

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

**APARECIDO DA SILVA JÚNIOR**

**“Obtenção de plantas autotetraplóides de variedades de porta-enxertos de citros”**

**PIRACICABA - SP**

**2008**

**APARECIDO DA SILVA JÚNIOR**  
**Engenheiro Agrônomo**

**Obtenção de plantas autotetraplóides de variedades de porta-enxertos de citros**

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente.

Orientador: Dr. Rodrigo Rocha Latado

**PIRACICABA - SP**

**2008**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
**Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP**

Silva Junior, Aparecido da

Obtenção de plantas autotetraplóides de variedades de porta-enxertos de citros / Aparecido da Silva Junior; orientador Rodrigo Rocha Latado. - - Piracicaba, 2008.

98 f. : fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Alcalóides 2. Cultura de tecidos vegetais 3. Fisiologia vegetal  
4. Microscopia 5. Recursos genéticos vegetais I. Título

CDU 634.32:575.854

À minha mãe Sônia Lúcia dos Santos da Silva, à minha irmã Jackeline Thaís da Silva e meu irmão Rafael Henrique da Silva.

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

### **Agradeço:**

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), da Universidade de São Paulo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Centro APTA Citros Sylvio Moreira / IAC, por possibilitar o desenvolvimento de meu projeto de dissertação.

Ao Dr. Rodrigo Rocha Latado, pela orientação durante o desenvolvimento de meu projeto.

Ao Prof. Dr. Pedro César dos Santos, pelo auxílio com as análises estatísticas

Ao Prof. Dr. Augusto Tulmann Neto, pelo auxílio durante o desenvolvimento de meu projeto.

Aos colegas de laboratório Daniela, Thiago, Mariana, Raquel C., Juliana B., Carolina, Rafael, Fernanda, Keli, Amélia, Renata pelo bom convívio durante a execução do trabalho e o fundamental auxílio nas atividades laboratoriais.

Aos colegas do CENA/USP.

A todos os pesquisadores do Centro APTA Citros Sylvio Moreira / IAC.

Aos funcionários do CENA/USP que auxiliaram na execução das atividades acadêmicas e realização da dissertação.

À Profa. Dr. Adriana P. Martinelli Rodriguez que possibilitou a utilização do laboratório e a realização das avaliações de microscopia.

À Mônica Lanzoni Rossi pelo auxílio nas avaliações de microscopia.

Ao Prof. Dr. Francisco André Ossamu Tanaka e Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima, pelo auxílio no Núcleo de Apoio à Pesquisa em microscopia eletrônica aplicada à pesquisa agropecuária (NAP/MEPA).

**“Eu não Conheço a chave para o sucesso, mas a chave do fracasso é tentar agradar a todos”. (Bill Cosby)**

## RESUMO

SILVA JÚNIOR, A. **Obtenção de plantas autotetraplóides de variedades de porta-enxertos de citros.** 2008. 99 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

A citricultura brasileira destaca-se como a de maior expressão em nível mundial, com cerca de 27,9% da produção mundial de laranjas e 59% da produção global de suco concentrado congelado de laranja. No entanto, apresenta uma vulnerabilidade que é o predomínio de uma única espécie de porta-enxerto, o limão 'Cravo', com aproximadamente 85% das plantas cítricas plantadas sobre ele. Assim, uma maior diversificação dos porta-enxertos é necessária mas isto depende também da obtenção e da disponibilização de variedades superiores ao limão 'Cravo'. O porta-enxerto é de fundamental importância na formação da muda cítrica, visto que ele interfere em vários aspectos da planta enxertada, dentre eles o vigor da copa e o tamanho das plantas. Atualmente, devido ao surgimento de novas doenças e a necessidade de maximização dos recursos alocados na propriedade citrícola, tem sido utilizado o plantio de pomares mais adensados, com conseqüentemente aumento no interesse da produção de plantas com menor porte. Uma das possibilidades de se obter plantas de porte baixo é por meio do uso de porta-enxertos ananizantes ou semi-ananizantes, sendo que alguns autores já verificaram que plantas autotetraplóides, quando usadas como porta-enxertos, induzem à formação de plantas de porte baixo. O objetivo inicial deste trabalho foi obter e identificar plantas autopoliplóides de limão 'Cravo', tangerinas 'Cleópatra' e 'Sunki', utilizando-se o método de cultivo *in vitro* de segmentos de epicótilo temporariamente em meio de cultura contendo colchicina, seguido de regeneração das brotações em meio sem o alcalóide. A colchicina causou toxidez aos explantes, nos diversos tempos de cultivo e concentrações testadas. Várias plantas foram obtidas e dentre estas, 27 foram selecionadas por possuir características morfológicas semelhantes à plantas poliplóides. A seguir, foram realizados experimentos com seis plantas selecionadas (duas de cada espécie) visando confirmar a ploidia e a origem nucelar, além de caracterizar a morfologia das folhas, a densidade estomática e alguns parâmetros fisiológicos. Dentre as seis plantas, apenas quatro foram confirmadas como sendo autotetraplóides pelo método de citometria de fluxo. Estas, geralmente apresentaram folhas com comprimento significativamente menor, maior espessura do limbo foliar e menor densidade estomática nas folhas. Todas as seis plantas apresentaram alguma modificação

em parâmetros fisiológicos, mas ainda não se pode determinar se estas modificações poderão afetar as taxas de crescimento.

Palavras-chave: citros, autotetraplóide, porta-enxerto, cultura de tecido, colchicina.

## ABSTRACT

SILVA JÚNIOR, A. **Obtention of autotetraploids plants of varieties of rootstocks of *Citrus***. 2008. 99 f. Dissertation (Master) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

The Brazilian citriculture stands out as the greatest expression worldwide, with about 27.9% of world production of oranges and 59% of global production of frozen orange juice concentrate. However, it presents a vulnerability that is the predominance of a single species of rootstock, the 'Cravo' lemon, with approximately 85% of citrus planted on it. Thus, greater diversification of rootstocks is necessary, which also depends on obtaining and provision of superior kind of lemon 'Cravo'. The rootstock is of fundamental importance in shaping the citrus scion, since it interferes with various aspects of graft, such as the vigour of the graft and plant size. Currently, due the appearance of new diseases and the need to maximize resources allocated in the citrus farm, more dense citrus orchards have been used, increasing the interest in the production of smaller plants. One of the possibilities of obtaining plants of small size is through the use of dwarf or semi-dwarf rootstocks, and some authors have found that plants autotetraploids, when used as rootstock, induce the formation of small-sized plants. The initial objective of this study was to obtain and identify plants autoploiploids of 'Cravo' lemon, 'Cleopatra' and 'Sunki' tangerines, using the method of *in vitro* culture of segments of epicotyl temporarily in the culture medium containing colchicine, followed by shoots regeneration in medium without the alkaloid. The colchicine caused toxicity in explants, at the different times of cultivation and concentrations tested. Several plants were obtained and among these, 27 were selected for morphological characteristics similar to polyploid plants. Afterwards, trials were conducted with six selected plants (two of each kind) to confirm the nucelar ploidy origin, and to characterize the morphology of the leaves, stomatal density and some physiological parameters. Among the six plants, only four were confirmed as autotetraploids by method of flow cytometry. These, generally presented leaves with small length, greater thickness of the leaf lamina and lower stomatal density in leaves. All six plants showed some change in physiological parameters, but data could not determine whether these changes could affect the plants growth rates.

Keywords: *citrus*, autotetraploid, rootstock, tissue culture, colchicine

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Histogramas obtidos por análises de citometria de fluxo de suspensões nucleares de plantas poliplóides e dos controles. A – tangerinas ‘Sunki’ controle e planta 2; B – tangerina ‘Sunki’ planta 1; C – tangerinas ‘Cleópatra’ controle e planta 1, D – tangerina ‘Cleópatra’ planta 2; E – Limões ‘Cravo’ controle e planta 1..... 63
- Figura 2. Folhas de plantas poliplóides e dos controles. A) Tangerina ‘Sunki’ controle (C), planta 1 e planta 2; B) Limão ‘Cravo’ controle (C), planta 1 e planta 2; C) Tangerina ‘Cleópatra’ controle (C), planta 1 e planta 2. .... 67
- Figura 3. Imagens de corte transversal de lâmina foliar de plantas poliplóides e dos controles: a - tangerina ‘Cleópatra’ controle; b - planta 1 e c - planta 2; d - limão ‘Cravo’ controle; e - planta 1 e f - planta 2; g - tangerina ‘Sunki’ controle; h - planta 1 e i - planta 2. pp -parênquima paliçádico e as setas, indicam o espaço intercelular do parênquima lacunoso. .... 71
- Figura 4. Imagens da superfície foliar contendo estômatos, de plantas poliplóides e dos controles: a - tangerina ‘Cleópatra’ controle; b - planta 1 e c - planta 2; d - limão ‘Cravo’ controle; e - planta 1 e f - planta 2; g - tangerina ‘Sunki’ controle; h - planta 1 e i - planta 2. .... 74
- Figura 5. Gel de poliacrilamida (5%) denaturante contendo o padrão de bandamento resultante da amplificação com primers F2P5 e F2P6 de TRAP’s. Amostras: 1- limão ‘Cravo’ controle; 2- planta 1; 3- planta 2; 4- tangerina ‘Sunki’ controle; 5- planta 1; 6- planta 2; 7- tangerina ‘Cleópatra’ controle; 8- planta 1 e 9- planta 2. .... 77
- Figura 6. Gel de poliacrilamida (5%) denaturante contendo o padrão de bandamento resultante da amplificação com primers F2P5 de TRAP’s. Amostras: P- tangerina ‘Sunki’ controle; amostras das plantas 1, 2, 11, 13 e 14. Setas indicam região com polimorfismo de DNA. .... 86
- Figura 7. Gel de poliacrilamida (5%) denaturante contendo o padrão de bandamento resultante da amplificação com primers F2P4 de TRAP’s. Amostras: P- limão ‘Cravo’ controle; amostras das plantas 1 a 19. Setas indicam região com polimorfismo de DNA. .... 87

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genótipos utilizados nos experimentos de caracterização morfológica, fisiológica e molecular e os seus respectivos controles diplóides. ....	39
Tabela 2 - Genótipos utilizados no experimento de avaliação de densidade estomática e os respectivos controles diplóides e tetraplóides. ....	49
Tabela 3 - Número médio de brotações adventícias obtidas por segmento de epicótilo, em função dos diversos tempos de cultivo e em diversas concentrações de colchicina adicionadas ao meio de cultivo, em variedades de porta-enxertos de citros. Análise estatística considerando apenas um fator: tratamento .....	51
Tabela 4 - Porcentagem de explantes responsivos, em função dos diversos tempos de cultivo e em diversas concentrações de colchicina adicionadas ao meio de cultivo, em variedades de porta-enxertos de citros.....	53
Tabela 5 - Valores de teste F e coeficiente de variação para os fatores: tempo de cultivo, concentrações de colchicina e a interação tempo x concentração, em análise fatorial. Dados de número médio de brotações adventícias obtidas por segmento de epicótilo, em função dos diversos tempos de cultivo e em diversas concentrações de colchicina adicionadas ao meio de cultivo. ....	56
Tabela 6 - Efeito da concentração de colchicina e tempo de cultivo, na regeneração de brotações adventícias de tangerina ‘Sunki’, a partir de segmentos de epicótilo. Análise estatística considerando dois fatores: tempo e concentração de colchicina. ....	58
Tabela 7 - Efeito da concentração de colchicina e tempo de cultivo, na regeneração de brotações adventícias de limão ‘Cravo’ Santa Bárbara, a partir de segmentos de epicótilo. Análise estatística considerando dois fatores: tempo e concentração de colchicina. ....	58
Tabela 8 - Efeito da concentração de colchicina e tempo de cultivo, na regeneração de brotações adventícias de limão ‘Cravo’ Limeira, a partir de segmentos de epicótilo. Análise estatística considerando dois fatores: tempo e concentração de colchicina. ....	58
Tabela 9 - Efeito da concentração de colchicina e tempo de cultivo, na regeneração de brotações adventícias de tangerina ‘Cleópatra’, a partir de segmentos de epicótilo. Análise estatística considerando dois fatores: tempo e concentração de colchicina. ....	59

Tabela 10 – Leituras de suspensões celulares de folhas plantas poliplóides e dos controles, coradas com o fluorocromo DAPI e avaliadas por citometria de fluxo.....	61
Tabela 11 – Médias de comprimento, largura, relação comprimento/largura e espessura do limbo foliar, de plantas poliplóides e dos controles. ....	66
Tabela 12 - Médias de comprimento, largura, relação comprimento/largura e espessura de pecíolo, de plantas poliplóides e dos controles.....	69
Tabela 13 - Médias de densidade estomática, comprimento e largura das células-guarda dos estômatos de plantas poliplóides de citros e dos controles. ....	73
Tabela 14 - Médias da taxa de assimilação de CO <sub>2</sub> por área de folha (A), taxa de assimilação de CO <sub>2</sub> por massa seca de folha (A'), condutância estomática (gs), concentração intercelular de CO <sub>2</sub> (C <sub>i</sub> ), transpiração (E), eficiência de uso da água (EUA), eficiência quântica potencial do fotossistema II (F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub> ), eficiência quântica efetiva do fotossistema II (ΔF/F <sub>m</sub> '), coeficiente de extinção fotoquímica da fluorescência (qP), coeficiente de extinção não-fotoquímica da fluorescência (NPQ), transporte aparente de elétrons (ETR) e massa específica de plantas poliplóides de citros e dos controles.....	79
Tabela 15 – Médias dos teores de clorofila a, clorofila b, clorofila total e relação entre clorofila a/b de plantas poliplóides de citros e dos controles. ....	81
Tabela 16 - Médias de densidade estomática de plantas poliplóides putativas selecionadas por características morfológicas e dos controles. ....	84

## LISTA DE SÍMBOLOS

- A - taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> por área de folha ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )  
A' - taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> por massa seca de folha ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{s}^{-1}$ )  
gs - condutância estomática ( $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )  
Ci - concentração intercelular de CO<sub>2</sub> ( $\mu\text{L L}^{-1}$ )  
E - transpiração ( $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )  
EUA - eficiência de uso da água  
Fv/Fm - eficiência quântica potencial do fotossistema II  
 $\Delta F/Fm'$  - eficiência quântica efetiva do fotossistema II  
qP - coeficiente de extinção fotoquímica da fluorescência  
NPQ - coeficiente de extinção não-fotoquímica da fluorescência  
ETR - transporte aparente de elétrons ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1	Aspectos gerais do gênero Citrus.....	17
2.2	Aspectos econômicos dos Citros.....	17
2.3	Variedades de porta-enxerto de Citros.....	19
2.4	Melhoramento Genético de Citros.....	24
2.5	Poliploidia em plantas.....	25
2.6	Obtenção de poliplóides em citros.....	27
2.7	Identificação e caracterização de plantas poliplóides de citros.....	30
3	OBJETIVOS.....	33
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1	Material vegetal.....	34
4.2	Métodos.....	34
4.2.1	Obtenção de plantas a partir do cultivo <i>in vitro</i> de segmentos de epicótilo, em meio contendo colchicina.....	34
4.2.2	Seleção de plantas poliplóides putativas, em função de características morfológicas.....	37
4.2.3	Confirmação da ploidia de seis plantas poliplóides putativas por citometria de fluxo.....	38
4.2.4	Caracterização morfológica, molecular e fisiológica de seis plantas com ploidia identificada.....	39
4.2.5	Experimentos adicionais.....	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1	Obtenção de plantas a partir do cultivo <i>in vitro</i> de segmentos de epicótilo, em meio contendo colchicina.....	51
5.1.1	Efeito do cultivo em meio contendo colchicina.....	51
5.1.2	Microenxertia <i>in vitro</i> e cultivo das plantas até a aclimatização.....	59
5.2	Seleção de plantas poliplóides putativas, em função de características morfológicas.....	60

5.3	Confirmação da ploidia de seis plantas poliplóides putativas por citometria de fluxo.....	61
5.4	Caracterização morfológica, molecular e fisiológica de seis plantas com ploidia identificada.....	65
5.4.1	Caracterização morfológica do limbo foliar e do pecíolo de plantas.....	65
5.4.2	Caracterização da estrutura do limbo foliar, por meio de microscopia.....	70
5.4.3	Avaliação da densidade estomática em folhas e tamanho das células-guarda dos estômatos.....	72
5.4.4	Confirmação da natureza nucelar das plantas poliplóides com uso de marcadores moleculares.....	75
5.4.5	Caracterização fisiológica.....	78
5.5	Experimentos adicionais.....	83
5.5.1	Avaliação de densidade estomática, de outras plantas poliplóides putativas.....	83
5.5.2	Estimativa da porcentagem de plantas nucleares, obtidas de sementes germinadas <i>in vitro</i> de variedades de porta-enxertos, pelo método de marcadores moleculares TRAP's.....	85
6	CONCLUSÕES.....	89
	REFERÊNCIAS.....	90

## 1 INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira destaca-se como a de maior expressão em nível mundial, com uma população de plantas da ordem de 270 milhões, distribuída em todos os Estados do País, numa área superior a 900 mil ha. A maior parte, cerca de 800 mil ha, é ocupada por laranjeiras doces [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. Com 30% da produção mundial de laranjeiras doces e 59% da produção global de suco concentrado congelado de laranja, o sistema agroindustrial citrícola nacional movimentava aproximadamente R\$ 9 bilhões anuais, gerando em torno de 400 mil empregos diretos e indiretos (NEVES; JANK, 2008).

Limitações devido à presença de alta heterozigosidade, esterilidade de pólen e óvulos, incompatibilidade sexual, sementes poliembriônicas, baixo vigor de híbridos sexuais e fase juvenil longa dificultam e, às vezes, até impedem o melhoramento de porta-enxertos de citros via cruzamentos controlados (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990).

Atualmente pode-se observar uma vulnerabilidade muito grande do parque citrícola brasileiro devido ao predomínio do limão 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck) como porta-enxerto, pois cerca de 85% das plantas cítricas estão plantadas sobre este porta-enxerto, tornando urgente iniciar um programa de diversificação de porta-enxertos. Essa condição de risco é crítica em razão do surgimento de diversas doenças que têm limitado a cultura dos citros. Como exemplo pode ser citado o aparecimento da 'Morte Súbita dos Citros' (MSC), nas regiões norte do Estado de São Paulo e sul do triângulo mineiro, doença esta que ataca plantas cítricas plantadas sobre o limão 'Cravo' (SOARES FILHO et al., 2007).

Esta pressão exercida pelas novas doenças e pragas, associada à necessidade da maximização dos recursos alocados, dentre eles o uso mais intensivo das áreas agricultáveis

disponíveis e as reduções de custos de produção, ocasionou o surgimento de uma nova tendência da citricultura Brasileira, a opção por plantios de pomares mais adensados (POMPEU JUNIOR, 2001). O cultivo em pomares adensados requer a utilização de plantas com menor porte mas mantendo uma alta eficiência produtiva, sob pena de ocorrer a necessidade da utilização periódica de podas. Uma das possibilidades de se produzir plantas com menor porte é com o uso de porta-enxertos ananícantes ou semi-ananícantes (POMPEU JUNIOR, 2001).

O cultivo de plantas cítricas de porte menor resulta em vantagens, sendo que as principais são o aumento da eficiência de inspeção e de controle de pragas e doenças (pela melhor aplicação de defensivos) e a redução dos custos de colheita e, conseqüentemente, de produção (POMPEU JUNIOR, 2001).

No entanto, para a diversificação do uso de porta-enxertos de citros no Brasil é necessária a obtenção e a disponibilização de materiais (variedades) agronomicamente semelhantes ou superiores ao limão ‘Cravo’, sem o que não será observada a adoção destas novas variedades.

Devido a estes fatos citados, justifica-se realizar trabalhos de melhoramento de variedades de porta-enxerto de citros no Brasil com o objetivo de se obter variedades com características superiores, o que poderá resultar na diversificação de porta-enxertos.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Aspectos gerais do gênero Citrus**

O gênero Citrus e outros gêneros relacionados à subfamília Aurantioideae, família Rutaceae, são nativos da região sudeste do continente asiático (SWINGLE; REECE, 1967; SOOST; CAMERON, 1975). O número básico de cromossomos é  $x = 9$ , sendo a diploidia ( $2n = 2x = 18$ ) a sua condição mais freqüente (MOREIRA; PIO, 1991).

As plantas deste gênero geralmente apresentam plantas de porte médio (arbóreo/arbustivo), flores brancas e aromáticas e frutos contendo vesículas preenchidas por um suco de grande interesse comercial (ARAÚJO et al., 2005).

As espécies do gênero Citrus geralmente reproduzem-se sexualmente, por meio de autopolinização e fecundação cruzada, e assexuadamente, por meio de apomixia nucelar (MACHADO et al., 2005).

### **2.2 Aspectos econômicos dos citros**

A produção mundial de citros em 2006 foi de aproximadamente 108 milhões de toneladas, sendo o Brasil responsável por 27,9% da produção mundial de laranja. O Estado de São Paulo é atualmente o maior produtor Brasileiro de laranja, produzindo 18 milhões de toneladas de que corresponde 80,4% da produção total de laranja do país (FAO, 2008).

O sistema agroindustrial citrícola movimenta R\$ 9 bilhões por ano e gera mais de 400 mil empregos diretos e indiretos. Inovações em pesquisa, tecnologia e logística estão na base da eficiência e liderança do Brasil. O país exportou em 2006, US\$ 1,5 bilhão em suco de laranja, o

que representa a fatia de 82% do mercado mundial, cujo consumo cresce a taxa de 2% a 4% ao ano (NEVES et al., 2007).

Nos últimos anos, a citricultura no Estado de São Paulo apresentou notável desenvolvimento graças à adoção de novas tecnologias na condução dos pomares, pela utilização de mudas de melhor qualidade e de novos materiais genéticos, resultando assim em maiores índices de produtividade. Atualmente, a produção de citros está localizada em praticamente todo o Estado, desde o sul até o norte, que junto com a região do triângulo mineiro, formam o “cinturão citrícola”. Nas regiões norte e noroeste do Estado de SP concentram-se a maior produção, com 45% do total, mas com tendência para a perda de participação, dadas as fortes pressões de doenças e da concorrência com a cultura da cana-de-açúcar (NEVES; LOPES, 2005).

Entre 2001 e 2005, a área de laranja na região sudeste foi reduzida em 2%, e em 9% na região norte. O deslocamento da citricultura para a região sudoeste é uma alternativa encontrada para reduzir a pressão de doenças como a MSC e clorose variegada dos citros (CVC), cuja proliferação tornou o controle fitossanitário oneroso e dependente da alta tecnologia ou, em última instância, causando danos irreversíveis, como a erradicação de pomares. Outra doença mais recente, o *huanglongbing* (HLB), já se espalhou por mais de 105 municípios paulistas, três anos após a descoberta dos primeiros focos no município de Araraquara (SP), o que representa um quarto do cinturão citrícola (NEVES et al., 2007).

Desde 2000, a área plantada permaneceu praticamente a mesma no Estado de São Paulo, ao contrário da produtividade, que nos últimos seis anos cresceu 21%. Os pomares mais novos são os grandes responsáveis por este ganho de produtividade, em função dos seguintes fatores: maior densidade de plantio por área, variedades mais produtivas, rígido controle fitossanitário, tratos culturais mais adequados e uso de irrigação nos pomares (cerca de 15% de toda área

citricola), sendo que este último fator também contribuiu para uma menor variação entre as safras (NEVES et al., 2007).

