

NOTAS CIENTÍFICAS

FREQÜÊNCIA DE HÍBRIDOS EM CRUZAMENTO ENTRE TANGERINA 'CRAVO' E LARANJA 'PÊRA': ANÁLISE DE MARCADORES MORFOLÓGICOS E RAPD¹

ROBERTO PEDROSO DE OLIVEIRA², VALDENICE MOREIRA NOVELLI³
e MARCOS ANTONIO MACHADO⁴

RESUMO - Os objetivos deste trabalho foram avaliar a freqüência de híbridos de cruzamento entre tangerina 'Cravo' (*Citrus reticulata* Blanco) e laranja 'Pêra' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), o uso de marcadores morfológicos e moleculares (RAPD) na identificação precoce de plantas zigóticas, e a variabilidade dos híbridos. A porcentagem de híbridos foi maior na população germinada em placas de Petri (19,4%). Verificou-se que quanto maior a competição entre os "seedlings" por espaço e nutrientes, menor a freqüência de plantas híbridas. A identificação dos híbridos não foi possível apenas com o uso de marcadores morfológicos. A análise morfológica dos híbridos revelou elevada variabilidade.

HYBRID FREQUENCY BETWEEN TANGERINE 'CRAVO' AND ORANGE 'PÊRA' CROSSING: ANALYSIS OF MORPHOLOGICAL AND RAPD MARKERS

ABSTRACT - The objectives of this work were to evaluate the hybrid frequency from the cross between tangerine 'Cravo' (*Citrus reticulata* Blanco) and sweet orange 'Pêra' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), the use of morphological and RAPD markers for early identification of zygotic plants between parents with similar phenotype, and the morphological variability among the hybrids. Plants germinated on Petri dishes showed the higher hybrid percentage (19.4%). Hybrid plant frequency was inversely proportional to the competition level for space and nutrients among the hybrids. Accurate hybrid identification is not possible using morphological markers alone. The hybrids selected showed high morphological variability.

A citricultura é uma das atividades agrícolas de maior importância econômica e social para o Brasil, gerando centenas de milhares de empregos e mais de 1,5 bilhão de dólares em exportações (Schartz, 1997).

¹ Aceito para publicação em 7 de dezembro de 1999.

Extraído da tese de doutorado do primeiro autor, CENA-USP, Piracicaba, SP.

² Eng. Agrôn., M.Sc., Embrapa-Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado (CPACT), Caixa Postal 403, CEP 96001-970 Pelotas, RS. E-mail: rpedroso@cena.usp.br

³ Biol., M.Sc., Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), CEP 44031-460 Feira de Santana, BA. E-mail: fiac@siteplanet.com.br

⁴ Eng. Agrôn., Ph.D., Centro de Citricultura Sylvio Moreira (CCSM), Instituto Agronômico (IAC), Caixa Postal 04, CEP 13490-970 Cordeirópolis, SP. E-mail: fiac@siteplanet.com.br

O melhoramento genético dos citros vem sendo conduzido em diversos centros de pesquisa do país, visando a obtenção de novas cultivares copa e porta-enxerto de interesse econômico. Os citros compreendem um grande número de espécies, sendo, em geral, sexualmente compatíveis (Cameron & Frost, 1968). Cruzamentos controlados têm sido realizados há mais de um século, sendo obtidas progênes com variabilidade genética para diversas características de importância agrônômica.

A poliembrião tem sido uma das maiores limitações ao melhoramento dos citros, pois dificulta o desenvolvimento e a identificação dos híbridos, embora proporcione a multiplicação de clones nucleares sadios para serem utilizados como porta-enxertos (Ballve et al., 1991).

Diversas técnicas podem ser utilizadas na identificação de híbridos, desde as baseadas em caracteres morfológicos até análises da composição de óleos essenciais das folhas (Sakamoto et al., 1997), cromatografia líquida de compostos flavonóides (Ortiz et al., 1981), análises bioquímicas com sistemas isoenzimáticos (Abdullah et al., 1979), análises moleculares tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e bandeamento cromossômico (Soares Filho et al., 1997).

