mest86 a reação de PCR foi preparada com um volume final de 20 µL com 1 U de enzima DNA polimerase de alta fidelidade, tampão de enzima 1 X, 0,2 mM de dNTPs, 2 mM de MgCl₂, 2 µM de cada *primer* e 90 ng de DNA genômico. Os parâmetros utilizados para as ampliações foram: (a) 94°C/ 5 min, 40 ciclos a 94°C/ 30 s, 56°C/ 1 min, 72°C/ 30 s, e alongação final a 72°C/ 10 min para os oligonucleotídeos CIR07C07; (b) 94°C/ 5 min, 40

ciclos a 94°C/ 30 s, 66°C/ 1 min, 72°C/ 30 s, e elongação final a 72°C/ 10 min para os oligonucleotídeos mest 86 e (c) 94°C/ 5 min, 40 ciclos a 94°C/ 30 s, 60°C/ 1 min, 72°C/ 30 s, e elongação final a 72°C/ 10 min para os oligonucleotídeos mest 107.

Foram utilizados 1 µL de cada um dos três produtos de reação de PCR e colocados em outro tubo onde adicionou-se 7 µL de água. Dessa mistura tomou-se uma alíquota de 1 µL que foi adicionada a 0,4 µL de GeneScan™ 500 ROX™ Size Standard e 8,6 µL de formamida, em placa com 96 poços. A separação dos fragmentos foi efetuada em sequenciador automático ABI 3730 XL DNA Analyser (Applied Biosystems®, Foster City, California, CA) onde as amostras foram processadas e os resultados analisados com o software Genemapper no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica da UNESP – FCAV, Campus de Jaboticabal.

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foram feitas análises de variância, teste de Tukey para comparação de médias e teste de Bartlett para homogeneidade de variâncias, utilizando-se o programa “Assistat” versão 7.7 beta, para os dados de viabilidade de pólen pela técnica do carmim acético; viabilidade de pólen *in vitro* e número médio de sementes por fruto.

Foi aplicado o teste Qui-quadrado para o parâmetro frequência fenotípica (morfologia de folha) para os tratamentos Pera + citrandarin (polinização mista) e citrandarin (polinização simples) e para o parâmetro fixação de frutos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- VIABILIDADE DE PÓLEN *in vitro*

O experimento com as polinizações controladas no campo se iniciou em outubro 2011, porém, como para essa safra a fixação de frutos de maneira geral foi baixa, no ano 2013 conduziu-se um estudo de viabilidade de pólen, com o mesmo pólen que se utilizou nas polinizações controladas.

De acordo com o teste de coloração por carmim acético, os pólenes utilizados nesse experimento apresentaram-se viáveis. Foram encontradas diferenças significativas para a viabilidade entre os pólenes de laranja doce (Tabela 1). Os pólenes de Hamlin e citrandarin foram os que apresentaram o maior percentual de viabilidade. O pólen de Valência foi o menos viável entre as laranjas doce, diferindo significativamente das demais variedades.

Tabela 1. Teste de viabilidade de pólen por carmim acético (2,5%) para a safra 2013/2014.

Cítrico ¹	Pólen viáveis (%)	Erro padrão	(n)
Pera	46 c	± 0,97	15
Valência	28,1 d	± 1,67	15
Hamlin	84,3 ab	± 1,39	6
Pineapple	78,9 b	± 4,22	6
Citrandarin	89,6 a	± 0,90	9

F (4,46) = 250,43** p <0,0001 CV% = 9,83

¹ Pera, Valência, Hamlin e Pineapple são variedade de laranja doce; citrandarin (Acesso CCSM 1600) é um híbrido de *C. reshni* x *Poncirus trifoliata*.

(n) = lâminas avaliadas, entre agosto e setembro de 2013.

Pelo teste de Bartlett, $\chi^2 > \chi^2$ (1%) indicando que as variâncias não foram homogêneas (p < 0,01).

Estudando a viabilidade de pólen de laranjas doce e utilizando a mesma metodologia do carmim acético, Domingues et al. (1999) obtiveram resultados bem próximos dos apresentados na Tabela 1, sendo as viabilidades de pólen para Hamlin (78,6%), Valência Late (20,9%), Pera Rio (20,5%) e Pera Coroada (42,7%).

Domingues et al. (2000), empregando a técnica de coloração por carmim acético, encontraram entre onze clones de laranjeira Pera, a maior viabilidade de pólen para Pera Olímpia (57,3%) e a menor para Pera Bianchi (28,1%).

A germinação de pólen *in vitro* foi baixa para as laranjas doce, especialmente para a variedade Pineapple (Tabela 2), comparado aos dados obtidos por Pons et al. (2011), onde obtiveram para essa variedade valores entre 40% e 50%. Pio et al. (2004), estudando a composição do meio de cultura para germinação de pólen, obtiveram valores mais próximos do que os reproduzidos nesse trabalho, sendo de 10% para Valência, acima de 6% para Pêra e 4% para Natal.

Salles et al. (2006), estudando o efeito da concentração de sacarose e do pH na germinação *in vitro* de pólenes de laranjeira Pera, Valência e Natal, verificaram que, as melhores germinações para as três variedades estudadas, ocorreram na concentração de sacarose de 100 g/L e em pH 6,5. Os valores mais frequentes de porcentagem de germinação variaram entre 2% e 8%, corroborando com os dados obtidos nesse estudo (Tabela 2).

Pio et al. (2007) avaliaram o efeito da temperatura (-10 °C, 4 °C e temperatura ambiente), ambientes (com e sem dessecador) e presença ou ausência de sílica gel no armazenamento de pólen de laranja doce e concluíram que, ao longo de nove semanas de armazenamento, as maiores porcentagens de germinação *in vitro*, para os pólenes de laranjeira Pera, Valência e Natal, foram obtidas à -10 °C em dessecador, independente da presença de sílica gel. Depois de nove semanas, nas condições de armazenamento citadas, as taxas de germinação para Pera, Valência e Natal foram respectivamente de 7,94%, 8,84% e 6,86%.

Considerando-se a metodologia adotada nesse experimento, onde o período entre a coleta das flores para extração das anteras até a polinização das flores de *Clemnules* foi de três dias, as taxas de germinação de pólen “*in vitro*” encontradas para as variedades de laranja doce (Tabela 2), exceto para a variedade Pineapple, são condizentes com os resultados obtidos em outros estudos.

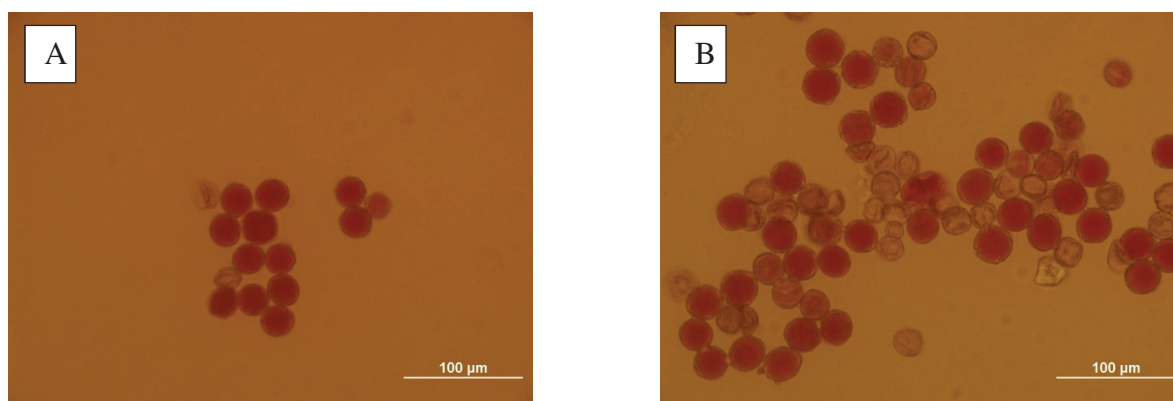


Figura 6. Fotografias de microscópio óptico. Grãos de pólen corados por carmim acético, (A) citrandarin, (B) Pera.

Tabela 2. Germinação de pólen *in vitro* safra 2013/2014.

Cítrico ¹	Germinação (%)	Erro padrão	(n)
Pera	6,3 b	± 1,36	6
Valência	3,7 b	± 0,99	6
Hamlin	2,0 b	± 0,84	3
Pineapple	0,8 b	± 0,07	3
Citrandarin	16,0 a	± 2,81	3

F (4, 16) = 13,42^{**} p < 0,0001 CV% = 52,81

¹ Pera, Valência, Hamlin e Pineapple são variedade de laranja doce; citrandarin (Acesso CCSM 1600) é um híbrido de *C. reshni* x *Poncirus trifoliata*.

(n) = lâminas avaliadas, distribuídas em cinco semanas entre agosto e setembro de 2013.

Pelo teste de Bartlett, $\chi^2 < \chi^2$ (1%), indicando que as variâncias foram homogêneas (p > 0,01).

A germinação *in vitro* do pólen de citrandarin foi superior à germinação *in vitro* dos pólenes de laranja doce (Tabela 2). Considerando apenas os pólenes de laranja doce, embora não houve diferença significativa para a germinação *in vitro* entre eles, aparentemente não há correlação entre os dois métodos (coloração por carmim acético X germinação *in vitro*). As variedades Hamlin e Pineapple que, dentre as laranjas doce, apresentaram os maiores percentuais de viabilidade pelo carmim acético (Tabela 1) foram as que, em números absolutos, mostraram os menores percentuais de germinação de pólen *in vitro* (Tabela 2).

4.2 – VIABILIDADE DO PÓLEN *in vivo*

Para o ano de 2013, podem-se considerar compatíveis todos os pólenes de laranja doce testados com o parental feminino Clemenules, posto que as quatro variedades de laranja doce apresentaram valores para fixação de frutos cima de 50%. As variáveis que normalmente se utilizam para estudar o êxito de cruzamentos intervarietais são a fixação de frutos e a formação de sementes (Cameron & Frost, 1968) (Spiegel-Roy & Goldschmidt, 1996).

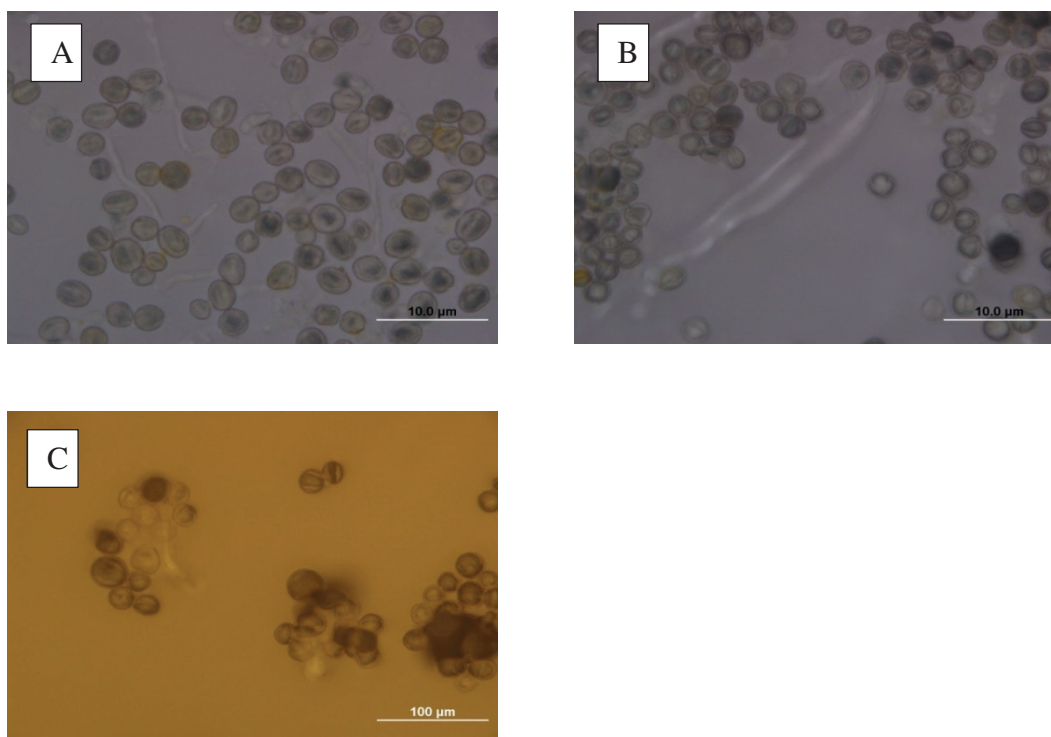


Figura 7. Fotografias em microscópio óptico. Germinação de pólen *in vitro*. (A) citrandarin, (B) Pera e (C) Valência.

Tabela 3. Fixação de frutos de *Clemenules* obtidos por meio de polinizações controladas (2011 – Cordeirópolis e 2013 – Botucatu)

Tratamento ¹	2011		2013	
	(%)	(n)	(%)	(n)
Pera	5,8	120	60	400
Valência	0,8	120	51,3	320
Hamlin	6,7	150	51	200
Pineapple	15	160	52	200
Cirandarin ¹	38,3	120	56,9	160
Pera + citrandarin ¹	16,8	340	51,7	520
Pineapple + citrandarin ¹	17	400	---	---
Valência + citrandarin ¹	---	---	51,6	440

¹ Pera, Valência, Hamlin e Pineapple são variedades de laranja doce; citrandarin (Acesso CCSM 1600) é um híbrido de *C. reshni* x *Poncirus trifoliata*.

(n) = número de flores polinizadas.

Para o ano de 2011 obteve-se baixa fixação de frutos tanto para os cruzamentos com polinização simples quanto nos cruzamentos com polinizações mistas. Nesse ano, como havia escassez de botões para serem polinizados, os tratamentos ficaram concentrados em poucas plantas, o que possivelmente acentuou a discrepância do parâmetro fixação de frutos.

Nas polinizações realizadas em 2011, priorizou-se as misturas de pólen de Pera + citrandarin e Pineapple + citrandarin por haver poucas flores nas árvores e pelo fato de a Pineapple ser uma variedade que já tinha sido estudada no trabalho de Pons et al. (2011).

Em 2013, foram priorizadas as polinizações mistas com pólen de Pera + citrandarin e Valência + citrandarin, por serem de variedades de grande importância para a citricultura nacional e também porque nas polinizações de 2011, essas duas variedades em polinizações simples, foram as que, entre as laranjas doces, apresentaram menor fixação de frutos (Tabela 3). Além disso, foi impraticável efetuar polinizações mistas combinando o pólen citrandarin com os quatro outros pólenes de laranja doce, devido ao pequeno número de plantas doadoras de pólen de citrandarin acesso CCSM 1600.

Nos tratamentos que se repetiram em duas safras foi aplicado o teste Qui-Quadrado, para testar, dentro de cada tratamento, a independência do fator ano na fixação de frutos. Como resultado, obteve-se $\chi^2 > \chi^2_{0,01;1}$ para os seis tratamentos testados (apêndices, Tabela 12), o que levou a rejeitar a hipótese nula ($p < 0,01$), assumindo que o ano interferiu no “pegamento de frutos”. Ressalta-se que, na comparação entre os anos 2011 e 2013 não variou apenas o ano, mas também o campo de plantas receptoras de pólen (Clementina Nules). O tratamento citrandarin, embora pelo teste Qui-Quadrado não tenha diferido significativamente dos demais, foi, em números absolutos, o tratamento menos influenciado pelo fator ano (apêndices, Tabela 11), o que é um indicativo não só de compatibilidade com Clementina Nules, mas também de capacidade competitiva entre os pólenes de laranja doce por formação de frutos.

As porcentagens de fixação de fruto para a polinização com pólen de citrandarin, nos dois anos, evidencia que esse doador não influencia negativamente nesse parâmetro.

Moreira & Gurgel (1941), relataram uma tendência para uma correlação média entre a fertilidade do pólen e o número de sementes (coeficiente de correlação positivo de 0,53), considerando um grande número de dados analisados, porém com valores altos para os coeficientes de variação dos parâmetros estudados: 31,18% para pólen e 93,01% para a semente. Segundo esses autores, de 0 a 10 sementes por fruto a variação do pólen em relação ao número médio de sementes por frutos é bem desordenada. Para 10 a 20 sementes por fruto, já há necessidade de certa fertilidade do pólen, geralmente mais de 50%. A existência de

grande número de sementes por fruto, mais de 20, requer alta fertilidade do pólen, para mais de 70%.

Tabela 4. Número médio de sementes por fruto de Clemenules obtidos por meio de polinizações controladas (2011 – Cordeirópolis e 2013 – Botucatu).