### **2.3 Variedades de porta-enxerto de citros**

As plantas cítricas podem ser multiplicadas por sementes (via sexual), por estaquia e enxertia (via assexual), sendo que a forma mais utilizada comercialmente no Brasil é a enxertia (CARVALHO et al., 2005).

O porta-enxerto é de fundamental importância na formação da muda cítrica, visto que ele pode interferir no desenvolvimento e vigor da copa, na precocidade de produção, na quantidade e na qualidade da produção, no período de maturação dos frutos, na resistência à pragas e doenças, na capacidade de adaptação da planta às condições edafoclimáticas desfavoráveis, preservando as características fundamentais das copas desejadas, dentre outras (POMPEU JUNIOR, 2005). Para Wutscher (1991), são quatro as razões principais para o uso de plantas cítricas enxertadas: a) obter plantas com frutificação precoce ou a supressão de juvenilidade; b) obter plantas de tamanho uniforme; c) facilitar o controle da produção e da qualidade de fruto e d) manter a tolerância aos fatores bióticos e abióticos.

O vigor da copa e conseqüentemente o tamanho das plantas cítricas, estão relacionados diretamente ao porta-enxerto utilizado. No passado, buscava-se porta-enxertos que propiciassem maior tamanho de copa e, desta forma, maior produtividade por planta. No entanto, o surgimento das novas tendências da citricultura, incluindo a opção por plantios mais adensados, causou o aparecimento de uma nova demanda, a busca de porta-enxertos que produzam plantas com menor porte, mas mantendo uma alta eficiência produtiva (POMPEU JUNIOR, 2001).

Uma das possibilidades de se obter plantas de porte baixo é por meio do uso de porta-enxertos ananicanos ou semi-ananicanos, sendo que algumas seleções ou híbridos de trifoliatas apresentam esta característica naturalmente (POMPEU JUNIOR, 2001).

Lee (1990), observou que plantas autotetraplóides de citros, quando usadas como porta-enxertos, também induziam a formação de plantas anãs ou semi-anãs. O mesmo fato foi observado por Grosser et al. (2000) e Grosser; Gmitter Júnior (2005), mas em estudos com plantas híbridas somáticas alotetraplóides.

Plantas cítricas com menor porte também podem ser obtidas utilizando-se a técnica de inoculação com viróides ananicanos. A indução de porte baixo em plantas cítricas, pela ação de agentes transmissíveis, foi inicialmente observada na Austrália (ROISTACHER, 1994). Em vários casos, os pesquisadores concluíram que o agente transmissor era o VEC (Viróide do exocorte do citros). Desde então, a indução de porte baixo por estes agentes já foi relatada em vários países (POLIZZI et al., 1994; PÉREZ et al., 1994; SEMANCIK et al., 2002; COHEN, 1974; STUCHI et al., 1998; VERNIÈRE et al., 2004, 2006; STUCHI et al., 2007) e comercialmente recomendada na Austrália e Israel (ASHKENAZITA; OREN, 1989; BAR- JOSEPH, 1993; BROADBENT et al., 1994).

No entanto, existem algumas restrições para a utilização desta técnica. As principais seriam a indução de maior susceptibilidade das frutas ao armazenamento ao frio, uma potencial redução da produtividade por planta; a falta de conhecimento sobre a patogenicidade dos viróides em outras variedades cítricas; a possível associação de viróides com doenças ainda não identificadas, o risco da distribuição a outras culturas, de viróides com potencial mais destrutivo (ROISTACHER, 1994); e a distribuição dos viróides em outros pomares devido à transmissão mecânica por meio de podas e colheitas (BARBOSA et al., 2005).

No Brasil Stuchi et al. (2007), avaliaram vários isolados de viróides do exocorte inoculados em plantas de pomeleiro e observaram reduções drásticas no tamanho das plantas e na produção média por planta, mas não na eficiência produtiva por volume de copa e nem na qualidade dos frutos.

Podas mecânicas ou manuais também podem ser utilizadas para o controle do tamanho de plantas cítricas e para melhorar a qualidade de frutos, mas os seus efeitos na produtividade das plantas são inconsistentes. Vários trabalhos demonstraram a ocorrência de perdas de produtividade no primeiro ano ou nas primeiras safras após a realização da poda, seguido de aumento nos anos subseqüentes (FUCIK, 1977; BEVINGTON; BACON, 1976; WHITNEY et al., 1983; MORALES et al., 2000). No entanto, outros autores relataram ter realizado podas sem a perda de produção mesmo na primeira safra (IWAGAKI, 1981; RACITI et al., 1981; EL-ZEFTAWI, 1976).

Além da questão envolvendo a perda de produção após a realização da poda, outras desvantagens do uso das podas são: o aumento nos custos anuais de produção e a necessidade de maiores investimentos para a aquisição de maquinário apropriado. Isto sem falar da elevação da quantidade de brotos vegetativos, emitidos pelas plantas após sofrerem podas mais drásticas.

Segundo Pompeu Junior (2001), plantas cítricas de menor altura permitem maior eficiência nas inspeções sanitárias e na aplicação de defensivos, o que resulta na redução de custos e numa menor agressão ao meio ambiente. Outras vantagens seriam a maior facilidade e segurança na colheita dos frutos, o que também resulta em menores custos de produção (POMPEU JUNIOR, 2001).

O porta-enxerto de citros mais utilizado nos plantios comerciais brasileiros é o limão 'Cravo', em virtude de suas boas qualidades agronômicas. A evolução do número de plantas de variedades de porta-enxertos produzidas nos viveiros de São Paulo nos anos de 2000 a 2003

demonstrou um incremento no seu uso até o ano de 2002 (2000 - 28,5% do total; 2001 - 60,5% e 2002 - 76,8%). A partir do ano de 2003, observou-se uma redução drástica, caindo para 48,4% do total e um incremento no uso da tangerina 'Cleópatra' e do citrumelo 'Swingle' (NEVES; LOPES, 2005), possivelmente devido ao fato de se acreditar que estes dois porta-enxertos são tolerantes à Morte Súbita dos Citros (MSC) (BASSANEZI et al., 2003).

Como porta-enxerto, o limão 'Cravo' apresenta precocidade na formação das mudas, compatibilidade com todas as variedades de copa, alta produção, resistência à seca e tolerância à tristeza. No entanto, apresenta alta suscetibilidade ao declínio e à MSC, o que tem causado a eliminação de milhões de plantas cítricas por ano no Brasil (POMPEU JUNIOR, 2005). De acordo com Pompeu Junior (1991), as plantas de citros enxertadas sobre o limão 'Cravo' apresentam tamanho mediano, o que resulta em maiores custos para a realização dos tratamentos culturais e para a colheita manual de frutos, em comparação com as trifoliatas, por exemplo, que geralmente são menores.

A tangerina 'Cleópatra' é uma das tangerinas mais estudadas em todo o mundo e, no Brasil, vem sendo utilizada a mais de 50 anos como porta-enxerto com relativo sucesso. Apresenta tolerância aos vírus da tristeza, do exocorte, da xiloporose, ao declínio e à MSC, bem como apresenta média resistência à gomose de *Phytophthora*. No entanto, não é resistente ao nematóide dos citros e apresenta outras limitações, tais como: apresentar início de produção mais tardiamente do que plantas enxertadas sobre limão 'Cravo' e citrumelo 'Swingle', produzir plantas com porte mais elevado e maior suscetibilidade à seca. Com relação à produtividade, quando plantada em solos argilosos, induz produções de frutos próximas ou superiores às obtidas sobre o limão 'Cravo' (POMPEU JUNIOR, 1991, 2005).

A presença no Brasil da tangerina 'Sunki' como porta-enxerto de citros, começou a ser registrada em 1985, quando participou de 0,2% das mudas presentes nos viveiros, motivada pela

sua resistência ao declínio e por induzir produções de frutos geralmente superiores às proporcionadas pela tangerina ‘Cleópatra’. A constatação de que as plantas enxertadas sobre este porta-enxerto não são afetadas pela MSC fez com que a sua presença nos viveiros aumentasse para 5,1%, em 2002 e 7,1%, em 2003 (POMPEU JUNIOR, 2005). A Sunki também é tolerante ao vírus da tristeza e a xiloporose, porém intolerante à exocorte. Produz plantas com o porte elevado, é suscetível à gomose de *Phytophthora*, à seca e ao frio. Porém, é tolerante ao declínio e a MSC (POMPEU JUNIOR, 2005).

Pode-se supor que o uso generalizado de apenas uma variedade de porta-enxerto para as mais diversas copas e tipos de solos e climas, como ocorre com o limão ‘Cravo’ no Brasil, não atenda adequadamente as necessidades de todas as variedades de copa, impedindo que estas manifestem todo o seu potencial produtivo. Além disso, o uso generalizado de apenas poucos porta-enxertos coloca a citricultura brasileira à mercê do surgimento de novas doenças que podem ocasionar danos severos. Como exemplo, pode ser citada a Morte Súbita dos Citros (MSC), doença que ataca algumas combinações de copa/porta-enxerto de citros suscetíveis e manifesta sintomas de amarelecimento na região logo abaixo da enxertia. A MSC representa uma ameaça potencial para a citricultura em todo país, uma vez que afeta todas as variedades comerciais de laranja doce, tangerina ‘Cravo’ e ‘Ponkan’, enxertadas sobre limão ‘Cravo’ e, até o momento, não são conhecidos clones de limão ‘Cravo’ resistentes ou tolerantes (BASSANEZI et al., 2003).

Em resumo, a diversificação do uso de porta-enxertos de citros no Brasil, passa, necessariamente, pela obtenção e disponibilização de materiais (variedades) semelhantes ou superiores ao limão ‘Cravo’, sem o que os produtores não demonstrarão interesse na sua substituição.

## 2.4 Melhoramento Genético de Citros

Os relatos indicam que os primeiros programas de melhoramento de citros foram realizados no Estado da Flórida (EUA), por Swingle e Webber, a partir de 1893 (DAVIES; ALBRIGO, 1994).

O melhoramento genético de citros tem sido utilizado de forma eficiente na busca de soluções para resolver ou minimizar problemas agrônômicos e fitossanitários. Nestes trabalhos, buscam-se novas variedades contendo características desejáveis tais como: plantas com maior produção e produtividade, maior tolerância e/ou resistência à pragas e doenças, plantas com menor porte, características morfológicas e de qualidade nutricional adequadas de plantas, frutos e de seus produtos (sucos, óleos, pectina etc...), dentre outras (MACHADO et al., 2005).

Os programas de melhoramento genético em citros podem ser divididos em duas categorias, em função dos objetivos: melhoramento de variedades de copa e de variedades de porta-enxerto (POMPEU JUNIOR, 1991).

Os programas de melhoramento de variedades de porta-enxerto dão maior ênfase a tolerância à doenças tais como: gomose de *Phytophthora*, CTV (Vírus da tristeza dos citros), declínio e nematóides; tolerância a vários fatores abióticos, tais como: baixas temperaturas, salinidade do solo, estresse hídrico e encharcamento, bem como características hortícolas desejáveis das plantas matrizes e das plantas cítricas resultantes da propagação das matrizes (plantas comerciais).

As plantas matrizes de porta-enxertos, as doadoras das sementes para a produção comercial, devem possuir fácil propagação, produzir grande quantidade de frutos, contendo grande quantidade de sementes por frutos, sementes com altas taxa de poliembrionia e bom vigor germinativo, resultando em plantas com grande vigor no viveiro. Já as plantas comerciais de

porta-enxertos, obtidas das plantas matrizes, devem possuir compatibilidade com a maioria das variedades de copa, induzir a precocidade de início de produção, boa produção, bem como induzir a produção de plantas com vigor reduzido, para facilitar a implementação e a condução de pomares adensados (POMPEU JUNIOR, 1991; POMPEU JUNIOR, 2005).

Em Cítricos, o melhoramento genético via cruzamentos controlados apresenta uma série de entraves que dificultam a sua aplicação. Dentre todas citam-se principalmente a poliembrionia, a alta heterozigosidade, auto-incompatibilidade, esterilidade e longo período de juvenilidade (GROSSER et al., 1990; GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990), o que torna os programas de melhoramento tradicionais custosos e de longa duração. Em decorrência disto, fica claro que novas técnicas, principalmente biotecnológicas, podem e devem ser utilizadas, para que os avanços ocorram mais rapidamente (ALMEIDA, 2002).

## **2.5 Poliploidia em plantas**

A poliploidia pode ser definida pelo aumento no número de conjuntos cromossômicos ou genomas de uma espécie, sendo denominadas como poliplóides àquelas plantas com três ou mais conjuntos cromossômicos completos. A poliploidia pode ser distinguida em autopoliploidia e alopoliploidia. A autopoliploidia consiste na duplicação do número de cromossomos da própria espécie, de modo que a mesma passa a ter 3, 4, 5, 6 ou mais cópias do mesmo conjunto básico de cromossomos. Já a alopoliploidia, é resultante do cruzamento de duas espécies distintas, onde posteriormente o número de cromossomos é duplicado, resultando na obtenção de indivíduos com dois ou mais genomas distintos duplicados, provenientes de diferentes espécies (WRIGHT, 1976).

Por essa razão, os alopoliplóides geralmente exibem combinações de características dos dois parentais, podendo ser mais semelhantes a um dos pais, caso ocorra dominância, sendo difícil determinar em que nível de extensão as diferenças quantitativas e qualitativas observadas são um reflexo de mecanismos genéticos ou da poliploidia em si. Sendo assim, os efeitos da poliploidização podem ser melhor avaliados em plantas autotetraplóides (SWANSON, 1957).

Cerca de 80% das angiospermas são poliplóides, evidenciando que a poliploidia tem um papel relevante na evolução de plantas superiores (LEITCH; BENNET, 1997).

A poliploidia normalmente resulta em um aumento no tamanho das células, de acordo com Anderson (1972), observando-se que células tetraplóides, geralmente têm um volume duas vezes superior e o comprimento ou a largura, 20% a 25% maiores do que o de células diplóides. Estes aumentos no tamanho das células podem ser mais facilmente detectados nas células-guarda dos estômatos (WRIGHT, 1976). Há evidências, porém, indicativas de que o tamanho de células, tecidos e órgãos nem sempre acompanham o nível de ploidia, nem é igual para todas as estruturas (MEDRI et al., 1980).

Em plantas, a poliploidia também pode induzir a um desenvolvimento fisiológico mais lento, em comparação com plantas diplóides (SWANSON, 1957; WRIGHT, 1976).

Células poliplóides vegetais podem surgir espontaneamente pela duplicação de células somáticas, que pode ocorrer em qualquer tecido ou pela fusão de gametas citologicamente não-reduzidos, durante a fase sexuada das plantas (DE WET, 1971).

Apesar das discussões ocorridas desde o início do século XX, hoje se aceita que a origem espontânea de plantas poliplóides na natureza é devida principalmente pela união de gametas não-reduzidos, ao invés da duplicação somática ou, quando isso eventualmente ocorre, é considerado como um evento raro e isolado. Casos documentados do surgimento de poliplóides somáticos são raros (SCHIFINO-WITTMANN, 2004).

De acordo com Simioni (2004), foi Winge, em 1917, quem formulou a primeira teoria sobre este assunto. Winge afirmou que os cromossomos de uma célula zigótica híbrida são quem sofrem a duplicação, dando origem a uma célula poliplóide. Com o passar do tempo, a idéia de que os poliplóides naturais surgiram pela união de gametas não-reduzidos passou a ser mais amplamente aceita, sendo atualmente consenso entre os pesquisadores.

Segundo Simioni (2004), o esperado é que as plantas poliplóides sejam superiores as plantas diplóides numa série de características. A razão para tal fato é que, como as características adaptativas são controladas por numerosos genes que estão distribuídos em vários cromossomos. No processo da evolução dos poliplóides, o efeito da poliploidia em mutações individuais pode ter pequenas conseqüências, mas coletivamente, pode dar lugar a características diferentes que estão sob controle de múltiplos genes. Além disso, o aumento do nível de poliploidia pode se constituir numa vantagem adaptativa porque pode mascarar os efeitos de mutações deletérias, já que os poliplóides em geral têm um efeito tamponante sobre estas mutações, que seriam silenciadas devido ao maior número de genomas.

Uma outra possibilidade de se obter plantas poliplóides é por meio da indução artificial de poliploidia, com uso de colchicina ou de outros agentes poliploidizantes como a oryzalina ou o ácido nitroso (SCHIFINO-WITTMANN, 2004).

## **2.6 Obtenção de poliplóides em citros**

A habilidade de porta-enxertos tetraplóides citros de produzir plantas anãs foi descrita por Lee (1990), que avaliaram como porta-enxertos várias plantas autotetraplóides de diversas espécies de *Citrus* e de *Poncirus trifoliata*.

O mesmo fato foi observado por Grosser et al. (2000), Grosser e Gmitter Junior (2005), que avaliaram vários híbridos somáticos tetraplóides diferentes como porta-enxertos. Nestes experimentos verificou-se que alguns híbridos somáticos produziram árvores tão pequenas como o *P. trifoliata* cv. Flying dragon, mas com maior produção por planta. Em outras combinações híbridas, as plantas eram iguais em tamanho ou ligeiramente maiores, mas com produções também superiores (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 2005).

Wu et al. (2005), no entanto, observaram que plantas alotetraplóides de citros possuíam um crescimento muito mais vigoroso do que plantas autotetraplóides com mesma idade. Segundo estes autores, tal fato deve estar associado à ocorrência de maior número de divisões celulares regulares nas plantas alotetraplóides, o que resultou no maior crescimento.

Segundo Soost e Cameron (1975), a maioria das plantas de citros tetraplóides foram obtidas por meio de poliploidização espontânea, em populações de *seedlings* cultivados para outros fins. Geralmente, a frequência de surgimento de plantas tetraplóides nestas populações variava entre 0,2% e 3% (SOOST, 1987; LEE et al., 1988). Além desta baixa frequência, as plantas nucleares tetraplóides obtidas por este método apresentavam juvenilidade, como seria esperado, demorando entre 5 e 10 anos para produzir frutos.

A colchicina, uma droga alcalóide extraída do açafrão e que tem a capacidade de inibir a formação do fuso mitótico em células, tem sido usada em experimentos de indução artificial de poliploidia, em células e tecidos vegetais, de diversas espécies (GRIFFITHS et al., 2002).

Ramos e plantas autotetraplóides em citros podem ser obtidas por meio do tratamento de ramos ou borbulhas com colchicina (por imersão), seguido de enxertia, como foi o trabalho de Barret (1974). Já Wakana et al. (2005), utilizaram ramos de um ano de idade para o tratamento com colchicina, mas com sobre enxertia em plantas velhas, para adiantar o período de florescimento e frutificação. Os problemas relacionados com estes métodos estão na baixa

eficiência da penetração do alcalóide nos tecidos, o que resulta numa baixa frequência de obtenção de plantas poliplóides, além de uma alta frequência de plantas contendo quimeras setoriais, que são instáveis. Sendo assim, vários ciclos de propagação vegetativa podem ser necessários para eliminar o quimerismo e obter plantas poliplóides estáveis (PEI, 1985).

A obtenção de plantas autotetraplóides em citros também pode ser conseguida associando-se à cultura de tecidos. Gmitter Junior e Ling (1991), obtiveram plantas autotetraplóides por meio do cultivo de óvulos não desenvolvidos em meio contendo 0,01% e 0,1% de colchicina. Já Wu e Mooney (2002), conseguiram obter sucesso cultivando calos em meio contendo 0,05% e 0,1% de colchicina (durante oito semanas), seguido de regeneração de plantas. Em todos estes trabalhos, a via de regeneração de plantas foi por meio de embriogênese somática.

É possível obter plantas poliplóides e evitar o quimerismo, utilizando-se do tratamento de células isoladas (protoplastos) com colchicina (YANG et al., 2006), ou pelo tratamento de explantes multicelulares, seguido de regeneração direta a partir de uma ou poucas células do explante (LATADO et al., 2007). Latado et al. (2007), relataram ter cultivado *in vitro* segmentos de epicótilo de laranja 'Pêra-de-abril' e tangor 'Murcote' na presença de colchicina, seguido da indução de regeneração de brotações adventícias via organogênese. Como resultados foram obtidas várias plantas autotetraplóides não-quiméricas.

A comprovação de que a organogênese *in vitro* em citros a partir de segmentos de epicótilo tem origem a partir de uma ou poucas células foi relatada por Almeida (2002), que realizou um estudo em laranja 'Valência' e concluiu que a organogênese ocorria de forma direta, com as brotações adventícias originando-se de células meristemáticas da zona cambial do explante.

Para os citros, a vantagem da obtenção de plantas autotetraplóides completas (não-quiméricas) utilizando-se a técnica de cultivo *in vitro* de explantes em meio contendo colchicina é que não demanda a realização de procedimentos posteriores para ampliação e estabilização de setores quiméricos. No entanto, apresenta como desvantagem o fato das plantas obtidas serem originadas de tecidos juvenis, o que resultará num maior tempo para início da fase de frutificação (média de 5 a 10 anos) (LATADO et al., 2007).

Outra técnica já bastante utilizada para se produzir plantas tetraplóides em citros é a hibridação somática, que tem a vantagem de poder obter plantas auto ou alotetraplóides, usando uma variedade única (híbridos autotetraplóides) ou pela combinação de duas variedades ou espécies distintas (híbridos alotetraplóides) (MENDES et al., 2001; CARVALHO-COSTA et al., 2003; CALIXTO et al., 2004).

## **2.7 Identificação e caracterização de plantas poliplóides de citros**

Quanto ao método utilizado para confirmar a ploidia das plantas autotetraplóides de citros, Gmitter e Ling (1991) e Wakana et al. (2005) utilizaram a contagem de número de cromossomos, ao passo que Wu e Mooney (2002), preferiram usar a análise de citometria de fluxo para identificar a ploidia das plantas, enquanto que a contagem do número cromossômico foi utilizada apenas para confirmar a natureza poliplóide. Neste último estudo, os autores afirmaram que o método de citometria de fluxo apresentou rapidez e precisão suficientes para distinguir as plantas tetraplóides das diplóides e para identificar uma planta mixoplóide, que continha setores tetraplóides e diplóides juntos.

Uma das formas mais modernas de se verificar a origem nuclear de plantas cítricas, obtidas por sementes ou por regeneração *in vitro*, é com o uso da técnica de marcadores

moleculares. Para este objetivo, diferentes marcadores podem ser usados. Dentro de marcadores moleculares dominantes e *multiloci*, há os marcadores RAPD - *Random amplified polymorphic DNA* (WILLIAMS et al., 1990) e AFLPs - *Amplified fragment length polymorphism* (VOS et al., 1995), que têm como vantagens produzir grande número de bandas por gel e não demandar o desenvolvimento prévio de *primers* específicos para as espécies. Mesmo assim, os RAPD's tem sido cada vez menos utilizados devido aos problemas relacionados a sua baixa reprodutibilidade.

Uma nova classe de marcadores moleculares dominantes e *multiloci* são os TRAP's - *Target region amplification polymorphism* (HU; VICK, 2003). Estes marcadores são baseados em PCR e avaliam polimorfismos de DNA próximos de regiões-alvo utilizando dois *primers* de aproximadamente 18 nucleotídeos. Um *primer*, chamado de fixo, é desenhado a partir de uma seqüência expressa, gerada de bancos de dados de EST's (*Expressed Sequence Tag*) e um segundo *primer*, o arbitrário, é formado por uma seqüência arbitrária rica em AT ou GC para anelar com um *intron* ou *exon*. A reação de amplificação por PCR geralmente produz fragmentos de aproximadamente 50-900 pb que podem ser separados e visualizados em géis de poliacrilamida.