As análises baseadas na morfologia das plantas são as mais simples e de menor custo, sendo eficientes quando os parentais apresentam características distintas (Frost & Soost, 1968; Ballve et al., 1991). Os principais caracteres morfológicos utilizados na identificação de plantas zigóticas de citros referem-se à presença de folhas trifoliadas nos híbridos de *Poncirus trifoliata* (Cameron & Frost, 1968), coloração dos embriões e das plantas jovens (Soares Filho et al., 1997), número de glândulas de óleos (Gogorcena & Ortiz, 1989), comprimento e largura das folhas (Teich & Spiegel-Roy, 1972), área foliar (Gogorcena & Ortiz, 1989), forma das folhas, comprimento e tipo de asa do pecíolo (International Board for Plant Genetic Resources, 1988), presença de espinhos (Donadio, 1979), entre outros.

Com o avanço e disseminação das técnicas moleculares, os marcadores RAPD passaram a ser utilizados na identificação precoce de híbridos de citros (Soares Filho et al., 1997). Segundo Ferreira & Grattapaglia (1995), as principais vantagens são rapidez e precisão da análise, grande número de marcadores existentes, possibilidade de automação, necessidade de pequena quantidade de DNA e não interferência de fatores ambientais. No entanto, trata-se de uma técnica laboriosa e de custo elevado em relação à seleção com base em caracteres morfológicos (Soares Filho et al., 1997).

A porcentagem de embriões nucleares pode variar de 0% a 100% em função da constituição genética dos parentais, vigor dos híbridos, fatores ambientais e estado fisiológico das plantas (Cameron & Frost, 1968). Em materiais altamente poliembriônicos, o resgate e a cultura *in vitro* de embriões zigóticos têm sido recomendados para garantir a sobrevivência de híbridos pouco vigorosos (Barlass & Skene, 1982).

Este trabalho teve por objetivo avaliar a frequência de híbridos provenientes de cruzamento entre tangerina 'Cravo' (*Citrus reticulata* Blanco) e laranja 'Pêra' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), o uso de marcadores morfológicos e RAPD na identificação precoce de plantas zigóticas de parentais com fenótipo semelhante, e a variabilidade morfológica dos híbridos.

Os parentais tangerina ‘Cravo’ (feminino) e laranja ‘Pêra’ foram caracterizados quanto a morfologia foliar: largura e comprimento das folhas, relação largura/comprimento das folhas, comprimento e tipo de asa do pecíolo. Para esta análise, foram utilizadas 20 folhas em estágio completo de desenvolvimento, coletadas ao acaso nos quatro pontos cardeais da copa das árvores.

As sementes utilizadas foram provenientes de cruzamentos controlados entre as cultivares estudadas, realizados na florada de agosto a dezembro de 1997, no Centro de Citricultura ‘Sylvio Moreira’ (CCSM-IAC), Cordeirópolis, SP, conforme as recomendações de Cristofani (1997).

Os tratamentos externo e interno das sementes foram removidos e a germinação e desenvolvimento das plantas foram conduzidos segundo três métodos: 1. Embriões em placas de Petri, sobre papel de filtro umedecido com água destilada, mantidas sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura média de 27°C, sendo os embriões, após quatro dias, individualizados e, após 15 dias, transferidos para tubetes (100 cm³) contendo substrato Plantmax; 2. Semeadura em canteiros (2 cm na linha x 10 cm entre linhas), área de 1,8 m², diretamente no solo, no interior de telado sob condições controladas de irrigação; 3. Resgate e cultura *in vitro* de embriões, segundo as recomendações de Wickert (1998), sendo as plântulas com 1-2 cm transferidas para tubetes contendo Plantmax.

Quatro a seis meses após a germinação, uma amostra de 36 plantas foi retirada ao acaso de cada um dos três tratamentos. O restante das plantas desenvolvidas em canteiros e tubetes foi classificada em três grupos, de acordo com sua morfologia: plantas com menor altura (<12 cm) e com folhas de coloração verde-escura (Seleção A); plantas com comprimento, largura das folhas ou forma da asa do pecíolo distintos do parental feminino (Seleção B); plantas com características idênticas às do parental feminino (Seleção de nucelares).

As plantas selecionadas (Tabela 1) foram analisadas, quanto a natureza híbrida, empregando-se marcadores RAPD. O DNA genômico das plantas foi

TABELA 1. Porcentagem de híbridos de tangerina ‘Cravo’ (*Citrus reticulata* Blanco) e laranja ‘Pêra’ (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) selecionados por caracteres morfológicos e confirmados por marcadores RAPD. Cordeirópolis, SP, 1999.