Tratamento ¹ (carga de pólen)	2011			2013		
	Média	Erro padrão	(n)	Média	Erro padrão	(n)
Pera	12,71 a	± 2,53	7	16,61 a	± 0,40	240
Valência	---	---	---	11,5 b	± 0,50	164
Hamlin	16,4 a	± 3,02	10	11,13 b	± 0,48	102
Pineapple	9,75 a	± 1,23	24	16,35 a	± 0,62	104
Citrandarin ¹	14,76 a	± 1,23	46	14,34 a	± 0,45	91
Pera + citrandarin ¹	9,46 a	± 0,98	57	15,09 a	± 0,34	269
Pineapple + citrandarin ¹	11,06 a	± 0,86	68	---	---	---
Valência + citrandarin ¹	---	---	---	14,93 a	± 0,32	227

F (5, 206) = 3,25^{**} (p < 0,01) CV% = 38,50 (ano 2011)

F (6, 1190) = 21,55^{**} (p < 0,01) CV% = 19,03 (ano 2013)

¹ Pêra, Valência, Hamlin e Pineapple são variedade de laranja doce; citrandarin (Acesso CCSM 1600) é um híbrido de *C. reshni* x *Poncirus trifoliata*.

(n) = número de frutos por tratamento

Os dados foram transformados em log para análise estatística

Pelo teste de Bartlett $\chi^2 < \chi^2$ (5%), indicando que as variâncias são homogêneas (p > 0,05) (ano 2011)

Pelo teste de Bartlett $\chi^2 > \chi^2$ (1%), indicando que as variâncias não são homogêneas (p < 0,01) (ano 2013)

Considerando os dados da Tabela 4, para o ano de 2013, o pólen de Pineapple (com boa porcentagem de viáveis na coloração por carmim (78,9%)), foi um dos que mais sementes produziu. O pólen de Hamlin apresentou uma das melhores porcentagens de viáveis por carmim (84,3%), porém, produziu menos sementes que o pólen de Pera, que teve menor porcentagem de viáveis por carmim comparado a Hamlin e Pineapple, mas foi um dos tratamentos que mais produziu sementes. Já o pólen de Valência teve a menor porcentagem de viáveis por carmim, sendo também um dos que produziu menor número de sementes. Esses dados sugerem que, dependendo da variedade, pode existir correlação entre viabilidade de pólen por carmim acético e número de sementes.

Em um estudo de caracterização da variedade Clementina Nules nas condições de Cordeirópolis – SP, realizaram-se polinizações controladas com pólenes de laranjas, tangerinas e tangelo. Polinizações com laranjas e com o tangelo Nova originaram maior número de sementes aos frutos de Clementina Nules e frutos com maior tamanho em relação ao cruzamento com Ortanique (Fávero, dados não publicados).

Azevedo et al., (2013) avaliaram que a polinização cruzada gerou frutos de Clementina Nules cujo número médio de sementes variou de acordo com o doador de pólen, sendo 29,85 para tangelo Nova, 20,86 para laranja Valência, 16,51 para laranja Pera, 30,58 para tangor Murcott e 21,15 para tangerina Ponkan. As variedades de Clementina possuem alta taxa de partenocarpia e podem produzir frutos sem sementes, pois seu próprio pólen é incompatível, não promovendo a fertilização dos óvulos. No entanto, caso seus estigmas sejam polinizados por pólen oriundo de outras variedades compatíveis, seus frutos poderão apresentar sementes.

Os dados obtidos em outros estudos para o parâmetro “número de sementes por fruto” comparado com os resultados apresentados na Tabela 4, principalmente para o ano de 2013, reforçam que todos os genótipos testados foram compatíveis com Clementina Nules (Spiegel-Roy & Goldschmidt, 1996).

4.3 – AVALIAÇÃO FENOTÍPICA

As polinizações simples com o pólen de citrandarin mostraram menores frequências de plântulas trifoliadas do que monofoliadas (Tabela 5). A avaliação por microssatélites de uma parte das plântulas não trifoliadas obtidas desse cruzamento (186 híbridos) eleva a paternidade atribuída ao citrandarin de 35,2% obtida somente pela avaliação visual para 98,9%, somatório da avaliação visual mais avaliação por microssatélites (Tabela 9). Isso justifica a necessidade de avaliação por microssatélites das plântulas não trifoliadas originadas dos cruzamentos com mistura de pólen.

Para as polinizações simples com pólen de laranjas doces (controles), 100% dos híbridos obtidos apresentaram folhas monofoliadas.

Como os tratamentos (Pera + citrandarin) e citrandarin se repetiram em duas safras, foi aplicado o teste Qui-Quadrado, calculando-se as frequências fenotípicas esperadas através de tabelas de contingência (apêndices, Tabelas 10, 11, 13 e 14). Como, para os dois tratamentos $\chi^2 < \chi^2_{(0,05;1)}$, o fator ano não interferiu nas frequências fenotípicas ($p > 0,05$).

Tabela 5. Avaliação fenotípica de progênie oriunda de cruzamentos com polinizações mistas e simples

Ano 2011	Total	Trifoliados	Monofoliados	Miscelânea
Citrandrin ¹	532	168 (31,6%)	299 (56,2%)	65 (12,2%)
Pera + citrandarin ¹	424	84 (19,8%)	266 (62,7%)	74 (17,5%)
Pineapple + citrandarin ¹	627	134 (21,4%)	434 (69,2%)	59 (9,4%)

Ano 2013	Total	Trifoliados	Monofoliados	Miscelânea
Citrandrin ¹	186	56 (30,1%)	99 (53,2%)	31 (16,7%)
Pera + citrandarin ¹	1193	288 (24,1%)	776 (65%)	129 (10,8%)
Valência + citrandarin ¹	982	260 (26,5%)	603 (61,4%)	119 (12,1%)

Miscelânea = plantas que apresentaram folhas mono e bifoliadas;

(¹) = citrandarin acesso CCSM 1600;

4.4- AVALIAÇÃO POR MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES

A utilização de três marcadores microssatélites, selecionados entre os dez utilizados no estudo de Pons et al. (2011), permitiu a atribuição de paternidade para 91,1% dos híbridos oriundos de polinização mista Pera + citrandarin e 92,3% dos híbridos oriundos de polinização mista Pineapple + citrandarin (Tabela 7).

Para cada placa de 96 poços que foi submetida à análise no sequenciador, foram colocadas três amostras controle com produto da reação de PCR feita com DNA genômico de cada um dos três parentais envolvidos nas polinizações mistas (citrandarin, laranjas Pera ou Pineapple e Clementina Nules), sendo o restante das amostras na placa progênies dos cruzamentos com polinizações mistas ou simples.

O polimorfismo revelado pelos três marcadores microssatélites para os quatro parentais envolvidos nas polinizações são os resultados da análise do software “Genemapper”, à partir do qual pode-se inferir a paternidade de cada híbrido. As figuras 8, 9 e 10 representam as ampliações de fragmentos de DNA interpretadas pelo software, as quais correspondem aos alelos.

As Tabelas 15 e 16 (apêndices) encerram, respectivamente, os resultados de atribuição de paternidade para os híbridos obtidos dos cruzamentos com polinizações mistas Pera + citrandarin e Pineapple + citrandarin. Já as Tabelas 17 e 18 (apêndices) encerram, respectivamente, os resultados de atribuição de paternidade para os híbridos obtidos nos

cruzamentos com polinização simples com pólen de citrandarin e dos híbridos controle (híbridos oriundos de polinizações simples e mistas, selecionados os trifoliados para polinização simples com pólen de citrandarin, trifoliados para polinizações mistas e os monofoliados para polinizações simples com pólen de laranjas doces), que serviram de controle de polimorfismo. Com base na observação daqueles alelos presentes nas progênes que são exclusivos de um determinado parental masculino, foi possível inferir a paternidade dos híbridos obtidos nos tratamentos com polinizações mistas. A observação da combinação de pares de alelos das progênes onde só um dos parentais masculinos envolvidos poderia ter contribuído também serviu para inferir a paternidade.

Tabela 6. Número de plantas com fenótipo monofoliado e miscelânea, oriundas de polinizações simples (controles) e mistas (ano 2011), submetidas à avaliação por marcadores microssatélites.

Parental ¹	Monofoliados	Miscelânea ²	Total
Pera	5		5 ²
Valência	5		5 ²
Hamlin	5		5 ²
Pineapple	5		5
Citrandarin ³	158	28	186
Pera + citrandarin	256	70	326
Pineapple + citrandarin	418	51	469

¹ Pera, Valência, Hamlin e Pineapple são variedade de laranja doce; citrandarin (Acesso CCSM 1600) é um híbrido de *C. reshni* x *Poncirus trifoliata*.

² Miscelânea = plantas que apresentaram folhas mono e bifoliadas.

³ Por se tratar de tratamento controle, apenas um subconjunto de plantas originadas desse tratamento foi submetido à análise por microssatélites.

Por motivo de falha na extração do DNA genômico, nem todas as plantas avaliadas visualmente foram submetidas à avaliação por marcadores moleculares microssatélites

O alelo A1 e A4 revelados pelo marcador *CIR07C07* (Figura 8) e o alelo A1 revelado pelo marcador *mest107* (Figura 10) foram exclusivos de citrandarin e altamente determinantes para atribuição de paternidade à esse parental. O alelo A2, revelado pelo marcador *mest86* (Figura 9) foi determinante para a atribuição de paternidade das laranjas doces Pera e Pineapple.

Tabela 7. Resultados da atribuição de paternidade à progênie oriunda de polinizações mistas e simples (ano 2011), com fenótipo monofoliado e miscelânea, por meio de marcadores microssatélites.

Paternidade atribuída à ¹	Pólen		
	Pera + citrandarin	Pineapple + citrandarin	Citrandarin
Citrandarin	238 (73%)	280 (59,7%)	183 (98,4%)
Laranja doce	59 (18,1%)	153 (32,6%)	1 (0,53%)
Indeterminados	25 (7,7%)	26 (5,5%)	2 (1%)
Nd ²	4 (1%)	10 (2,1%)	--
Total atribuído	297 (91,1%)	433 (92,3%)	184 (98,9%)
Total	326	469	186

¹ Pera e Pineapple são variedade de laranja doce; citrandarin (acesso CCSM 1600) é um híbrido de *C. reshni* x *Poncirus trifoliata*.

Nd = amostras cujos resultados não foram úteis.

Tabela 8. Resultados da atribuição de paternidade à progênie oriunda de polinizações mistas e simples (ano 2011), com fenótipo miscelânea (plantas que apresentaram folhas mono e bifoliadas), por meio de marcadores microssatélites

Paternidade atribuída à ¹	Pólen		
	Pera + citrandarin ¹	Pineapple + citrandarin ¹	Citrandarin ¹
Citrandarin ¹	59 (84,3%)	40 (78,4%)	22 (78,6%)
Laranja doce	1 (1,4%)	1 (2%)	1 (3,6%)
Indeterminados	10 (14,3%)	10 (19,6%)	5 (17,9%)
Total	70	51	28

¹ Pera e Pineapple são variedade de laranja doce; citrandarin (Acesso CCSM 1600) é um híbrido de *C. reshni* x *Poncirus trifoliata*.

Os resultados da Tabela 8 mostram que grande parte dos híbridos classificados como miscelânea tem como parental o citrandarin.

Tabela 9. Integração dos resultados da avaliação fenotípica e avaliação por marcadores microsatélites para a progênie oriunda de polinizações simples e mistas (ano 2011).

Paternidade atribuída à ¹	Pera + citrandarin	Pineapple + citrandarin	Citrandarin
Citrandarin (avaliação fenotípica) = A	84 (20,5%)	134 (22,2%)	101 (35,2%)
Citrandarin (microsatélites) = B	238 (58%)	280 (46,4%)	183 (63,7%)
Citrandarin (A + B)	322(78,5%)	414 (68,6%)	284 (98,9%)
Laranja doce (microsatélites)	59 (14,4%)	153 (25,4%)	1 (0,3%)
Indeterminados ²	25 (6,1%)	26 (4,3%)	2 (0,7%)
Nd ³	4 (1%)	10 (1,7%)	--
Total	410	603	287

¹ Laranja doce das variedades Pera e Pineapple. Citrandarin (acesso CCSM 1600), híbrido de *C. reshni* x *Poncirus trifoliata*;

Indeterminados = progênie cujo parental não foi possível determinar com os marcadores microsatélites utilizados;

Nd. = não determinadas, amostras cujos resultados de microsatélites não foram úteis.

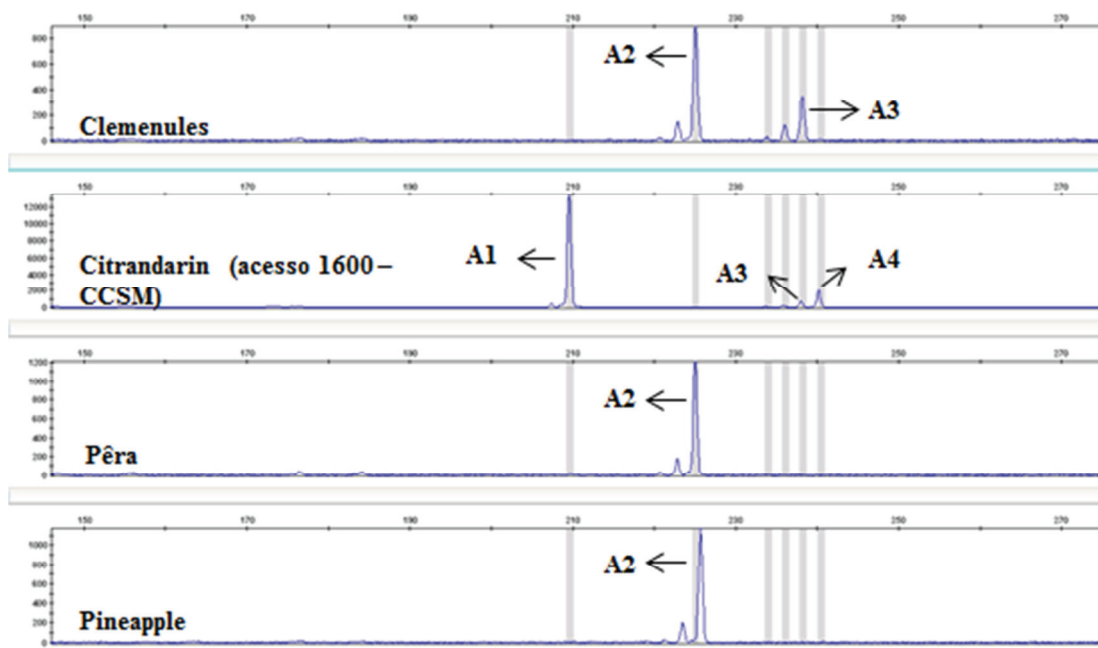


Figura 8. Alelos obtidos pelo marcador microsatélite *CIR07C07* para os quatro parentais estudados. A1 tem 212 pb, A2 tem 227 pb, A3 tem 237 pb e A4 tem 241 pb (Pons et al., 2011).

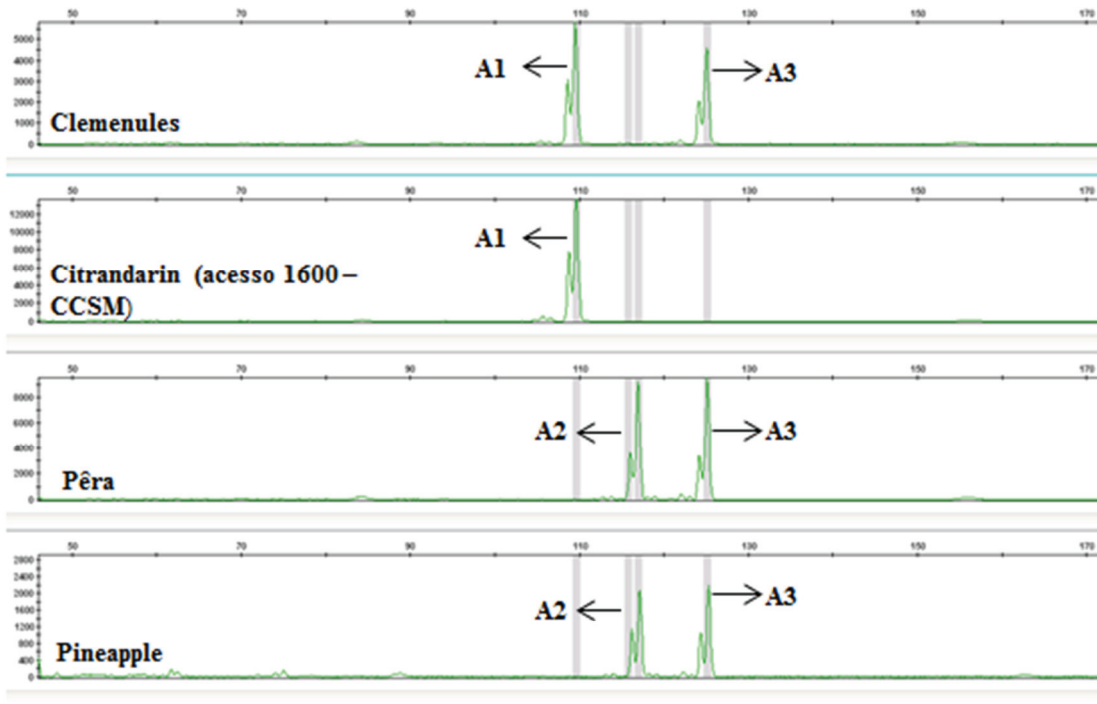


Figura 9. Alelos obtidos pelo marcador *mest86* para os quatro parentais estudados. A1 tem 112 pb, A2 tem 120pb e A3 tem 128 pb (Pons et al., 2011).