Esta técnica tem sido utilizada tendo como alvos genes que governam características agrônômicas de interesse. Por isto, ela apresenta grande potencial para identificação varietal e para programas de melhoramento, por agregar as seguintes vantagens: alta reprodutibilidade, possuir a simplicidade dos marcadores RAPD e a capacidade de produzir padrão de bandamento com grande número de fragmentos, semelhantemente à da técnica de AFLP (HU; VICK, 2003).

Em várias espécies, a poliploidia está geralmente associada com aumento no volume das células do mesófilo (ROMERO-ARANDA et al., 1997), aumento na espessura das folhas (BYRNE et al., 1981; MOLIN et al., 1982; ROMERO-ARANDA et al., 1997), na quantidade de

enzimas fotossintetizantes e de pigmentos por célula (JOSEPH et al., 1981; MEYERS et al., 1982; LEECH et al., 1985), comparando-se com plantas diplóides.

Em citros, também já foi demonstrado que plantas autotetraplóides geralmente apresentam folhas com alterações típicas em relação às plantas diplóides. As principais são a maior largura e maior espessura do limbo foliar, além de coloração verde mais intensa (WU; MOONEY, 2002; WU et al., 2005; WAKANA et al., 2005; LATADO et al., 2007). Também já foi observado que a elevação da ploidia em várias espécies de citros resultou em plantas menores, com copa mais compacta, produção de frutos mais largos e com maior potencial para tolerância à seca, em comparação com os controles diplóides (BARRET, 1992).

Romero-Aranda et al. (1997), fizeram um extenso estudo sobre as características físicas de folhas e a capacidade fotossintética de plantas tetraplóides e de diplóides, de laranja 'Valência' e de limão 'Femminello', em duas condições de irradiância de luz (alta e baixa). Os autores citaram que foram observadas diversas alterações nas características físicas das folhas das plantas tetraplóides, algumas delas devidas às diferentes irradiâncias, enquanto que outras, somente pela ação da maior ploidia. Modificações também foram observadas no conteúdo de clorofila, na relação entre clorofilas a e b, assim como na taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> das plantas tetraplóides, causadas por ambos os fatores isoladamente ou em conjunto (ploidia e irradiância). A principal conclusão foi a de que o aumento na ploidia das plantas, somente resultaria em aumento da taxa fotossintética se causasse também uma redução na resistência à difusão do CO<sub>2</sub> ou um aumento na capacidade da via bioquímica da fotossíntese, por unidade de área, o que não ocorreu.

Syvertsen et al. (2000), avaliaram o crescimento de plantas (caule e raízes), relações hídricas, concentração de nutrientes nas folhas e parâmetros fisiológicos, de plantas autotetraplóides de variedades de copa de citros, sob condições de cultivo em ambiente natural e em condições de alta concentração de CO<sub>2</sub>. As principais conclusões foram de que o ambiente

contendo maior concentração de CO<sub>2</sub> não possibilitou maiores taxas de fotossíntese e de crescimento para plantas tetraplóides. Além disto, a baixa taxa de crescimento de raízes, observada nas plantas autotetraplóides, estava correlacionada com uma menor taxa de transpiração total das plantas e com a menor concentração de nitrogênio presente nas folhas (para mesma área foliar), o que pode ter determinado a característica de menor crescimento das plantas autotetraplóides, nos dois ambientes.

Garcia-Sánchez et al. (2002), compararam alguns parâmetros fisiológicos, taxa de crescimento e conteúdo de clorofilas de três híbridos somáticos alotetraplóides de citros com os seus respectivos parentais, mas em experimentos de avaliação de tolerância a salinidade do solo. Como resultados, os híbridos somáticos não apresentaram características diferenciais nas condições do experimento e nem maior tolerância à salinidade.

A densidade estomática e tamanho de células-guarda de estômatos, de folhas de híbridos somáticos tetraplóides de citros e das espécies parentais foram avaliados por Costa et al. (2004). Os autores observaram que as plantas tetraplóides apresentavam menor densidade estomática e células-guarda dos estômatos com maior tamanho. As mesmas características foram observadas por Thao et al. (2003), por meio da avaliação de plantas tetraplóides de *Alocasia*.

### **3 OBJETIVOS**

Os objetivos deste trabalho foram obter, identificar e caracterizar plantas autopoliplóides de variedades de porta-enxerto de citros utilizando o método de cultivo *in vitro* de segmentos de epicótilo temporariamente em meio contendo colchicina, seguido de regeneração de brotações em meio sem a presença do alcalóide.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Material vegetal**

Os experimentos descritos a seguir foram realizados utilizando-se as seguintes variedades de porta-enxerto: limão ‘Cravo’ seleção Santa Bárbara, limão ‘Cravo’ seleção Limeira, tangerinas ‘Cleópatra’ e ‘Sunki’, todas mantidas no Banco Ativo de Germoplasma do Centro APTA Citros Sylvio Moreira – IAC.

### **4.2 Métodos**

#### **4.2.1 Obtenção de plantas a partir do cultivo *in vitro* de segmentos de epicótilo, em meio contendo colchicina**

O método utilizado para a indução de poliploidia em variedades de citros foi por meio do cultivo *in vitro* de segmentos de epicótilos em meio contendo colchicina, seguido de regeneração de brotações adventícias em meio sem a presença do alcalóide. As brotações obtidas foram microenxertadas *in vitro* e posteriormente aclimatizadas ao meio-ambiente.

##### **4.2.1.1 Obtenção de segmentos de epicótilo *in vitro***

As sementes foram extraídas de frutos maduros, das quatro variedades citadas acima. A seguir, as sementes foram lavadas, a mucilagem foi retirada e as mesmas foram secas a temperatura ambiente.

Inicialmente, retirou-se manualmente a camada mais externa das sementes (testa). A esterilização superficial das sementes foi realizada com a imersão em solução de hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo), durante 20 minutos, seguido da lavagem, por três vezes, em água destilada autoclavada.

Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram colocadas em tubos de ensaio contendo meio MS semi-sólido (metade da concentração de sais, sem sacarose e vitaminas, acrescido com 7,0 g L<sup>-1</sup> de ágar e o pH, ajustado para 6,0).

Os tubos foram então colocados em condições de escuro, a 25 ± 1°C, durante 30-45 dias, para possibilitar a germinação das sementes e estiolamento das plântulas.

#### **4.2.1.2 Tratamento de explantes em meios contendo diferentes concentrações de colchicina e por diversos tempos de cultivo**

Para cada variedade, segmentos de epicótilo com 0,5 cm de comprimento, obtidos de plantas com 30-45 dias de idade, foram inoculados em placas de Petri contendo diferentes meios de cultivo, compostos por diferentes concentrações de colchicina (0,025, 0,05 ou 0,1 % p/v).

O meio basal utilizado era composto por sais de MT (MURASHIGUE; TUCKER, 1969), acrescido de 0,5 g L<sup>-1</sup> de extrato de malte, 0,1 g L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 50 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 2 mg L<sup>-1</sup> de benzilaminopurina (BAP), 7,0 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH, ajustado para 6,0.

Aproximadamente 1 g de colchicina foi previamente dissolvida em 5 mL de água destilada, que foi filtro-esterilizada com filtro 0,22 µm. Em seguida, a solução esterilizada foi acrescida ao meio de cultivo já autoclavado na quantidade necessária para se atingir a concentração desejada, antes da distribuição do meio nas placas de Petri.

As placas de Petri foram mantidas no escuro e em sala de crescimento ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), durante os períodos de um, dois e três dias. Após este período, os explantes foram transferidos para o mesmo meio de cultura sem a presença do alcalóide, para induzir a regeneração de brotações. Durante esta fase, as placas foram mantidas sob fotoperíodo de 16 horas de luz ( $49 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e em sala de crescimento ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), por 45 dias.

Para cada variedade e para cada tratamento (concentração e tempo de cultivo em colchicina) foram inoculados 60 segmentos de epicótilo, em delineamento inteiramente casualizado. O controle experimental foi formado por placas de Petri contendo 60 segmentos de epicótilo cultivados em meio sem colchicina, de cada variedade.

Foram realizados, três experimentos iguais e consecutivos para cada variedade, perfazendo um total de 180 segmentos de epicótilo para cada tratamento (concentração e tempo de cultivo no meio) e cada variedade.

A avaliação do efeito tóxico da colchicina nos explantes foi realizada após 45 dias de cultivo em meio sem colchicina. Para isto, foram avaliados o número de brotações regeneradas por explante e o número de explantes não-responsivos, isto é, explantes que não regeneraram nenhuma brotação. Cada explante foi considerado como uma repetição.

A porcentagem de explantes não-responsivos foi calculada dividindo-se o número de explantes não-responsivos, pelo total de explantes inoculados no tratamento. Os dados de número de brotações por explante foram transformados pela equação: raiz de  $(X + 0,5)$ , antes das análises estatísticas.

As análises estatísticas foram realizadas para cada variedade separadamente, de duas formas diferentes: 1) análise em delineamento inteiramente casualizado, considerando apenas um fator (tratamento), com a realização dos testes F e Tukey, para se comparar as médias dos

tratamentos entre si e com a média do controle e 2) análise na forma de delineamento em fatorial 3 x 3 considerando-se dois fatores: concentração de colchicina e tempo de cultivo, com a realização dos mesmos testes estatísticos. O objetivo desta última análise era verificar a existência de efeitos de concentração de colchicina, tempo de cultivo e da interação concentração x tempo.

#### **4.2.1.3 Microenxertia *in vitro***

As brotações adventícias regeneradas foram excisadas dos explantes e microenxertadas *in vitro*, em plântulas de citrumelo 'Swingle', de forma semelhante ao descrito por Peña et al. (1995).

Estas plantas microenxertadas foram mantidas em sala de crescimento ( $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e fotoperíodo de 16 horas de luz ( $49 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), por 30 a 60 dias. A seguir, as brotações desenvolvidas foram enxertadas sobre limão 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck) e mantidas durante 30 a 60 dias em câmara úmida, numa estufa, para a aclimatização das plantas.

Na etapa final, as plantas foram transferidas para estufas, sob condições de temperatura e umidade relativa não-controladas.

#### **4.2.2 Seleção de plantas poliplóides putativas, em função de características morfológicas**

Todas as plantas aclimatizadas e mantidas em estufas, obtidas de experimentos de cultivo de segmentos de epicótilo com colchicina, foram avaliadas visualmente, em busca de características morfológicas distintas das respectivas plantas-controle de cada variedade.

As características utilizadas para a seleção foram: folhas mais espessas, com a presença de glândulas de óleo mais protuberantes; folhas com formato diferente e com coloração verde mais intensa. A presença de uma ou mais característica, na mesma planta, era um indicativo da ocorrência de ploidia alterada e a planta era considerada então, como sendo uma planta poliplóide putativa.

#### **4.2.3 Confirmação da ploidia de seis plantas poliplóides putativas por citometria de fluxo**

Dentre as plantas selecionadas e consideradas como sendo poliplóides putativas, seis tiveram amostras de folhas coletadas e enviadas ao Laboratório de Citogenética e Citometria, da Universidade Federal de Viçosa (duas de limão ‘Cravo’, duas de tangerina ‘Cleópatra’ e duas de tangerina ‘Sunki’), para identificação da ploidia pelo método de citometria de fluxo. Também foram enviadas amostras de plantas-controle de cada uma das espécies. O equipamento utilizado nas análises foi o citômetro PAS II-III (Partec GmbH., Alemanha), equipado com lâmpada HBO 100 W e filtros kg1, BG 38 e CG 435.

As amostras eram compostas de três folhas jovens de cada planta. As folhas foram coletadas, lavadas em água corrente, acondicionadas em ambiente úmido e fresco (entre 4 e 15°C) até a realização das análises. De cada folha foi obtida uma suspensão nuclear, por meio de corte do limbo foliar com lâmina de bisturi, na presença de tampão do kit CyStain UV precise T-DAPI (Partec GmbH), que usa o 4-6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) como fluorocromo (corante), seguindo-se as recomendações do fabricante.

Em cada amostra (suspensão nuclear), mais de 4.000 núcleos foram avaliados e o resultado foi analisado com *software* específico, nas três repetições de cada planta. As amostras cujos coeficientes de variação (cv) se situaram acima de 5% foram descartadas. Os histogramas

gerados pelo software foram calibrados para um parâmetro (Side Scatter - SSC) e dimensionados com resolução em escala linear com 10 bits (1.024 pixels).

#### 4.2.4 Caracterização morfológica, molecular e fisiológica de seis plantas com ploidia identificada

As seis plantas selecionadas com ploidia identificada e as plantas-controle diplóides foram propagadas vegetativamente com a produção de cinco mudas enxertadas, cada. O porta-enxerto utilizado foi o limão ‘Cravo’.

As mudas foram confeccionadas em sacos contendo 4 Kg de substrato e mantidas em viveiro até quatro meses de idade, momento da realização dos experimentos de caracterização morfológica, fisiológica e molecular.

Na Tabela 1 estão descritos os genótipos utilizados nestes experimentos de caracterização e as suas respectivas ploidias, estimadas nos experimentos de citometria de fluxo.

Tabela 1 - Genótipos utilizados nos experimentos de caracterização morfológica, fisiológica e molecular e os seus respectivos controles diplóides.

Genótipo	Tratamento (concentração/tempo em colchicina)
tangerina ‘Sunki’ controle	-
tangerina ‘Sunki’ planta 1	0,05%/1 dia
tangerina ‘Sunki’ planta 2	0,05%/ *
limão ‘Cravo’ controle	-
limão ‘Cravo’ planta 1	0,05%/3dias
limão ‘Cravo’ planta 2	0,05%/3dias
tangerina ‘Cleópatra’ controle	-
tangerina ‘Cleópatra’ planta 1	0,025%/1 dia
tangerina ‘Cleópatra’ planta 2	0,05%/1 dia

\* tempo de tratamento em colchicina desconhecido

#### **4.2.4.1 Caracterização morfológica do limbo foliar e do pecíolo de plantas**

Este experimento foi realizado com os nove genótipos descritos na Tabela 1, com o uso de três plantas propagadas vegetativamente, de cada genótipo.

A caracterização morfológica destes genótipos foi realizada por meio da avaliação do comprimento, largura e espessura do limbo foliar, além do comprimento e largura dos pecíolos, de cada uma das três plantas de cada genótipo. Para tal, as medidas foram tomadas com um paquímetro digital. A relação entre comprimento e largura (razão C/L) do limbo foliar também foi calculada para cada amostra.

Antes das medições, foram destacadas de cada planta três folhas completamente expandidas, geralmente a terceira contada do ápice para base do ramo e em ramos distintos. Estas folhas compuseram as amostras a serem avaliadas.

As análises estatísticas foram realizadas separadamente para cada variedade, na seguinte forma. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, contendo sempre três tratamentos e nove repetições por tratamento (três folhas por planta e três plantas por genótipo). Os dados não foram transformados. Realizou-se primeiramente a análise de variância com o teste F, seguido do teste de Tukey, para a comparação entre as médias dos tratamentos.

#### **4.2.4.2 Caracterização da estrutura do limbo foliar, por meio de microscopia**

Este experimento foi realizado com os nove genótipos descritos na Tabela 1, com o uso apenas uma planta de cada genótipo, as plantas matrizes obtidas nos experimentos de cultura de tecidos.

Esta caracterização foi realizada a fim de verificar a existência de diferenças na estrutura do limbo foliar das plantas poliplóides, em comparação com as plantas do controle.

Para preparo das amostras, foram coletadas de cada planta, três folhas completamente expandidas, geralmente a terceira folha, contada do ápice para base do ramo e em ramos distintos. Estas folhas foram lavadas e cortadas em pedaços de 2 mm, na forma retangular.

As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky modificado [glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2%, cloreto de cálcio 5 mM em tampão de cacodilato de sódio (0,05 M, pH 7,2)], durante 4 horas, a seguir foram lavadas em tampão de cacodilato 0,1M e posteriormente fixadas por 1 hora com tetróxido de ósmio 1%, em tampão de cacodilato de sódio 0,1M. Após três lavagens com solução salina 0,9% (NaCl), foram coradas durante toda a noite, com acetato de uranila 2,5% em água, e desidratadas com séries crescentes de solução aquosa de acetona (25%, 50%, 75%) por 5 minutos, seguidas por dois tratamentos com acetona 90% (10 minutos cada) e três tratamentos com acetona 100% (20 minutos cada).

Posteriormente, os tecidos foliares sofreram o processo de infiltração com resina Spurr e acetona pura (1:3 por 4 horas, 1:2 a noite toda, 1:1 por 8 horas, resina Spurr sob agitação por 48 horas), em seguida os tecidos foliares foram incluídos em resina Spurr por 48 horas à 70°C.

Os cortes histológicos (5  $\mu$ m de espessura) foram obtidos através do micrótomo Porter Blum Sorval MT-2 e contrastados com azul de toluidina 2% em solução de bórax 1% (FEDER; O'BRIEN, 1968). A montagem das lâminas foi feita com lamínula e resina sintética (Entelan). As amostras foram observadas ao microscópio ótico Zeiss Axioscop 40 HBO 50 A/C, onde imagens foram capturadas e depois, digitalizadas.

#### 4.2.4.3 Avaliação da densidade estomática e do tamanho das células-guarda dos estômatos

Este experimento foi realizado com as nove plantas descritas na Tabela 1, com o uso apenas uma planta de cada genótipo, as plantas matrizes obtidas nos experimentos de cultura de tecidos.

Para avaliação da densidade estomática e do tamanho (largura e comprimento) das células-guarda dos estômatos, foram utilizadas folhas totalmente expandidas, geralmente da terceira folha, contada do ápice para a base do ramo e em ramos distintos.

As folhas foram lavadas e seccionadas em tiras, transferidas para solução de etanol 70%, por cinco minutos. A seguir, as tiras de folhas foram transferidas para solução de hidróxido de potássio a 5%, em temperatura próxima do ponto de fervura, durante três minutos, seguido de transferência para água destilada, à temperatura ambiente.

A epiderme abaxial foi retirada com auxílio de uma pinça e colocada na lâmina, com a face externa para abaixo. Após cobrir a amostra com a lamínula, procedeu-se a visualização num microscópio ótico Zeiss Axioscop 40 HBO 50 A/C, onde as imagens foram capturadas e depois, digitalizadas.

A avaliação da densidade estomática foi realizada com uso da objetiva de 40X, observando-se dez campos de visão por amostra. Como cada campo de visão possuía uma área de 0,046876 mm<sup>2</sup>, optou-se pela transformação dos dados originais para densidade de estômatos por mm<sup>2</sup> de folha, antes de se realizar as análises estatísticas.

O comprimento e a largura das células-guarda dos estômatos foram avaliados utilizando-se a mesma objetiva e com o auxílio do *software* AxioVision. Foram tomadas medidas de dez células-guarda, escolhidas ao acaso, das três repetições de cada planta.

As análises estatísticas foram realizadas separadamente para cada variedade, na seguinte forma. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, contendo sempre com três tratamentos, por variedade. Realizou-se primeiramente a análise de variância com o teste F, seguido do teste de Tukey, para a comparação entre as médias dos tratamentos.

#### **4.2.4.4 Identificação e confirmação da natureza nucelar das plantas poliplóides com uso de marcadores moleculares**

Estes experimentos foram realizados com os nove genótipos descritos na Tabela 1, com o uso apenas uma planta de cada genótipo, as plantas matrizes obtidas nos experimentos de cultura de tecidos.

Na primeira etapa foram realizados experimentos de escolha de *primers* de marcadores moleculares TRAP's. Nestes, foram testadas 12 combinações de *primers* (dois *primers* fixos e seis *primers* arbitrários) utilizando-se o DNA das plantas do controle. Para cada variedade foram escolhidas três combinações de *primers* que produziram padrão de bandamento contendo o maior número de bandas e que apresentavam maior nitidez.

Os *primers* fixos (genes-alvo) utilizados foram desenhados de um banco de dados de seqüência EST de citros, a partir dos genes diferencialmente expressos detectados nos trabalhos com hibridização *in silico* que apresentavam homologia ao gene da lignina.

*Primer F1* -                   sequência: 5' - ACA.GGG.CCA.AAG.GTA.AAC.ACA -3'

*Primer F2* -                   sequência: 5' - GCC.CGT.GCT.GCC.TGA.TGA.TT -3'

Os *primers* arbitrários utilizados possuem 18 pb, três nucleotídeos seletivos na sua extremidade 3', de quatro a seis nucleotídeos no centro da seqüência (rica ou em AT ou em GC), intercalada por um *intron* ou *exon*. Estes *primers* arbitrários foram desenhados de acordo com Li e Quiros (2001):

- Primer P1* -               sequência: 5' - GAC.TGC.GTA.CGA.ATT.AAT - 3'
- Primer P2* -               sequência: 5' - GAC.TGC.GTA.CGA.ATT.TGC - 3'
- Primer P3* -               sequência: 5' - GAC.TGC.GTA.CGA.ATT.GAC - 3'
- Primer P4* -               sequência: 5' - GAC.TGC.GTA.CGA.ATT.TGA - 3'
- Primer P5* -               sequência: 5' - GAC.TGC.GTA.CGA.ATT.AAC - 3'
- Primer P6* -               sequência: 5' - GAC.TGC.GTA.CGA.ATT.GCA - 3'

A extração do DNA genômico das amostras foi realizada a partir de folhas novas, mas completamente desenvolvidas, de acordo com a metodologia descrita por Machado et al. (1996), com ligeiras modificações. De cada planta retirou-se apenas uma folha para a realização dos experimentos.

As reações foram conduzidas num volume final de 12,5  $\mu\text{L}$  com os seguintes componentes: 2,0  $\mu\text{L}$  da amostra de DNA (30-50  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ ), 1,5  $\mu\text{L}$  do tampão de reação 10 X, 1,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs (5 mM), 10 nmol dos primers arbitrários e 10 nmol dos primers fixos e 1,5 U de *Taq* DNA polimerase. O programa para a amplificação dos fragmentos de DNA foi o composto por ciclo inicial de desnaturação do DNA a 94°C por 2 min. A seguir, 5 ciclos a 94°C por 45 s, 35°C por 45 s, e 72°C por 1 min, seguido de 35 ciclos a 94°C por 45 s, 50°C por 45 s, e 72°C por 1 min e uma etapa de extensão a 72°C por 7 min.

Os produtos de PCR, com tamanhos variando de 50 a 900pb, foram separados em gel de seqüenciamento de poliacrilamida denaturante a 5%. Após a reação de amplificação, 10 µL de tampão de desnaturação [10 mL de formamida, 0,001 mg de azul de bromofenol, 0,001 mg de xilenocianol e 200 µL de solução de EDTA 0,5 M pH 8,0) foram adicionados às reações e a reação foi denaturada a 94°C durante 3 minutos. Uma alíquota de 10 µL de cada reação de PCR foi aplicada no gel de poliacrilamida.

A eletroforese foi conduzida a 1.100 V. por 2 h, em cuba vertical para eletroforese tipo Sequi-Gen System (Bio Rad Corp) e o gel foi corado com o método de nitrato de prata, de acordo com Creste et al. (2001).

