

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**ANÁLISE DO COMPORTAMENTO MEIÓTICO, VIABILIDADE DE PÓLEN,  
NÍVEL DE PLOIDIA E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA EM PORTA-  
ENXERTOS DE CITROS CONDUZIDOS A CAMPO E EM CASA-DE-  
VEGETAÇÃO**

**Divanilde Guerra  
Engenheira Agrônoma/ UFRGS  
Mestre em Fitotecnia/UFRGS**

**Tese apresentada como um dos requisitos  
à obtenção do Grau de Doutor em Fitotecnia  
Ênfase Melhoramento e Biotecnologia Vegetal**

**Porto Alegre (RS), Brasil  
Dezembro de 2011**

DIVANILDE GUERRA  
Engenheira Agrônoma - UFRGS  
Mestre em Fitotecnia - UFRGS

## TESE


Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

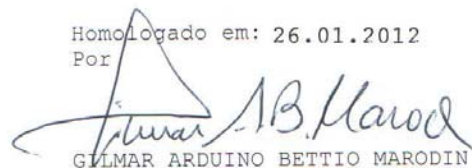
### DOUTOR EM FITOTECNIA

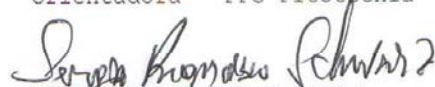
Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil


Aprovado em: 13.12.2011  
Pela Banca Examinadora


Homologado em: 26.01.2012  
Por


  
MARIA TERESA SCHIFINO WITTMANN  
Orientadora - PPG Fitotecnia

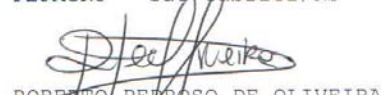
  
GILMAR ARDUINO BETTIO MARODIN  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Fitotecnia


  
SERGIO FRANCISCO SCHWARZ  
Coordenador - PPG Fitotecnia

  
PAULO VITOR DUTRA DE SOUZA  
PPG Fitotecnia

  
CARINE SIMIONI  
PPG Zootecnia/UFRGS

  
IONARA FÁTIMA CONTERARO  
FEPAGRO - São Gabriel/RS

  
ROBERTO PEDROSO DE OLIVEIRA  
EMBRAPA Clima Temperado  
Pelotas/RS

  
PEDRO ALBERTO SELBACH  
Diretor da Faculdade  
de Agronomia

## AGRADECIMENTOS

À Professora Maria Teresa Schifino Wittmann pela orientação, amizade e incentivo.

Ao Professor Sergio Francisco Schwarz pela coorientação e amizade.

À CAPES pela concessão de bolsa.

À professora Carine Simioni pela ajuda e amizade.

À Denise Olkoski, Ionara Conterato, Nair Dahmer e Roberto Weiler pela amizade, apoio e pelos momentos de descontração no laboratório.

Ao pesquisador Rodrigo Rocha Latado pela grande ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Miguel Dall’Agnol por ceder o laboratório de análises genéticas para o desenvolvimento de parte deste estudo.

Ao amigo Igor Carassai pela ajuda na análise dos dados.

Ao Engenheiro Agrônomo Mateus Gonzato pela ajuda nas coletas na EEA/UFRGS.

Aos amigos Fabio Berndt, Ana Rosso e Thanise Fuller pela amizade.

À bolsista Samanta Siqueira Campos pela fundamental ajuda na condução deste trabalho.

Às bolsistas Karine, Carol e Janaina pela agradável convivência no laboratório.

Aos funcionários do Departamento de Horticultura e Silvicultura e do Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia pela ajuda prestada.

À secretária do PPG-Fitotecnia Marisa pela amizade.

A Deus pela força em todas as etapas desta caminhada.

“Aos meus pais Celso e Santana, a minha irmã Divane e ao meu noivo Claudio”.

Sou eternamente grata por tudo.