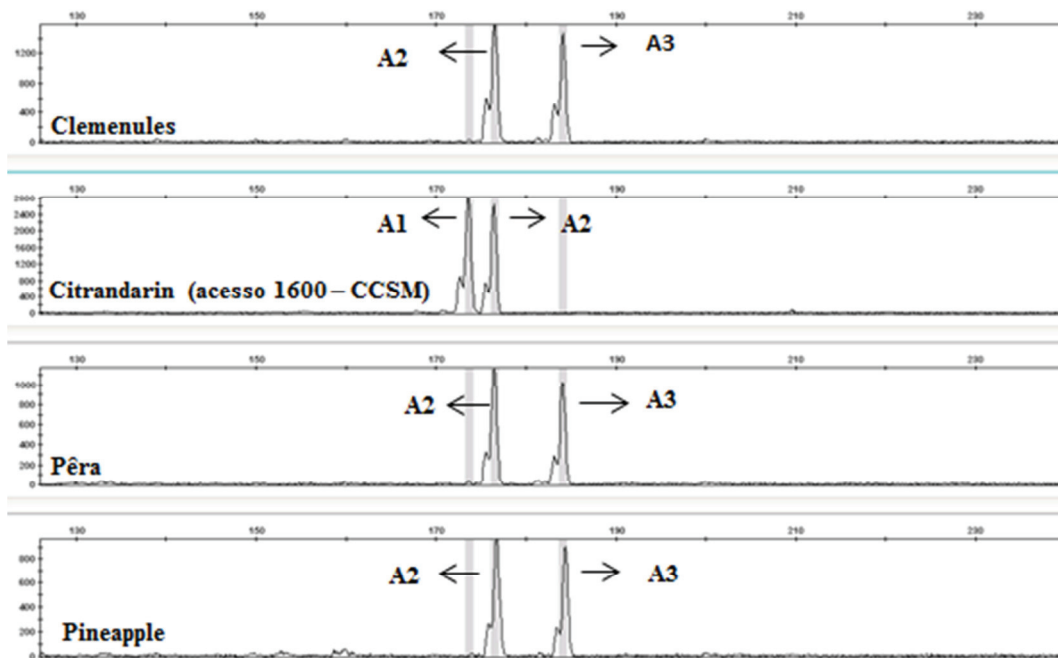


Figura 10. Alelos obtidos pelo marcador *mest107* para os quatro parentais estudados. A1 tem 173 pb, A2 tem 176 pb e A3 tem 184 pb (Pons et al., 2011).

Como os resultados da avaliação fenotípica de 2011 e 2013 são semelhantes, são esperados resultados semelhantes para a avaliação por marcadores moleculares SSR para a progênie oriunda de cruzamentos com cargas mistas de pólen do ano de 2013. Embora não viável de ser realizada no decorrer do prazo do mestrado, a avaliação por marcadores moleculares da polinização realizada em 2013 será efetuada da mesma maneira que a efetuada em 2011.

Cristofani et al. (2001) obtiveram do cruzamento entre laranja “Caipira” e laranja “Azeda”, 6 % de embriões zigóticos e do cruzamento entre laranja Caipira e limão Cravo 9,6 % de embriões zigóticos, avaliados por marcador SSR. Anderson et al. (1991), empregando marcadores isoenzimáticos determinaram que a frequência de plântulas zigóticas de citrandarin Swingle variou entre 5 a 10% em uma população oriunda de várias fontes de sementes de polinização aberta em um viveiro comercial na Flórida (USA). Schäfer et al. (2004) identificaram, com uso de marcador RAPD, 3,23% de embriões zigóticos em sementes de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. oriundas de polinização aberta.

Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram superioridade do pólen de citrandarin na formação de embriões zigóticos em Clementina Nules, sendo 68,6% e 78,5% da progênie com paternidade atribuída ao citrandarin quando em competição com pólen de Pineapple e Pêra respectivamente (Tabela 9). No trabalho de Pons et al. (2011) o pólen do híbrido tangerina Cleópatra X *Poncirus trifoliata* (L.) competindo com o pólen de laranja Pineapple transgênica produziu 95% de embriões zigóticos descendentes de citrandarin. Esse valor foi maior que os valores obtidos nesse trabalho. Embora se tratando de híbridos com os mesmos parentais, os genótipos são distintos, sendo assim e excluindo as variações ambientais, a heterozigotidade pode ter influenciado a maior fertilidade do pólen do citrandarin empregado no trabalho de Pons et al. (2011).

Machado et al. (2005) relatam que a temperatura tem efeito significativo na eficiência da polinização, tanto indiretamente na atividade no pomar (as abelhas são os principais polinizadores) ou indiretamente, afetando o crescimento do tubo polínico. Considerando as diferenças ambientais e genéticas existentes entre o estudo conduzido por Pons et al. (2011) na Espanha e esse estudo, conduzido no Estado de São Paulo, é importante, em estudos posteriores, avaliar a capacidade competitiva dos pólenes dos citrandarins (genótipo estudado por Pons et al. (2011) e o citrandarin acesso CCSM 1600), em competição com pólen de laranja doce, nas condições brasileiras, tendo em vista que o genótipo de citrandarin estudado por Pons et al. (2011) foi importado pelo Fundecitrus e está em fase de propagação.

Com base nos resultados obtidos, é promissora a estratégia de utilização desse genótipo como barreira de isolamento genético em áreas de liberação de laranja doce geneticamente modificada, conforme normativa da CTNBio (RN nº 10 – Anexo II).

5 CONCLUSÕES

- (1) O pólen do citrandarin acesso CCSM 1600 mostrou capacidade competitiva superior ao pólen das laranjas doces Pera e Pineapple, produzindo em frutos de Clementina Nules 78,5% e 68,6% de embriões zigóticos quando em competição com os pólenes de laranja Pera e Pineapple, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- Aleza, P., Juárez, J., Ollitrault, P., Navarro, L. 2010. Polyembryony in non-apomitic citrus genotypes. **Annals of Botany** 106: 533-545.
- Anderson, C.M., Castle, W.S., Moore, G.A. 1991. Isozymic identification of seedlings in Swingle citrumelo *Citrus Paradise X Poncirus trifoliata* nursery and field populations. **Journal of American Society of Horticultural Science** 116(2):322-326.
- Araújo, E.F., Roque, N. 2005. Taxonomia dos citros. In: de Mattos Junior, D., De Negri, J.P., Pio, R.M., Pompeu Junior, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag. cap. 6. p. 125-146.
- Azevedo, F.A., Borges, R. de S., Fávero, M.A.B., Giorgi Neto, R.O., Schinor, E.H., Bastinel, M. 2013. A polinização cruzada determina a formação de sementes em frutos de clementina Nules. **Pesquisa Agropecuária Tropical** 43(1):88-92.
- Borém, A., Miranda, G.V. (Ed.). 2009. **Melhoramento de Plantas**. 5. ed. Viçosa: UFV. 529 p.
- Bové, J.M., Ayres, A.J. 2007. Etiology of three recente diseases of citrus in São Paulo State: Sudden Death, Vairegated Chlorosis and Huanglongbing. **Life** 59(4-5):346-354.
- Brasil. Resolução Normativa nº 10 de 02 de outubro de 2013. Estabelece condições de isolamento para a liberação planejada no meio ambiente de laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) OSBEK) geneticamente modificada. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 03 de outubro de 2013. nº 192, seção 1.
- Caldas, E.D., de Souza, L.C.K. 2000. Avaliação do risco crônico da ingestão de pesticidas na dieta brasileira. **Revista Saúde Pública** 34(5):529-537.
- Cameron, J.W., Frost, H.B. 1968. Genetics, Breeding, and Nucellar Embryony. In: Reuther, W., Batchelor, L.D., Webber, H.J (Ed.). **The Citrus Industry**. Riverside: University of California. cap 5. p. 325- 370.
- Chacoff, N.P, Aizen, N.M.A. 2007. Pollinaiton requirements of pigmented grapefruit (*Citrus paradise* Macf.) form northwestern Argentina. **Crop Science** 47:1-8.
- Chandler, S., Dunwell, J.M. 2008. Gene flow, risk assessment and the environment release of transgenic plants. **Critical Review in Plant Sciences** 27:25-49.
- Coletta-Filho, H.D., Targon, M.L.P.N., Takita, M.A., De Negri, J.D., Pompeu Jr, J., Machado, M.A., do Amaral, A.M., Müller, G.W. 2004. First Report of the Causal Agent of Huanglongbing (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) in Brazil. Diseases Notes. **Plant Disease** 88(12):1382.
- Craft, K.J, Ashley, M.V. 2010. Pollen mediated gene flow in isolated and continuous stands of bur oak, *Quercus macrocarpa* (Fagaceae). **American Journal of Botany** 97(12):1999-2006.

- Cristofani, M., Novelli, V.M., De Oliveira, A.C., Otaviano, A.R., De Souza, A.A., Machado, M.A. 2001. Identificação de híbridos de cruzamentos interespecíficos em citros utilizando marcadores RAPD e SSR. **Laranja** 22:231-241.
- De Jong, T.J., Batenburg, J.C., Klinkhamer, P.G.L. 2005. Distance- dependent pollen limitation of seed set in some insect- pollinated dioecius plants. **Acta Oecologica**. 28:331-335.
- Distefano, G., Gentile, A., Herrero, M. 2011. Pollen pistil interactions and early fruiting in pathercocarpic citrus. **Annals of Botany**. 108:499-509.
- Domingues, E.T., Tulmann Neto, A., Teófilo Sobrinho, J. 1999. Viabilidade de pólen em variedades de laranja doce. **Scientia Agrícola** 56:265-272.
- Domingues, E.T., Tulmann Neto, A., Teófilo Sobrinho, J. 2000. Viabilidade de pólen em clones de laranja Pêra e outras variedades assemelhadas. **Ciência Rural** 30:85-89.
- Donadio, L.C., Mourão Filho, F.A.A., Moreira, C.S. 2005. Centros de origem, distribuição geográfica e história da citricultura no Brasil. In: de Mattos Junior, D., De Negri, J.P., Pio, R.M., Pompeu Junior, J. (Ed). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag. cap. 1. p. 1-18.
- Eastham, K., Sweet, J. 2002. Genetically modified organisms (GMOs): the significance of gene flow through pollen transfer. Copenhagen: European Environment Agency. 75 p. n. 28.
- Free, J. B. 1960. The behavior of honeybees visiting flowers of fruit trees. **Journal of Animal Ecology** 29(2):385-395.
- Froelicher, Y., Dambier, D., Bassene, J.B., Costantino, G., Lofty, S., Didout, C., Breaumont, V., Brottier, P., Risterucci, A.M., Luro, F., Ollitrault, P. 2008. Characterization of microsatellite markers in mandarin orange. **Molecular Ecology Resources** 8:119-122.
- Frost, H.B., Soost, R. 1968. Seed reproduction: development of gametes and embryos In: Reuther, W., Batchelor, L.D., Webber, H. J. (Ed.). **The Citrus Industry**. Riverside: University of California. cap 4. p. 290- 324. v. 2.
- Hall, D., Richardosn, M.L., Ammar, E.D., Halbert, S.E. 2012. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 146:207-223.
- Gmitter Júnior., F.G., Chen, C., Rao, M.N., Soneji, J.R. 2010. Citrus Fruits. In: Kole, C. (Ed.). **Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants: fruits and nuts**. Berlin: Springer. cap. 14. p. 265-275. vol. 4.
- Klips, R.A. 1999. Pollen competition as a reproductive isolating mechanism between two sympatric *Hibiscus* species (Malvaceae). **American Journal of Botany** 86 (2):269-272.
- Latado, R.R., Bueno Filho, J.S.S., Pompeu Junior, J., Tulmann Neto, A. 2004. Correlações entre viabilidade de pólen e características de fruto em mutantes de laranja Pêra. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 39:961-965.

- Levin, D.A., Kerster, H.W. 1969. The dependence of bee-mediated pollen and gene dispersal upon plant density. **Evolution** 23:560-571.
- Machado, M.A., Cristofani, M., Amaral, A.M., De Oliveira, A.C. 2005. Genética, melhoramento e biotecnologia dos citros. In: de Mattos Junior, D., De Negri, J.P., Pio, R.M., Pompeu Junior, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag. cap. 9. p. 223-264.
- Marshall, D.L., Folsom, M.W. 1991. Mate choice in plants: an anatomical to population perspective. **Annual Review Ecological Syste** 22:37-63.
- Messeguer, J. 2003. Gene flow assessment in transgenic plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 73:201-212.
- Miranda, M.P., Noronha Júnior., N.C., Marques, R.N. 2011. Alternativas para o manejo do vetor do greening no Brasil. In: Baldin, E.L.L., Fujihara, R.T., Firmino, A.C., Negrisoli, E., Souza, E.de S., Prado, E.P., Marubayashi, J.M. (Ed.). **Avanços em fitossanidade**. Botucatu: UNSEP/ FEPAF. 163 p.
- Moreira, S., Gurgel, J.T.A. 1941. A fertilidade do pólen e sua correlação com o número de sementes em formas e espécies do gênero *Citrus*. **Bragantia** 1:670-711
- Müller, G.W., Targon, M.L.P.N., Carvalho, A.S., de Souza, A.A., Rodrigues, J.C.V. 2005. Doenças de citros causadas por vírus e viróides. In: de Mattos Junior, D., De Negri, J.P., Pio, R.M., Pompeu Junior, J. (Eds) **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag. cap. 19. p. 569-596.
- Murray, M.G., Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research** 8:4321-5.
- Neves, M. F., Trombin, V.G., Milan, P., Lopes, F.F., Cressoni, F., Kalali, R. 2010. **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: Markestrat. 137p.
- Peña, L., Cervera, M., Ghorbel, R., Domínguez, A., Fagoaga, C., Juárez, J., Pina, J.A., Navarro, L. 2007. Genetic transformation. In: Khan, I.A. (Ed.). **Citrus: genetics, breeding and biotechnology**. Oxfordshire: CAB Interational. cap. 15. p. 329-344.
- Pio, L.A.S., Junqueira, K.P., Ramos, J.D., Rufini, J.C.M., Villa, F. 2004. Composição do meio de cultura para germinação de pólen de variedades de laranja doce. **Laranja** 25:87-97.
- Pimentel Gomes, F. 1987. **A estatística moderna na pesquisa agropecuária**. 3. ed. Piracicaba: POTAFOS. 162 p.
- Pio, L.A.S., Ramos, J.D., Pasqual, M., Junqueira, K.P., Santos, F.C., Rufini, J.C.M. 2007. Viabilidade do pólen de laranjas doce em diferentes condições de armazenamento. **Ciência Agrotécnica** 31:147-153.
- Pons, E., Navarro, A., Olitrault, P., Peña, L. 2011. Pollen competition as a reproductive isolation barrier represses transgene flow between compatible and coflowering citrus genotypes. **Public Library of Science** 6:1-13.

Powell, W., Machray, G.C., Provan, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequences repeats. **Trends in plant Science Reviews** 1(7):215-222.

Rahmé, J., Widmer, A., Karremberg, S. 2009. Pollen competition as a asymmetric reproductive barrier between two closely related *Silene* species. **Journal of Evolutionary Biology** 22:1937-1943.