A confirmação da origem nucelar das plantas poliplóides foi realizada na seguinte forma: O perfil molecular de cada planta poliplóide foi comparado com o da respectiva planta-controle, nas seis combinações de *primers* de marcadores TRAP's testadas. Foram consideradas como plantas poliplóides nucleares as que possuíam padrão de bandamento idêntico ao da respectiva planta-controle, nas seis combinações de *primers*. Por outro lado, as plantas poliplóides que apresentaram diferenças no padrão de bandamento, em uma ou mais combinações de *primers*, foram consideradas como tendo origem zigótica.

#### **4.2.4.5 Caracterização fisiológica**

Este experimento foi realizado com os nove genótipos descritos na Tabela 1, com o uso das cinco plantas propagadas vegetativamente, de cada genótipo.

Para as avaliações foi escolhida, de cada planta, uma folha completamente expandida de cada planta, localizada no ramo principal.

As avaliações de trocas gasosas foram realizadas com um analisador de gases por infravermelho modelo LI-6400 (LI-COR, EUA), operando em sistema aberto. As variáveis avaliadas foram: assimilação de CO<sub>2</sub> (A), transpiração (E), condutância estomática (gs), concentração intercelular de CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>), temperatura foliar (T<sub>f</sub>), diferença de pressão de vapor entre folha e ar (DPV folha-ar), fluorescência máxima após adaptação ao escuro (F<sub>m</sub>), fluorescência máxima na presença de luz (F<sub>m</sub>' ), fluorescência variável após adaptação ao escuro (F<sub>v</sub>), coeficiente de extinção não-fotoquímica da fluorescência (NPQ) e coeficiente de extinção fotoquímica da fluorescência (qP).

A partir dessas variáveis, calculou-se a eficiência de uso da água (EUA), calculado pela razão A/E; A eficiência quântica potencial do fotossistema II (F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>), calculado pela razão F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> e a eficiência quântica efetiva do fotossistema II ( $\Delta F/F_m'$ ), calculado pela razão  $\Delta F/F_m'$  (FLEXAS et al., 2001; MACHADO et al., 2005).

Durante as avaliações, a temperatura média das folhas foi de  $29,1 \pm 1^\circ\text{C}$ , a temperatura média do ar foi de  $26,1 \pm 0,2^\circ\text{C}$  e a média do déficit de pressão de vapor do ar para a folha (DPV) foi de  $1,6 \pm 0,2$  kPa. As avaliações foram realizadas pela manhã (8 as 9:30h.), para se evitar as altas temperaturas e o alto DPV.

Em seguida, cada uma das folhas foi destacada e avaliou-se a massa específica da amostra. Para isto, com auxílio de um saca-folhas, foi extraído um disco com área de  $10\text{ cm}^2$ . Esta amostra foi seca em estufa, a  $50^\circ\text{C}$ , durante 96 horas. A seguir, os discos foliares foram pesados em balança de precisão e a massa, foi determinada. Após, a massa específica da amostra foi calculada em  $\text{g } 10\text{cm}^{-2}$ , e depois, transformada para a unidade de  $\text{g m}^{-2}$ .

O parâmetro assimilação de CO<sub>2</sub>, expresso em  $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (A'), foi então calculado, utilizando-se os dados de A (expresso em  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e da massa específica de cada amostra.

As análises estatísticas foram realizadas separadamente para cada variedade, na seguinte forma. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, contendo sempre três tratamentos e cinco repetições por tratamento (uma folha por planta e cinco plantas por genótipo). Os dados não foram transformados. Realizou-se primeiramente a análise de variância com o teste F, seguido do teste de Tukey, para a comparação das médias dos tratamentos.

Por último foi avaliado o teor de clorofila presente nas folhas. Para isto, foi utilizado o método espectrofotométrico descrito por Arnon (1949), com ligeiras modificações. As amostras (folhas desenvolvidas e frescas) foram maceradas em nitrogênio líquido, até a redução em partículas de granulometria fina. Em seguida, de cada amostra retirou-se aproximadamente 0,05 g e transferiu-se para tubo 'Falcon'. Neste, acrescentou-se 10 ml da solução aquosa de acetona 80%, contendo 0,5 g L<sup>-1</sup> de carbonato de cálcio. Após agitar por 3 minutos, procedeu-se a centrifugação a 4.000 rpm, por 6 minutos.

O sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta e realizaram-se as leituras no espectrofotômetro marca Bel Photonics, com luz halôgena de Tungstênio, nos comprimentos de onda de 645 nm (A<sub>645</sub>) e 663 nm (A<sub>663</sub>).

Os valores obtidos nas duas leituras foram usados para o cálculo do teor de clorofila a (Clor a), teor de clorofila b (Clor b) e teor de clorofila total (Clor total), utilizando as seguintes fórmulas:

$$\text{Clor b (g L}^{-1}\text{)} = 22,9 \cdot A_{645} - 4,68 \cdot A_{663}$$

$$\text{Clor a (g L}^{-1}\text{)} = 12,7 \cdot A_{663} - 2,69 \cdot A_{645}$$

$$\text{Clor total (g L}^{-1}\text{)} = 20,2 \cdot A_{645} + 8,02 \cdot A_{663}$$

As análises estatísticas foram realizadas separadamente para cada variedade, na seguinte forma. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, contendo sempre com três

tratamentos e cinco repetições por tratamento (uma folha por planta e cinco plantas por genótipo). Os dados não foram transformados. Realizou-se primeiramente a análise de variância com o teste F, seguido do teste de Tukey, para a comparação das médias dos tratamentos.

#### **4.2.5 Experimentos adicionais**

##### **4.2.5.1 Avaliação de densidade estomática, de outras plantas poliplóides putativas**

O objetivo deste experimento foi avaliar a densidade estomática de várias plantas poliplóides putativas, selecionadas anteriormente com base nas características morfológicas de folha (citadas no item 4.2.2), e verificar a eficiência do método de seleção visual para a identificação inicial de plantas poliplóides.

Este experimento foi realizado com 27 genótipos, descritos na Tabela 2, e utilizando-se uma planta de cada genótipo, as plantas obtidas a partir dos experimentos de cultura de tecidos.

A avaliação da densidade estomática foi realizada de maneira semelhante ao que foi descrito no item 4.2.4.3 dos métodos, quanto à forma de coleta e preparo das amostras, método de preparação das lamínas e de contagem de estômatos, bem como à forma de análise dos resultados.

Tabela 2 - Genótipos utilizados no experimento de avaliação de densidade estomática e os respectivos controles diplóides e tetraplóides.

Número	Genótipo	Tratamento (concentração/tempo em colchicina)
Controle	limão 'Cravo'	2x
Controle	limão 'Cravo' planta 2	4x
Controle	tangerina 'Cleópatra'	2x
Controle	tangerina 'Cleópatra' planta 2	4x
Controle	tangerina 'Sunki'	2x
Controle	tangerina 'Sunki' planta 2	4x
1	tangerina 'Sunki'	0,05% / *
2	tangerina 'Sunki'	0,05% / 1 dia
3	limão 'Cravo'	0,05% / 2 dias
4	tangerina 'Sunki'	0,025% / 2 dias
5	tangerina 'Sunki'	0,05% / 1 dia
6	tangerina 'Sunki'	0,1% / 1 dia
7	tangerina 'Cleópatra'	0,1% / 1 dia
8	tangerina 'Cleópatra'	0,05% / 2 dias
9	tangerina 'Sunki'	0,05% / 1 dia
10	tangerina 'Sunki'	0,05% / *
11	tangerina 'Sunki'	0,025% / 2 dias
12	tangerina 'Sunki'	0,1% / 1 dia
13	tangerina 'Sunki'	0,025% / 2 dias
14	tangerina 'Sunki'	0,05% / 1 dia
15	limão 'Cravo'	0,1% / 1 dia
16	tangerina 'Sunki'	0,05% / 3 dias
17	tangerina 'Sunki'	0,025% / 2 dias
18	tangerina 'Sunki'	0,025% / 1 dia
19	tangerina 'Sunki'	0,025% / 2 dias
20	limão 'Cravo'	0,025% / 1 dia
21	limão 'Cravo'	0,1% / 1 dia

\* tempo de tratamento em colchicina desconhecido

#### **4.2.5.2 Estimativa da porcentagem de plantas nucelares, obtidas de sementes germinadas *in vitro* de variedades de porta-enxertos, pelo método de marcadores moleculares TRAP's**

O objetivo deste experimento foi estimar a porcentagem de plantas nucelares, obtidas de sementes germinadas *in vitro*, em três variedades de porta-enxertos, utilizando-se o método de marcadores moleculares TRAP's.

Este experimento foi realizado com as variedades limão 'Cravo', tangerina 'Sunki' e tangerina 'Cleópatra'.

Para cada variedade tomou-se 20 sementes e procedeu a germinação das mesmas, em condições de cultivo *in vitro*, de forma semelhante ao descrito no item 4.2.1.1. Após a germinação, foram retiradas as duas primeiras folhas verdadeiras de cada planta e transferidas para tubo Eppendorf, para a extração do DNA genômico. Como controle experimental utilizou-se folhas coletadas de plantas matrizes, das respectivas variedades-controle.

A extração de DNA foi realizada de forma idêntica a descrita no item 4.2.4.4, assim como as reações de PCR e as eletroforeses. Para cada variedade foram utilizados três pares de *primers* diferentes, em reações de PCR que incluíam DNA das vinte amostras a serem testadas e o da planta-controle. A confirmação da origem nucelar das plantas poliplóides foi realizada na seguinte forma: O perfil molecular de cada planta foi comparado com o das respectivas plantas-controle, utilizando-se as três combinações de *primers* de marcadores TRAP's. Foram consideradas como plantas nucelares as que possuíam padrão de bandamento idêntico ao da respectiva planta-controle nas três combinações de *primers*.

A seguir, foi calculada a porcentagem de plantas nucelares dividindo-se o número de plantas nucelares, pelo número total de plantas avaliadas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Obtenção de plantas a partir do cultivo *in vitro* de segmentos de epicótilo, em meio contendo colchicina

#### 5.1.1 Efeito do cultivo em meio contendo colchicina

Na Tabela 3 estão citados os dados de número médio de brotações adventícias regeneradas, nas diversas concentrações e tempos de cultivo em meio contendo colchicina, em quatro variedades de porta-enxerto, bem como os respectivos controles, representados por segmentos de epicótilo cultivados em meio sem a presença do alcalóide.

Tabela 3 - Número médio de brotações adventícias obtidas por segmento de epicótilo, em função dos diversos tempos de cultivo e em diversas concentrações de colchicina adicionadas ao meio de cultivo, em variedades de porta-enxertos de citros. Análise estatística considerando apenas um fator: tratamento

Tempo (dias)	Concentração (%)	Tangerina 'Sunki'	Limão 'Cravo' Santa Bárbara	Limão 'Cravo' Limeira	Tangerina 'Cleópatra'
	Controle	0,79 a	1,04 a	1,00 a	0,40 a
1	0,025	0,56 ab	0,77 ab	0,51 bc	0,42 ab
	0,05	0,26 bcd	0,41 bcd	0,63 b	0,14 c
	0,1	0,59 ab	0,40 bcd	0,44 bc	0,06 c
	0,025	0,44 bc	0,61 bc	0,37 bcd	0,18 bc
2	0,05	0,06 cd	0,36 bcd	0,09 de	0,07 c
	0,1	0,43 bc	0,06 d	0,20 cde	0,04 c
	0,025	0,09 cd	0,43 bcd	0,08 de	0,15 c
3	0,05	0,01 d	0,19 cd	0,03 e	0,01 c
	0,1	0,37 bcd	0,16 d	0,05 e	0,00 c
	Teste F	13,3 *	13,1 *	28,0 *	13,2 *
CV (%)	38,3	40,0	37,1	29,4	

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Comparando-se as variedades entre si nos tratamentos do controle pode-se observar que o limão 'Cravo' foi a que apresentou a melhor resposta ao meio de cultivo básico utilizado no experimento, com a maior média de brotações adventícias regeneradas nos dois clones utilizados neste trabalho: o Santa Bárbara e o Limeira. Ambos apresentaram controles com médias entre 1,00 e 1,04 brotação adventícia regenerada por explante, seguido pela tangerina 'Sunki', com 0,79 brotação e por último, a tangerina 'Cleópatra', com apenas 0,4 brotação por explante.

Estas taxas de regeneração de brotações, obtidas com os dois clones de limão 'Cravo', estão próximas das relatadas por Almeida et al. (2002) e Moura et al. (2001), que obtiveram respectivamente 1,4 e 1,6 broto/explante de limão 'Cravo, após cultivo em meio MT acrescido de 2,0 e 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

No presente estudo, os dois clones de limão 'Cravo' também foram os que apresentaram as maiores porcentagens de explantes responsivos, com 52,5% e 52,9%, nos respectivos controles (Tabela 4). Valores próximos dos encontrados por Almeida et al. (2002) e Moura et al. (2001), que obtiveram entre 55,3% e 62,5%, respectivamente.

A colchicina causou um efeito deletério nos explantes de citros, na maioria dos tempos de cultivo e das concentrações de colchicina testadas. Isto pode ser comprovado pelos dados citados na Tabelas 3 e 4. Na Tabela 3 pode se observar que, a exceção de alguns tratamentos realizados durante um dia (segmentos de epicótilo de tangerina 'Sunki', de limão 'Cravo' Santa Bárbara e de tangerina 'Cleópatra', cultivados em meio contendo 0,025% de colchicina e segmentos de epicótilo de tangerina 'Sunki', cultivados em meio contendo 0,1% de colchicina), os demais tratamentos apresentaram taxa de regeneração de brotações adventícias significativamente menores que os dos respectivos controles. Em alguns casos, o tratamento foi tão drástico que impossibilitou a regeneração de brotações em todos do explantes, caso do

tratamento de explantes de tangerina ‘Cleópatra’ durante três dias, em meio contendo 0,1% de colchicina (Tabelas 3 e 4).

Tabela 4 - Porcentagem de explantes responsivos, em função dos diversos tempos de cultivo e em diversas concentrações de colchicina adicionadas ao meio de cultivo, em variedades de porta-enxertos de citros.

Tempo (dias)	Concentração (%)	Tangerina ‘Sunki’ (%)	Limão ‘Cravo’ Santa Bárbara (%)	Limão ‘Cravo’ Limeira (%)	Tangerina ‘Cleópatra’ (%)
	Controle	48,1	52,5	52,9	29,8
1	0,025	34,1	32,5	33,3	22,1
	0,05	15,0	22,5	36,3	8,0
	0,1	38,0	25,9	30,0	6,0
2	0,025	24,1	32,5	26,0	13,0
	0,05	6,2	23,8	8,0	5,3
	0,1	26,6	3,8	12,0	3,1
3	0,025	7,3	21,0	4,1	8,8
	0,05	1,2	10,1	3,0	1,0
	0,1	16,4	6,5	2,0	0,0

Na Tabela 4, também é possível observar este efeito, expresso pelas reduções na porcentagem de explantes responsivos, em todas as variedades avaliadas, nas várias concentrações e tempos de cultivo em meios contendo colchicina.

Nos explantes, os primeiros sintomas da toxidez causada pela colchicina demoraram em média uma semana para aparecer e as principais características observadas foram a modificação da coloração dos explantes, principalmente nas pontas, de verde para verde mais claro, modificando para marrom e depois, para marrom-escuro, demonstrando haver necrose dos tecidos e evidente morte dos mesmos. A realização de novos subcultivos dos explantes para meio fresco, não tinha a capacidade de reverter o processo e, portanto, não causava nenhum efeito benéfico.

A observação de toxidez causada por colchicina em tecidos vegetais, já foi relatada anteriormente por vários autores. Latado et al. (2007), relataram o efeito da toxidez em explantes (segmentos de epicótilo) de três variedades de copa de citros, quando cultivados temporariamente em meios de cultura contendo diferentes concentrações de colchicina. Esta toxidez era expressa por reduções significativas no número médio de brotações adventícias obtidas e na porcentagem de explantes responsivos.

Gmitter Junior e Ling (1991), utilizaram o cultivo de calos embriogênicos em meio Murashige e Tucker (MT) contendo 0,01% ou 0,1% de colchicina, visando a indução de poliploidia em laranjas 'Hamlin' e 'Ridge Pineapple'. Os autores verificaram que para as duas variedades houve uma alta sensibilidade a colchicina representado por uma alta taxa de mortalidade, em resposta as duas concentrações de colchicina. A toxidez a colchicina foi expressa pela interrupção do crescimento dos calos, seguido da modificação da coloração, para marrom-escuro.

Já Gmitter Junior e Ling (1991), observaram que a concentração de 0,01% de colchicina resultou em menor efeito supressivo na embriogênese de óvulos imaturos de variedades de laranja doce e de tangelo, comparando-se com a concentração de 0,1%. Para esta última, observou-se uma sensibilidade diferencial entre genótipos, pois os óvulos imaturos de tangelo 'Orlando' e 'Mineola' apresentaram alta sensibilidade, enquanto que os óvulos de laranja 'Valência' aparentemente não sofreram nenhuma toxidez.

Wu e Mooney (2002), testaram dois tipos diferentes de alcalóides para induzir a poliploidização de calos embriogênicos de várias espécies de citros, a colchicina e a oryzalina. A oryzalina não foi efetiva, causando a letalidade dos explantes. Segundo os autores, isto ocorreu possivelmente devido ao seu uso em concentrações excessivas (0,01, 0,05 e 0,1%). Já

para a colchicina, observou-se que os genótipos apresentaram diferentes níveis de sensibilidade após cultivo em meio contendo este alcalóide.

Zeng et al. (2006), observaram os mesmos efeitos, mas trabalhando com protoplastos e calos de citros, cultivados temporariamente em meio contendo colchicina.

Zhang et al. (2007), cultivaram suspensões celulares de laranja ‘Anliucheng’ em meio contendo  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de colchicina, em diferentes tempos de cultivo (2 a 10 dias), para obtenção de plantas autotetraplóides. Os autores verificaram uma redução na taxa de regeneração com aumento do tempo de exposição e consideraram que quatro ou seis dias foram os melhores tempos de exposição à colchicina, em termos de porcentagem de plantas regeneradas autotetraplóides (50%).

A ocorrência de toxidez em tratamentos *in vivo* com colchicina também já foi observada. De acordo com Wakana et al. (2005), gemas axilares de citros tratadas com colchicina apresentaram uma diminuição na taxa de brotação, quando usadas concentrações mais altas do alcalóide (0,8%). Em baixa concentração (0,05%) observou-se uma reduzida frequência de obtenção de plantas tetraplóides, necessitando de concentrações intermediárias para se obter maior eficiência de indução de tetraploidia (0,1, 0,2 e 0,4% de colchicina). Também observaram reduções no desenvolvimento de ramos e na taxa de pegamento de enxertos, de três espécies de *Citrus*, cujas estacas foram tratadas com solução contendo 0,8% de colchicina.

Em outras espécies vegetais também já foram observados os efeitos tóxicos da colchicina. Yang et al. (2006), trabalhando com obtenção de tetraplóides de *Vitis vinifera* partindo de embriões zigóticos, observaram um decréscimo na sobrevivência com o aumento da concentração de colchicina e tempo de exposição, portanto com menor concentração e menor tempo de exposição dos embriões ao alcalóide, maior foi a taxa de regeneração, porém foi com

maior concentração e maior tempo de exposição dos explantes à colchicina que se obteve melhores resultados em termos de obtenção de plantas tetraplóides.

No presente estudo, uma segunda análise estatística foi realizada considerando-se os experimentos como em delineamento fatorial (3x3), avaliando-se separadamente os efeitos dos fatores tempo de cultivo e concentração de colchicina, bem como a interação entre eles. Na Tabela 5 pode-se verificar os valores de F calculados.

A exceção do limão ‘Cravo’ Limeira, em todas as outras variedades pôde-se observar que a concentração e o tempo de cultivo afetaram significativamente a taxa de regeneração de brotações adventícias, sendo então consideradas como importantes. Já as interações Concentração x Tempo foram sempre não-significativas, indicando que os diferentes níveis de um fator, não afetavam o outro (Tabela 5).

Para o limão ‘Cravo’ Limeira, a única diferença em relação às outras espécies foi observação de que a concentração de colchicina não exerceu nenhum efeito significativo no número de brotações regeneradas (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores de teste F e coeficiente de variação para os fatores: tempo de cultivo, concentrações de colchicina e a interação tempo x concentração, em análise fatorial. Dados de número médio de brotações adventícias obtidas por segmento de epicótilo, em função dos diversos tempos de cultivo e em diversas concentrações de colchicina adicionadas ao meio de cultivo.

	Tangerina ‘Sunki’	Limão ‘Cravo’ Santa Bárbara	Limão ‘Cravo’ Limeira	Tangerina ‘Cleópatra’
Concentração (C)	12,1 **	11,2 **	1,5 ns	12,9 **
Tempo (T)	10,6 **	5,9 **	31,0 **	6,0 **
Interação C x T	0,7 ns	0,9 ns	1,8 ns	1,0 ns
CV(%)	38,3	40,5	37,1	29,4

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

<sup>ns</sup> Não significativo

Nas Tabelas 6, 7, 8 e 9 verifica que apenas para limão ‘Cravo’ Limeira apresentou diferenças significativas em relação ao número médio de brotações regeneradas por explante, entre os tratamentos de cultivo durante um e dois dias em colchicina. Já o cultivo durante três dias foi sempre inferior aos demais.

Com relação às diferentes concentrações de colchicina testadas, apenas para o limão ‘Cravo’ Santa Bárbara e para a tangerina ‘Cleópatra’, a concentração de 0,025% foi a que se obteve número médio de brotações por explante significativamente superior aos das concentrações de 0,05% e 0,1%, que não apresentaram diferenças significativas entre si (Tabelas 7 e 9).

Para a tangerina ‘Sunki’, observou-se que a regeneração de plantas na concentração de 0,025% de colchicina foi semelhante à observada na concentração de 0,1%, e ambas apresentaram taxas de regeneração significativamente superiores as do cultivo na concentração de 0,05%. Fato curioso e inesperado (Tabela 6).

Para limão ‘Cravo’ não foram observadas diferenças entre tratamentos, nas diversas concentrações de colchicina testadas.

Portanto, de maneira geral, a concentração de 0,025% e com exposição durante um dia em colchicina foi o tratamento em que se conseguiu obter melhores resultados em termos de número médio de brotações por explante, nas quatro variedades de porta-enxerto de citros estudadas neste trabalho.

Tabela 6 - Efeito da concentração de colchicina e tempo de cultivo, na regeneração de brotações adventícias de tangerina ‘Sunki’, a partir de segmentos de epicótilo. Análise estatística considerando dois fatores: tempo e concentração de colchicina.

Tempo (dias)	Concentração (%)				Média
	0	0,025	0,05	0,1	
0	0,79 Aa	-	-	-	0,79 A
1	-	0,56 Bb	0,26 Bc	0,59 Bb	0,47 B
2	-	0,44 BCb	0,06 BCc	0,43 BCb	0,31 BC
3	-	0,08 Cb	0,01 Cc	0,37 Cb	0,15 C
Média	0,79 a	0,36 b	0,11 c	0,46 b	

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Na horizontal, as letras maiúsculas representam o efeito do tempo de cultivo e na vertical, as letras minúsculas representam o efeito da concentração de colchicina.

Tabela 7 - Efeito da concentração de colchicina e tempo de cultivo, na regeneração de brotações adventícias de limão ‘Cravo’ Santa Bárbara, a partir de segmentos de epicótilo. Análise estatística considerando dois fatores: tempo e concentração de colchicina.