# **ANÁLISE DO COMPORTAMENTO MEIÓTICO, VIABILIDADE DE PÓLEN, NÍVEL DE PLOIDIA E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA EM PORTA-ENXERTOS DE CITROS CONDUZIDOS A CAMPO E EM CASA-DE-VEGETAÇÃO<sup>1</sup>**

Autora: Divanilde Guerra

Orientadora: Maria Teresa Schifino Wittmann

Coorientador: Sergio Francisco Schwarz

## **RESUMO**

O Brasil se destaca como um dos maiores produtores de citros no mundo, porém esta atividade apresenta vulnerabilidade pelo uso de poucas combinações copa/porta-enxerto. Por isso, a diversificação e a ampliação da variabilidade genética nos pomares é imprescindível para garantir a produção citrícola nos próximos anos. Fatores ambientais podem influenciar negativamente características morfológicas e reprodutivas das plantas e o entendimento destas alterações pode ajudar na seleção de genótipos mais estáveis. Este trabalho teve como objetivos: a) avaliar os porta-enxertos de citros Trifoliata, citrumeleiro ‘Swingle’ e os citrangeiros ‘Troyer’, ‘Fepagro C 13’, ‘Fepagro C 37’ e ‘Fepagro C 41’, conduzidos a campo e em casa-de-vegetação, quanto ao comportamento meiótico, índice meiótico, viabilidade e capacidade de germinação do pólen; b) comparar os níveis de ploidia da progênie destes genótipos nos dois ambientes; c) caracterizar morfológicamente folhas e frutos; e d) determinar o número de embriões por semente e a capacidade de germinação destes em meio de cultivo e em substrato comercial. Os parâmetros variaram nos anos de 2008, 2009 e 2010, pois em meiose, a média de células normais de todos os genótipos conduzidos a campo foi de 60,05%, 44,44% e 60,12% e em casa-de-vegetação foi de 52,75%, 30,95% e 52,82%, respectivamente; o índice meiótico médio a campo foi de 61,28%, 46,31% e 61,28% e em casa-de-vegetação foi de 54,26%, 31,75% e 54,47% e a média da viabilidade do pólen a campo foi de 90,28%, 56,23% e 74,74% e em casa-de-vegetação foi de 64,25%, 41,41% e 66,71%. Em 2010, a germinação do pólen de plantas conduzidas em casa-de-vegetação (36,32%) foi inferior que a campo (41,81%). Quanto ao nível de ploidia, 1,69% da progênie de plantas conduzidas a campo e 6,66% daquelas de casa-de-vegetação eram tetraplóides, sendo todas as plantas identificadas, por marcadores SSR, como sendo de origem nucelar. Estas plantas tetraplóides apresentaram um desenvolvimento mais lento e tinham folhas com pecíolos menores, mas de maior tamanho do que as plantas diplóides relacionadas. Os porta-enxertos conduzidos em casa-de-vegetação apresentaram folhas com menor largura e comprimento, frutos menores e com menos sementes do que quando conduzidos em casa-de-vegetação. Os porta-enxertos mostraram diferenças no número de embriões e a percentagem de germinação dos embriões foi maior quando as sementes eram implantadas em meio de cultivo do que em substrato. Fatores presentes em ambiente protegido podem influenciar desfavoravelmente diversas características dos porta-enxertos de citros.

---

<sup>1</sup>Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (126p.) Dezembro, 2011.

# **MEIOTIC BEHAVIOR, POLLEN VIABILITY, PLOIDY LEVEL ANALYSES AND MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF CITRUS ROOTSTOCKS UNDER FIELD AND GREEN HOUSE CONDITIONS<sup>1</sup>**

Author: Divanilde Guerra  
Adviser: Maria Teresa Schifino Wittmann  
Coadviser: Sergio Francisco Schwarz

## **ABSTRACT**

Brazil is one of the greatest world citrus producers however this activity is impaired by the use of a small number of canopy combinations. Therefore, diversification and broadening of genetic variability in orchards is essential to secure citrus production in the next years. Environmental factors may negatively affect plant morphological and reproductive characteristics and a better knowledge of these alterations can help in the selection of more stable genotypes. The objectives of this work were to: a) evaluate citrus rootstocks Trifoliata, citrumeleiro ‘Swingle’ and citrangeiros ‘Troyer’, ‘Fepagro C 13’, ‘Fepagro C 37’ and ‘Fepagro C 41’ under field and green-house conditions regarding meiotic behavior, meiotic index and pollen viability and germination; b) evaluate the ploidy level of the progenies of these genotypes under the two conditions; c) characterize morphologically leaves and fruits and d) determine embryo number per seed and embryo germination in culture medium and commercial substrate. Cytogenetic parameters varied in 2008, 2009 e 2010: the average percentage of cells with normal meiotic behavior, for all genotypes, under field conditions were 60.05%, 44.44% and 60.12% and in green-house 52.75%, 30.95% and 52.82%, respectively; average meiotic indexes under field conditions were 61.28%, 46.31% and 61.28% and in green-house 54.26%, 31.75% and 54.47%; average pollen viability under field conditions was 90.28%, 56.23% and 74.74% and in green-house 64.25%, 41.41% and 66.71%. In 2010, pollen germination of plants in the green-house (36,32%) was lower than at field conditions (41,81%). Regarding ploidy level, 1.69% of the progeny of plants grown in the field and 6.66% of the progeny of plants grown in the green-house were tetraploid. These plants were confirmed by molecular SSR markers to be from nucellar origin. The tetraploid plants had a slower development and their leaves had smaller petioles but were bigger than those of related diploid plants. The rootstocks grown under field conditions had narrower and shorter leaves and smaller fruits with less seeds than those grown in the green-house. There were differences in embryo number among rootstocks and embryo germination was higher in medium culture than in commercial substrate. It can be concluded that green-house conditions affect negatively several characteristics of the rootstocks analyzed.