Ruiz, C., Paz Breto, M., Asíns, M.J. 2000. A quick methodology to identify sexual seedlings in citrus breeding programs using SSR markers. **Euphytica** 112:89-94.

Salles, L.A., Ramos, J.D., Pasqual, M. Junqueira, K.P., da Silva, A.B. 2006. Sacarose e pH na germinação “*in vitro*” de grãos de pólen de citros. **Ciência Agrotécnica** 30:170-174.

Saunt, J. 2000. **Citrus varieties of the world**. Norwich: Sinclair International Limited. 156 p.
Schäfer, G., Bastianel, M., Dornelles, A.L.C. 2004. Identificação de plantas zigóticas de trifoliata com uso de marcadores moleculares RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 39: 167-172.

Soares Filho, W. dos S., Moreira, C. dos S., da Cunha, M.A.P., Sobrinho, A.P. da Cunha, Passos, O.S. 2000. Poliembrião e frequência de híbridos em *Citrus spp.* **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 35:857-864.

Soares Filho, W. dos S., Medrado, A.C. de M., da C., M.A.P., Sobrinho, A.P. da C., Passos, O.S. 2002. Frequência de híbridos em cruzamentos controlados de citros: cultivo de sementes *versus* cultivo *in vitro* de embriões. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 37:981-988.

Snow, A.A., Mallory-Smith, C., Ellstrand, N., Holt, J., Quemada, H. 2002. Ecological and agronomic consequences of gene flow from transgenic crops to wild relatives – Scientific Methods Workshop. Disponível em: <<http://www.osu.edu>>. Acesso em: 17 nov. 2014.

Snow, A.A. 1994. Postpollination selection and male fitness in plants. **The American Naturalist** 144:S69-S83. Suplemento.

Souza, D.T.M., Couto, R.H.N., Couto, L.A. 2003. Polinização em cultura de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) variedade Pêra- rio. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** 40(4):237-242.

Spiegel-Roy, P., Goldschmidt, E.E. 1996. **Biology of Horticultural Crops: biology of citrus**. Melbourne: Cambridge University Press. 230 p.

Stanford, M.T. 1992. Pollination of citrus by honey bees. Disponível em: <<http://www.edis.ifas.ufl.edu>>. Acesso em: 20 mai. 2013.

Wallace, H.M., King, B.J., Lee, L. S. 2002. Pollen flow and the effect on fruit size in a “Imperial” mandarin orchard. **Horticultural Science** 37(1):84-86.

Teixeira, D.C., Ayres, J., Kitajima, E.W., Tanaka, F.A.O., Danet, S., Jagoueix-Eveillard, S., Saillard, C., Bové, J.M. 2005. First Report of a Huanglongbing- Like Disease of Citrus in Sao Paulo State, Brasil and Association of a New Liberibacter Species, “*Candidatus Liberibacter americanus*”, with the Disease. Diseases Notes. **Plant Disease** 89(1):107.

Tiwari, S., Rajinger, S.M., Rogers, M.E., Stelinski, L. 2011. Insecticide resistance in field populations of Asian citrus psyllid in Florida. **Pest Management Science** 67(10):1258-1268.

APÊNDICES

Tabela 10. Tabela de contingência para o cálculo das frequências fenotípicas esperadas para a progênie oriunda de cruzamento com mistura de pólen, para o tratamento Pera + citrandarin.

Pêra + citrandarin ¹	Observados		Total
	Trifoliados + miscelânea ²	Monofoliados	
2011	158	266	424
2013	417	776	1193
Total	515	1042	1617

¹ Laranja doce Pera. Citrandarin (acesso CCSM 1600), híbrido de *C. reshni* x *Poncirus trifoliata*;

² Miscelânea = plantas que apresentaram folhas mono e bifoliadas.

Tabela 11. Frequências fenotípicas esperadas calculadas para a progênie oriunda de polinizações mistas, para o tratamento Pera + citrandarin.

Pêra + citrandarin ¹	Esperados	
	Trifoliados + miscelânea	Monofoliados
2011	150,77	273,23
2013	424,23	768,77

¹ Laranja doce Pera. Citrandarin (acesso CCSM 1600), híbrido de *C. reshni* x *Poncirus trifoliata*;

² Miscelânea = plantas que apresentaram folhas mono e bifoliadas.

$$X^2 = 0,72$$

$$X^2_{(0,05;1)} = 3,84$$

Como $X^2 < X^2_{(0,05;1)}$, o fator ano não interferiu nas proporções fenotípicas ($p > 0,05$).

Tabela 12. Valores observados e esperados (calculados) para fixação de frutos utilizados na aplicação do teste Qui-Quadrado nos anos de 2011 e 2013.

Tratamento ¹	Observado				Esperado				X ²
	2011		2013		2011		2013		
	sim	não	sim	não	sim	não	sim	não	
Pera	5,8	94,2	60	40	32,9	67,1	32,9	67,1	66,53
Valência	0,8	99,2	51,3	48,7	26,05	73,95	26,05	73,95	66,19
Hamlin	6,7	93,3	51	49	28,85	71,15	28,85	71,15	47,8
Pineapple	15	85	52	48	33,5	66,5	33,5	66,5	30,72
Citrandarin	38,3	61,7	56,9	43,1	47,6	52,4	47,6	52,4	6,94
Pera + citrandarin	16,8	83,2	51,7	48,3	34,25	65,75	34,25	65,75	27,04

¹ Laranja doce das variedades Pera, Valência, Hamlin e Pineapple. Citrandarin (acesso CCSM 1600), híbrido de *C. reshni* x *Poncirus trifoliata*;

X²_(0,01;1) = 6,64

Como X² > X²_(0,01;1), o fator ano interferiu na fixação de frutos para todos os tratamentos (p < 0,01).

Tabela 13. Tabela de contingência para cálculo das frequências fenotípicas esperadas para a progênie oriunda de cruzamento com polinização simples, com pólen de citrandarin (tratamento controle).

Citrandarin ¹	Observados		
	Trifoliados + miscelânea ²	Monofoliados	Total
2011	233	299	532
2013	87	99	186
Total	320	398	718

¹ Citrandarin (acesso CCSM 1600), híbrido de *C. reshni* x *Poncirus trifoliata*;

Miscelânea = plantas que apresentaram folhas mono e bifoliadas.

Tabela 14. Frequências fenotípicas esperadas calculadas para a progênie oriunda de polinizações simples, com pólen de citrandarin (tratamento controle).

Citrandarin ¹	Esperados	
	Trifoliados + miscelânea	Monofoliados
2011	237,10	249,90
2013	82,90	103,10

¹ Citrandarin (acesso CCSM 1600), híbrido de *C. reshni* x *Poncirus trifoliata*;

Miscelânea = plantas que apresentaram folhas mono e bifoliadas.

X² = 0,4945 < X²_(0,05;1).

X²_(0,05;1) = 3,84

Como X² < X²_(0,05;1), o fator ano não interferiu na frequência fenotípica (p > 0,05).

Tabela 15. Polimorfismo revelado pelos três marcadores microssatélites nas progênies de polinização mista (Laranja doce Pera + citrandarin - acesso CCSM 1600, híbrido de *C. reshni* x *Poncirus trifoliata*).

	CIR07C07				mest86			mest107			Paternidade
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A1	A2	A3	
Pera		X				X	X		X	X	(Parental)
Clemenules		X	X		X		X		X	X	(Parental)
Citrandarin	X		X	X	X			X	X		(Parental)
120	X		X		X		X	X		X	Citrandarin
121	X	X			X		X	X		X	Citrandarin
122	X		X		X		X	X		X	Citrandarin
123	X		X		X		X		X		Citrandarin
124	X	X			X		X		X		Citrandarin
125			X	X	X		X		X	X	Citrandarin
126	X		X		X			X	X		Citrandarin
127	X	X			X		X	X	X		Citrandarin
128	X	X			X		X	X		X	Citrandarin
130		X	X	X	X				X	X	Citrandarin
131	X		X		X			X	X		Citrandarin
132	X		X		X			X	X		Citrandarin
135	X				X				X		Citrandarin
136		X	X	X	X		X	X		X	Citrandarin
137	X		X		X		X	X		X	Citrandarin
138		X		X	X		X	X		X	Citrandarin
139		X		X	X		X		X		Citrandarin
140	X				X			X		X	Citrandarin
141	X	X			X		X		X	X	Citrandarin
142	X		X		X		X		X		Citrandarin
143			X		X				X	X	Citrandarin
144		X	X	X	X			X		X	Citrandarin
146		X				X	X		X	X	Pera
147		X	X		X		X		X		?
151		X			X	X			X		Pera
152		X			X	X			X		Pera
153		X			X	X			X	X	Pera
154		X			X		X		X	X	?
155		X					X		X	X	Pera
156		X			X	X			X		Pera
157		X			X		X		X	X	?
158		X	X			X	X		X	X	Pera
159		X	X		X	X			X		Pera
160		X	X						X		?
161		X			X	X			X	X	Pera

Tabela 15 (Continuação). Polimorfismo revelado pelos três marcadores microssatélites detectado nas progênes de polinização mista (Pera + citrandarin)

	CIR07C07				mest86			mest107			Paternidade
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A1	A2	A3	
Pera		X				X	X		X	X	(Parental)
Clemenules		X	X		X		X		X	X	(Parental)
Citrandarin	X		X	X	X			X	X		(Parental)
162		X	X		X		X		X		?
163	X	X			X		X	X	X		Citrandarin
164			X	X					X	X	Citrandarin
165		X					X		X		Pera
166		X	X	X	X			X		X	Citrandarin
167	X	X			X				X		Citrandarin
168		X	X	X	X				X		Citrandarin
169		X	X	X	X		X		X		Citrandarin
170			X	X	X		X	X	X		Citrandarin
171	X		X		X				X	X	Citrandarin
172			X	X	X		X		X	X	Citrandarin
173		X	X	X	X			X		X	Citrandarin
174		X					X		X		Pera
175	X		X		X		X		X	X	Citrandarin
176	X	X					X		X	X	Citrandarin
177			X				X		X		Pera
178	X		X		X		X	X		X	Citrandarin
179			X	X	X				X	X	Citrandarin
180	X	X			X			X		X	Citrandarin
181			X				X		X		Pera
182		X			X		X		X	X	?
183			X	X	X		X	X		X	Citrandarin
184		X					X		X		Pera
185		X			X		X		X		?
186	X	X			X			X	X		Citrandarin
187	X	X			X				X	X	Citrandarin
188		X	X	X	X			X	X		Citrandarin
190		X	X	X	X			X	X		Citrandarin
191	X		X		X				X		Citrandarin
192		X	X	X	X		X	X		X	Citrandarin
193	X	X			X		X	X		X	Citrandarin
194		X	X		X		X		X		?
195		X	X	X	X		X		X	X	Citrandarin
196			X				X		X		Pera
197		X			X		X		X		?
198		X					X		X	X	Pera
199		X	X		X		X		X		?

Tabela 15 (Continuação). Polimorfismo revelado pelos três marcadores microssatélites detectado nas progênes de polinização mista (Pera + citrandarin)

	CIR07C07				mest86			mest107			Paternidade
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A1	A2	A3	
Pera		X				X	X		X	X	(Parental)
Clemenules		X	X		X		X		X	X	(Parental)
Citrandarin	X		X	X	X			X	X		(Parental)
200	X	X			X		X	X		X	Citrandarin
201		X			X	X			X		Pera
202		X						X		X	Citrandarin
203			X	X					X		Citrandarin
204	X	X							X		Citrandarin
205			X	X	X			X		X	Citrandarin
206	X	X			X		X		X		Citrandarin
207			X				X		X	X	PERA
208		X	X	X	X		X		X	X	Citrandarin
209		X	X	X				X	X		Citrandarin
210	X		X		X				X	X	Citrandarin
211		X							X		?
212	X	X						X		X	Citrandarin
214	X		X		X		X		X		Citrandarin
215	X	X			X		X	X		X	Citrandarin
216	X	X			X		X	X	X		Citrandarin
217	X	X			X			X	X		Citrandarin
218			X				X	X		X	Citrandarin
219		X	X	X	X		X		X	X	Citrandarin
220	X		X		X		X	X		X	Citrandarin
221	X	X			X		X	X	X		Citrandarin
222		X			X		X	X		X	Citrandarin
223			X	X	X		X	X	X		Citrandarin
224	X	X			X		X	X		X	Citrandarin
225		X					X		X	X	Pera
226	X	X			X		X		X		Citrandarin
227			X				X		X	X	Pera
228	X		X		X		X	X		X	Citrandarin
229	X		X		X			X		X	Citrandarin
230		X			X		X		X		?
231		X					X		X		Pera
232	X		X		X				X		Citrandarin
233	X	X			X		X		X	X	Citrandarin
234		X			X		X		X	X	?
235	X	X			X			X	X		Citrandarin
236			X	X	X		X		X	X	Citrandarin
237	X	X			X			X		X	Citrandarin

Tabela 15 (Continuação). Polimorfismo revelado pelos três marcadores microssatélites detectado nas progênes de polinização mista (Pera + citrandarin)

	CIR07C07				mest86			mest107			Paternidade
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A1	A2	A3	
Pera		X				X	X		X	X	(Parental)
Clemenules		X	X		X		X		X	X	(Parental)
Citrandarin	X		X	X	X			X	X		(Parental)
238	X		X		X		X	X	X		Citrandarin
239	X	X			X		X	X		X	Citrandarin
240	X	X			X		X		X	X	Citrandarin
241	X		X		X		X		X		Citrandarin
242		X			X		X		X		?
243	X	X			X			X		X	Citrandarin
244		X					X		X	X	Pera
245		X	X	X	X		X	X		X	Citrandarin
246		X	X	X	X			X	X		Citrandarin
247		X			X		X		X		?
248		X	X			X	X		X		Pera
249		X			X	X			X		Pera
250			X				X		X	X	Pera
251		X	X			X	X		X		Pera
252		X	X	X	X		X		X	X	Citrandarin
253			X				X		X		Pera
254		X					X		X	X	Pera
255		X				X	X		X		Pera
256	X	X			X			X	X		Citrandarin
257		X							X		?
258		X	X	X	X				X	X	Citrandarin
259	X		X		X		X	X		X	Citrandarin
260	X	X			X			X		X	Citrandarin
261	X	X			X		X	X	X		Citrandarin
262	X		X		X			X	X		Citrandarin
263			X	X	X			X	X		Citrandarin
264		X	X	X	X				X	X	Citrandarin
265	X	X			X		X		X		Citrandarin
266	X		X		X				X		Citrandarin
267	X	X			X				X	X	Citrandarin
268	X		X		X		X		X	X	Citrandarin
269		X	X	X	X				X	X	Citrandarin
270		X			X		X		X		?
272			X			X	X		X		Pera
274	X	X			X		X		X		Citrandarin
275	X		X		X			X		X	Citrandarin
276		X					X		X		Pera

Tabela 15 (Continuação). Polimorfismo revelado pelos três marcadores microssatélites detectado nas progênes de polinização mista (Pera + citrandarin)

	CIR07C07				mest86			mest107			Paternidade
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A1	A2	A3	
Pera		X				X	X		X	X	(Parental)
Clemenules		X	X		X		X		X	X	(Parental)
Citrandarin	X		X	X	X			X	X		(Parental)
277	X	X			X		X	X	X		Citrandarin
278	X		X		X		X	X		X	Citrandarin
279	X		X		X		X	X	X		Citrandarin
280		X	X	X	X			X		X	Citrandarin
281		X			X	X			X		Pera
282			X			X	X		X		Pera
283	X	X			X		X		X		Citrandarin
284	X		X		X			X	X		Citrandarin
285		X							X		?
286	X	X			X		X	X	X		Citrandarin
287	X		X		X		X	X		X	Citrandarin
288	X		X	X	X		X	X	X		Citrandarin
289	X	X			X			X	X		Citrandarin
290	X	X			X				X		Citrandarin
291		X	X	X	X		X		X	X	Citrandarin
292	X	X			X		X		X	X	Citrandarin
293			X	X	X		X		X		Citrandarin
294			X	X	X		X	X		X	Citrandarin
295			X	X	X			X	X		Citrandarin
296			X	X	X		X	X	X		Citrandarin
297	X	X			X			X		X	Citrandarin
298	X	X			X		X	X	X		Citrandarin
299		X	X	X	X				X	X	Citrandarin
300			X	X	X			X	X		Citrandarin
301	X		X		X			X		X	Citrandarin
302	X		X		X		X	X		X	Citrandarin
303	X		X		X		X		X	X	Citrandarin
304			X	X	X				X	X	Citrandarin
305		X	X	X	X		X	X	X		Citrandarin
306		X	X				X		X	X	Pera
307	X		X		X				X	X	Citrandarin
308			X	X	X		X		X	X	Citrandarin
314		X		X	X		X	X		X	Citrandarin
315	X		X		X				X	X	Citrandarin
316			X	X	X		X		X		Citrandarin
317	X		X		X		X	X		X	Citrandarin