Tempo (dias)	Concentração (%)				Média
	0	0,025	0,05	0,1	
0	1,04 Aa	-	-	-	1,04 A
1	-	0,77 Bb	0,41 Bc	0,41 Bc	0,53 B
2	-	0,61 BCb	0,36 BCc	0,06 BCc	0,35 BC
3	-	0,43 Cb	0,19 Cc	0,15 Cc	0,26 C
Média	1,04 a	0,61 b	0,32 c	0,21 c	

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Na horizontal, as letras maiúsculas representam o efeito do tempo de cultivo e na vertical, as letras minúsculas representam o efeito da concentração de colchicina.

Tabela 8 - Efeito da concentração de colchicina e tempo de cultivo, na regeneração de brotações adventícias de limão ‘Cravo’ Limeira, a partir de segmentos de epicótilo. Análise estatística considerando dois fatores: tempo e concentração de colchicina.

Tempo (dias)	Concentração (%)				Média
	0	0,025	0,05	0,1	
0	1,00 A	-	-	-	1,00 A
1	-	0,51 B	0,63 B	0,44 B	0,53 B
2	-	0,37 C	0,09 C	0,20 C	0,22 C
3	-	0,08 D	0,03 D	0,05 D	0,05 D
Média	1,00	0,31	0,25	0,23	

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Na horizontal, as letras maiúsculas representam o efeito do tempo de cultivo na colchicina.

Tabela 9 - Efeito da concentração de colchicina e tempo de cultivo, na regeneração de brotações adventícias de tangerina ‘Cleópatra’, a partir de segmentos de epicótilo. Análise estatística considerando dois fatores: tempo e concentração de colchicina.

Tempo (dias)	Concentração (%)				Média
	0	0,025	0,05	0,1	
0	0,40 Aa	-	-	-	0,40 A
1	-	0,42 Bb	0,14 Bc	0,06 Bc	0,20 B
2	-	0,18 BCb	0,07 BCc	0,04 BCc	0,10 BC
3	-	0,15 Cb	0,01 Cc	0,00 Cc	0,05 C
Média	0,40 a	0,24 b	0,07 c	0,03 c	

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Na horizontal, as letras maiúsculas representam o efeito do tempo de cultivo e na vertical, as letras minúsculas representam o efeito da concentração de colchicina.

### 5.1.2 Microenxertia *in vitro* e cultivo das plantas até a aclimatização

Todas as brotações regeneradas, obtidas nos vários experimentos de cultivo de explantes em meio contendo colchicina, foram microenxertadas *in vitro*, utilizando-se sempre como porta-enxertos plântulas estioladas de citrumelo ‘Swingle’ ou citrange ‘Troyer’.

O sucesso na realização da microenxertia *in vitro* provou ser dependente do tamanho da brotação regenerada a ser microenxertada e também, da habilidade do enxertador. Neste estudo, observou-se que a porcentagem média de pegamento dos microenxertos foi considerada como alta (acima de 50%).

Após 40 a 60 dias de cultivo *in vitro* foram realizadas avaliações visuais para a identificação das plântulas (conjunto enxerto/porta-enxerto) que apresentavam desenvolvimento adequado e eram passíveis de serem aclimatizadas.

Os conjuntos enxerto/porta-enxerto selecionados foram então aclimatizados em estufa, por meio de uma nova enxertia sobre plantas de limão ‘Cravo’. As plantas enxertadas eram mantidas inicialmente em ambiente de alta umidade relativa do ar, seguido de transferência para

local com menor umidade relativa, até a aclimatização completa das plantas às condições ambientais.

Apesar de sempre ter sido verificada a perda de plantas não-desenvolvidas nas fases de microenxertia *in vitro* e enxertia em estufas, é importante relatar que estes métodos facilitaram enormemente a obtenção e o cultivo de plântulas *in vitro*, pois as brotações cresceram mais rapidamente e não necessitaram emitir raízes *in vitro*, o que possibilitou obter uma frequência muito mais elevada de plantas aclimatizadas por experimento e num menor período de tempo.

As plantas aclimatizadas foram avaliadas visualmente e algumas foram identificadas como sendo poliplóides putativas, com base em características morfológicas. A seguir, as plantas selecionadas foram avaliadas em experimentos de determinação de ploidia por meio de citometria de fluxo ou em experimentos de avaliação da densidade estomática em folhas.

## **5.2 Seleção de plantas poliplóides putativas, em função de características morfológicas**

Todas as plantas aclimatizadas e mantidas em estufas, obtidas de experimentos de cultivo de segmentos de epicótilo com colchicina, foram avaliadas visualmente em busca de características morfológicas distintas das respectivas plantas-controle de cada variedade: folhas mais espessas, com a presença de glândulas de óleo mais protuberantes; folhas com formato diferente e com coloração verde mais intensa. Características citadas em vários trabalhos que relatam a obtenção de plantas autotetraplóides de citros (GMITTER JUNIOR; LING, 1991; WU; MONEY, 2002; WAKANA et al., 2005; LATADO et al., 2007).

No total, 27 plantas foram selecionadas com base nestas características morfológicas. Dentre estas, seis plantas foram utilizadas nos experimentos seguintes de confirmação da ploidia

e de caracterização morfológica, molecular e fisiológica. Enquanto que as demais foram somente avaliadas quanto à densidade estomática nas folhas.

### 5.3 Confirmação da ploidia de seis plantas poliplóides putativas por citometria de fluxo

A metodologia de citometria de fluxo possibilitou a identificação rápida e precisa da ploidia das plantas amostradas. Os resultados obtidos com estas análises estão citados na Tabela 10 e na Figura 1.

Tabela 10 – Leituras de suspensões celulares de folhas plantas poliplóides e dos controles, coradas com o fluorocromo DAPI e avaliadas por citometria de fluxo.

Genótipo	Leituras ( $G_1$ )			Média	Ploidia estimada
Tangerina ‘Sunki’ controle <sup>1</sup>	100	100	100	100	2x
Tangerina ‘Sunki’ (1)	100:202	100:228	100:210	100:213	2x:4x
Tangerina ‘Sunki’ (2)	194	202	200	199	4x
Limão ‘Cravo’ controle <sup>1</sup>	100	100	100	100	2x
Limão ‘Cravo’ (1)	179	202	192	191	4x
Limão ‘Cravo’ (2)	186	186	190	187	4x
Tangerina ‘Cleópatra’ controle <sup>1</sup>	100	100	100	100	2x
Tangerina ‘Cleópatra’ (1)	149	145	157	150	3x *
Tangerina ‘Cleópatra’ (2)	194	195	193	194	4x

<sup>1</sup> Planta diplóide da variedade controle.

\* Padrão semelhante ao de uma planta triplóide

As duas plantas selecionadas de limão ‘Cravo’ demonstraram ser autotetraplóides (Tabela 10), ambas obtidas a partir do tratamento de segmentos de epicótilo em meio contendo 0,05% de colchicina, durante três dias (Tabela 1). Na Figura 1E está o histograma da amostra composta por folhas da planta-controle de limão ‘Cravo’ e da planta 1. Neste histograma pode-se perfeitamente verificar a existência de dois picos, um representando a planta diplóide (controle) e o outro, representando a planta tetraplóide.

Uma planta de tangerina ‘Sunki’ e uma de tangerina ‘Cleópatra’ (plantas número 2) também apresentaram perfil de planta autotetraplóide (Tabela 10). Ambas foram obtidas a partir do tratamento em meio contendo 0,05% de colchicina, sendo que a ‘Cleópatra’ foi cultivada durante um dia neste meio e a ‘Sunki’, não se pôde definir o tempo de cultivo, pois a marcação foi perdida (Tabela 1).

Na Figura 1A está o histograma da amostra composta por folhas da planta-controle de tangerina ‘Sunki’ e da planta 2, enquanto que o histograma da Figura 1D contém a amostra de folha da planta 2 de tangerina ‘Cleópatra’. Em ambos os casos, pode-se comprovar a existência de células com núcleos tetraplóides.

A planta 1 de tangerina ‘Cleópatra’, originada do tratamento com 0,025% de colchicina durante um dia (Tabela 1), apresentou histogramas com padrão semelhante ao de uma planta triploide, nas três amostras avaliadas (Tabela 10 e Figura 1C).

Como o explante inicial eram segmentos de epicótilo de plantas diplóides, a única explicação plausível para a ploidia verificada nesta planta seria a ocorrência de duplicação cromossômica completa da planta original, mas seguido de perda de parte destes cromossomos duplicados, durante fase final da mitose. Possivelmente, pela inibição parcial da formação dos fusos acromáticos, ocasionada pelo cultivo durante apenas um dia em meio contendo 0,025% de colchicina. Será necessário realizar avaliações citogenéticas mais completas para compreender melhor a composição cromossômica desta planta. Trata-se do primeiro caso relatado de obtenção de plantas cítricas contendo duplicação parcial do genoma após tratamento com colchicina.

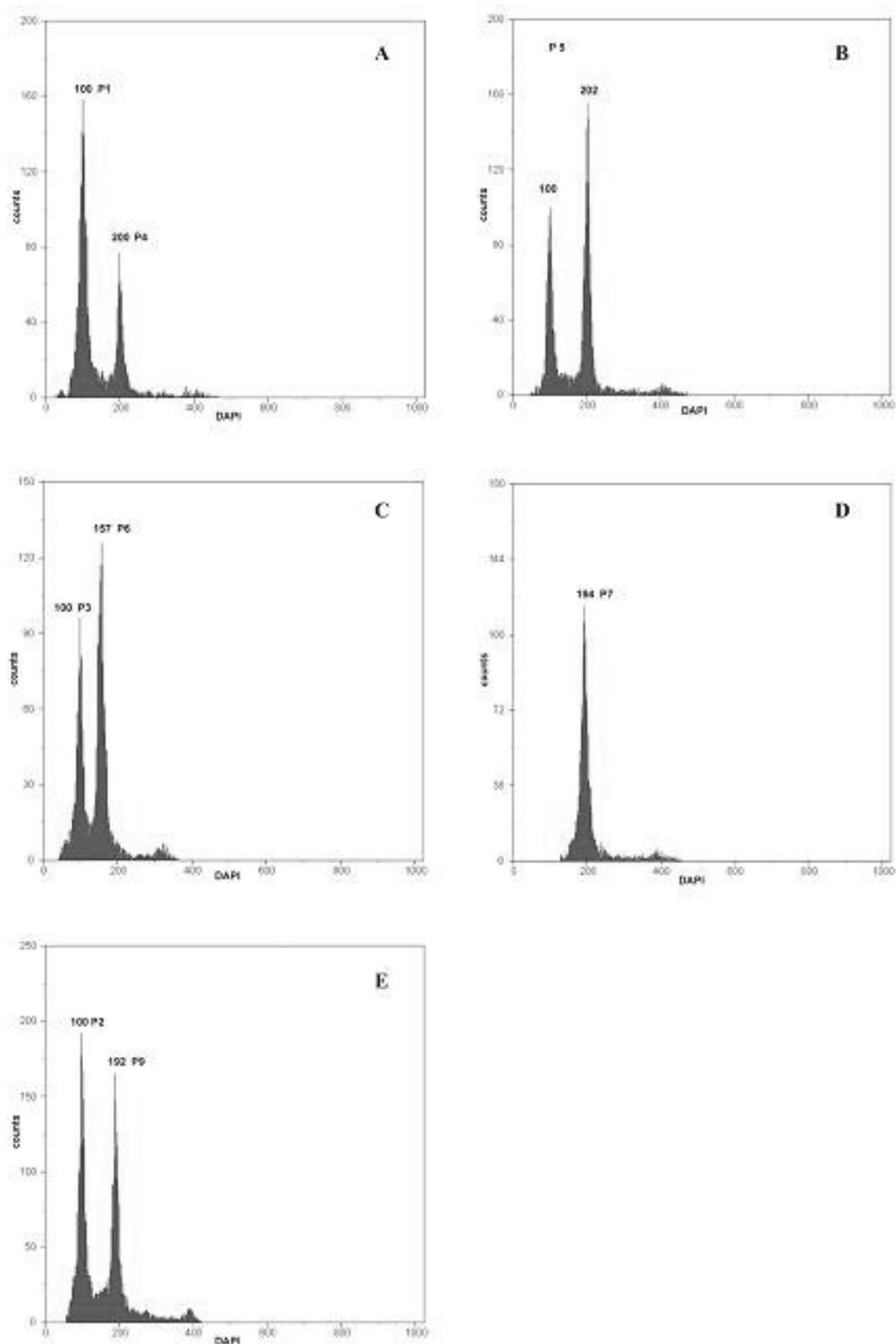


Figura 1. Histogramas obtidos por análises de citometria de fluxo de suspensões nucleares de plantas poliplóides e dos controles. A – tangerinas 'Sunki' controle e planta 2; B – tangerina 'Sunki' planta 1; C – tangerinas 'Cleópatra' controle e planta 1, D – tangerina 'Cleópatra' planta 2; E – Limões 'Cravo' controle e planta 1.

A planta 1 de tangerina ‘Sunki’ foi originada do tratamento com 0,05% de colchicina durante um dia (Tabela 1) e apresentou-se como sendo uma planta quimérica, contendo dois tecidos geneticamente distintos numa mesma folha, tecidos com células tetraplóides e diplóides (Tabela 10 e Figura 1B), nas três avaliações realizadas por citometria de fluxo. Por isto, foi considerada como sendo uma planta mixoplóide.

A exceção do relato de Wu e Mooney (2002), que afirmaram ter identificado uma planta mixoplóide de citros, em nenhum outro trabalho foi relatada a obtenção de plantas mixoplóides após tratamento com colchicina.

A origem de plantas mixoplóides derivadas por embriogênese somática ou organogênese ainda é desconhecida. Uma possível explicação para tal fato pode ser devido a ocorrência de duplicação cromossômica das células somente após o início do processo de diferenciação celular (WU; MOONEY, 2002). De todo modo, os resultados obtidos no presente estudo, isto é, a produção de cinco plantas não quiméricas e apenas uma planta quimérica reforça a tese de que durante o cultivo *in vitro* de segmentos de epicótilo de citros, as brotações adventícias originam-se de uma ou poucas células do tecido do câmbio, o que resulta numa menor probabilidade de haver quimerismo nas plantas regeneradas (ALMEIDA, 2002; LATADO et al., 2007).

Pelo contrário, quando é realizado o tratamento com colchicina em propágulos contendo gemas multicelulares (apical ou axilar) tais como: sementes, estacas ou borbulhas, existe uma maior probabilidade de se obter plantas quiméricas mixoplóides, como foi citado por Barret (1974) e Wakana et al. (2005).

Väinölä (2000), usando segmentos nodais de híbridos de *Rhododendron* para indução de poliploidização, obteve 10,1% de plantas mixoplóides e 4,8% de tetraplóides, sendo que o tempo de exposição dos explantes não causou efeito significativo na produção de mixoplóides ou tetraplóides. O grande número de plantas quiméricas obtidas foi atribuído ao tipo de tecido

usado, gemas axilares. Como se trata de meristema multicelular, apenas uma porção ou camada de células pode ser afetada pela colchicina, enquanto que as outras células ou tecidos adjacentes podem permanecer diplóides.

## **5.4 Caracterização morfológica, molecular e fisiológica de seis plantas com ploidia identificada**

### **5.4.1 Caracterização morfológica do limbo foliar e do pecíolo de plantas**

As duas características comuns observadas nas seis plantas com maior ploidia avaliadas foi o menor comprimento e a maior espessura do limbo foliar (Tabela 11).

A maior espessura do limbo foliar era uma característica já esperada, pois foi bastante utilizada na seleção visual das plantas poliplóides putativas.

Com relação ao comprimento de limbo foliar, uma única observação interessante é a de que a planta mixoplóide (tangerina ‘Sunki’ planta 1) apresentou comprimento estatisticamente diferente, mas intermediário entre a planta-controle e a planta 2 - tetraplóide (Tabela 11).

A planta tetraplóide de ‘Sunki’ (planta 2) foi a única que apresentou largura significativamente menor em relação ao controle da espécie, enquanto que a planta mixoplóide apresentou largura intermediária mas não significativa (Tabela 11 e Figura 2A). Isto resultou na obtenção de folhas menores nas duas plantas (tangerina ‘Sunki’ plantas 1 e 2), mas com mesma relação comprimento/largura em relação à planta-controle (Tabela 11).

Já para as plantas poliplóides de ‘Cravo’ e de ‘Cleópatra’, a existência de folhas contendo a mesma largura das observadas nas respectivas plantas-controle resultou na observação de folhas com formato mais arredondado, que pode ser observado pela relação comprimento/largura do

limbo foliar que foi significativamente menor, a exceção da planta 1 de 'Cleópatra' (Tabela 11, Figuras 2B e 2C).

Tabela 11 – Médias de comprimento, largura, relação comprimento/largura e espessura do limbo foliar, de plantas poliplóides e dos controles.

Tratamento	Comprimento (cm)	Largura (cm)	Relação Comprim./Larg.	Espessura (cm)
SK - controle	103,4 a	57,9 a	1,8	0,27 b
SK - planta 1	89,2 b	51,8 ab	1,7	0,38 a
SK - planta 2	76,4 c	46,5 b	1,6	0,36 a
Teste F	47,9 **	5,6 *	1,6 <sup>ns</sup>	154,5 **
CV(%)	3,8	8,0	5,9	2,4
LC - controle	110,4 a	48,5	2,3 a	0,25 b
LC - planta 1	86,8 b	44,1	2,0 b	0,32 a
LC - planta 2	88,9 b	46,1	1,9 b	0,32 a
Teste F	26,0 **	1,6 <sup>ns</sup>	7,7 *	40,4 **
CV(%)	4,6	6,4	5,8	3,7
Cleópatra - controle	82,1 a	43,6	1,9 a	0,28 b
Cleópatra - planta 1	73,4 b	45,1	1,6 b	0,35 a
Cleópatra - planta 2	70,7 b	42,7	1,7 ab	0,35 a
Teste F	8,9 *	0,9 <sup>ns</sup>	5,9 *	13,4 **
CV(%)	4,6	5,2	5,8	5,6

Médias seguidas de letras distintas, na mesma coluna, diferem entre si ao nível de significância de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F.

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F.

<sup>ns</sup> Não significativo

Amostras: SK - tangerina 'Sunki'; LC - limão 'Cravo'; Cleópatra - tangerina 'Cleópatra'

Essas mesmas alterações no tamanho e no formato de folhas de plantas autotetraplóides também foram descritas por vários outros autores (GMITTER; LING, 1991; WAKANA et al., 2005). Wu e Mooney (2002), observaram plantas autotetraplóides de tangor 'Umatilla' com folhas de menores, comprimento e largura, em relação às da cultivar original.

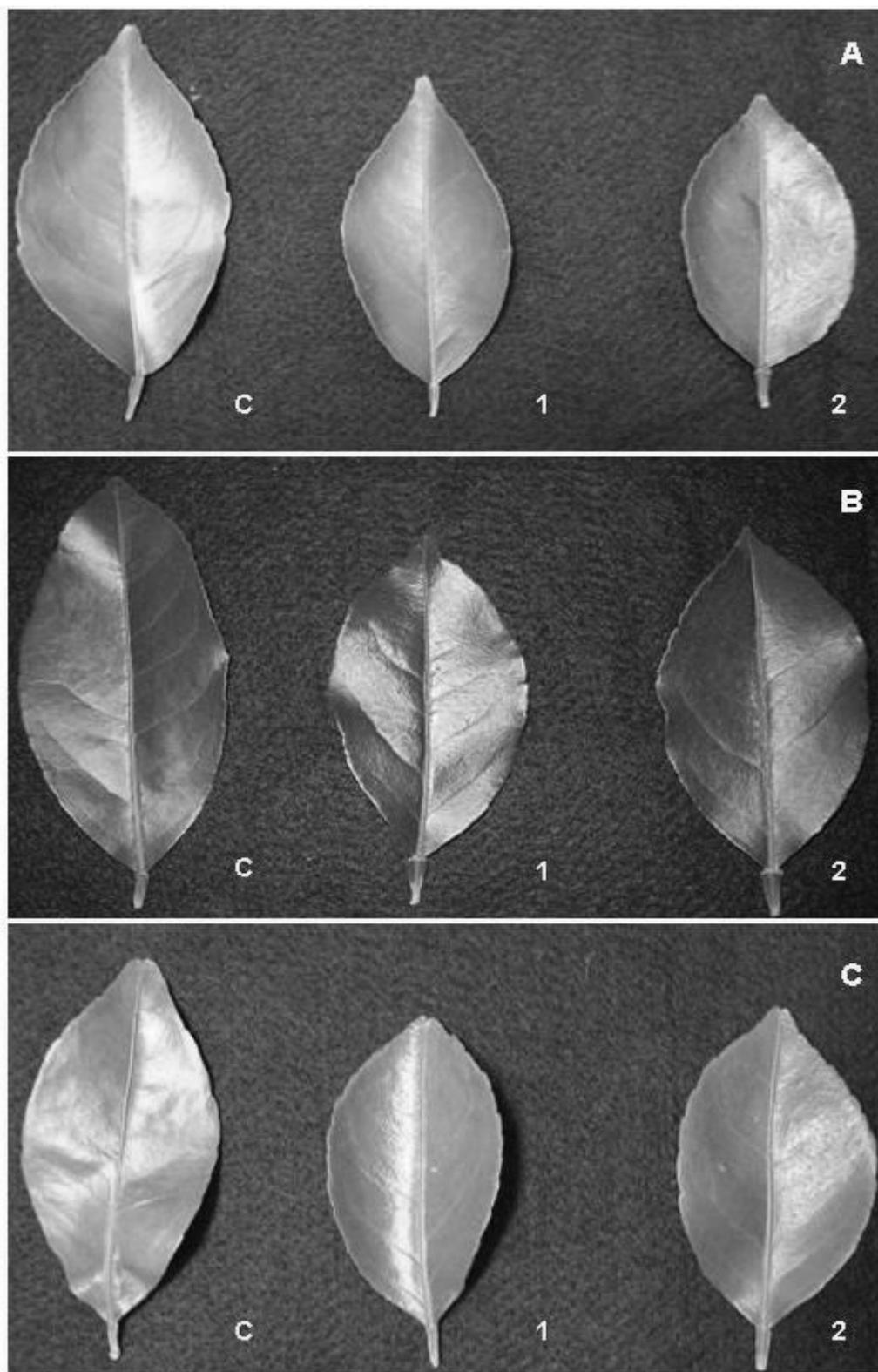


Figura 2. Folhas de plantas poliplóides e dos controles. A) Tangerina 'Sunki' controle (C), planta 1 e planta 2; B) Limão 'Cravo' controle (C), planta 1 e planta 2; C) Tangerina 'Cleópatra' controle (C), planta 1 e planta 2.

Já Romero-aranda et al. (1997), ao invés de tomar medidas de largura e de comprimento das folhas de plantas tetraplóides de citros, preferiram avaliar a área foliar total com o uso de equipamento específico e comprovaram que não havia diferenças entre plantas tetraplóides e as plantas diplóides de laranja Valência para este parâmetro. No entanto, para limão ‘Femminelo’, observou-se folhas com maior área durante o cultivo em condições de baixa irradiância luminosa.

Wu et al. (2005), trabalhando com obtenção de plantas alotetraplóides de citros por fusão de protoplastos, verificou que estas apresentavam folhas com coloração verde mais intensa, maior largura e espessura do limbo foliar, em relação às plantas diplóides.

Shao et al. (2003), trabalhando com indução de tetraplóides *in vitro* usando colchicina em romã (*Punica granatum* L.) também observou alterações nos padrões morfológicos foliares das plantas tetraplóides tais como: a diminuição do tamanho da folha e a presença de folhas mais escuras.