Método de germinação/cultivo	Método de coleta das plantas	Número de plantas	Número de híbridos	Porcentagem de híbridos
Placas de Petri/tubetes	Ao acaso	36	7	19,4
	Seleção A ¹	101	47	46,5
	Seleção B ²	81	45	55,6
	Seleção de nucelares ³	36	0	0,0
Canteiro	Ao acaso	36	2	5,6
	Seleção A	36	3	8,3
	Seleção B	46	37	80,4
	Seleção de nucelares	36	1	2,8
Cultura de tecidos/tubetes	Ao acaso	36	1	2,8

¹ Plantas com menor altura e com folhas de coloração verde-escura.

² Plantas com morfologia foliar distinta do parental feminino.

³ Plantas com características morfológicas semelhantes ao parental feminino.

extraído usando a metodologia de Murray & Thompson (1980), com as alterações propostas por Machado et al. (1996). A quantificação do DNA foi feita segundo Sambrook et al. (1989) e a qualificação observando-se a presença/ausência de rastro na corrida eletroforética em gel de agarose. As reações de amplificação foram feitas de acordo com Grattapaglia & Sederoff (1994), sendo realizadas em termociclador MJ Research Thermocycler com blocos para tubos de 0,5 mL programados para 36 ciclos de 1 minuto a 92°C, 1 minuto a 36°C, 2 minutos a 72°C e uma extensão de 10 minutos a 72°C. A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada segundo Cristofani (1997). Os “primers” OPG8, OPG13 e OPG19, de seqüência arbitrária de dez nucleotídeos da Operon Technologies Inc., foram utilizados para identificação dos “seedlings” zigóticos.

Em seguida, foi realizado o transplântio dos híbridos para saquinhos de 1,5 L contendo substrato Rendmax (produto comercial da Eucatex a base de perlita), sendo mantidos em casa de vegetação com irrigação controlada. Uma nova análise morfológica das plantas foi realizada após 60 dias, considerando-se a frequência de plantas com folhas lanceoladas, arredondadas e de formas intermediárias; folhas com malformações; asa deltoide, cordiforme e estreita do pecíolo; presença e ausência de espinhos; florescimento precoce; e porte reduzido. Também foi quantificado o comprimento e a largura média das folhas dos híbridos.

A análise molecular do material vegetal amostrado ao acaso revelou frequências de híbridos de 19,4% e 5,6% nas plantas germinadas em placas de Petri e em canteiro, respectivamente (Tabela 1). Resultados intermediários, em cruzamentos controlados entre as espécies *C. reticulata* e *C. sinensis*, foram obtidos por Roose & Traugh (1988) (10%) e Donadio (1979) (13%).

A frequência de híbridos obtida pode ser considerada satisfatória, uma vez que na literatura são comuns relatos inferiores a 5% (Cameron & Frost, 1968). A compatibilidade genética entre os parentais, a realização de polinização controlada (Ballve et al., 1997) e as condições ambientais e fisiológicas das plantas (Cameron & Frost, 1968) devem ter contribuído para a superação do nível elevado de poliembrião dos parentais (Moreira et al., 1947; Frost & Soost, 1968). Segundo Frost & Soost (1968), as espécies de *C. sinensis* e *C. reticulata* apresentam nível de poliembrião de moderado a elevado dependendo da cultivar e das condições ambientais.

A porcentagem de híbridos foi maior no tratamento plantas germinadas em placas de Petri e cultivadas individualmente em tubetes, em virtude da menor competição dos indivíduos por espaço e nutrientes. Os “seedlings” zigóticos são geralmente menos vigorosos que os nucelares em decorrência da provável homozigose de alelos deletérios recessivos, originários de mutações nos parentais e acumulados pela embrião nucelar (Cameron & Frost, 1968; Frost & Soost, 1968). A sobrevivência das plântulas germinadas em placas de Petri e transferidas para tubetes foi superior a 90%. A metodologia em canteiro com população adensada de “seedlings” permitiu a seleção de indivíduos mais vigorosos, principalmente os nucelares, devendo ser recomendada apenas para a multiplicação de porta-enxertos.

As plantas resultantes de cultura de embriões apresentaram apenas 2,8% de híbridos. A adoção do critério de que os embriões zigóticos são os maiores (Soares Filho et al., 1997) não foi suficiente para a identificação dos híbridos, uma vez que tanto os embriões zigóticos como os nucelares localizam-se na região da micrópila do nucelo e possuem diversas formas e tamanhos (Frost & Soost, 1968).