Tabela 15 (Continuação). Polimorfismo revelado pelos três marcadores microssatélites detectado nas progênes de polinização mista (Pera + citrandarin)

	CIR07C07				mest86			mest107			Paternidade
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A1	A2	A3	
Pera		X				X	X		X	X	(Parental)
Clemenules		X	X		X		X		X	X	(Parental)
Citrandarin	X		X	X	X			X	X		(Parental)
318	X		X		X		X		X		Citrandarin
319	X		X		X		X	X	X		Citrandarin
320	X		X		X		X	X	X		Citrandarin
321		X			X	X			X		Pera
322			X	X	X		X	X		X	Citrandarin
323		X	X	X	X			X	X		Citrandarin
324	X	X			X		X		X	X	Citrandarin
325		X					X		X		Pera
326		X	X	X	X		X	X		X	Citrandarin
327		X	X	X			X		X		Pera
328			X	X	X				X	X	Citrandarin
329	X	X			X			X		X	Citrandarin
330			X	X	X		X	X	X		Citrandarin
331			X	X	X				X	X	Citrandarin
332			X	X	X			X	X		Citrandarin
333	X		X		X		X	X	X		Citrandarin
334		X	X				X		X	X	Pera
335		X	X	X	X		X	X	X		Citrandarin
336		X			X		X		X	X	?
337		X				X	X		X	X	Pera
338	X		X		X		X		X		Citrandarin
340	X	X			X				X	X	Citrandarin
342			X	X	X		X	X	X		Citrandarin
343		X	X	X	X			X	X		Citrandarin
344			X	X	X		X	X	X		Citrandarin
345	X		X		X		X	X		X	Citrandarin
346			X	X	X		X	X		X	Citrandarin
347			X	X	X		X		X		Citrandarin
348		X	X	X	X		X	X	X		Citrandarin
349	X		X		X		X		X	X	Citrandarin
350			X	X	X		X	X	X		Citrandarin
351	X		X		X			X	X		Citrandarin
352		X	X		X		X		X	X	?
353		X	X			X	X		X		Pera
354					X		X		X		?
355		X				X	X		X		Pera
356		X				X	X		X		Pera

Tabela 15 (Continuação). Polimorfismo revelado pelos três marcadores microssatélites detectado nas progênes de polinização mista (Pera + citrandarin)

	CIR07C07				mest86			mest107			Paternidade
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A1	A2	A3	
Pera		X				X	X		X	X	(Parental)
Clemenules		X	X		X		X		X	X	(Parental)
Citrandarin	X		X	X	X			X	X		(Parental)
357		X	X		X	X			X	X	Pera
358			X		X	X			X		Pera
359	X	X			X		X		X		Citrandarin
360	X		X		X		X	X		X	Citrandarin
361	X	X			X			X		X	Citrandarin
362		X	X		X			X		X	Citrandarin
363			X	X	X				X		Citrandarin
364	X		X		X			X	X		Citrandarin
365		X	X	X	X		X	X	X		Citrandarin
366			X	X	X			X		X	Citrandarin
367	X		X		X			X	X		Citrandarin
368			X	X	X			X		X	Citrandarin
369			X	X	X		X		X	X	Citrandarin
370	X		X		X		X		X	X	Citrandarin
372	X	X			X				X	X	Citrandarin
373		X					X		X		Pera
374	X		X		X				X		Citrandarin
375	X	X			X				X	X	Citrandarin
376		X	X				X		X		Pera
377		X				X	X		X	X	Pera
378			X	X	X		X		X		Citrandarin
379		X	X	X	X		X		X		Citrandarin
380		X	X	X	X		X	X	X		Citrandarin
381			X	X	X				X	X	Citrandarin
382	X		X		X		X	X		X	Citrandarin
383	X		X		X		X	X		X	Citrandarin
384	X		X		X			X	X		Citrandarin
385		X					X		X		Pera
386			X	X	X		X		X	X	Citrandarin
387		X					X		X	X	Pera
388			X	X	X		X		X	X	Citrandarin
389	X	X			X			X		X	Citrandarin
390	X	X			X				X	X	Citrandarin
391			X	X	X		X		X	X	Citrandarin
392	X	X			X			X	X		Citrandarin
393	X		X		X		X		X		Citrandarin
394		X					X	X	X		Pera

Tabela 15 (Continuação). Polimorfismo revelado pelos três marcadores microssatélites detectado nas progênes de polinização mista (Pera + citrandarin)

	CIR07C07				mest86			mest107			Paternidade
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A1	A2	A3	
Pera		X				X	X		X	X	(Parental)
Clemenules		X	X		X		X		X	X	(Parental)
Citrandarin	X		X	X	X			X	X		(Parental)
395		X	X		X	X			X		Pera
396		X	X				X		X	X	Pera
397	X		X		X		X		X		Citrandarin
398	X		X		X		X		X		Citrandarin
400	X	X			X				X	X	Citrandarin
401		X	X	X	X		X	X		X	Citrandarin
402	X		X		X		X	X		X	Citrandarin
403	X	X			X				X		Citrandarin
404	X		X		X		X		X		Citrandarin
405		X	X		X		X		X		?
406			X	X	X		X	X		X	Citrandarin
407		X			X				X	X	Citrandarin
408	X		X		X				X	X	Citrandarin
409	X		X		X		X		X	X	Citrandarin
410			X	X	X		X	X		X	Citrandarin
411	X	X			X		X		X		Citrandarin
412			X			X	X		X		Pera
413			X	X	X		X	X	X		Citrandarin
414			X	X	X		X		X	X	Citrandarin
415		X	X	X	X		X		X	X	Citrandarin
416			X	X	X				X		Citrandarin
417	X	X			X				X	X	Citrandarin
418	X	X			X			X		X	Citrandarin
420			X	X	X				X	X	Citrandarin
421			X	X	X		X		X	X	Citrandarin
422	X		X		X		X	X		X	Citrandarin
423		X	X	X	X			X		X	Citrandarin
424			X	X	X				X	X	Citrandarin
425			X	X	X			X	X		Citrandarin
426	X			X	X				X	X	Citrandarin
427	X		X		X		X	X		X	Citrandarin
428	X		X		X			X		X	Citrandarin
429			X	X	X			X	X		Citrandarin
431			X	X	X			X		X	Citrandarin
432		X			X		X		X	X	?
433		X			X	X			X		Pera
434		X	X	X	X		X		X	X	Citrandarin

Tabela 15 (Continuação). Polimorfismo revelado pelos três marcadores microssatélites detectado nas progênes de polinização mista (Pera + citrandarin)

	CIR07C07				mest86			mest107			Paternidade
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A1	A2	A3	
Pera		X				X	X		X	X	(Parental)
Clemenules		X	X		X		X		X	X	(Parental)
Citrandarin	X		X	X	X			X	X		(Parental)
435		X			X	X			X	X	Pera
436	X	X			X		X		X	X	Citrandarin
437	X		X		X				X		Citrandarin
438		X	X	X	X		X		X	X	Citrandarin
439	X		X		X		X	X	X		Citrandarin
440		X	X		X		X		X		?
441			X	X	X		X		X		Citrandarin
442	X	X			X		X		X	X	Citrandarin
443			X	X	X		X		X		Citrandarin
444	X	X			X			X	X		Citrandarin
445		X				X	X		X	X	Pera
446			X	X	X		X	X	X		Citrandarin
447	X		X		X				X		Citrandarin
448			X	X	X		X		X	X	Citrandarin
449			X		X		X		X		?
450			X	X	X			X	X		Citrandarin
451		X	X	X	X			X		X	Citrandarin
452	X	X			X			X		X	Citrandarin
453	X	X			X			X	X		Citrandarin
454			X			X	X		X		Pera
455	X	X			X				X		Citrandarin
456		X			X				X		Citrandarin
457	X		X		X			X		X	Citrandarin
458			X	X	X		X	X		X	Citrandarin
459	X	X			X		X		X	X	Citrandarin
460		X					X		X		Pera
461			X	X	X		X		X	X	Citrandarin
462		X					X		X		Pera
463		X	X		X				X		Citrandarin

Tabela 16. Polimorfismo revelado pelos três marcadores microssatélites nas progênies de polinização mista (Laranja doce Pineapple + citrandarin - acesso CCSM 1600, híbrido de *C. reshni* x *Poncirus trifoliata*).

	CIR07C07				mest86			mest107			Paternidade
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A1	A2	A3	
Pineapple		X				X	X		X	X	(Parental)
Clemenules		X	X		X		X		X	X	(Parental)
Citrandarin	X		X	X	X			X	X		(Parental)
464		X	X	X	X			X	X		Citrandarin
465			X	X	X		X	X	X		Citrandarin
466	X	X			X		X	X	X		Citrandarin
467			X	X	X		X		X	X	Citrandarin
468		X	X	X	X			X	X		Citrandarin
469	X	X			X			X	X		Citrandarin
470	X	X			X		X		X		Citrandarin
471	X		X		X		X	X		X	Citrandarin
472	X		X		X				X		Citrandarin
473	X	X			X			X	X		Citrandarin
474		X			X	X			X	X	Pineapple
475	X	X			X		X		X		Citrandarin
476	X		X		X		X	X		X	Citrandarin
477		X			X	X			X	X	Pineapple
478	X		X		X				X		Citrandarin
479		X			X	X			X		Pineapple
480	X		X		X		X		X	X	Citrandarin
481	X		X		X		X	X	X		Citrandarin
482			X	X	X				X		Citrandarin
483		X	X			X	X		X	X	Pineapple
484			X	X	X		X	X	X		Citrandarin
485			X	X	X		X		X		Citrandarin
486		X				X	X		X		Pineapple
487		X	X	X	X				X	X	Citrandarin
488		X				X	X		X	X	Pineapple
489			X	X	X		X		X		Citrandarin
490		X			X	X			X	X	Pineapple
491	X		X		X				X		Citrandarin
492	X	X			X			X		X	Citrandarin
493		X	X	X	X		X	X	X		Citrandarin
494			X				X		X		Pineapple
495		X	X	X	X			X		X	Citrandarin
496		X	X	X	X		X		X	X	Citrandarin
497		X					X		X	X	Pineapple
498			X	X	X		X		X		Citrandarin
499		X	X	X	X				X		Citrandarin

Tabela 16 (continuação...). Polimorfismo revelado pelos três marcadores microsatélites detectados nas progênes de polinização mista (Pineapple + Citrandarin)

	CIR07C07				mest86			mest107			Paternidade
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A1	A2	A3	
Pineapple		X				X	X		X	X	(Parental)
Clemenules		X	X		X		X		X	X	(Parental)
Citrandarin	X		X	X	X			X	X		(Parental)
500	X	X			X		X		X	X	Citrandarin
501			X	X	X		X		X	X	Citrandarin
502	X		X		X		X	X		X	Citrandarin
503	X		X		X		X	X	X		Citrandarin
504			X	X	X		X	X	X		Citrandarin
505		X	X			X	X		X		Pineapple
506		X	X	X	X				X	X	Citrandarin
507			X	X	X				X	X	Citrandarin
508	X	X			X		X		X		Citrandarin
509		X	X	X	X			X		X	Citrandarin
510	X		X		X			X		X	Citrandarin
511		X	X	X	X		X	X	X		Citrandarin
512		X	X	X	X		X	X		X	Citrandarin
513			X			X	X		X		Pineapple
514		X			X	X			X	X	Pineapple
515		X				X	X		X	X	Pineapple
516		X				X			X	X	Pineapple
517	X		X		X			X		X	Citrandarin
518	X	X			X		X		X		Citrandarin
519	X	X			X		X	X		X	Citrandarin
520		X					X		X		Pineapple
521	X		X		X				X	X	Citrandarin
522		X	X	X	X			X		X	Citrandarin
523	X	X			X				X	X	Citrandarin
524		X	X			X	X		X		Pineapple
525	X	X			X		X		X	X	Citrandarin
526	X	X			X			X		X	Citrandarin
527		X	X			X	X		X		Pineapple
528		X	X		X		X		X		?
529	X	X			X		X		X	X	Citrandarin
530	X				X				X	X	Citrandarin
532	X	X	X		X		X		X	X	Citrandarin
533			X	X	X		X		X	X	Citrandarin
534	X		X		X		X	X	X		Citrandarin
535	X	X			X			X	X		Citrandarin

Tabela 16 (continuação...). Polimorfismo revelado pelos três marcadores microssatélites detectados nas progênes de polinização mista (Pineapple + Citrandarin)

	CIR07C07				mest86			mest107			Paternidade
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A1	A2	A3	
Pineapple		X				X	X		X	X	(Parental)
Clemenules		X	X		X		X		X	X	(Parental)
Citrandarin	X		X	X	X			X	X		(Parental)
536		X	X	X	X		X	X	X		Citrandarin
537	X	X			X		X	X	X		Citrandarin
538	X		X		X		X	X	X		Citrandarin
540		X	X	X	X		X		X		Citrandarin
541		X	X	X	X		X	X	X		Citrandarin
542		X	X		X	X			X		Pineapple
543		X				X	X		X		Pineapple
544		X	X			X	X		X		Pineapple
545		X					X		X	X	Pineapple
546		X			X	X				X	Pineapple
547		X				X	X		X	X	Pineapple
548						X	X		X	X	Pineapple
549	X		X		X			X	X		Citrandarin
551		X	X	X	X			X		X	Citrandarin
552		X	X	X	X		X		X		Citrandarin
553			X	X	X		X		X	X	Citrandarin
554			X				X		X	X	Pineapple
555							X		X	X	Pineapple
556	X	X			X		X	X	X		Citrandarin
557	X	X			X				X		Citrandarin
558	X		X		X		X	X	X		Citrandarin
559		X	X		X		X		X	X	?
560	X	X			X				X	X	Citrandarin
561		X	X	X	X			X		X	Citrandarin
562		X			X		X		X		?
563		X				X	X		X	X	Pineapple
564			X	X	X				X		Citrandarin
565			X	X	X		X		X		Citrandarin
566			X	X	X				X		Citrandarin
567		X					X		X	X	Pineapple
568		X				X	X		X	X	Pineapple
569		X				X	X		X		Pineapple
570		X					X		X		Pineapple
571	X		X		X		X	X	X		Citrandarin

Tabela 16 (continuação...). Polimorfismo revelado pelos três marcadores microsatélites detectados nas progênies de polinização mista (Pineapple + Citrandarin)

	CIR07C07				mest86			mest107			Paternidade
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A1	A2	A3	
Pineapple		X				X	X		X	X	(Parental)
Clemenules		X	X		X		X		X	X	(Parental)
Citrandarin	X		X	X	X			X	X		(Parental)
572	X		X		X		X		X		Citrandarin
573	X	X			X			X	X		Citrandarin
574	X		X		X		X		X	X	Citrandarin
575		X			X	X			X	X	Pineapple
577		X	X			X	X		X		Pineapple
578	X	X			X		X		X	X	Citrandarin
579					X	X				X	Pineapple
581		X			X	X			X	X	Pineapple
582		X				X	X		X		Pineapple
583		X	X		X		X		X	X	?
584		X	X			X	X		X		Pineapple
585			X		X	X			X	X	Pineapple
586		X	X			X	X			X	Pineapple
587		X	X				X		X	X	Pineapple
588			X	X	X			X		X	Citrandarin
589		X				X	X		X	X	Pineapple
590		X				X	X		X	X	Pineapple
591		X			X		X		X	X	?
592			X	X	X		X	X	X		Citrandarin
593	X		X		X			X		X	Citrandarin
594		X				X	X		X		Pineapple
595			X		X	X			X	X	Pineapple
596					X				X	X	Citrandarin
597	X		X		X		X	X		X	Citrandarin
598	X	X			X				X		Citrandarin
599		X	X	X	X		X		X		Citrandarin
600			X	X	X		X	X	X		Citrandarin
601			X	X	X		X		X	X	Citrandarin
601			X	X	X		X		X	X	?
602	X		X		X			X		X	Citrandarin
603		X				X	X		X		Pineapple
605			X		X		X		X	X	?
606			X	X	X		X		X	X	Citrandarin
607		X	X	X	X			X	X		Citrandarin
608		X	X		X		X		X		?