Nas avaliações de comprimento de pecíolo pôde-se observar que houve alteração significativa no comprimento do pecíolo apenas para as plantas poliplóides de tangerina ‘Sunki’, o que resultou numa menor relação comprimento/largura do pecíolo das mesmas (Tabela 12).

As duas plantas autotetraplóides de limão ‘Cravo’ e uma de ‘Cleópatra’ (planta 2) apresentaram pecíolo com largura significativamente maior, o que também resultou em modificação significativa na relação comprimento/largura (Tabela 12).

Sobre a morfologia das folhas das plantas tetraplóides, Cameron e Frost (1968) e Moreira (1980) relatam que, comparando-se plantas tetraplóides com plantas diplóides, as primeiras geralmente apresentam folhas maiores em largura, do que em comprimento, mais espessas e com tendência a uma coloração mais escura. As asas dos pecíolos são normalmente mais largas e em

algumas variedades fundem-se freqüentemente com o limbo foliar. Essas características foram encontradas em várias plantas poliplóides no presente estudo.

Gmitter Junior e Ling (1991), relataram que o desenvolvimento das plantas tetraplóides era mais lento, com a emissão de menor número de brotações orientadas para a posição vertical (cima) e maior número de brotações, orientadas para a posição horizontal.

Tabela 12 - Médias de comprimento, largura, relação comprimento/largura e espessura de pecíolo, de plantas poliplóides e dos controles.

Tratamento	Comprimento (cm)	Largura (cm)	Relação comprimento/largura
SK - controle	8,8 a	3,0	3,0 a
SK - planta 1	7,2 ab	3,1	2,3 b
SK - planta 2	5,9 b	3,5	1,7 c
Teste F	10,1 *	1,0 ns	29,5 **
CV(%)	10,8	14,2	8,5
LC - controle	8,6	3,2 b	2,7 a
LC - planta 1	7,6	4,7 a	1,6 b
LC - planta 2	8,4	4,8 a	1,8 b
Teste F	0,6 ns	8,9 *	9,8 *
CV(%)	15,1	12,0	15,38
Cleópatra - controle	5,5	2,8 b	2,0
Cleópatra - planta 1	6,6	3,0 b	2,2
Cleópatra - planta 2	6,2	3,3 a	1,8
Teste F	1,4 ns	23,4 **	1,3 ns
CV(%)	13,2	3,5	13,8

Médias seguidas de letras distintas, na mesma coluna, diferem entre si ao nível de significância de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F.

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F.

<sup>ns</sup> Não significativo

Amostras: SK - tangerina 'Sunki' e LC - limão 'Cravo'; Cleópatra - tangerina 'Cleópatra'

Quanto à influência da poliploidia sobre o número de sementes dos frutos, isto é bem variável, havendo tetraplóides que apresentaram reduções no número de sementes, enquanto outros não mostram alterações para esta característica, caso das laranjas doces 'Ruby' e 'Paperrind'. Outros ainda produziram frutos contendo mais sementes, caso do limão 'Lisboa'

(SOARES FILHO, 2008). No presente estudo, as plantas ainda não foram avaliadas para tal característica.

O número de embriões por semente tende a ser menor nos tetraplóides, predispondo a um aumento no tamanho médio de cada embrião, observaram Cameron e Frost (1968). Estes autores citaram também que autotetraplóides de natureza espontânea parecem ocorrer quase que exclusivamente como *seedlings* nucleares e que os efeitos da tetraploidia em *Citrus* podem ser melhor avaliados em seleções nucleares, dado que nestes, a meiose e a segregação genética não estão envolvidas.

Plantas tetraplóides, quando na condição de pé-franco, freqüentemente apresentam menor desenvolvimento em comparação com plantas diplóides (CAMERON; FROST, 1968; SOARES FILHO, 2008). O mesmo afirmou Lee (1988), mas para plantas tetraplóides quando usadas como porta-enxerto. Segundo o autor, plantas enxertadas sobre porta-enxertos autotetraplóides geralmente apresentam nanismo.

Nos genótipos obtidos no presente estudo, estas observações poderão ser realizadas somente quando as plantas atingirem um crescimento maior e/ou quando iniciarem a produção de frutos.

#### **5.4.2 Caracterização da estrutura do limbo foliar, por meio de microscopia**

A Figura 3 representa a estrutura do limbo foliar das plantas poliplóides e de plantas diplóides de citros. Nesta figura pode-se observar que as plantas poliplóides de tangerina ‘Cleópatra’ e de limão ‘Cravo’ apresentaram menor número de células no parênquima paliçádico mas células com maior tamanho, em comparação as plantas-controle diplóides. Na variedade tangerina ‘Sunki’ não foram observadas tais alterações.

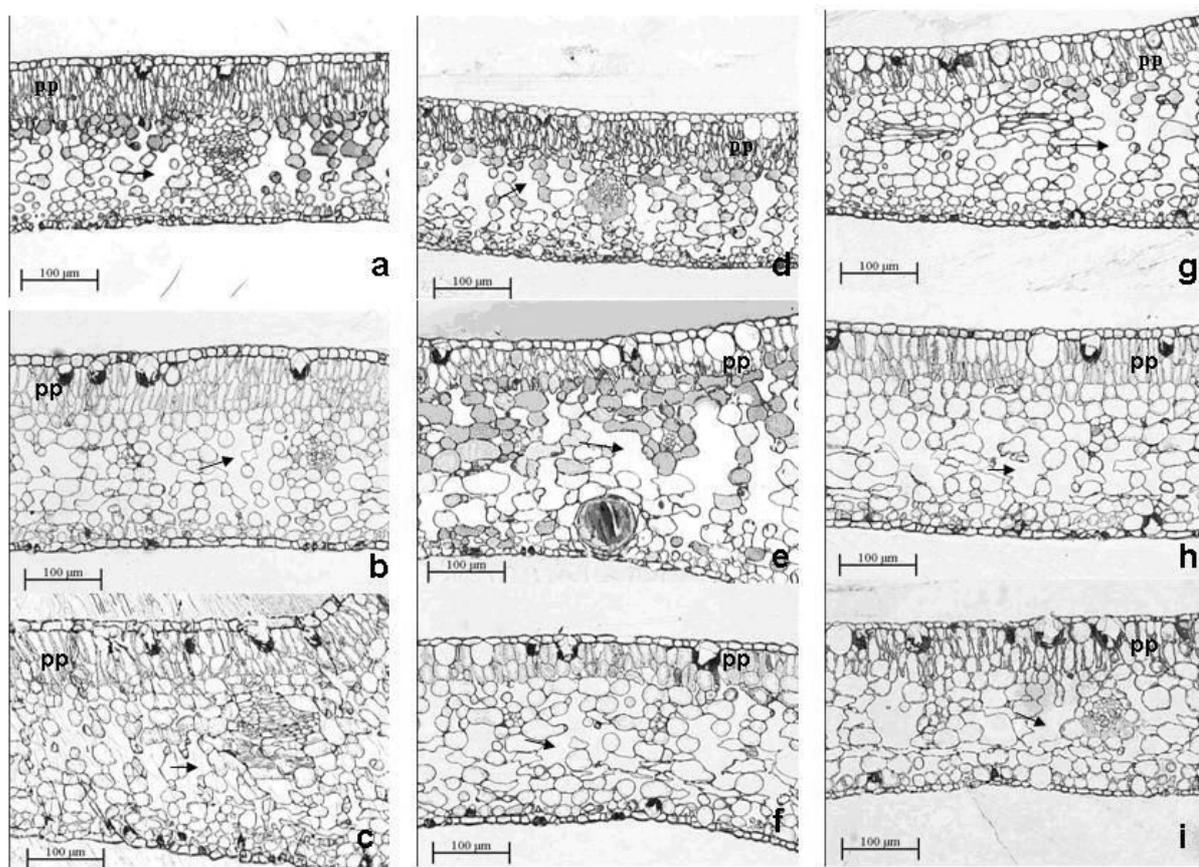


Figura 3. Imagens de corte transversal de lâmina foliar de plantas poliplóides e dos controles: a - tangerina ‘Cleópatra’ controle; b - planta 1 e c - planta 2; d - limão ‘Cravo’ controle; e - planta 1 e f - planta 2; g - tangerina ‘Sunki’ controle; h - planta 1 e i - planta 2. pp - parênquima paliçádico e as setas, indicam o espaço intercelular do parênquima lacunoso.

Romero-aranda et al. (1997), avaliaram por meio de microscopia e *software* de análise de imagens, a estrutura de limbo foliar de plantas autotetraplóides em comparação com plantas diplóides. Os autores observaram que as plantas autotetraplóides apresentavam folhas mais largas, com células com menor tamanho e com maior volume, menor número de células, o que resultou no maior volume e maior superfície de tecido de mesófilo por unidade de área foliar. Por último, observou-se que a densidade do tecido foliar foi menor nas plantas com maior ploidia.

Korondosi et al. (2000), revisaram os trabalhos relacionados ao controle de tamanho celular e concluíram que a ploidia exerce importante controle no tamanho das células. Para estes, a poliploidia resulta na formação de células de maior tamanho e volume. Resultado semelhante ao observado no presente estudo.

### **5.4.3 Avaliação da densidade estomática em folhas e tamanho das células-guarda dos estômatos**

A exceção da planta mixoplóide de tangerina ‘Sunki’ (planta 1), todas as demais apresentaram folhas com número significativamente menor de estômatos por mm<sup>2</sup> (Tabela 13 e Figura 4). Em alguns casos, a planta tetraplóide apresentou quase a metade da densidade estomática da planta-controle (plantas 2 de limão ‘Cravo’ e de tangerina ‘Cleópatra’).

Com relação ao tamanho das células-guarda dos estômatos, pôde-se observar que a maioria das plantas poliplóides apresentou células significativamente maiores que as dos controles, representados por maiores comprimento, largura ou ambos (Tabela 13).

Costa et al. (2004), compararam diferentes híbridos somáticos alotetraplóides de variedades de citros com os seus respectivos parentais diplóides e relataram terem encontrado a mesma característica nos híbridos somáticos, menor densidade estomática e células-guarda com maior tamanho.

Kadota e Niimi (2002), induziram a tetraploidia em plantas de pêra (*Pyrus pyrifolia* N.) com uso de colchicina em meio de cultura e também observaram que os comprimentos dos estômatos das plantas tetraplóides aumentaram em relação aos das plantas diplóides.

Yang et al. (2006), encontraram diferenças significativas nos tamanhos de estômatos e na densidade estomática entre plantas diplóides e tetraplóides de *Vitis vinifera*, regeneradas a partir

de embriões somáticos tratados com colchicina. A média da densidade estomática em tetraplóides foi significativamente menor que em diplóides, já o tamanho e largura dos estômatos foram significativamente maiores.

Tabela 13 - Médias de densidade estomática, comprimento e largura das células-guarda dos estômatos de plantas poliplóides de citros e dos controles.

Tratamento	Densidade estomática (mm <sup>2</sup> )	Comprimento (µm)	Largura (µm)
SK - controle	317,9 a	11,6	9,3 ab
SK - planta 1	369,1 a	10,8	8,2 b
SK - planta 2	230,4 b	11,6	9,4 a
Teste F	18,0 **	3,0 ns	4,2 *
CV(%)	17,1	11,3	16,6
LC - controle	526,9 a	10,5 b	8,1 c
LC - planta 1	341,3 b	13,8 a	9,5 b
LC - planta 2	247,5 c	14,2 a	11,1 a
Teste F	103,0 **	47,0 **	35,3 **
CV(%)	11,9	10,2	11,8
Cleópatra - controle	477,8 a	10,9 b	8,8
Cleópatra - planta 1	317,9 b	12,0 a	9,6
Cleópatra - planta 2	279,5 b	12,1 a	9,9
Teste F	25,4 **	6,1 **	3,0 ns
CV(%)	18,4	11,2	16,0

Médias seguidas de letras distintas, na mesma coluna, diferem entre si ao nível de significância de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F.

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F.

<sup>ns</sup> Não significativo

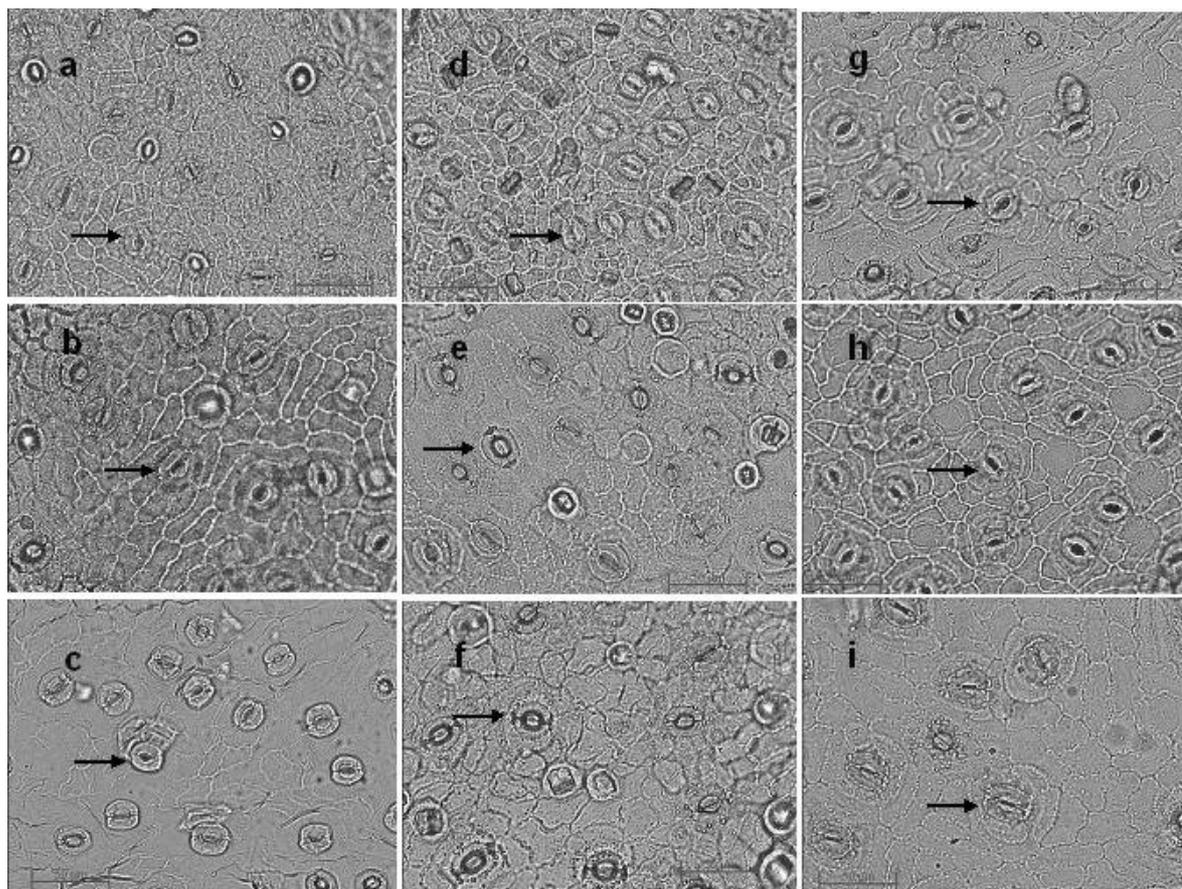


Figura 4. Imagens da superfície foliar contendo estômatos, de plantas poliplóides e dos controles: a - tangerina 'Cleópatra' controle; b - planta 1 e c - planta 2; d - limão 'Cravo' controle; e - planta 1 e f - planta 2; g - tangerina 'Sunki' controle; h - planta 1 e i - planta 2.

Gao et al. (1996), usando colchicina em meio de cultura MS para induzir poliploidia em gemas de *Salvia miltiorrhiza*, relataram que as plantas tetraplóides eram vigorosas e com coloração de folha mais escura, os estômatos eram maiores e em menor densidade, em relação ao controle.

Thao et al. (2003), usaram colchicina e oryzalina para conseguir plantas tetraplóides de *Alocasia* a partir de cultivo de brotos *in vitro* em diferentes concentrações dos alcalóides. Após a obtenção de plantas tetraplóides, os autores verificaram que estas possuíam características típicas, tais como menor densidade de estômatos e maior do tamanho dos estômatos.

Já Przywara et al. (1988), verificaram que plantas haplóides de Kiwi (*Actinidia deliciosa*) apresentavam folhas com estômatos com menor comprimento, quando comparados com a planta hexaplóide original.

Em resumo, Kadota e Niimi (2002) e Thao et al. (2003), citam que os parâmetros estomáticos são freqüentemente usados como indicadores do nível de ploidia em plantas. Já Masterson (1994), afirma que as informações sobre os parâmetros estomáticos podem se constituir num forte indicador para a mudança do nível de ploidia.

#### **5.4.4 Confirmação da natureza nucelar das plantas poliplóides com uso de marcadores moleculares**

A etapa inicial do experimento consistiu da extração de DNA genômico das plantas. Com o método utilizado foi possível obter DNA genômico com pureza adequada, a realização de experimentos com a técnica de PCR.

Em seguida foram realizados os experimentos de seleção das seis combinações de *primers* TRAP's. De um modo geral, as amplificações resultantes destes experimentos resultaram em géis com número de bandas variando entre 20 e 30, em cada gel. Como seria esperado, cada par de *primers* produziu um padrão de bandamento distinto dos demais e as melhores combinações de *primers* foram as seguintes: F1P3, F1P5, F2P2, F2P4, F2P5 E F2P6.

A seguir, foram realizados experimentos com amplificações utilizando-se os seis pares de *primers* TRAP's, em experimentos com os DNA's das seis plantas poliplóides avaliadas e dos seus respectivos controles (Tabela 1). A Figura 5 representa um gel de poliacrilamida denaturante (a 5%) contendo os resultados obtidos (padrão de bandamento) com o uso de duas combinações de *primers* de marcadores moleculares TRAP's: F2P5 e F2P6.

Por esta figura, e também nos outros géis obtidos com as diferentes combinações de *primers* TRAP's testadas, pode-se observar que não foi possível detectar diferenças entre o padrão de bandamento das plantas controles e o das plantas poliplóides. Diante de tais resultados, é possível afirmar de que as seis plantas poliplóides obtidas e avaliadas com marcadores moleculares se tratam de plantas originadas de embriões nucelares, pois apresentam padrão molecular idêntico ao das respectivas variedades originais.

Este resultado é de grande importância pois facilita os trabalhos posteriores de avaliação agronômica destes respectivos genótipos poliplóides. Isto porque o desejado neste estudo seria a obtenção de plantas autotetraplóides nucelares das três variedades de porta-enxertos de citros, de forma que se espera que estes genótipos produzam plantas enxertadas com porte reduzido, mas sem alterar nenhuma outra característica agronômica. Isto seria praticamente impossível se fossem obtidas plantas autotetraplóides com origem híbrida, já que, nos embriões zigóticos, sempre ocorrem segregações genéticas devido a união dos dois gametas originados de processo meiótico.

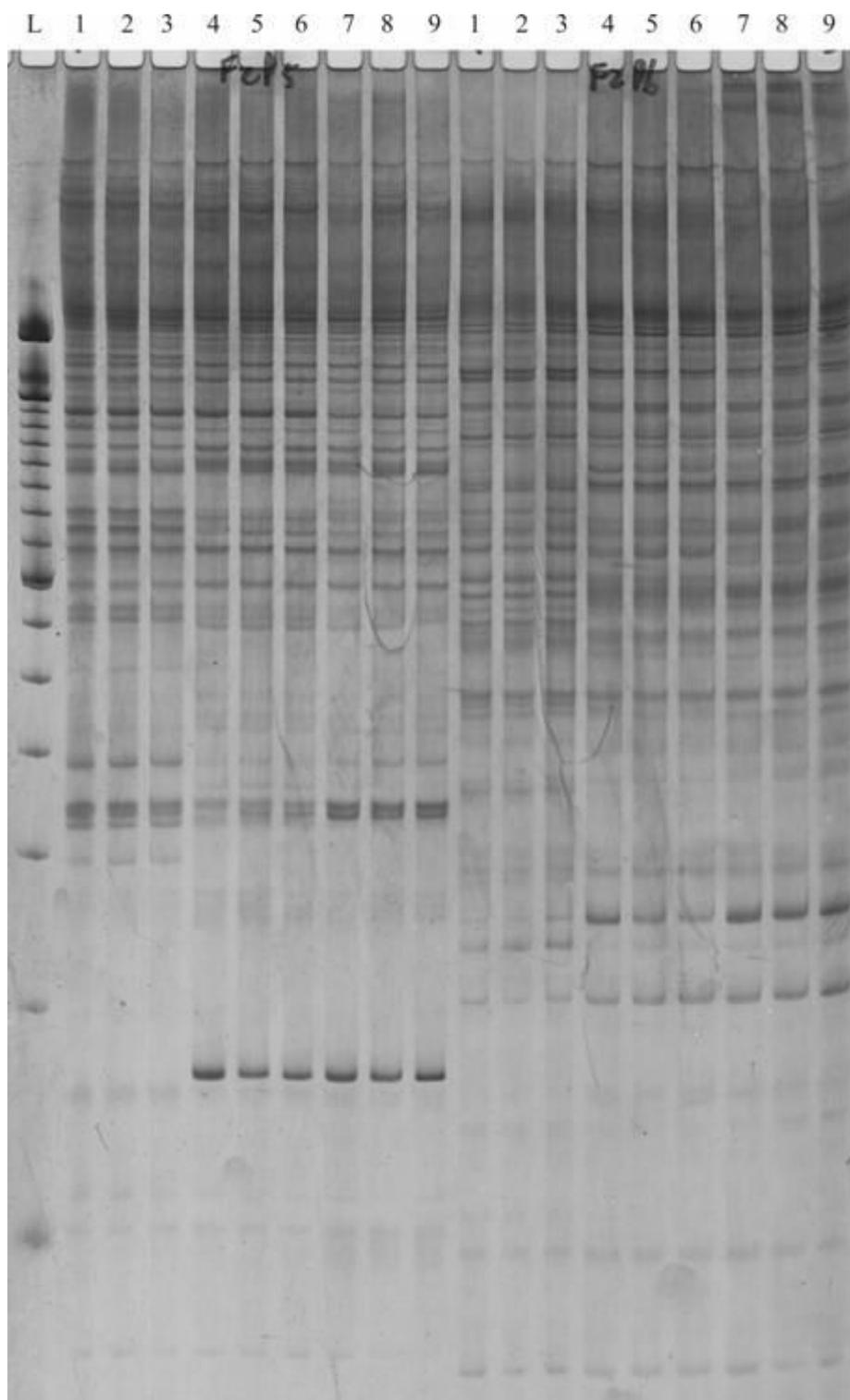


Figura 5. Gel de poliacrilamida (5%) denaturante contendo o padrão de bandamento resultante da amplificação com primers F2P5 e F2P6 de TRAP's. Amostras: 1- limão 'Cravo' controle; 2- planta 1; 3- planta 2; 4- tangerina 'Sunki' controle; 5- planta 1; 6- planta 2; 7- tangerina 'Cleópatra' controle; 8- planta 1 e 9- planta 2.

Trata-se de um dos primeiros trabalhos em que se relata o uso de marcadores moleculares TRAP's em citros. Apesar de se tratar de um marcador molecular dominante, os marcadores TRAP's apresentam vantagens por ser de fácil uso, ser *multi-loci*, produzir géis contendo grande número de bandas, possuir boa repetibilidade e reproducibilidade, bem como apresenta baixo custo para o desenvolvimento dos *primers* e nas fases posteriores.