Os parentais tangerina 'Cravo' e laranja 'Pêra' apresentaram pequenas variações quanto a morfologia foliar, nas condições ambientais de Cordeirópolis, SP, com comprimento médio do limbo foliar de $6,3 \pm 0,6$ cm e $9,8 \pm 1,2$ cm, largura de $3,1 \pm 0,4$ cm e $5,1 \pm 0,9$ cm e relação comprimento/largura de $2,1 \pm 0,1$ e $2,0 \pm 0,3$, respectivamente. Verificou-se que as folhas de laranja 'Pêra' foram consideravelmente maiores do que as de tangerina 'Cravo', com pequena diferença na relação comprimento/largura das folhas. Donadio et al. (1995) obtiveram resultados semelhantes nas regiões de Bebedouro e Jaboticabal, ambas no Estado de São Paulo.

Outra diferença morfológica observada entre os parentais foi em relação ao pecíolo. As folhas de tangerina 'Cravo' apresentaram pecíolo mais curto e com asa estreita, ao passo que na copa de laranja 'Pêra' verificou-se aproximadamente 50% das folhas com pecíolos com asa deltóide e 10% em forma cordiforme, de acordo com a classificação do International Board for Plant Genetic Resources (1988). A variabilidade de expressão desse fenótipo já havia sido relatada em *C. aurantium* por Ballve et al. (1997). Donadio (1979), Ashari et al. (1988) e Donadio et al. (1995) também mencionam a largura da asa do pecíolo como importante marcador em laranjas doces e tangerinas. Segundo Ballve et al. (1997) esse caráter é controlado por poligenes, devendo haver algum tipo de epistasia.

A análise das plantas desenvolvidas nos tubetes e no canteiro revelou materiais com diferenças em relação às dimensões das folhas, largura da asa do pecíolo e altura das plantas, enquanto as plantas provenientes da cultura de embriões mostraram-se uniformes.

Nos tubetes foram obtidas 574 plantas derivadas de germinação em placas de Petri, das quais 17,6% apresentaram menor vigor, caracterizado pela menor altura e reduzida emissão de folhas novas; e 14,1% morfologia foliar (folhas lanceoladas, ovais ou com malformações, asa larga do pecíolo e tamanho pronunciado da folha) diferente do parental feminino. As demais plantas foram semelhantes à tangerina 'Cravo'.

No canteiro foram obtidas mais de 2.000 plantas com ampla variabilidade de altura e coloração das folhas, porém apenas 46 apresentaram variações na morfologia foliar. A competição por espaço e nutrientes deve ter contribuído para a ampla variabilidade no porte das plantas.

A natureza híbrida ou nucelar das plantas selecionadas morfológicamente foi confirmada pelo emprego de marcadores RAPD, sendo selecionados os "primers" OPG8, OPG13 e OPG19 que apresentaram, respectivamente, 1 (PM 623), 6 (PM 327, 536, 629, 1384, 2780 e 2945) e 2 (PM 1203 e 1261) marcadores com alta repetibilidade. Em teoria, apenas a utilização do "primer" OPG13 é suficiente para a detecção de 99,9% dos híbridos do cruzamento estudado por possuir seis marcadores de natureza dominante.

Nas plantas provenientes de tubetes, a seleção baseada no porte das plantas e na morfologia foliar apresentou 46,5% e 55,6% de eficiência, ao passo que em canteiro foi de 8,3% e 80,4%, respectivamente para as seleções A e B (Tabela 1). Esses dados demonstram que a identificação de híbridos baseada exclusivamente nos caracteres morfológicos não é precisa, mas constitui importante ferramenta para a redução de custos com análises laboratoriais.

O fato de a maioria dos caracteres morfológicos apresentarem herança aditiva, serem poligênicos e altamente influenciados pelo ambiente, dificultaram a identificação dos híbridos (Cameron & Frost, 1968; Teich & Spiegel-Roy, 1972). Além desse aspecto, segundo Frost & Soost (1968), Khan & Roose (1988) e Ballve et al. (1991), podem ser obtidos híbridos muito semelhantes ao parental feminino mesmo quando os parentais são distintos morfológicamente.

Webber (1932) foi o primeiro a demonstrar que as plantas zigóticas de citros são menos vigorosas que as nucelares. Cameron & Frost (1968), Khan & Roose (1988) e outros confirmaram esses resultados. No entanto, a semeadura muito adensada proporcionou níveis distintos de crescimento entre as próprias plantas nucelares.