Tabela 16 (continuação...). Polimorfismo revelado pelos três marcadores microssatélites detectados nas progênies de polinização mista (Pineapple + Citrandarin)

	CIR07C07				mest86			mest107			Paternidade
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A1	A2	A3	
Pineapple		X				X	X		X	X	(Parental)
Clemenules		X	X		X		X		X	X	(Parental)
Citrandarin	X		X	X	X			X	X		(Parental)
609		X	X	X	X			X	X		Citrandarin
610	X		X		X		X		X	X	Citrandarin
611	X		X		X				X	X	Citrandarin
612		X	X			X	X		X		Pineapple
613		X	X			X	X		X		Pineapple
614	X		X		X			X	X		Citrandarin
615			X	X	X				X	X	Citrandarin
616	X	X			X				X	X	Citrandarin
617		X	X		X	X			X	X	Pineapple
618			X	X	X		X	X		X	Citrandarin
619					X	X			X		Pineapple
620		X	X	X	X		X	X		X	Citrandarin
621			X	X	X		X	X		X	Citrandarin
622		X			X		X		X	X	?
623		X	X		X	X			X		Pineapple
624		X			X	X			X		Pineapple
625		X	X	X	X			X	X		Citrandarin
626		X			X		X		X		?
627		X				X	X		X	X	Pineapple
628	X	X			X		X		X	X	Citrandarin
629	X	X			X		X		X	X	Citrandarin
630		X			X	X			X	X	Pineapple
631					X		X	X		X	Citrandarin
632	X	X			X			X		X	Citrandarin
633		X			X	X			X		Pineapple
634		X				X	X		X	X	Pineapple
635		X			X		X		X	X	?
636			X	X	X			X		X	Citrandarin
638	X		X		X		X	X	X		Citrandarin
639		X				X	X		X	X	Pineapple
640		X					X		X		Pineapple
641			X	X	X				X	X	Citrandarin
642	X		X						X	X	Citrandarin
643		X	X			X	X		X	X	Pineapple
644			X			X	X		X	X	Pineapple

Tabela 16 (continuação...). Polimorfismo revelado pelos três marcadores microssatélites detectados nas progênes de polinização mista (Pineapple + Citrandarin)

	CIR07C07				mest86			mest107			Paternidade
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A1	A2	A3	
Pineapple		X				X	X		X	X	(Parental)
Clemenules		X	X		X		X		X	X	(Parental)
Citrandarin	X		X	X	X			X	X		(Parental)
645		X				X	X		X	X	Pineapple
646		X				X	X		X		Pineapple
647	X	X			X			X	X		Citrandarin
648		X	X			X	X		X		Pineapple
649		X	X			X	X			X	Pineapple
650		X			X				X	X	Citrandarin
651			X			X	X		X		Pineapple
652	X				X			X		X	Citrandarin
653	X		X		X				X		Citrandarin
654			X	X	X		X		X	X	Citrandarin
655	X	X			X				X	X	Citrandarin
656		X				X	X		X	X	Pineapple
657		X	X			X	X		X		Pineapple
658			X			X	X		X		Pineapple
659	X	X			X				X	X	Citrandarin
660	X	X			X				X		Citrandarin
661	X	X			X				X		Citrandarin
662		X	X	X	X				X		Citrandarin
663	X	X			X				X	X	Citrandarin
664	X		X		X		X		X		Citrandarin
665		X			X		X		X	X	?
666		X	X			X	X		X	X	Pineapple
667		X	X		X		X		X		?
668			X	X	X			X		X	Citrandarin
669		X	X			X	X		X		Pineapple
670			X		X	X			X		Pineapple
671	X	X			X		X		X	X	Citrandarin
672		X	X		X			X		X	Citrandarin
673		X	X		X		X	X	X		Citrandarin
674	X	X			X		X	X		X	Citrandarin
676	X		X		X			X		X	Citrandarin
677			X	X	X		X	X	X		Citrandarin
678			X	X	X			X		X	Citrandarin
679			X	X	X		X	X	X		Citrandarin
680		X			X	X			X	X	Pineapple

Tabela 16 (continuação...). Polimorfismo revelado pelos três marcadores microsatélites detectados nas progênes de polinização mista (Pineapple + Citrandarin)

	CIR07C07				mest86			mest107			Paternidade
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A1	A2	A3	
Pineapple		X				X	X		X	X	(Parental)
Clemenules		X	X		X		X		X	X	(Parental)
Citrandarin	X		X	X	X			X	X		(Parental)
716	X		X		X		X		X		Citrandarin
717	X		X		X		X	X		X	Citrandarin
719		X				X	X		X		Pineapple
720			X	X	X		X		X		Citrandarin
721	X	X			X		X		X		Citrandarin
722			X	X	X		X		X	X	Citrandarin
723		X	X				X		X	X	Pineapple
724		X				X	X		X		Pineapple
725		X	X				X		X		Pineapple
727		X	X				X		X		Pineapple
728					X						Citrandarin
729	X			X	X		X	X		X	Citrandarin
730	X			X	X				X	X	Citrandarin
731	X		X		X			X		X	Citrandarin
732		X	X			X	X		X		Pineapple
734	X		X		X		X	X	X		Citrandarin
735					X	X			X		Pineapple
736	X	X			X				X		Citrandarin
737		X			X	X			X	X	Pineapple
738	X	X			X			X		X	Citrandarin
739			X			X	X		X	X	Pineapple
740		X				X	X			X	Pineapple
741	X		X		X				X		Citrandarin
742	X		X		X				X		Citrandarin
743			X		X	X			X	X	Pineapple
745		X			X		X		X		?
746	X		X		X		X		X		Citrandarin
747	X		X		X		X		X		Citrandarin
748	X		X		X		X		X	X	Citrandarin
749		X		X	X		X	X		X	Citrandarin
750		X	X		X	X			X		Pineapple
751		X				X	X		X	X	Pineapple
752				X		X	X		X		Pineapple
753	X	X			X				X		Citrandarin
754		X					X		X		Pineapple
755	X	X			X		X		X		Citrandarin

Tabela 16 (continuação...). Polimorfismo revelado pelos três marcadores microssatélites detectados nas progênes de polinização mista (Pineapple + Citrandarin)

	CIR07C07				mest86			mest107			Paternidade
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A1	A2	A3	
Pineapple		X				X	X		X	X	(Parental)
Clemenules		X	X		X		X		X	X	(Parental)
Citrandarin	X		X	X	X			X	X		(Parental)
756	X	X			X				X		Citrandarin
757		X	X		X	X			X		Pineapple
758		X	X	X	X		X		X	X	Citrandarin
759	X	X			X				X	X	Citrandarin
760			X				X		X		Pineapple
761	X	X			X			X	X		Citrandarin
762						X	X		X	X	Pineapple
763	X	X			X			X		X	Citrandarin
764	X	X			X		X	X	X		Citrandarin
765					X		X		X	X	?
766	X		X		X			X		X	Citrandarin
767		X	X			X	X		X		Pineapple
768	X	X			X			X		X	Citrandarin
769	X		X		X		X		X		Citrandarin
770	X	X			X		X	X		X	Citrandarin
771	X		X		X		X	X		X	Pineapple
772	X		X		X		X		X	X	Citrandarin
773		X	X	X	X		X	X		X	Citrandarin
774		X					X		X		Pineapple
775	X		X		X				X		Citrandarin
776			X	X	X				X		Citrandarin
777			X	X	X				X		Citrandarin
778		X			X	X			X		Pineapple
779			X	X	X			X		X	Citrandarin
780		X			X	X			X	X	Pineapple
781	X	X			X			X		X	Citrandarin
782			X				X		X	X	Pineapple
783			X	X	X				X	X	Citrandarin
784		X				X	X		X	X	Pineapple
785		X	X		X				X	X	Citrandarin
786		X	X	X	X		X	X		X	Citrandarin
787			X			X	X		X	X	Pineapple
788		X	X	X	X		X	X	X		Citrandarin
789		X	X	X	X		X		X	X	Citrandarin
790	X	X			X				X		Citrandarin

Tabela 16 (continuação...). Polimorfismo revelado pelos três marcadores microssatélites detectados nas progênies de polinização mista (Pineapple + Citrandarin)

	CIR07C07				mest86			mest107			Paternidade
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A1	A2	A3	
Pineapple		X				X	X		X	X	(Parental)
Clemenules		X	X		X		X		X	X	(Parental)
Citrandarin	X		X	X	X			X	X		(Parental)
791		X	X			X	X		X		Pineapple
792	X	X			X		X	X		X	Citrandarin
793	X	X			X		X		X	X	Citrandarin
794		X	X	X	X		X	X		X	Citrandarin
795			X	X	X			X		X	Citrandarin
796		X	X		X		X		X	X	?
797		X				X	X		X		Pineapple
798					X	X			X	X	Pineapple
800		X				X	X		X		Pineapple
801		X				X	X		X		Pineapple
802			X	X	X		X	X		X	Citrandarin
803			X	X	X		X		X	X	Citrandarin
804		X			X	X			X	X	Pineapple
805			X	X	X				X		Citrandarin
806			X	X	X		X		X		Citrandarin
807	X		X		X		X		X	X	Citrandarin
808		X	X		X				X	X	Citrandarin
809	X	X			X		X		X		Citrandarin
810	X	X			X				X		Citrandarin
812	X		X		X		X	X	X		Citrandarin
813		X	X		X				X		Citrandarin
814	X		X		X			X	X		Citrandarin
815		X	X		X	X			X	X	Pineapple
816	X	X			X				X		Citrandarin
817			X	X	X				X		Citrandarin
818		X	X			X	X		X	X	Pineapple
819		X	X		X				X		Citrandarin
820	X	X			X				X		Citrandarin
821		X	X				X		X		Pineapple
822		X	X		X				X	X	Citrandarin
823		X	X		X		X		X	X	?
824		X				X	X		X	X	Pineapple
825		X				X	X		X	X	Pineapple
826			X	X	X		X		X		Citrandarin
827		X	X		X				X	X	Citrandarin
828		X				X	X		X		Pineapple

Tabela 16 (continuação...). Polimorfismo revelado pelos três marcadores microsatélites detectados nas progênes de polinização mista (Pineapple + Citrandarin)

	CIR07C07				mest86			mest107			Paternidade
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A1	A2	A3	
Pineapple		X				X	X		X	X	(Parental)
Clemenules		X	X		X		X		X	X	(Parental)
Citrandarin	X		X	X	X			X	X		(Parental)
829		X				X	X		X	X	Pineapple
830			X		X		X		X		?
831	X	X			X		X		X	X	Citrandarin
832	X	X			X			X		X	Citrandarin
833		X					X		X	X	Pineapple
834		X	X	X	X		X	X	X		Citrandarin
835	X		X		X			X		X	Citrandarin
836			X	X	X		X	X	X		Citrandarin
837	X	X			X				X	X	Citrandarin
838	X		X		X		X	X		X	Citrandarin
839	X	X			X				X	X	Citrandarin
840			X	X	X		X	X	X		Citrandarin
841					X		X	X		X	Citrandarin
842	X	X			X			X		X	Citrandarin
843			X	X	X		X		X		Citrandarin
844		X			X	X			X		Pineapple
845	X	X			X		X	X		X	Citrandarin
846	X	X			X			X		X	Citrandarin
847		X	X		X		X	X	X		Citrandarin
848		X	X			X	X		X		Pineapple
849	X		X		X		X	X		X	Citrandarin
850		X			X		X	X	X		Citrandarin
851	X		X		X			X		X	Citrandarin
852		X	X		X		X		X	X	?
853		X	X		X		X	X	X		Citrandarin
854	X	X			X				X		Citrandarin
855	X		X		X		X		X	X	Citrandarin
856	X	X			X		X		X		Citrandarin
857	X		X		X		X		X		Citrandarin
858	X	X			X			X		X	Citrandarin
859	X	X			X		X	X	X		Citrandarin
860	X	X			X			X		X	Citrandarin
861			X	X	X		X		X	X	Citrandarin
862	X	X			X				X	X	Citrandarin
863			X		X	X			X	X	Pineapple
864		X				X	X		X		Pineapple

Tabela 16 (continuação...). Polimorfismo revelado pelos três marcadores microsatélites detectados nas progênies de polinização mista (Pineapple + Citrandarin)

	CIR07C07				mest86			mest107			Paternidade
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A1	A2	A3	
Pineapple		X				X	X		X	X	(Parental)
Clemenules		X	X		X		X		X	X	(Parental)
Citrandarin	X		X	X	X			X	X		(Parental)
865	X		X		X		X	X		X	Citrandarin
866	X		X		X		X		X		Citrandarin
867	X		X		X			X		X	Citrandarin
868	X	X			X		X		X		Citrandarin
869	X	X			X				X		Citrandarin
870			X		X	X			X	X	Pineapple
871		X	X		X				X	X	Citrandarin
872	X	X			X			X		X	Citrandarin
873		X				X	X		X		Pineapple
876	X	X			X			X	X		Citrandarin
877			X	X	X			X	X		Citrandarin
878		X	X		X			X		X	Citrandarin
879			X		X		X		X		?
880	X	X			X		X	X		X	Citrandarin
881			X				X		X	X	Pineapple
882		X				X	X		X	X	Pineapple
883	X		X		X		X		X	X	Citrandarin
884	X		X		X			X		X	Citrandarin
885					X		X	X		X	Citrandarin
886			X	X	X				X	X	Citrandarin
887		X	X			X	X		X	X	Pineapple
888		X				X	X		X	X	Pineapple
889		X				X	X		X	X	Pineapple
890		X			X	X			X		Pineapple
891		X			X	X			X		Pineapple
892		X	X		X				X	X	Citrandarin
893	X		X		X			X		X	Citrandarin
894		X	X		X				X	X	Citrandarin
895		X	X		X	X			X		Pineapple
896			X		X	X			X	X	Pineapple
897		X				X	X		X		Pineapple
898		X					X		X		Pineapple
899		X				X	X		X		Pineapple
900			X	X	X			X		X	Citrandarin
901		X			X	X			X	X	Pineapple

Tabela 16 (continuação...). Polimorfismo revelado pelos três marcadores microsatélites detectados nas progênes de polinização mista (Pineapple + Citrandarin)

	CIR07C07				mest86			mest107			Paternidade
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A1	A2	A3	
Pineapple		X				X	X		X	X	(Parental)
Clemenules		X	X		X		X		X	X	(Parental)
Citrandarin	X		X	X	X			X	X		(Parental)
902		X	X		X	X			X	X	(Parental)
903		X	X		X	X			X		Pineapple
905		X	X		X	X			X		Pineapple
906			X	X	X		X		X	X	Citrandarin
907	X		X		X			X		X	Citrandarin
908		X				X	X		X	X	Pineapple
909			X		X	X			X		Pineapple
910	X		X		X				X	X	Citrandarin
911			X	X	X				X	X	Citrandarin
912	X		X		X			X	X		Citrandarin
913	X		X		X		X		X	X	Citrandarin
914		X	X		X				X	X	Citrandarin
915		X	X		X				X		Citrandarin
916	X	X			X		X		X	X	Citrandarin
917		X			X	X			X		Pineapple
918		X			X	X			X		Pineapple
919		X	X		X			X	X		Citrandarin
920			X	X	X		X	X	X		Citrandarin
921	X		X		X		X	X		X	Citrandarin
923		X	X	X	X			X	X		Citrandarin
924	X		X		X				X		Citrandarin
925	X	X			X			X	X		Citrandarin
926	X		X		X				X		Citrandarin
927		X	X	X	X		X	X		X	Citrandarin
928		X	X	X	X		X		X		Citrandarin
929		X			X		X		X		?
930		X	X	X	X		X		X		Citrandarin
931		X			X	X			X		Pineapple
932		X	X	X	X	X			X	X	Pineapple
935			X	X	X		X	X		X	Citrandarin
936			X		X	X			X	X	Pineapple
937		X				X	X	X	X		Citrandarin
938	X	X			X				X	X	Citrandarin
943		X				X	X		X	X	Pineapple
949	X		X		X			X		X	Citrandarin

Tabela 16 (continuação...). Polimorfismo revelado pelos três marcadores microssatélites detectados nas progênes de polinização mista (Pineapple + Citrandarin)

	CIR07C07				mest86			mest107			Paternidade
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A1	A2	A3	
Pineapple		X				X	X		X	X	(Parental)
Clemenules		X	X		X		X		X	X	(Parental)
Citrandarin	X		X	X	X			X	X		(Parental)
950		X			X	X			X	X	Pineapple
953		X							X		?
954		X			X	X			X	X	Pineapple

Tabela 17. Polimorfismo revelado pelos três marcadores microssatélites nas progênes de polinização simples com pólen de citrandarin (tratamento controle).