Trabalhos recentes relatam o emprego de marcadores moleculares TRAP's na avaliação da diversidade genética em cana-de-açúcar e para a identificação de possíveis genes candidatos associados à tolerância ao frio ou envolvidos na rota metabólica da síntese da sacarose (ALWALA et al., 2006).

Os marcadores TRAP's também foram empregados com sucesso para avaliar a dispersão de pólen de organismos geneticamente modificados em plantação de *Lolium perenne* (GIDDINGS et al., 1997).

#### **5.4.5 Caracterização fisiológica**

Na Tabela 14 estão dispostos os dados obtidos com as avaliações de parâmetros fisiológicos das plantas poliplóides e das respectivas plantas-controle.

Tabela 14 - Médias da taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> por área de folha (A), taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> por massa seca de folha (A'), condutância estomática (gs), concentração intercelular de CO<sub>2</sub> (Ci), transpiração (E), eficiência de uso da água (EUA), eficiência quântica potencial do fotossistema II (Fv/Fm), eficiência quântica efetiva do fotossistema II ( $\Delta F/Fm'$ ), coeficiente de extinção fotoquímica da fluorescência (qP), coeficiente de extinção não-fotoquímica da fluorescência (NPQ), transporte aparente de elétrons (ETR) e massa específica de plantas poliplóides de citros e dos controles.

Genótipo	A ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	A' ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	gs ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Ci ( $\mu\text{L L}^{-1}$ )	E ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	EUA	Fv/Fm	$\Delta F/Fm'$	qP	NPQ	ETR ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Massa Específica ( $\text{g m}^{-2}$ )
SK- Controle	9,3 ab	0,09	0,10	207,5	1,66	5,71	0,82	0,12	0,27	0,54	60,0	108,0 ab
SK-1	6,8 b	0,07	0,08	229,2	1,49	4,56	0,83	0,10	0,23	0,51	50,0	102,0 b
SK-2	11,0 a	0,09	0,13	229,2	2,04	5,45	0,84	0,14	0,35	0,57	73,7	123,3 a
Teste F	6,78 **	1,23 <sup>ns</sup>	3,91 <sup>ns</sup>	1,33 <sup>ns</sup>	2,81 <sup>ns</sup>	1,95 <sup>ns</sup>	0,48 <sup>ns</sup>	2,43 <sup>ns</sup>	1,40 <sup>ns</sup>	0,37 <sup>ns</sup>	2,42 <sup>ns</sup>	9,95 **
CV(%)	18,0	17,85	27,5	9,8	19,4	16,38	2,54	24,8	34,1	20,1	245,0	10,30
LC- Controle	10,8	0,09	0,13 b	229,0 b	2,10	5,18 a	0,83	0,13	0,36	0,66	68,0	116,6
LC-1	9,5	0,08	0,11 b	217,0 b	1,90	5,03 ab	0,84	0,13	0,37	0,64	67,5	121,3
LC-2	11,6	0,09	0,18 a	261,7 a	2,74	4,27 b	0,83	0,13	0,32	0,58	67,8	129,5
Teste F	1,45 <sup>ns</sup>	1,03 <sup>ns</sup>	9,45 **	23,94 **	3,77 <sup>ns</sup>	4,58	0,24 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0,49 <sup>ns</sup>	1,14 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	2,78 <sup>ns</sup>
CV(%)	16,1	16,45	18,6	4,0	20,0	9,39	0,85	13,5	21,2	11,7	13,6	6,35
Cleo- Contr.	11,5	0,11	0,13	214,2	2,07	5,65	0,82	0,16	0,39	0,64	79,6	104,9 b
Cleo-1	11,5	0,11	0,12	210,7	2,12	5,44	0,83	0,15	0,37	0,64	78,9	104,1 b
Cleo-2	11,1	0,09	0,11	200,0	1,97	5,83	0,84	0,16	0,41	0,65	81,8	128,9 a
Teste F	0,03 <sup>ns</sup>	1,60 <sup>ns</sup>	0,12 <sup>ns</sup>	0,53 <sup>ns</sup>	0,07 <sup>ns</sup>	0,30 <sup>ns</sup>	2,14 <sup>ns</sup>	0,06 <sup>ns</sup>	0,40 <sup>ns</sup>	0,06 <sup>ns</sup>	0,05 <sup>ns</sup>	12,48 **
CV(%)	21,2	21,21	32,1	9,8	27,8	12,48	1,02	16,1	18,1	10,0	16,0	7,58

Médias seguidas de letras distintas, na mesma coluna, diferem entre si ao nível de significância de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F.

\*\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F.

<sup>ns</sup> Não significativo

Amostras: SK - tangerina 'Sunki'; LC - limão 'Cravo'; Cleo - tangerina 'Cleópatra'

Para a tangerina ‘Sunki’ pode-se observar que a planta autotetraplóide (planta 2) apresentou a taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> por área de folha (A) e a massa específica significativamente maiores que a da planta 1 (mixoplóide), mas não diferindo do controle. Como ambos os parâmetros tiveram mesmo padrão e juntos, eles compõem a taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> por massa seca de folha (A<sup>1</sup>), esta última não apresentou alteração significativa entre os genótipos de tangerina ‘Sunki’. Os outros parâmetros avaliados não apresentaram alterações significativas.

Por estes resultados pode-se concluir que a maior taxa fotossintética (A) das folhas da planta autotetraplóide de tangerina ‘Sunki’ (planta 2) em relação a planta 1 deve estar correlacionada com a produção de folhas com maior massa específica (Tabela 14), já que ambas apresentaram folhas mais espessas que o controle, mas com medidas bem próximas (Tabela 11 e Figura 3) Assim, a produção de folhas com maior quantidade de células e tecidos por unidade de área pode ter possibilitado a planta possuir maior eficiência fotossintética. Por outro lado, não há nenhum indício de que a alteração da ploidia da planta tenha ocasionado outra alteração nos processos fotossintéticos (difusivos ou fotoquímicos) da folha.

Após um extenso estudo, Romero-aranda et al. (1997), observaram que plantas autotetraplóides de laranja ‘Valência’ apresentaram menor taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> por área, por peso e por células, do que as plantas diplóides. Segundo os autores, isto ocorreu devido ao aumento das barreiras à difusão do CO<sub>2</sub>, possivelmente por causa de modificações físicas e estruturais, ocorridas nas folhas, o que ocasionou uma redução da capacidade fotossintética por unidade de área.

Já Syvertsen et al. (2000), não observaram efeitos significativos da tetraploidia na taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> de plantas de três variedades de porta-enxerto.

As plantas poliplóides de tangerina ‘Cleópatra’ não apresentaram alterações significativas em relação às características fisiológicas avaliadas (Tabela 14). A exceção foi a

planta 2 (autotetraplóide), que apresentou uma massa específica significativamente maior (128,9 g m<sup>-2</sup>) que o controle e que a outra planta poliplóide, a planta 1 (Tabela 14).

Neste caso, a maior espessura e massa específica das folhas não foram suficientes para induzir a planta a uma maior taxa de assimilação de CO<sub>2</sub>. Certamente, deve ter ocorrido alguma outra limitação nos processos fotossintéticos que impediu a maior eficiência fotossintética das folhas mais espessas. Fato semelhante ao observado por Romero-aranda et al. (1997).

A planta 2 de tangerina ‘Cleópatra’ também apresentou outras alterações mas somente em relação a planta 1, folhas com conteúdos significativamente menores de clorofila a, b e total (Tabela 15).

Tabela 15 – Médias dos teores de clorofila a, clorofila b, clorofila total e relação entre clorofila a/b de plantas poliplóides de citros e dos controles.

	clorofila a (mg g <sup>-1</sup> PF)	clorofila b (mg g <sup>-1</sup> PF)	clorofila total (mg g <sup>-1</sup> PF)	Relação clorofila a/b
SK – controle	0,88	0,33	1,22	2,67
SK - planta 1	0,89	0,32	1,21	2,82
SK - planta 2	0,81	0,29	1,10	2,81
Teste F	0,23 <sup>ns</sup>	0,34 <sup>ns</sup>	0,26 <sup>ns</sup>	1,18 <sup>ns</sup>
CV(%)	28,25	31,47	29,03	6,76
LC – controle	0,96	0,37	1,33	2,62 b
LC - planta 1	0,73	0,24	0,98	2,96 a
LC - planta 2	0,76	0,25	1,01	3,09 a
Teste F	0,93 <sup>ns</sup>	2,75 <sup>ns</sup>	1,28 <sup>ns</sup>	16,44 <sup>**</sup>
CV(%)	32,62	31,09	32,20	4,11
Cleópatra - controle	0,80 ab	0,31 ab	1,11 ab	2,65
Cleópatra - planta 1	0,96 a	0,39 a	1,35 a	2,44
Cleópatra - planta 2	0,70 b	0,27 b	0,97 b	2,61
Teste F	3,55 *	4,55 *	3,99 *	1,09 <sup>ns</sup>
CV(%)	24,41	26,58	24,53	12,03

Médias seguidas de letras distintas, na mesma coluna, diferem entre si ao nível de significância de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F.

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F.

<sup>ns</sup> Não significativo

Amostras: SK - tangerina ‘Sunki’; LC - limão ‘Cravo’; Cleo - tangerina ‘Cleópatra’

Dentre as duas plantas autotetraplóides de limão ‘Cravo’, apenas a planta 2 apresentou alterações significativas nos parâmetros fisiológicos, em relação à planta-controle: folhas com

maior condutância estomática ( $g_s$ ), maior concentração intercelular de  $CO_2$  ( $C_i$ ) e menor eficiência do uso da água (EUA).

Apesar destas duas alterações observadas no processo difusivo da fotossíntese das folhas ( $CO_2$ ), não se pôde observar nenhum incremento significativo na taxa de assimilação de  $CO_2$  por unidade de área ( $A$ ) e nem por unidade de massa ( $A'$ ). Deste modo considera-se que esta alteração pode ser considerada como deletéria para a planta pois indica que a mesma apresenta uma menor eficiência do uso da água, necessitando de maior volume de água para a realização de mesma quantidade de fotossíntese (quantidade de  $CO_2$  assimilado).

Segundo Machado et al. (2008), acréscimos na concentração intercelular de  $CO_2$  ( $C_i$ ) podem causar um aumento na taxa de assimilação de  $CO_2$  ( $A$ ), devido ao aumento da concentração de  $CO_2$  para atividade da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase-oxigenase (*Rubisco*).

Syvertsen et al. (2000), observaram que as plantas autotetraplóides produziram raízes maiores do que as plantas diplóides, mas com tendência a produzir raízes mais curtas e com menor número de raízes fibrosas, que são as responsáveis pela maior absorção de água e de nutrientes. Deste modo, pôde-se observar menor absorção de água, de nitrogênio e menores respostas de crescimento, após o cultivo das plantas autotetraplóides em ambientes com maior concentração de  $CO_2$ . Em suma, os autores observaram que este padrão de raízes produzidas pelas plantas tetraplóides resultou em menores taxas de crescimento.

Outra característica alterada significativamente nas plantas autotetraplóides de limão 'Cravo' foi a relação entre clorofila a e b, que aumentou nas duas plantas (Tabela 15). Romero-aranda et al. (1997), pelo contrário, observaram valores 25% menores da relação de clorofila a/b nas plantas tetraplóides, apesar de verificarem incremento na concentração total de clorofila nas mesmas plantas.

As clorofilas são grupos de pigmentos verdes absorventes de luz, ativos na fotossíntese. A luz absorvida por carotenóides ou pela clorofila b é rapidamente transferida para a clorofila a dando continuidade à cadeia de produção de energia (TAIZ; ZEIGER, 2004). Portanto, os teores de clorofilas e as suas proporções equilibradas, são fundamentais para que as plantas apresentem uma maior eficiência fotossintética. Provavelmente, quanto maior o teor de clorofila total, maior será a eficiência de produção de energia para a planta, desde que outros fatores que contribuem para realização da fotossíntese também estejam em proporções adequadas.

É conhecido que na poliploidização há um incremento no tamanho das células em todos os tecidos: raiz, caule, folha, flores e grãos de pólen, entretanto, o tamanho do cloroplasto normalmente não é alterado pelo fator ploidia (LADYGIN, 2004).

## **5.5 Experimentos adicionais**

### **5.5.1 Avaliação de densidade estomática, de outras plantas poliplóides putativas**

Os resultados obtidos com as avaliações de densidade estomática das plantas selecionadas e das respectivas plantas-controle estão citados na Tabela 16.

Para tangerina ‘Sunki’, foram selecionadas 15 plantas pelo método de seleção visual e dentre estas, 11 foram consideradas como sendo poliplóides (tetraplóides ou outra poliploidia) utilizando-se o método de avaliação da densidade estomática (SK - plantas 1, 2, 4, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 16 e 18). Isto porque apresentaram valores de densidade estomática iguais ou inferiores aos da planta-controle tetraplóide (Tabela 16).

Diante de tal resultado, considera-se que o método de identificação de plantas poliplóides de tangerina 'Sunki' com base em características morfológicas de folhas foi eficiente em identificar plantas poliplóides.

Tabela 16 - Médias de densidade estomática de plantas poliplóides putativas selecionadas por características morfológicas e dos controles.

Genótipos	Densidade estomática (mm <sup>2</sup> )	Tratamento (concentração/tempo em colchicina)
SK-Controle 2X	317,9 b	
SK-Controle 4X	230,4 cd	0,05%/*
SK - planta 1	213,0 de	0,05%/*
SK - planta 2	183,9 de	0,05%/1 dia
SK - planta 4	165,7 de	0,025%/2 dias
SK - planta 5	160,2 e	0,05%/1 dia
SK - planta 6	156,6 e	0,1%/1 dia
SK - planta 9	233,0 cd	0,05%/1 dia
SK - planta 10	223,9 cde	0,05%/*
SK - planta 11	293,1 bc	0,025%/2 dias
SK - planta 12	318,6 b	0,1%/1 dia
SK - planta 13	214,8 de	0,025%/2 dias
SK - planta 14	163,8 de	0,05%/1 dia
SK - planta 16	152,9 e	0,05%/3 dias
SK - planta 17	418,7 a	0,025%/2 dias
SK - planta 18	162,0 de	0,025%/1 dia
SK - planta 19	344,1 b	0,025%/2 dias
Teste F	32,7 **	
CV (%)	14,7	
LC - Controle 2X	529,9 a	
LC - Controle 4X	247,5 c	0,05%/3 dias
LC - planta 3	391,4 b	0,05%/2 dia
LC - planta 15	458,7 ab	0,1%/1 dia
LC - planta 20	402,3 b	0,025%/1 dia
LC - planta 21	442,4 b	0,1%/1 dia
Teste F	43,1 **	
CV (%)	10,9	
Cleo - Controle 2X	477,8 a	
Cleo - Controle 4X	265,5 b	0,05%/1 dia
Cleo - planta 7	320,4 b	0,1%/1 dia
Cleo - planta 8	189,3 c	0,05%/2 dias
Teste F	83,5 **	
CV (%)	11,7	

Médias seguidas de letras distintas, na mesma coluna, diferem entre si ao nível de significância de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

\* tempo de tratamento em colchicina desconhecido.

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F.

Amostras: SK - tangerina 'Sunki'; LC - limão 'Cravo'; Cleo - tangerina 'Cleópatra'

Dentre as quatro plantas poliplóides putativas de limão ‘Cravo’ avaliadas, uma foi considerada como sendo diplóide (LC – planta 15), por apresentar ploidia idêntica ao da planta-controle diplóide (Tabela 16). As demais plantas avaliadas apresentaram densidades estomáticas intermediárias entre as duas plantas controles (2x e 4x) e, portanto, não puderam ter a sua ploidia confirmada. Para isto, seria necessária a realização de análises mais precisas, pela metodologia de citometria de fluxo ou contagem de número de cromossomos.

A planta 8 de tangerina ‘Cleópatra’ foi confirmada como sendo tetraplóide, com base na avaliação da densidade estomática. Já a planta 7, apresentou densidade estomática intermediária ao das duas plantas-controle, mas com valor estatisticamente semelhante ao da planta tetraplóide. Diante de tal fato, pode-se supor de que se trata de uma planta poliplóide, mas para a confirmação desta hipótese seria necessária a realização de análises mais precisas.

### **5.5.2 Estimativa da porcentagem de plantas nucelares, obtidas de sementes germinadas *in vitro* de variedades de porta-enxertos, pelo método de marcadores moleculares TRAP’s**

Os resultados obtidos com as amplificações realizadas com os três pares de *primers* TRAP’s, nos DNA’s de plantas de tangerina ‘Sunki’ demonstraram que 10% das plantas avaliadas apresentavam bandas distintas das observadas na planta-controle. Estas plantas foram então consideradas como sendo plantas zigóticas.

A Figura 6 representa uma região de um gel de poliacrilamida denaturante (a 5%) contendo os resultados obtidos (padrão de bandamento) com o uso da combinação de *primers* F2P5 de marcadores moleculares TRAP’s. Nesta figura pode-se observar a existência de polimorfismos no DNA de algumas plantas obtidas por germinação de sementes. Os polimorfismos podem ser representados pela ausência de bandas, no padrão da planta

avaliada, ou então, pela presença de bandas adicionais no padrão destas mesmas plantas (Figura 6).

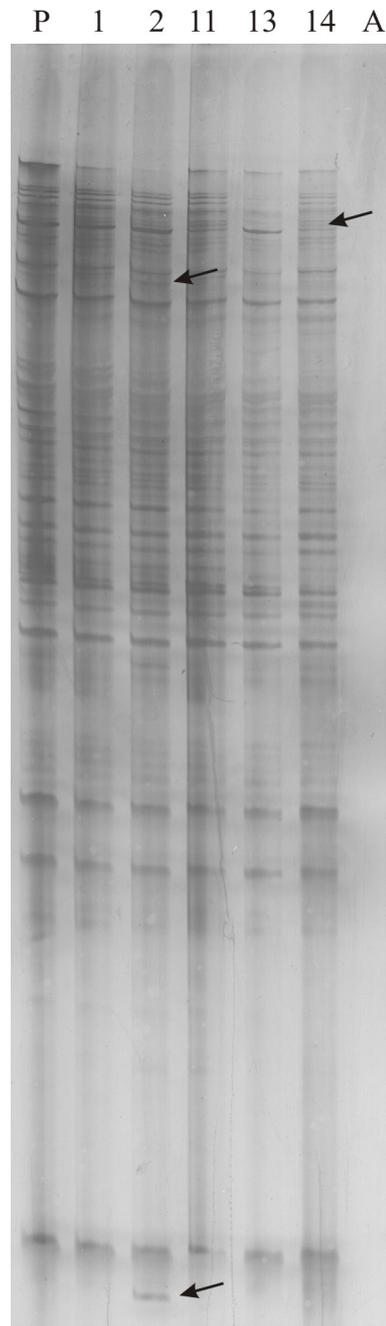


Figura 6. Gel de poliacrilamida (5%) denaturante contendo o padrão de bandamento resultante da amplificação com primers F2P5 de TRAP's. Amostras: P- tangerina 'Sunki' controle; amostras das plantas 1, 2, 11, 13 e 14. Setas indicam região com polimorfismo de DNA.

Os resultados obtidos com as ampliações realizadas com os três pares de *primers* TRAP's, nos DNA's de plantas de tangerina 'Cleópatra' demonstraram que todas as plantas apresentavam o mesmo padrão de bandamento da planta-controle, demonstrando que a tangerina 'Cleópatra' não produziu plantas zigóticas a partir da germinação de sementes.

Já o limão 'Cravo' foi a espécie que apresentou a maior porcentagem de plantas zigóticas, nas avaliações dos três pares de *primers* de marcadores moleculares TRAP's. Esta porcentagem foi estimada em 55% de plantas zigóticas, obtidas a partir da germinação *in vitro* de sementes.

Na Figura 7 pode-se ter uma idéia do padrão de polimorfismo, observado nas amostras de DNA de limão 'Cravo'.

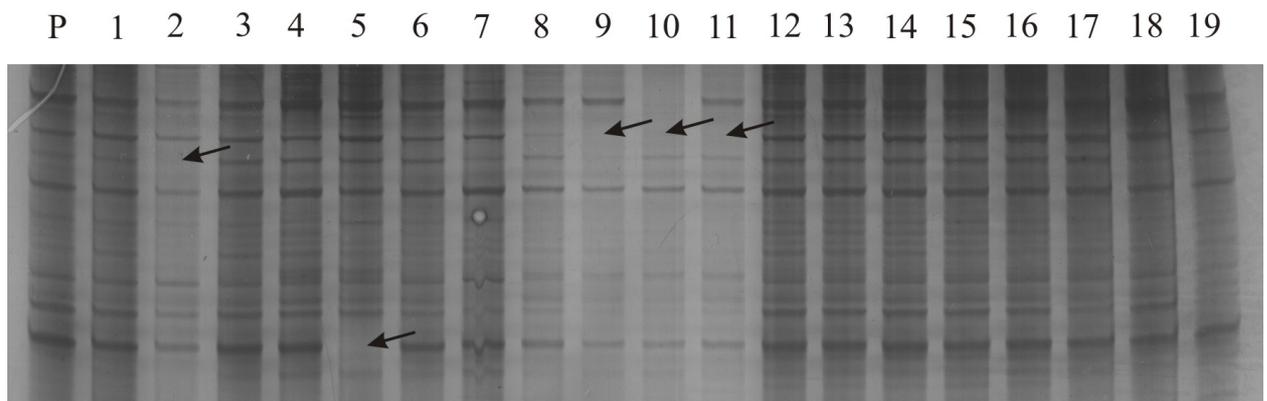


Figura 7. Gel de poliacrilamida (5%) denaturante contendo o padrão de bandamento resultante da amplificação com primers F2P4 de TRAP's. Amostras: P- limão 'Cravo' controle; amostras das plantas 1 a 19. Setas indicam região com polimorfismo de DNA.

A poliembrião é caracterizada pela presença de dois ou mais embriões na mesma semente. Geralmente apenas um é de origem sexual, sendo os demais de natureza agâmica, provenientes do desenvolvimento de células do nucelo. Portanto, com genoma idêntico a planta-mãe (ANDRADE et al., 2007). A grande maioria das variedades cítricas produz sementes poliembriônicas devido ao seu forte potencial embriogênico do tecido nucelar do

ovário, que normalmente origina de um a múltiplos embriões adventícios ao redor do embrião sexual, denominado de embriões adventícios (KOLTUNOW, 1993).

Andrade (2007), usando a técnica de AFLP na detecção de polimorfismos em plântulas originadas de semente de diferentes variedades de citros, observou dissimilaridade de 22% para limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia*), 17% para tangerina ‘Sunki’ (*Citrus sunki*), 12% para tangerina ‘Cleópatra’ (*Citrus reshni*) e 18% para o citrumelo ‘Swingle’ (*Citrus paradise* x *Poncirus trifoliata*), sendo que no total de plântulas avaliadas apenas 47% das plântulas mostraram-se nucelares.

Cristofani e Machado (1998), usando marcadores moleculares do tipo RAPD para a identificação e determinação de embriões zigóticos, encontraram uma frequência de 6% de plantas zigóticas em sementeira de limão ‘Cravo’. Resultado bem inferior ao observado no presente estudo. No entanto, sabe-se que a taxa de polimebrionia é variável de ano para ano e que nas condições de germinação das sementes *in vivo*, como foi o caso das sementeiras, as plântulas híbridas possuem maior desvantagem em comparação com as nucelares, pois as últimas geralmente possuem maior vigor e não sofrem problemas genéticos. Assim, é realmente esperada uma estimativa mais baixa para a porcentagem de plantas zigóticas em populações de plantas obtidas de sementeiras, em comparação com populações originadas de germinação *in vitro*.