---

<sup>1</sup> Doctoral thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (126p.) December, 2011.

## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Centros de origem e taxonomia dos citros .....	4
2.2 Distribuição geográfica dos citros .....	6
2.3 Importância econômica dos citros .....	7
2.4 Porta-enxerto de citros .....	9
2.5 Melhoramento genético de citros .....	13
2.6 Apomixia, poliembrião e identificação de híbridos.....	17
2.7 Citogenética de citros .....	24
2.8 Poliploidia e sua ocorrência em citros .....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1 Análises citogenéticas .....	36
3.1.1 Análise meiótica, índice meiótico e viabilidade do pólen .....	37
3.1.2 Análise da germinação <i>in vitro</i> dos grãos de pólen .....	38
3.2 Determinação do nível de ploidia por citometria de fluxo e caracterização molecular dos genótipos poliplóides.....	40
3.2.1 Marcação de flores, colheita dos frutos e inoculação meio de cultivo..	41
3.2.2 Análises para a determinação do nível de ploidia .....	44
3.2.3 Análises com marcadores moleculares .....	45
3.3 Avaliações do desenvolvimento e caracterização morfológica de plantas diplóides e poliplóides.....	48
3.4 Caracterização morfológica e determinação do número de embriões por semente em porta-enxertos de citros.....	50
3.4.1 Caracterização de folhas e frutos .....	50
3.4.2 Determinação do número de embriões e potencial de germinação .....	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.1 Análises citogenéticas .....	55
4.1.1 Análise meiótica, índice meiótico e viabilidade do pólen .....	55
4.1.2 Análise da germinação <i>in vitro</i> dos grãos de pólen .....	77
4.2 Determinação do nível de ploidia e caracterização molecular dos genótipos poliplóides.....	80
4.2.1 Determinação do nível de ploidia .....	82
4.2.2 Caracterização molecular dos genótipos poliplóides.....	91
4.3 Avaliações do desenvolvimento e caracterização morfológica de plantas diplóides e poliplóides .....	92
4.4 Caracterização morfológica e determinação do número de embriões por semente em porta-enxertos de citros .....	99

	Página
4.4.1 Caracterização de folhas e frutos .....	99
4.4.2 Determinação do número de embriões e capacidade de germinação em meio de cultivo e substrato.....	109
5. CONCLUSÕES .....	113
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	115
7. APÊNDICES .....	125

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Porta-enxertos de citros conduzidos a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá-RS e em ambiente protegido na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS utilizados para o desenvolvimento deste estudo nos anos de 2008, 2009, 2010 e 2011.....	35
2. Relação dos dezoito <i>primers</i> polimórficos de microsatélite utilizados para a caracterização da progênie. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2010.....	47
3. Acessos de plantas diplóides e tetraplóides provenientes da mesma semente cultivadas em vasos em casa-de-vegetação para realização de avaliações comparativas de desenvolvimento e caracterização morfológica. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2010/2011.....	49
4. Descritores morfológicos de folhas e suas classes utilizadas na caracterização morfológica de plantas diplóides e poliplóides de acordo com o IPGRI, 1988. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2010/2011.....	50
5. Descritores morfológicos de frutos e suas classes utilizadas para a classificação de frutos de porta-enxertos conduzidos a campo e em casa-de-vegetação (IPGRI, 1988). UFRGS, Porto Alegre – RS, 2009.....	53
6. Análise meiótica de cinco porta-enxertos de citros conduzidos a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá - RS e de seis porta-enxertos de citros conduzidos em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, em 2008.....	58
7. Análise meiótica de cinco porta-enxertos de citros conduzidos a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá - RS e de seis porta-enxertos de citros conduzidos em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, em 2009.....	59
8. Análise meiótica de cinco porta-enxertos de citros conduzidos a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá - RS e de seis porta-enxertos de citros conduzidos em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, em 2010.....	60
9. Índice meiótico de cinco porta-enxertos de citros conduzidos a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá - RS e de seis porta-enxertos de citros conduzidos em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, em 2008.....	62