A variabilidade fenotípica dos híbridos foi quantificada na Tabela 2, sendo citada a frequência de marcadores morfológicos relacionados à forma e dimensões das folhas, tipo de asa do pecíolo, presença de espinhos e porte das plantas na população. Esses dados podem orientar na seleção morfológica de novos materiais. Conforme observado, a segregação ocorreu para várias características, pelo fato de os citros serem altamente heterozigotos. Segundo Cameron & Frost (1968), certos híbridos podem ser bastante diferentes dos pais ou próximos a um deles, porém os híbridos tendem a apresentar características intermediárias, pelo tipo de herança dos genes envolvidos.

TABELA 2. Caracteres morfológicos de híbridos do cruzamento entre tangerina ‘Cravo’ (*Citrus reticulata* Blanco) e laranja ‘Pêra’ (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). Cordeirópolis, SP, 1999.

Caráter morfológico	Porcentagem de híbridos ou valor médio
Folhas lanceoladas	4,3%
Folhas arredondadas	4,3%
Folhas com malformações	2,2%
Folhas com forma entre lanceolada/arredondada	89,2%
Folhas com asa deltóide do pecíolo	22,5%
Folhas com asa cordiforme do pecíolo	5,8%
Folhas com asa estreita do pecíolo	71,7%
Presença de espinhos grandes (> 1,5 cm)	23,2%
Presença de espinhos pequenos (< 1,5 cm)	51,5%
Ausência de espinhos	25,3%
Florescimento precoce	0,7%
Plantas com crescimento reduzido	4,3%
Comprimento médio das folhas	5,8 ± 1,1 cm
Largura média das folhas	2,9 ± 0,8 cm
Relação comprimento e largura das folhas	2,1 ± 0,4

Por meio do trabalho realizado pode-se observar que: 1. Quanto maior a competição entre os “seedlings” por espaço e nutrientes, menor a frequência de plantas híbridas na população; 2. A germinação em placas de Petri e o posterior crescimento de plântulas individualizadas em tubetes deve ser recomendado para a seleção de “seedlings” zigóticos, ao passo que a germinação adensada e o desenvolvimento de plantas em canteiros para a multiplicação de materiais “seedlings” (porta-enxertos); 3. O uso de caracteres morfológicos não possibilita a identificação precisa de híbridos, quando as espécies parentais são semelhantes fenotipicamente; 4. A utilização de caracteres morfológicos proporciona uma seleção precoce e eficiente de plantas com probabilidade elevada de serem híbridos, os quais podem ser confirmados por marcadores RAPD; 5. Os híbridos apresentam grande variabilidade morfológica, geralmente com características intermediárias aos parentais.

AGRADECIMENTOS

A Mariângela Cristofani, Helvécio Della Colleta Filho e Maria Luíza P.N. Targon, do Centro de Citricultura ‘Sylvio Moreira’ (CCSM-IAC), pelas sugestões nas análises com marcadores RAPD.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, G.; COUMANS, M.; VILLEMUR, P.; JONARD, R. Intergeneric hybridization between *Poncirus trifoliata* and *Citrus meyeri* or *Tangelo nova*: determination by electrophoresis of zygotic or nucellar embryos from the cross *P. trifoliata* x *Tangelo nova*. **Fruits**, Paris, v.45, n.6, p.591-597, 1979.
- ASHARI, S.; ASPINALL, D.; SEDGLEY, M. Discrimination of zygotic and nucellar seedling of five polyembryonic citrus rootstocks by isozyme analysis and seedling morphology. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.63, n.4, p.695-703, 1988.
- BALLVE, R.M.L.; BORDIGNON, R.; MEDINA FILHO, H.P.M.; SIQUEIRA, W.J.; TEÓFILO SOBRINHO, J.T.; POMPEU JÚNIOR, J. Isoenzimas na identificação precoce de híbridos e clones nucleares no melhoramento de citros. **Bragantia**, Campinas, v.50, n.1, p.57-76, 1991.
- BALLVE, R.M.L.; MEDINA FILHO, H.P.; BORDIGNON, R. Identification of reciprocal hybrids in citrus by the broadness of the leaf petiole wing. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.20, n.4, p.697-702, 1997.
- BARLASS, M.; SKENE, K.G.M. *In vitro* plantlet formation from *Citrus* species and hybrids. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.17, n.4, p.333-341, 1982.
- CAMERON, J.W.; FROST, H.B. Genetics, breeding and nucellar embryony. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley : University of California Press, 1968. v.2, p.325-370.