## 6 CONCLUSÕES

- O cultivo temporário em meio contendo colchicina causa toxidez aos explantes de citros (segmentos de epicótilo), e esta toxidez é maior em função do aumento da concentração de colchicina e do tempo de cultivo no meio contendo o alcalóide.
- As plantas autotetraplóides, em geral, apresentaram folhas com maior espessura do limbo e alteração na relação comprimento/largura do limbo foliar e aumento do espaço intercelular.
- A exceção da planta mixoplóide de tangerina 'Sunki', as demais plantas poliplóides avaliadas de tangerina 'Ceópatra', limão 'Cravo' e tangerina 'Sunki' apresentaram folhas com número significativamente menor de estômatos por  $\text{mm}^2$ .
- Todas as plantas autopoliplóides avaliadas demonstraram ter origem nucelar, em avaliações com uso de marcadores moleculares TRAP's.
- As plantas autopoliplóides apresentaram diferentes alterações nas características fisiológicas avaliadas.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, W.A.B.; Caracterização Anatômica da Organogênese *in vitro* e Transformação Genética Via *Agrobacterium tumefaciens* em *Citrus* sp., 2002, Tese de Doutorado, ESALQ – USP, Piracicaba, SP, Brasil, 138p.
- ALWALA, S.; SUAN, A.; ARRO, J. A.; VEREMIS, J. C.; KIMBENG, C. A. Target region amplification polymorphism (TRAP) for assessing genetic diversity in sugarcane germplasm collections. **Crop Science**, Madison, v. 46, p. 448-455, 2006.
- ANDERSON, L. C. *Flaveria campestris* (asteraceae): a case of polyhaploidy or relic ancestral diploidy?. **Evolution**, Lancaster, v. 26, n. 24, p. 671-673, 1972.
- ANDRADE, R. A.; MARTINS, A. B. G.; LEMOS, E. G. M.; LUZ, F. J. F.; SILVA, M. T. H. Detecção de polimorfismo em porta-enxertos para citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 2, p. 345-349, 2007.
- ARAÚJO, E. F.; ROQUE, N. Taxonomia dos citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico; Fundag, 2005. 926 p.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Washington, v. 24, p.1-15, 1949.
- ASHKENAZI, S.; OREN, Y. The use of citrus exocortis virus (CEV) for tree size control in Israel: practical aspects. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 6., 1988, Tel Aviv. **Proceedings...** Rehovot: International Society of Citriculture, 1989. p. 917-920.
- BARBOSA, C. J.; PINA, J. A.; PÉREZ-PANADÉS, J.; BERNARD, L.; SERRA, P.; NAVARRO, L.; DURAN-VILA, N. Mechanical transmission of citrus viroids. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, p. 749-754, 2005.
- BAR-JOSEPH, M. Citrus viroids and citrus dwarfing in Israel. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 349, p. 271-275, 1993.
- BARRET, H. C. An autotetraploid of the 'Key Lime', *Citrus aurantifolia*. **Fruit Varieties Journal**, University Park, v. 46, p. 166-170, 1992.
- BARRET, H. C. Colchicine-induced polyploidy in *Citrus*. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 135, p. 29-34, 1974.
- BASSANEZI, R. B.; FERNANDES, N.G.; YAMAMOTO, P.T. **Morte Súbita dos Citros**, Araraquara: Fundecitrus, 2003. 54p.
- BEVINGTON, K. B.; BACON, P. E. Response of Valencia orange trees to hedging. **Australian Citrus News**, Mildura, v. 50, p. 2, 1976.

BROADBENT, P.; FORSYTH, J. B.; HUTTON, R. J.; BEVINGTON, K. B. Guidelines for the commercial use of graft-transmissible dwarfing in Australia - potential benefits and risks. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 7., 1992. Acireale. **Proceedings...** Acireale: International Society of Citriculture, 1994. p. 697-701.

BYRNE, M. C.; NELSON, C. J.; RANDAL, D. D. Ploidy effects on anatomy and gas exchange of tall fescue leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 68, p. 891-893, 1981.

CALIXTO, M. C.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MENDES, B. M. J.; VIEIRA, M. L. C. Somatic hybridization between *Citrus sinensis* (L.) Osbeck and *C. grandis* (L.) Osbeck. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 7, p. 721-724, 2004.

CAMERON, J.W.; FROST, H.B. Genetics, breeding and nucellar embryony. In: REUTHER, W.L.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J. (Eds.). **The Citrus Industry**. Berkeley, University of California Press, v.2, p.325-370. 1968.

CARVALHO, S. A.; GRAF, C. C. D.; VIOLANTE, A. R. Produção de material básico e propagação In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2005. p. 279-316.

CARVALHO-COSTA, M. A. P.; MENDES, B. M. J.; MOURÃO FILHO, F. A. A. Somatic hybridisation for improvement of citrus rootstock: production of five new combinations with potential for improved disease resistance. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, East Melbourne, v. 43, n. 9, p. 1151-1156, 2003.

COHEN, M. Effect of exocortis inoculation on performance of Marsh grapefruit tree on various rootstocks. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 6., 1974, Mbabane. **Proceedings...** Richmond: International Organization of Citrus Virologists, 1974. p. 117-121.

COSTA, M. A. P. C.; ALMEIDA, W. A. B.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MENDES, B. M. J.; RODRIGUEZ, A. P. M. Stomatal analysis of citrus somatic hybrids obtained by protoplast fusion. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 3, p. 297-300, 2004.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of Single Sequence Repeat Polymorphisms in Denaturing Polyacrylamide Sequencing Gels by Silver Staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, n. 19, p. 299-306, 2001.

CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A. Utilização de marcadores moleculares na identificação de plântulas zigóticas e nucelares em sementeira de limão 'Cravo'. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 19, n. 1, p. 159-166, 1998.

DAVIES, F.; ALBRIGO, L. **Citrus**. Wallingford: CAB International, 1994. 254 p.

DE WET, J. M. J. Polyploid and evolution in plants. **Taxon**, Utrecht, v. 20, n. 1, p. 29-35, 1971.

EL-ZEFTAWI, B. M. Response of 'Navel' orange trees to skirting. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 5, p. 59-63, 1976.

FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, New York, v. 5, n. 1, p. 123-142, 1968.

FLEXAS, J.; GULIAS, J.; JONASSON, S.; MEDRANO, H.; MUS, M. Seasonal patterns and control of gas exchange in local populations of the Mediterranean evergreen shrub *Pistacia lentiscus* L. **Acta Oecologica**, Amsterdam- ELSEVIER, v.22, p.33-43, 2001.

FNP CONSULTORIA & AGROINFORMATIVOS. Citros. **Agriannual 2005: Anuário de Agricultura Brasileira**, São Paulo, p. 305-310, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. FAOSTAT. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567>>. Acesso em: 21 fev. 2008.

FUCIK, J. E. Hedging and topping in Texas grapefruit orchards. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 1., 1977, Orlando. **Proceedings...** Orlando: International Society of Citriculture, 1977. v. 1, p. 172-176.

GAO, S. L.; ZHU, D. N.; CAI, Z. H.; XU, D. R. Autotetraploid plants from colchicine-treated bud culture of *Salvia miltiorrhiza* Bge. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 43, p. 73-77, 1996.

GARCÍA-SÁNCHEZ, F.; MARTÍNEZ, V.; JIFON, J.; SYVERTSEN, J. P.; GROSSER, J. W. Salinity reduces growth, gas exchange, chlorophyll and nutrient concentrations in diploid sour orange and related allotetraploid somatic hybrids. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 77, n. 4, p. 379-386, 2002.

GIDDINGS, G.D.; HAMILTON, N.R.S.; HAYWARD, M.D. The release of genetically modified grasses. Part 1: pollen dispersal to traps in *Lolium perenne*. **Theoretical Applied Genetically**, Berlin, v.94, p.1000-1006, 1997.

Glossário. Disponível em: <<http://www.cib.org.br/glossario.php>>. Acesso em: 03 de março de 2008.

GMITTER JUNIOR, F. G.; LING, X. B. Embryogenesis in vitro and nonchimeric tetraploid plant-recovery from undeveloped citrus ovules treated with colchicine. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v. 116, p. 317-321. 1991.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D.J.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M. Mutação cromossômica. II: mudança no número de cromossomos. In: \_\_\_\_\_. **Introdução à genética**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 521-539.

GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G. Applications of somatic hybridization and cybridization in crop improvement, with citrus as a model. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Gaithersburg, v. 41, p. 220-225, 2005.

GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G. Protoplast fusion and *Citrus* improvement. **Plant Breeding Reviews**, New York, v. 8, p. 339-374, 1990.

GROSSER, J. W.; OLLITRAULT, P.; OLIVARES-FUSTER, O. Somatic hybridization in Citrus: an effective tool to facilitate variety improvement. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Gaithersburg, v. 36, p. 434-449, 2000.

HU, J.; VICK, B. A. Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 21, p. 289-294, 2003.

IWAGAKI, I. Tree configuration and pruning of satsuma mandarin in Japan. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 1., 1981, Tokyo. **Proceedings...** Tokyo: International Society of Citriculture, 1981. v. 1, p. 169-172.

JOSEPH, M. C.; RANDALL, D. D.; NELSON, C. J. Photosynthesis in polyploid tall fescue. **Plant Physiology**, Rockville, v. 68, p. 894-898, 1981.

KADOTA, M.; NIIMI, Y. In vitro induction of tetraploid plants from a diploid Japanese pear cultivar (*Pyrus pyrifolia* N.cn.Hosui). **Plant Cell Reports**, New York, v. 21, p. 282-286, 2002.

KOLTUNOW, A. M. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **Plant Cell**, Baltimore, v. 5, p. 1245-1467, 1993.

KONDOROSI, E.; ROUDIER, F.; GENDREAU, E. Plant cell-size control: growing by ploidy?. **Current Opinion in Plant Biology**, Amsterdam, v.3, p.488-492, 2000.

LANDYGIN, V. G. Photosystem damage and spatial architecture of thylakoids in chloroplasts of pea chlorophyll mutants. **Biology Bulletin**, Moscow, v. 31, n. 3, p. 268-276, 2004.

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

LEE, L. S. Citrus polyploidy – origins and potential for cultivar improvement. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 39, p. 735-747, 1988.

LEE, L. S.; GILLESPIE, D.; SHAW, R. Prospects for using citrus tetraploids for rootstocks. In: WORLD CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRUS NURSEYEMEN, 3., 1990, Sydney. **Proceedings...** Sydney: International Society of Citrus Nurserymen, 1990.

LEECH, R. M.; LEESE, B. M.; JELLINGS, A. J. Variation in cellular ribulose-1, 5-bisphosphate-carboxylase content in leaves of *Triticum* genotypes at three levels of ploidy. **Planta**, Berlin, v. 166, p. 259-263, 1985.

LEITCH, I.J.; BENNETT, M.D. Polyploidy in angiosperms. **Trends in Plant Science**, Killington, v. 2, n. 12, p. 470-476, 1997.

LI, G.; QUIROS, C. F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. **Theoretical Applied Genetics**, New York, v. 103, p. 455-461, 2001.

MACHADO, E. C.; OLIVEIRA, R. F.; RIBEIRO, R. V.; MEDINA, C. L.; STUCHI, E. S.; MARIN, F. R.; SILVA, J. A. B.; SILVA, S. R. Fluxo de seiva, fotossíntese e condutância estomática em laranjeira ‘Natal’ com clorose variegada dos citros. In: CONGRESSO

BRASILEIRO DE AGROMETEOROLOGIA, 14., Campinas, 2005. Campinas: Embrapa Informática Agropecuária; UNICAMP, FEAGRI, 2005. Disponível em: [http://www.agritempo.gov.br/publish/publicacoes/XIVCBA/CBAgro2005\\_16.pdf](http://www.agritempo.gov.br/publish/publicacoes/XIVCBA/CBAgro2005_16.pdf). Acesso em: 07 maio 2008.

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

MACHADO, M. A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A. M.; OLIVEIRA, A. C.; Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico; Fundag, 2005. 926 p.

MASTERSON, J. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. **Science**, Washington, v. 264, p. 421-424, 1994.

MEDRI, M. E.; LLERAS, E.; VALOIS, A. C. C. Comparação anatômica entre folhas diplóides e poliplóides do guaraná [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke]. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 10, n. 2, p. 283-288, 1980.

MENDES, B. M. J.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; FARIAS, P. C. D. M.; BENEDITO, V. A. Citrus somatic hybridization with potential for improved blight and CTV resistance. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Gaithersburg, v. 37, n. 4, p. 490-495, 2001.

MEYERS, S. P.; NICHOLS, S. L.; BAER, G. R.; MOLIN, W. T.; SCHRADER, L. E. Ploidy effects in isogenic populations of alfalfa. I. Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase, soluble protein, chlorophyll, and DNA in leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 70, p. 1715-1717, 1982.

MOLIN, W.T.; MEYERS, S.P.; BAER, G.R.; SCHRADER, L.E. Ploidy effects in isogenic populations of alfalfa. **Plant Physiology**, Rockville, v. 70, p. 1710-1714, 1982.

MORALES, P.; DAVIES, F.S.; LITTELL, R.C. Pruning and skirting affect canopy microclimate, yields, and fruit quality of 'Orlando' tangelo. **HortScience**, St. Joseph, v. 35, n. 1, p. 30-35, 2000.

MOREIRA, C. S. Melhoramento de citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F. **Citricultura brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1980. v. 1, p. 197-223.

MOREIRA, C. S.; PIO, R. M. Melhoramento de citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A. S. **Citricultura brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v. 1. p. 116-152.

MOURA, T. L.; ALMEIDA, W. A. B.; MENDES, B. M. J.; MOURÃO FILHO, F. A. A. Organogênese *in vitro* de *Citrus* em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 240-245, 2001.

MURASHIGE, T.; TUCKER, D.P.H. Growth factor requirement of citrus tissue culture. In: INTERNACIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1969, Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1969. v.3, p.1155-1169.

NEVES, M. F.; JANK, M. S. (Coord.). Perspectivas da cadeia produtiva de laranja no Brasil: a Agenda 2015. **Pensa Boletim Online**, São Paulo, 2006. Disponível em: <[http://www.fundacaofia.com.br/pensa/downloads/Agenda\\_Citrus\\_2015\\_PENSAICONE.pdf](http://www.fundacaofia.com.br/pensa/downloads/Agenda_Citrus_2015_PENSAICONE.pdf)>. Acesso em: 23 jan. 2008.

NEVES, M. F.; LOPES, F. **Estratégias para a laranja no Brasil**. São Paulo: Editora Atlas, 2005. 225 p.

NEVES, M. F.; LOPES, F. F.; TROMBIN, V. G.; AMARO, A. A.; NEVES, E. M.; JANK, M. S. **Caminhos para a citricultura**: uma agenda para manter a liderança. São Paulo: Atlas, 2007. 110 p.

PEI, X. S. Polyploidy Induction and Breeding. **Shanghai Science and Technology Press**, Shanghai, p. 95-98, 1985.

PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUAREZ, J.; ORTEGA, C.; PINA, J. A.; DURAN-VILA, N.; NAVARRO, L. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of *Citrus*. **Plant Science**, Amsterdam, v. 104, p. 183-191, 1995.

PÉREZ, R.; RODRÍGUEZ, R.; GONZÁLEZ, A.; DEL VALLE, N.; DURÁN-VILA, N. Dwarf citrus trees for high-density plantings. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 7., 1992, Acireale. **Proceedings...** Acireale: International Society of Citriculture, 1994. p. 712-713.

POLIZZI, G.; AZZARO, A.; CATARA, A. Effects of citrus viroids on different rootstocks. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 7., 1992, Acireale. **Proceedings...** Acireale: International Society of Citriculture, 1994. p. 797-799.

POMPEU JR., J. Porta-enxertos In: MATTOS JR., D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JR., J. (Eds.) **Citros**, Campinas, 2005. p. 61-104.

POMPEU JR., J. Porta-enxertos. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JR., J.; AMARO, A.A. (Eds.) **Citricultura Brasileira**, v.1 São Paulo: Fundação Cargill, 1991. p.265-280.

POMPEU JÚNIOR, J. Porta-enxerto para citros potencialmente ananícantes. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 22, n. 1, p. 147-155, 2001.

PRZYWARA, L.; PANDEY, K.K.; SANDERS, P.M. Length of stomata as na indicator of ploidy level in *Actinidia deliciosa*. **New Zealand Journal of Botany**, Wellington, v.26, p.179-182, 1988.

RACITI, G.; SPINA, P.; SCUDERI, A.; INTRIGLIOLO, F. Three years of mechanical pruning of citrus in Italy. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 1., 1981, Tokyo. **Proceedings...** Tokyo: International Society of Citriculture, 1981. v. 1, p. 175-180.

ROISTACHER, C. N. Dwarfing of citrus by use of citrus viroids -Pros and Cons. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 7., 1992, Acireale. **Proceedings...** Acireale: International Society of Citriculture, 1994. p. 791-796.

ROMERO-ARANDA, R.; BONDADA, B. R.; SYVERTSEN, J. P.; GROSSER, J. W. Leaf characteristics and net gas exchange of diploid and autotetraploid citrus. **Annals of Botany**, Oxford, v. 79, n. 2, p. 153-160, 1997.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Poliploidia e seu impacto na origem e evolução das plantas silvestres e cultivadas. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 10, n. 2, p. 151-157, 2004.

SEMANCIK, J. S.; BASH, J. A.; GUMPF, D. J. Induced dwarfing of citrus by transmissible small nuclear RNA (TsnRNA) In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 15., 2002, Riverside. **Proceedings...** Riverside: International Organization of Citrus Virologists, 2002. p. 390-391.

SHAO, J.; CHEN, C.; DENG, X. *In vitro* induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 75, p. 241-246, 2003.

SIMIONI, C. **Seleção para aumento da produção de gamentas não reduzidos e poloploidização sexual em trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.)**. 2004. 223 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

SOARES FILHO, W. S. Variabilidade genética e melhoramento de citros. In: QUEIRÓZ, M. A.; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro**. (on line). Versão 1.0. Petrolina-PE: Embrapa Semi-Árido; Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Disponível em: <<http://www.cpatsa.embrapa.br/catalogo/livroorg/citros.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2008.

SOARES FILHO, W. S.; LEDO, C. A. S.; QUINTELA, M. P.; MATTOS, L. A.; PASSOS, O. S.; SOUZA, A. S. Cruzamentos em citros: frequência e vigor de híbridos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 29, n. 2, p. 393-398, 2007.

SOOST, R. K. Breeding citrus - genetic and nucellar embryony. In: ABBOTT, A. J.; ATKIN, R. K. (Ed.). **Improving vegetatively propagated crops**. London: Academic Press, 1987. p. 83-110.

SOOST, R. K.; CAMERON, J. W. **Citrus**. In: JANNICK, J.; MOORE, J. N. (Ed.). **Advances in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1975. p. 507-540.

STUCHI, E. S.; DONADIO, L. C.; SEMPIONATO, O. R.; SILVA, J. A. A. Caracterização de cinco isolados de exocorte e efeitos de sua inoculação no desenvolvimento vegetativo e produção inicial de pomeleiro 'Marsh Seedless' (*Citrus paradisi* Macf.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 20, p. 167-174, 1998.

STUCHI, E. S.; SILVA, S. R.; DONADIO, L. C.; SEMPIONATO, O. R.; REIFF, E. T. Field performance of 'Marsh Seedless' grapefruit on trifoliolate orange inoculated with viroids in Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, n. 6, p. 582-588, 2007.

SWANSON, C. P. **Cytology and cytogenetics**. New Jersey: Prentice-Hall Inc., 1957. 596 p.

SWINGLE, W. T.; REECE, P. C. The botany of citrus and its wild relatives. In: REUTHER, W.; WEBBER, H. J.; BATCHELOR, L. D. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California Press, 1967. p. 190-430.

SYVERTSEN, J.O.; LEE, L.S.; GROSSER, J.W. Limitations on Growth and Net Gas Exchange of Diploid and Tetraploid *Citrus* Rootstock Cultivars Grown at Elevated CO<sub>2</sub>. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v. 125, n. 2, p. 228-234, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 219 p.

THAO, N. T. P.; URESHINO, K.; MIYAJIMA, I.; OZAKI, Y.; OKUBO, H. Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. **Plant Cell, Tissue Organ and Culture**, Dordrecht, v. 72, p. 19-25, 2003.

VÄINÖLA, A. Polyploidization and early screening of *Rhododendron* hybrids. **Euphytica**, Wageningen, v. 112, p. 239-244, 2000.

VERNIÈRE, C.; PERRIER, X.; DUBOIS, C.; DUBOIS, A.; BOTELLA, A.; CHABRIER, C.; BOVÉ, J. M.; DURAN-VILA, N. Citrus viroids: symptom expression and effect on vegetative growth and yield of Clementine grafted on trifoliolate orange. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, p. 1189-1197, 2004.

VERNIÈRE, C.; PERRIER, X.; DUBOIS, C.; DUBOIS, A.; BOTELLA, L.; CHABRIER, C.; BOVÉ, J. M.; DURAN-VILA, N. Interactions between citrus viroids affect symptom expression and field performance of Clementina trees grafted on Trifoliolate orange. **Phytopathology**, Lancaster, v. 96, n. 4, p. 356-368, 2006.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, London, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

WAKANA, A.; HANADA, N.; PARK, S. M.; FUKUDOME, I.; KAJIWARA, K. production of tetraploid forms of acid citrus cultivars by top grafting of shoots with sprouting axillary buds treated with colchicine. **Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University**, Fukuoka, v. 50, p. 93-102, 2005.

WHITNEY, J. D., WHEATON, T. A.; CASTLE, W. S.; TUCKER, D. P. H. Citrus tree size management affects fruit yields and mechanical harvesting efficiency. **Transactions of American Society of Agricultural Engineers**, St. Joseph, v. 26, p. 704-709, 1983.

WILLIAMS, J. G.K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

WRIGHT, J. W. **Introduction to forest genetics**. New York: Academic Press, 1976. 463 p.

WU, J. H.; FERGUSON, A. R.; MOONEY, A. Allotetraploid hybrids produced by protoplast fusion for seedless triploid *Citrus* breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 141, p. 229-235, 2005.

WU, J. H.; MOONEY, P. Autotetraploid tangor plant regeneration from in vitro Citrus somatic embryogenic callus treated with colchicine. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 70, p. 99-104, 2002.

WUTSCHER, H. K. **Citrus rootstocks**. Lake Alfred: University of Florida, 1991. 15 p.

YANG, X. M.; CAO, Z. Y.; AN, L. Z.; WANG, Y. M.; FANG, X. W. In vitro tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 152, n. 2, p. 217-224, 2006.

ZENG, S. H.; CHEN, C. W.; HONG, L.; LIU, J. H.; DENG, X. X. In vitro induction, regeneration and analysis of autotetraploids derived from protoplasts and callus treated with colchicine in Citrus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 87, n. 1, p. 85-93, 2006.

ZHANG, J.; ZHANG, M.; DENG, X. Obtaining autotetraploids in vitro at a high frequency in Citrus sinensis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 89, n. 2-3, p. 211-216, 2007.