	Página
10. Índice meiótico de cinco porta-enxertos de citros conduzidos a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá - RS e de seis porta-enxertos de citros conduzidos em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, em 2009.....	63
11. Índice meiótico de cinco porta-enxertos de citros conduzidos a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá - RS e de seis porta-enxertos de citros conduzidos em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, em 2010.....	64
12. Tamanho dos grãos e estimativa da viabilidade do pólen de cinco porta-enxertos de citros conduzidos a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá - RS e de seis porta-enxertos de citros conduzidos em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, em 2008.....	66
13. Tamanho dos grãos e estimativa da viabilidade do pólen de cinco porta-enxertos de citros conduzidos a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá - RS e de seis porta-enxertos de citros conduzidos em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, em 2009.....	67
14. Tamanho dos grãos e estimativa da viabilidade do pólen de cinco porta-enxertos de citros conduzidos a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá - RS e de seis porta-enxertos de citros conduzidos em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, em 2010.....	68
15. Percentagem média e comprimento do tubo polínico de grãos de pólen coletados de plantas conduzidas a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá - RS e em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, em 2010.....	78
16. Frutos colhidos em 2009 na Fazenda Panoramas Citros, Butiá - RS e na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, oriundos de flores marcadas em agosto/setembro de 2008.....	81
17. Análise por citometria de fluxo de plantas obtidas de sementes de frutos que tiveram as flores marcadas a campo em 2008 na Fazenda Panoramas Citros, Butiá – RS. IAC, Cordeirópolis – SP, 2010.....	83
18. Análise por citometria de fluxo de plantas obtidas de sementes de frutos que tiveram as flores marcadas em casa-de-vegetação em 2008 na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS. IAC, Cordeirópolis – SP, 2010.....	84
19. Análise de células somáticas de ponta de raiz de plantas obtidas de frutos de flores marcadas em 2008 a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá – RS e em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2010 e 2011.....	85

	Página
20. Caracterização morfológica em folhas de oito acessos de plantas diplóides e tetraplóides conduzidos em casa-de-vegetação. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2010/2011.....	95
21. Comparação de oito acessos de plantas diplóides e tetraplóides quanto ao comprimento de pecíolo, comprimento de folha (limbo) e largura de folha de plantas cultivadas em vasos e mantidas em casa-de-vegetação. UFRGS, Porto Alegre-RS, 2010/2011.....	96
22. Caracterização morfológica das folhas de plantas matrizes dos porta-enxertos de citros conduzidos a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá - RS e em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, em 2009.....	100
23. Caracterização morfológica das folhas dos porta-enxertos conduzidos a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá - RS e em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, em 2009.....	101
24. Caracterização morfológica dos frutos dos porta-enxertos conduzidos a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá - RS e em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, em 2009.....	103
25. Valores médios da caracterização dos frutos dos porta-enxertos conduzidos a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá - RS e em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS em 2009.....	104
26. Determinação do número médio de embriões pelo método direto e indireto, capacidade de germinação destes em meio de cultura e em substrato comercial para citros e taxa de poliembrião em cinco porta-enxertos de citros. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2009.....	109