- CRISTOFANI, M. **Mapas de ligação de *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux e localização do gene de resistência ao vírus da tristeza.** Piracicaba : ESALQ, 1997. 140p. Tese de Doutorado.
- DONADIO, L.C. **Estudo de alguns caracteres morfológicos de progênies obtidas de hibridações de cultivares poliembriônicas de *Citrus*.** Jaboticabal : UNESP-FCAV, 1979. 76p. Tese de Livre Docência.
- DONADIO, L.C.; FIGUEIREDO, J.O.; PIO, R.M. **Variedades cítricas brasileiras.** Jaboticabal : FUNEP, 1995. 228p.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética.** Brasília : Embrapa-Cenargen, 1995. 220p.
- FROST, H.B.; SOOST, R.K. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J. (Ed.). **The citrus industry.** Berkeley : University of California Press, 1968. v.2, p.290-324.
- GOGORCENA, Y.; ORTIZ, J.M. Characterization of sour orange (*Citrus aurantium*) cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, v.48, n.3, p.275-284, 1989.
- GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross; mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, Bethesda, v.137, p.1121-1137, 1994.
- INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES (Roma, Itália). **Descriptors for *Citrus*.** Roma, 1988. 27p.
- KHAN, I.A.; ROOSE, M.L. Frequency and characteristics of nucellar and zygotic seedlings in three cultivars of trifoliolate orange. **American Society for Horticultural Science Journal**, Alexandria, v.113, n.1, p.105-110, 1988.
- MACHADO, M.A.; COLETTA FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; POMPEU JÚNIOR, J. Genetic relationship of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. **Euphytica**, Dordrecht, v.92, p.321-326, 1996.
- MOREIRA, S.; GURGEL, J.T.A.; ARRUDA, L.F. Poliembriônia em citrus. **Bragantia**, Campinas, v.7, n.3, p.69-106, 1947.
- MURRAY, M.G; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.8, p.4321-4325, 1980.
- ORTIZ, J.M.; TADEO, J.L.; FORNER, J.B. Distinction between hybrid and nucellar citrus trees by analysis of their biochemical compounds. **International Society of Citriculture Proceedings**, Riverside, v.1, p.4-7, 1981.
- ROOSE, M.L.; TRAUGH, S.N. Identification and performance of *Citrus* trees on nucellar and zygotic rootstocks. **American Society for Horticultural Science Journal**, Alexandria, v.113, n.1, p.100-105, 1988.
- SAKAMOTO, K.; INOVE, A.; NAKATANI, M.; KOZUKA, H.; OHTA, H.; OSAJIMA, Y. Identification of hybrid and nucellar seedlings at the seedling stage by leaf oil compounds. **Nippon Nogeikagaku Kaishi**, Tokyo, v.71, n.12, p.1279-1282, 1997.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** New York : Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. não paginado.

- SCHARTZ, G. FAPESP faz investimento em cítricos. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 10 de out. de 1997. Caderno Folha Dinheiro, p.12.
- SOARES FILHO, W. dos S.; VILARINHOS, A.D.; CUNHA SOBRINHO, A.P. da; OLIVEIRA, A.A.R. de; SOUZA, A. da S.; CRUZ, J.L.; MORAIS, L.S.; CASTRO NETO, M.T. de; GUERRA FILHO, M. dos S.; CUNHA, M.A.P. da; PASSOS, O.S.; MEISSNER FILHO, P.E.; OLIVEIRA, R.P. **Citrus breeding program at Embrapa-CNPMPF**: development of hybrids. Cruz das Almas : Embrapa-CNPMPF, 1997. 17p. (Embrapa-CNPMPF. Documentos, 74).
- TEICH, A.H.; SPIEGEL-ROY, P. Differentiation between nucellar and zygotic citrus seedlings by leaf shape. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.42, p.314-315, 1972.
- WEBBER, H.J. Variations in citrus seedlings and their relation to rootstock selection. **Hilgardia**, Oakland, v.7, p.1-79, 1932.
- WICKERT, E. **Protocolo para preparação de meios de cultura e resgate de embriões de tangerina**. Porto Alegre : Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998. 7p.