	CIR07C07				mest86			mest107			Paternidade
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A1	A2	A3	
Laranja doce		X				X	X		X	X	(Parental)
Clemenules		X	X		X		X		X	X	(Parental)
Citrandarin	X		X	X	X			X	X		(Parental)
958	X		X		X			X	X		Citrandarin
959	X	X			X		X	X	X		Citrandarin
960		X	X		X			X		X	Citrandarin
961	X		X		X		X	X	X		Citrandarin
962		X	X		X			X	X		Citrandarin
963		X			X	X			X		Laranja doce
964		X	X		X			X		X	Citrandarin
965			X	X	X			X	X		Citrandarin
966		X	X		X			X	X		Citrandarin
967	X	X			X			X		X	Citrandarin
969	X	X			X				X		Citrandarin
970			X	X	X				X	X	Citrandarin
971		X	X		X		X	X		X	Citrandarin
972			X	X	X				X		Citrandarin
973	X	X			X		X	X		X	Citrandarin
974			X	X	X			X		X	Citrandarin
975	X	X			X			X		X	Citrandarin
976	X	X			X				X		Citrandarin
977	X		X		X		X		X		Citrandarin
978			X	X	X		X	X		X	Citrandarin
979	X	X			X				X	X	Citrandarin

Tabela 17 (Continuação...). Polimorfismo revelado pelos três marcadores microssatélites detectados nas progênes de polinização simples com pólen de citrandarin (tratamento controle).

	CIR07C07				mest86			mest107			Paternidade
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A1	A2	A3	
Laranja doce		X				X	X		X	X	(Parental)
Clemenules		X	X		X		X		X	X	(Parental)
Citrandarin	X		X	X	X			X	X		(Parental)
980		X	X	X	X				X		Citrandarin
981	X		X		X		X	X		X	Citrandarin
983		X	X		X		X		X		?
984	X	X			X		X	X	X		Citrandarin
985		X	X	X	X			X	X		Citrandarin
986	X	X			X				X		Citrandarin
987	X		X		X			X	X		Citrandarin
988			X	X	X				X	X	Citrandarin
989	X	X			X			X		X	Citrandarin
990		X	X	X	X			X	X		Citrandarin
991	X	X			X				X	X	Citrandarin
992	X		X		X			X	X		Citrandarin
993	X	X			X			X	X		Citrandarin
994	X	X			X		X		X		Citrandarin
995			X	X	X		X	X	X		Citrandarin
996		X	X	X	X				X	X	Citrandarin
997		X	X	X	X			X	X		Citrandarin
998	X		X		X				X	X	Citrandarin
999			X	X	X				X		Citrandarin
1000		X			X		X	X		X	Citrandarin
1001	X	X			X			X	X		Citrandarin
1002			X	X	X		X	X		X	Citrandarin
1003	X	X			X			X	X		Citrandarin
1004	X		X		X				X		Citrandarin
1005	X	X			X				X		Citrandarin
1006	X	X			X				X	X	Citrandarin
1007		X	X	X	X		X		X	X	Citrandarin
1008			X	X	X				X		Citrandarin
1009			X	X	X			X	X		Citrandarin
1010	X	X			X		X		X		Citrandarin
1011	X	X			X		X		X		Citrandarin
1012		X	X	X	X		X	X		X	Citrandarin
1013		X	X	X	X		X	X	X		Citrandarin
1014		X	X	X	X			X		X	Citrandarin

Tabela 17 (Continuação...). Polimorfismo revelado pelos três marcadores microsatélites detectados nas progênes de polinização simples com pólen de citrandarin (tratamento controle).

	CIR07C07				mest86			mest107			Paternidade
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A1	A2	A3	
Laranja doce		X				X	X		X	X	(Parental)
Clemenules		X	X		X		X		X	X	(Parental)
Citrandarin	X		X	X	X			X	X		(Parental)
1018	X	X			X				X		Citrandarin
1019	X		X		X		X		X	X	Citrandarin
1020			X	X	X		X	X	X		Citrandarin
1021	X		X		X			X	X		Citrandarin
1022		X			X		X	X	X		Citrandarin
1023		X	X	X	X		X	X		X	Citrandarin
1024	X		X		X			X		X	Citrandarin
1025	X	X			X		X		X	X	Citrandarin
1026		X	X	X	X				X	X	Citrandarin
1027		X	X	X	X		X		X		Citrandarin
1028		X	X	X	X			X		X	Citrandarin
1029	X		X		X		X	X	X		Citrandarin
1030			X	X	X		X	X		X	Citrandarin
1031			X	X	X		X		X	X	Citrandarin
1032	X	X			X		X		X		Citrandarin
1033	X		X		X			X		X	Citrandarin
1034	X	X			X		X		X		Citrandarin
1035	X	X			X			X	X		Citrandarin
1036	X		X		X				X		Citrandarin
1037		X	X	X	X			X		X	Citrandarin
1038			X	X	X			X		X	Citrandarin
1039	X		X		X			X	X		Citrandarin
1040			X	X	X		X		X		Citrandarin
1041	X	X			X		X	X	X		Citrandarin
1042	X		X		X			X		X	Citrandarin
1043	X		X		X		X	X		X	Citrandarin
1044	X		X		X			X	X		Citrandarin
1045	X		X		X		X	X		X	Citrandarin
1046			X	X	X		X		X	X	Citrandarin
1047		X	X		X				X		Citrandarin
1048	X	X			X				X		Citrandarin
1049	X		X		X				X	X	Citrandarin
1050		X			X			X	X		Citrandarin

Tabela 17 (Continuação...). Polimorfismo revelado pelos três marcadores microsatélites detectados nas progênes de polinização simples com pólen de citrandarin (tratamento controle).

	CIR07C07				mest86			mest107			Paternidade
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A1	A2	A3	
Laranja doce		X				X	X		X	X	(Parental)
Clemenules		X	X		X		X		X	X	(Parental)
Citrandarin	X		X	X	X			X	X		(Parental)
1051	X	X			X				X	X	Citrandarin
1052	X		X		X		X	X	X		Citrandarin
1053	X	X			X		X		X	X	Citrandarin
1054		X	X	X	X		X		X		Citrandarin
1055	X	X			X			X		X	Citrandarin
1056		X	X	X	X		X	X	X		Citrandarin
1058	X		X		X			X	X		Citrandarin
1059	X	X			X			X		X	Citrandarin
1060		X	X	X	X				X	X	Citrandarin
1061	X		X		X			X	X		Citrandarin
1062	X	X			X				X		Citrandarin
1063			X	X	X			X	X		Citrandarin
1064		X	X	X	X		X		X	X	Citrandarin
1065			X	X	X			X		X	Citrandarin
1066	X	X			X		X	X		X	Citrandarin
1067	X	X			X		X		X	X	Citrandarin
1068		X	X		X				X		Citrandarin
1069		X	X	X	X		X	X	X		Citrandarin
1070		X	X	X	X		X	X		X	Citrandarin
1071	X		X		X		X		X		Citrandarin
1072			X	X	X		X	X	X		Citrandarin
1073	X	X			X			X	X		Citrandarin
1075			X	X	X			X	X		Citrandarin
1076	X	X			X		X	X	X		Citrandarin
1077	X		X		X		X		X		Citrandarin
1078	X		X		X			X	X		Citrandarin
1079	X		X		X				X		Citrandarin
1080	X	X			X		X		X	X	Citrandarin
1081	X	X			X		X		X	X	Citrandarin
1082			X	X	X				X		Citrandarin
1083		X	X	X	X		X	X		X	Citrandarin
1084					X		X	X		X	Citrandarin
1085	X		X		X			X		X	Citrandarin
1086	X	X			X			X	X		Citrandarin

Tabela 17 (Continuação...). Polimorfismo revelado pelos três marcadores microssatélites detectados nas progênes de polinização simples com pólen de citrandarin (tratamento controle).

	CIR07C07				mest86			mest107			Paternidade
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A1	A2	A3	
Laranja doce		X				X	X		X	X	(Parental)
Clemenules		X	X		X		X		X	X	(Parental)
Citrandarin	X		X	X	X			X	X		(Parental)
1088	X		X		X				X	X	Citrandarin
1089			X	X	X			X		X	Citrandarin
1090			X	X	X				X	X	Citrandarin
1091	X		X		X				X		Citrandarin
1092		X	X	X	X		X	X		X	Citrandarin
1093	X	X			X				X		Citrandarin
1094	X	X			X				X	X	Citrandarin
1095			X	X	X		X		X	X	Citrandarin
1096		X	X	X	X		X	X	X		Citrandarin
1097			X	X	X		X		X		Citrandarin
1098		X		X	X		X	X	X		Citrandarin
1099			X	X	X			X		X	Citrandarin
1100		X	X	X	X				X	X	Citrandarin
1101		X	X	X	X		X		X	X	Citrandarin
1102	X	X			X		X	X	X		Citrandarin
1103	X		X		X			X	X		Citrandarin
1104		X	X	X	X		X		X	X	Citrandarin
1105	X	X			X		X	X		X	Citrandarin
1107	X	X			X			X		X	Citrandarin
1108		X	X	X	X				X	X	Citrandarin
1109	X		X		X		X		X	X	Citrandarin
1110		X	X	X	X			X	X		Citrandarin
1111	X		X		X				X		Citrandarin
1112			X	X	X				X		Citrandarin
1113			X	X	X				X	X	Citrandarin
1114	X	X			X				X		Citrandarin
1115		X	X	X	X			X		X	Citrandarin
1116	X		X		X		X		X	X	Citrandarin
1117	X	X			X		X		X		Citrandarin
1118	X		X		X		X	X	X		Citrandarin
1119	X		X		X		X		X		Citrandarin
1120		X	X	X	X				X		Citrandarin
1121	X	X			X		X		X		Citrandarin
1122			X	X	X			X	X		Citrandarin

Tabela 17 (Continuação...). Polimorfismo revelado pelos três marcadores microsatélites detectados nas progênies de polinização simples com pólen de citrandarin (tratamento controle).

	CIR07C07				mest86			mest107			Paternidade
	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A1	A2	A3	
Laranja doce		X				X	X		X	X	(Parental)
Clemenules		X	X		X		X		X	X	(Parental)
Citrandarin	X		X	X	X			X	X		(Parental)
1123		X			X		X		X	X	?
1124	X		X		X			X		X	Citrandarin
1125		X	X	X	X		X		X	X	Citrandarin
1126	X	X			X			X	X		Citrandarin
1127			X	X	X		X	X	X		Citrandarin
1128	X		X		X				X		Citrandarin
1129	X		X		X				X		Citrandarin
1130		X	X	X	X		X	X		X	Citrandarin
1131	X		X		X		X	X	X		Citrandarin
1132		X	X	X	X		X		X		Citrandarin
1133		X	X	X	X		X	X	X		Citrandarin
1134	X	X			X		X		X	X	Citrandarin
1135	X		X		X			X		X	Citrandarin
1136			X	X	X				X	X	Citrandarin
1137	X		X		X		X		X	X	Citrandarin
1138		X	X	X	X		X	X		X	Citrandarin
1139	X	X			X			X	X		Citrandarin
1140					X			X		X	Citrandarin
1141			X	X	X		X		X	X	Citrandarin
1142	X		X		X		X	X	X		Citrandarin
1143					X			X	X		Citrandarin
1144		X	X	X	X		X	X	X		Citrandarin
1145	X	X			X		X	X		X	Citrandarin
1146	X		X		X		X	X		X	Citrandarin
1147			X	X	X		X		X		Citrandarin
1148	X		X		X		X	X		X	Citrandarin
1149	X		X		X		X	X	X		Citrandarin
1150			X	X	X				X	X	Citrandarin
1151	X		X		X				X		Citrandarin
1152	X		X		X		X	X	X		Citrandarin

Tabela 18. Polimorfismo revelado pelos três marcadores microssatélites detectados em plantas selecionadas por morfologia de folha, oriundas de polinizações simples ou mistas (híbridos controles).

		CIR07C07				mest86			mest107			Paternidade	
		A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A1	A2	A3		
	Laranja doce		X				X	X		X	X	(Parental)	
	Clemenules		X	X		X		X		X	X	(Parental)	
	Citrandarin	X		X	X	X			X	X		(Parental)	
Citrandarin	trifoliados	1	X	X		X			X	X		Citrandarin	
		2		X		X		X		X		Citrandarin	
		3			X		X			X	X	Citrandarin	
		4		X			X		X		X		?
		5	X	X			X		X		X		Citrandarin
Pera	monofoliados	6		X				X		X	X	Pera	
		7		X				X		X	X	Pera	
		8		X	X				X		X	X	Pera
		9		X	X			X	X		X		Pera
		10			X		X		X		X		?
(Pera + citrandarin)	trifoliados	11			X	X	X		X	X	X	Citrandarin	
		12			X		X		X		X		?
		13	X				X			X	X		Citrandarin
		14	X		X		X				X		Citrandarin
Pineapple	monofoliados	16			X			X		X	X	Pineapple	
		17			X			X	X		X	X	Pineapple
		18		X			X	X			X	X	Pineapple
		19		X					X		X		Pineapple
		20		X					X		X		Pineapple
(Pineapple + citrandarin)	trifoliados	21		X				X		X		Pineapple	
		22			X	X	X			X	X		Citrandarin
		23	X		X		X			X	X		Citrandarin
		24	X	X			X				X	X	Citrandarin
		25	X		X		X				X		Citrandarin
Valência	monofoliados	26			X		X	X		X		Valência	
		27		X				X		X	X	Valência	
		28		X	X				X		X		Valência
		29			X		X		X		X	X	?
		30			X				X		X		Valência
Hamlin	monofoliados	36			X		X		X	X		?	
		37		X			X	X		X	X	Hamlin	
		38		X					X		X	X	Hamlin
		39		X	X		X		X		X		?
		40		X	X			X	X		X	X	Hamlin

Tabela 19. Número de flores polinizadas nas duas safras.

Tratamento ¹ (pólen)	2011	2013
Pera	120	400
Valência	120	320
Hamlin	150	200
Pineapple	160	200
Citrândarin	120	160
Pera +citrândarin	340	520
Pineapple + citrândarin	400	---
Valência + citrândarin	---	440
Total	1410	2240

¹ Laranja doce das variedades Pera, Valencia, Hamlin e Pineapple. Citrândarin (acesso CCSM 1600), híbrido de *C. reshni* x *Poncirus trifoliata*;

ANEXOS

Anexo I. Protocolo para determinação do número de grãos de pólen por antera (Pons et al., 2011).

- Colher anteras de flores em pré-antese e deixar em dessecador até que se abram (dois dias aproximadamente);
- Colocar duas anteras em 0,5 ml de pentano e levar ao “vortex” por x 5s;
- Deixar evaporar totalmente o líquido;
- Resuspender em 300 μ L de etanol 70%;
- Colocar 100 μ L em cada linha da câmara de Newbauer;
- Contar os grãos de pólen em quatro campos óticos de cada porta (no total se observam oito campos óticos).

Anexo II. RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 10, de 2 de outubro de 2013 (COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA).



tecnologias da informação devidos a título de contrapartidas em razão da fruição dos incentivos fiscais, seja pela incorporada, seja por ela incorporadora, resolvem:

Art. 1º Fica transferida a titularidade da Portaria Interministerial MCT/MDIC/MF nº 235, de 13 de maio 2003, publicada no DOU de 14.5.2003, da empresa Metrocable Indústria e Comércio Ltda., CNPJ nº 04.183.611/0003-35, para a empresa Furukawa Industrial S.A. Produtos Elétricos, CNPJ nº 51.775.690/0018-30.

Art. 2º Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação, ficando convalidados todos os atos praticados pela empresa Furukawa Industrial S.A. Produtos Elétricos, CNPJ nº 51.775.690/0018-30, em decorrência da sucessão, desde a data em que esta se operou.

MARCO ANTONIO RAUPP

Ministro de Estado da Ciência, Tecnologia e Inovação

FERNANDO DAMATA PIMENTEL

Ministro de Estado do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior

PORTARIA INTERMINISTERIAL Nº 1.025, DE 2 DE OUTUBRO DE 2013

OS MINISTROS DE ESTADO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO E DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR, no uso das atribuições que lhes confere o § 2º do art. 22 c/c o art. 50 do Decreto nº 5.906, de 26 de setembro de 2006, tendo em vista o contido no Processo MCTI nº 01200.003672/2011-44, de 14/10/2011, e

Considerando que a empresa Atos Automação Industrial Ltda., inscrita no Cadastro Nacional da Pessoa Jurídica do Ministério da Fazenda - CNPJ sob o nº 44.020.535/0001-08, é titular da Portaria Interministerial MCT/MDIC/MF nº 801, de 13 de dezembro de 2001, publicada no Diário Oficial da União, de 17 de dezembro 2001, que lhe concedeu habilitação à fruição dos incentivos fiscais previstos no Decreto nº 3.800, de 20 de abril de 2001, atualmente regulamentados pelo Decreto nº 5.906, de 26 de setembro de 2006;

Considerando que a Portaria Interministerial MCT/MDIC/MF nº 446, de 16 de junho de 2009, de 17 de junho de 2009, transferiu a titularidade da Portaria Interministerial MCT/MDIC/MF nº 801, de 13 de dezembro de 2001, da empresa Atos Automação Industrial Ltda., inscrita no CNPJ sob o nº 44.020.535/0001-08, para o estabelecimento matriz da empresa Schneider Electric Brasil Ltda., inscrita no Cadastro Nacional da Pessoa Jurídica do Ministério da Fazenda - CNPJ sob o nº 82.743.287/0001-04;

Considerando que, posteriormente, a matriz, CNPJ sob o nº 82.743.287/0001-04, mudou seu endereço, mas manteve o estabelecimento industrial no antigo endereço, localizada na Avenida das Nações Unidas, nº 23.223, Vila Almeida, CEP 04795-907, Estado de São Paulo, com a criação de uma filial da empresa Schneider Electric Brasil Ltda., inscrita no CNPJ sob o nº 82.743.287/0027-43, que deu prosseguimento às atividades da matriz, sem solução de continuidade, conforme consta da documentação juntada ao Processo acima referido, que foi devidamente registrada nos órgãos próprios, resolvem:

Art. 1º Fica transferida a titularidade da Portaria Interministerial MCT/MDIC/MF nº 446, de 16 de junho de 2009 e Portaria Interministerial MCT/MDIC/MF nº 801, de 13 de dezembro de 2001, do estabelecimento matriz da empresa Schneider Electric Brasil Ltda., CNPJ sob o nº 82.743.287/0001-04, para o estabelecimento filial, CNPJ sob o nº 82.743.287/0027-43.

Art. 2º Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação, ficando convalidados todos os atos praticados pelo estabelecimento filial da empresa Schneider Electric Brasil Ltda., CNPJ sob o nº 82.743.287/0027-43, em decorrência da transferência de titularidade, desde a data em que esta se operou.

MARCO ANTONIO RAUPP

Ministro de Estado da Ciência, Tecnologia e Inovação

FERNANDO DAMATA PIMENTEL

Ministro de Estado do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior

PORTARIA Nº 1.019, DE 2 DE OUTUBRO DE 2013

O MINISTRO DE ESTADO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO, no uso das atribuições que lhe confere o art. 2º do Decreto nº 98.830, de 15 de janeiro de 1990, resolve:

Art. 1º. Fica o Dr. RICARDO DIEGO TORRES, contraparte brasileira, na condição de representante do Programa de Pós Graduação em Engenharia Mecânica (PPGEM) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUC/PR, autorizado a coordenar, no âmbito do Processo CNPq nº 001717/2013-8, o projeto de pesquisa científica intitulado "Desenvolvimento de Revestimentos Protetivos Contra a Carbonatação de Superfícies Metálicas", a ser realizado nas dependências do PPGEM/PUC/PR, de interesse da pesquisadora estrangeira, natural do México, OLÍMPIA SALAS MARTINEZ, vinculada ao Instituto Tecnológico de Estudos Superiores de Monterrey - ITESM (MEX), representado pelo Dr. PEDRO LUIS GRASA SOLER, natural do México, pelo prazo de um ano, contado a partir da publicação desta Portaria no Diário Oficial da União.

Parágrafo único. A presente autorização não compreende a realização de trabalhos de coleta em campo no território brasileiro.

Art. 2º. Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação

MARCO ANTONIO RAUPP

PORTARIA Nº 1.024, DE 2 DE OUTUBRO DE 2013

O MINISTRO DE ESTADO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO, no uso das atribuições que lhe confere o art. 87, parágrafo único, incisos II e IV, da Constituição Federal, e tendo em vista o disposto nos arts. 3º da Lei nº 8.248, de 23 de outubro de 1991, e 7º do Decreto nº 5.906, de 26 de setembro de 2006, resolve:

Art. 1º Reconhecer, conforme consta do processo MCTI nº 01200.003164/2013-28, de 23 de julho de 2013, que os produtos e respectivos modelos descritos abaixo, desenvolvidos pela empresa UPSAI Sistemas de Energia Ltda., inscrita no Cadastro Nacional da Pessoa Jurídica do Ministério da Fazenda - CNPJ/MF sob o nº 02.258.188/0001-06, atendem às condições de bens de informática e automação, desenvolvidos no País, nos termos e para os fins estabelecidos na Portaria MCT nº 950, de 12 de dezembro de 2006:

Produto 1: Equipamento de alimentação ininterrupta de energia microprocessado ("UPS" ou "No Break").

Modelos: Flash II; ProSaver II.

Produto 2: Regulador/estabilizador eletrônico de voltagem, baseado em técnica digital.

Modelos: Pró Micro IV; Pró Gel; EWA; RVE; ACR 1100; ACR 2200; ACR 3100 D; ACF 1300; ACF 1600; ACF 2300; ACF 3100.

Art. 2º Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação.

MARCO ANTONIO RAUPP

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 14, DE 2 DE OUTUBRO DE 2013

Dispõe sobre a situação das instituições que não solicitaram seu credenciamento no CONCEA, as quais utilizam animais para fins científicos ou didáticos.

O PRESIDENTE DO CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - CONCEA, no uso das atribuições que lhe confere o art. 5º, inciso VII, e no art. 10, incisos III e I, da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e, tendo em vista o disposto nos incisos I e II do art. 41 do Decreto nº 6.899, 15 de julho de 2009, bem como no caput do art. 1º, no caput, no § 1º, no inciso VI e no § 2º do art. 8º da Lei nº 12.527, de 18 de novembro de 2011,

Considerando que compete ao CONCEA credenciar instituições para criação ou utilização de com finalidade de ensino ou pesquisa científica;

Considerando que qualquer instituição legalmente estabelecida no território nacional que crie ou utilize animais para ensino ou pesquisa científica deverá constituir uma CEUA para requerer seu credenciamento no CONCEA;

Considerando que a criação ou a utilização de animais para pesquisa e ensino ficam restritas, exclusivamente, às instituições credenciadas no CONCEA;

Considerando ter o CONCEA editado a Resolução Normativa nº 3, de 14 de dezembro de 2011, que instituiu o Credenciamento Institucional para Atividades com Animais em Ensino ou Pesquisa (CIAEP) e estabelece os critérios e procedimentos para requerimento, emissão, revisão, extensão, suspensão e cancelamento do credenciamento das instituições que criam, mantêm ou utilizam animais em ensino ou pesquisa científica;

Considerando caber ao CONCEA aplicar as sanções previstas nos arts. 17 e 18 da Lei nº 11.794, de 2008, reproduzidas nos arts. 49 e 50 do seu Decreto nº 6.899, de 2009, encontrando-se prevista, dentre elas, a criação ou utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica sem estar credenciado no CONCEA ou em desacordo com as normas por ele expedidas;

Considerando ter o CONCEA deliberado no decorrer de sua 20ª Reunião Ordinária que a ausência de pleito de credenciamento, de conformidade com as disposições previstas na referida Resolução Normativa nº 3, de 2011, configura a ocorrência de uma infração de natureza grave, no uso da competência prevista o art. 50 do Decreto nº 6.899, de 2009, que faculta ao Colegiado graduar as sanções administrativas, segundo os critérios previstos nos incisos I a V do parágrafo único do mesmo art. 50, resolve:

Art. 1º. Ficam interditadas temporariamente as instituições que fazem uso de animais para fins científicos ou didáticos no País e que não solicitaram seu credenciamento no CONCEA, de conformidade com as disposições previstas na Resolução Normativa nº 3, de 2011, nos termos do art. 20 da Lei nº 11.794, de 2008, e de acordo com a letra "c" do inciso I e do parágrafo único do art. 49 c/c o art. 50 do Decreto nº 6.899, de 2009.

Parágrafo único. A listagem das instituições credenciadas no CONCEA, bem como daquelas que se encontram com processo de solicitação de credenciamento em andamento estão disponíveis no sítio eletrônico do CONCEA em <http://concea.mct.gov.br>.

Art. 2º. As instituições que criam ou utilizam animais para fins científicos ou didáticos e que quiserem se regularizar perante o CONCEA podem solicitar seu credenciamento, que ocorre em fluxo contínuo por meio do endereço eletrônico do Cadastro de Instituições de Uso Científico de Animais - CIUCA em <http://ciuca.mct.gov.br/>

Art. 3º. Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

MARCO ANTONIO RAUPP

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA

RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 10, DE 2 DE OUTUBRO DE 2013

Estabelece condições de isolamento para a Liberação Planejada no Meio Ambiente de laranja doce (*Citrus Sinensis* (L.) OSBECK) geneticamente modificada.

A Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições legais e regulamentares, e tendo em vista o disposto no inciso II do art. 14 da Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005, resolve:

Art. 1º. Na liberação planejada de citros geneticamente modificados no meio ambiente deverá ser observada a estratégia de competição de pólen, mediante a introdução de três tipos de bordaduras, compondo, no mínimo, seis linhas de plantas cítricas, observadas, ainda, as seguintes condições:

1 - para áreas experimentais inseridas em plantios comerciais de citros:

a) dispor, ao redor da área que contenha laranja doce geneticamente modificada, uma bordadura composta por duas linhas de cultivo (filas de árvores) de um genótipo polinizador não geneticamente modificado, nos termos do Anexo I desta Resolução;

b) alocar uma segunda bordadura ao redor da bordadura apresentada na letra "a)" deste item, composta por duas linhas de cultivo de um genótipo não modificado geneticamente receptor de pólen, autoincompatível e monoembrionário, nos termos do Anexo II;

c) dispor a terceira bordadura ao redor das bordaduras anteriores, nos termos das letras "a)" e "b)" deste item, compostas por, no mínimo, duas linhas de cultivo de uma variedade de laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), nos termos do Anexo III.

II - para áreas experimentais fora de plantios comerciais de citros, a bordadura citada na letra "c)" do inciso I deste artigo deverá possuir, no mínimo, quatro linhas de cultivo de uma variedade de laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), nos termos do Anexo III.

Art. 2º. Fica estabelecida a distância mínima de 3 km (três quilômetros) em relação às colmeias destinadas à apicultura comercial ou doméstica pré-existent à época da instalação do experimento.

Parágrafo único. Após a instalação do experimento, os apicultores interessados em instalar colmeias comerciais deverão ser informados de que deverão respeitar a distância mínima de 1 km (um quilômetro) entre a área experimental e o apiário.

Art. 3º. Para a obtenção de porta-entertos cítricos de viveiros comerciais, deverá ser observada a distância mínima de 1 km (um quilômetro) em relação às plantas cítricas fonte de sementes (sementeiras).

Art. 4º. Na instalação do experimento de que trata esta Resolução Normativa deverá ser respeitada a distância de, pelo menos, 100 (cem) metros de áreas de preservação natural.

Art. 5º. Deverá ser realizado monitoramento de um raio de 100 (cem) metros em torno da área experimental, a partir da última linha da bordadura, visando à eliminação de plantas cítricas espontâneas.

Art. 6º. Os preceitos estabelecidos nesta Resolução Normativa não se aplicam quando a planta cítrica for formada pelo porta-enterto transgênico enxertado, com uma copa não transgênica.

Art. 7º. Esta Resolução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

FLÁVIO FINARDI FILHO

ANEXO I

Genótipo polinizador de citros. Citrandarins, híbridos de:

1. Tangerina Cleopatra (*Citrus reshni* hort. Ex Tanaka) X Poncirus trifoliata (L.) Raf.;
2. Tangerina Sunki (*Citrus reshni* hort. Ex Tanaka) X Poncirus trifoliata (L.) Raf.;
3. Tangerina Cleopatra (*Citrus reshni* hort. Ex Tanaka) X Citrange (*Citrus sinensis* L. Osb. X Poncirus trifoliata (L.) Raf.);
4. Mexerica tardia (*Citrus deliciosa* Ten.) X Citrange (*Citrus sinensis* L. Osb. X Poncirus trifoliata (L.) Raf.).

ANEXO II

Genótipos receptores de citros, monoembrionários e autoincompatíveis

1. Tangerina Clementina (*Citrus clementina* hort. ex. Tan)
2. Tangerina Imperial (*Citrus reticulata* Blanco)
3. Tangerina Ellendale (*Citrus reticulata* Blanco X *Citrus sinensis* L. Osb.)
4. Pomelo Sukega (*Citrus paradisi* MacF.)
5. Toranja Siamesa (*Citrus maxima* (Burm.) Merrill)

ANEXO III

Variedades de laranja doce (Citrus sinensis L. Osb.)

1. Folha Murcha
2. Hamlin
3. Natal
4. Pera
5. Pineapple
6. Rubi
7. Seleta
8. Valência
9. Westin

EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 3.772/2013

O Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 14, inciso XIX, da Lei 11.105/05 e do Art. 5º, inciso XIX do Decreto 5.591/05, torna público que na 165ª Reunião Ordinária, ocorrida em 19 de setembro de 2013, a CTNBio apreciou e emitiu parecer técnico para o seguinte processo:

Processo nº: 01200.001516/2013- 19

Requerente: Monsanto do Brasil Ltda.

CNPJ: 64.858.525/0001 45

Endereço: Avenida das Nações Unidas, 12901, Torre Norte 7º Andar, São Paulo SP.

Assunto: Liberação planejada no meio ambiente, importação de sementes e exportação.

Extrato Prévio: 3.557/2013

Decisão: Deferido

A CTNBio, após apreciação do pedido de liberação planejada no meio ambiente, importação e exportação de soja geneticamente modificada, concluiu pelo seu DEFERIMENTO, nos termos deste parecer técnico. A Monsanto do Brasil Ltda., detentora do Certificado de Qualidade - CQB - 003/96, solicita autorização para liberação planejada no meio ambiente, importação e exportação de soja MON 87427. Os experimentos serão realizados em Porto Nacional (TO) e ocuparão uma área total de 0,74 hectares e a área com OGM será de 0,4 hectares.

Fica autorizada a importação de 30,0 Kg de sementes de soja geneticamente modificada da Monsanto Company, EUA. O local de desembarque será Brasília - DF e a estação quarentenária, CENARGEN/EMBRAPA. O destino do material será a Estação Experimental da Monsanto do Brasil Ltda, localizada em Morrinhos - GO e Porto Nacional (TO); e a exportação de amostras de soja MON 87701 × MON 89788 × MON 87708 × A841661 que serão coletadas e exportadas para os Centros de Pesquisa da Monsanto Company na Argentina, Paraguai, Uruguai, Canadá e Estados Unidos aproximadamente 200 amostras de grãos totalizando 50 kg de grãos.

No âmbito das competências do art. 14 da Lei 11.105/05, a CTNBio considerou que as medidas de biossegurança propostas atendem às normas e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.

A CTNBio esclarece que este extrato não exige a requerente do cumprimento das demais legislações vigentes no país, aplicáveis ao objeto do requerimento.

A íntegra deste Parecer Técnico consta do processo arquivado na CTNBio. Informações complementares ou solicitações de maiores informações sobre o processo acima listado deverão ser encaminhadas por escrito à Secretaria Executiva da CTNBio.

FLÁVIO FINARDI FILHO

Leis, Decretos e Medidas Provisórias agora reunidos em volumes mensais



A Imprensa Nacional lança a série

Separata dos Atos do Poder Legislativo e do Poder Executivo,

uma publicação de periodicidade mensal, cujo conteúdo é extraído da base de dados do Diário Oficial da União. O novo produto oferece à sociedade mais uma forma de acessibilidade, com portabilidade, aos atos do Governo, facilitando ações cidadãs a partir da pluralização dos meios de divulgação oficial.

A Separata já se encontra disponível para assinatura ou venda avulsa.

Informações e vendas pelo telefone
0800 725 6787

Imprensa Nacional - Informações oficiais desde 1808