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Esquema dos locais, porta-enxertos e procedimentos de coleta e fixação para as análises citogenéticas nos anos de 2008, 2009 e 2010 na Fazenda Panoramas Citros, Butiá - RS e na EEA-UFRGS, Eldorado do Sul – RS.....	36
2. Esquema dos procedimentos adotados desde a marcação das flores até a obtenção da progênie que foi avaliada quanto ao nível de ploidia e caracterização com marcadores moleculares nos anos de 2008, 2009 e 2010 na Fazenda Panoramas Citros, Butiá - RS e na EEA-UFRGS, Eldorado do Sul – RS.....	40
3. Marcação das flores. a) Flores marcadas com fitas de diversas cores; b) Fruto em estágio inicial de desenvolvimento; c) Fruto em estágio de maturação. EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, 2008/2009.....	42
4. Sementes obtidas de frutos que tiveram as flores marcadas. a) Sementes quando coletadas; b) Semente já desprovida do tegumento externo (casca); c) Sementes já desprovidas do tegumento interno (tégmen). Escala: cm. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2009.....	43
5. Estádios de desenvolvimento das plantas. a) Germinação dos embriões em meio de cultivo; b) Aclimação das plantas; c) Desenvolvimento inicial das plantas em casa-de-vegetação. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2009.....	43
6. Preparo do material para análises via citometria de fluxo. a) Material vegetal (1cm <sup>2</sup> ); b) Material vegetal macerado; c) Filtragem em filtro de 30µm de diâmetro. IAC, Cordeirópolis - SP, 2010.....	44
7. Esquema dos procedimentos para a caracterização morfológica das folhas dos porta-enxertos de citros conduzidos a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá -RS e em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, em 2009.....	51
8. Esquema dos procedimentos para a caracterização morfológica dos frutos dos porta-enxertos de citros conduzidos a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá-RS e em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, em 2009.....	52

9. Caracterização de células normais desde a meiose I até o estágio de pólen. a, b) Diacinese com 9 II (bivalentes); c, d) Metáfase I com 9 II; e, f, g) Anáfase I com disjunção normal; h, i) Telófase I; j) Metáfase II; k, l) Anáfase II; m) Telófase II; n) Tétrade; o) Grão de pólen viável. Escala: 10µm. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2008, 2009 e 2010..... 56
10. Caracterização de células com irregularidades desde a meiose I até o estágio de pólen. a) Diacinese com 8 II (bivalentes) e 2 I (univalentes); b) Metáfase I com 8 II e 2I; c) Metáfase I com 6 II, 2 I e 1 IV (quadrivalente); d) Anáfase I com retardatários; e) Telófase I com retardatários; f) Metáfase II com disjunção irregular; g, h. i) Anáfase II com disjunção irregular; j) Telófase II com micronúcleos; k) Díade; l) Tríade; m) Pentade; n) Grãos de pólen normais e inviáveis; o) Grão de pólen viável de tamanho normal e grão de pólen viável maior que o normal, porém não reduzido. Escala: 10µm. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2008, 2009 e 2010..... 57
11. Flores do citrangeiro ‘Fepagro C 37’. a) Flor obtida a campo com antera de coloração amarela normal; b) Flor obtida em casa-de-vegetação com antera de coloração branca anormal. Escala: cm. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2009..... 76
12. Germinação *in vitro* de grãos de pólen de citros. a e b) Grãos de pólen do porta-enxerto Trifoliata conduzido a campo. c e d) Grãos de pólen do porta-enxerto Trifoliata conduzido em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, em 2010. Escala: 10 µm..... 78
13. Cromossomos somáticos de citros obtidos de células de ponta de raiz. a, b, c e d) Células mitóticas com 18 cromossomos ( $2n=18$ ) do porta-enxerto citrangeiro ‘Fepagro C 13’; e, f, g e h) Células mitóticas com 36 cromossomos ( $2n=36$ ) de plântulas obtidas de flores marcadas do porta-enxerto citrangeiro ‘Fepagro C 13’ conduzido em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS em 2009. Escala: 10µm. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2010 e 2011..... 86
14. Determinação do nível de ploidia por citometria de fluxo. a) Testemunha diplóide (tangerineira); b) Citrangeiro ‘Fepagro C 13’ diplóide e uma planta tetraplóide obtida da progênie; c) Planta tetraplóide da população avaliada. IAC, Cordeirópolis – SP, 2010..... 87
15. Gel de agarose 3%. Amplificação de fragmentos de DNA utilizando microssatélite CCSM 06. M=Marcador molecular; C13= Citrangeiro ‘Fepagro C 13’ (genitor); 1 a 18= Progênie obtida do citrangeiro ‘Fepagro C 13’; PT= Trifoliata (testemunha). UFRGS, Porto Alegre – RS, 2011..... 91
16. Comparação do desenvolvimento de oito acessos de plantas diplóides e tetraplóides oriundas da mesma semente (acesso) em nove avaliações no período de um ano. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2010/2011..... 93

	Página
17. Caracterização morfológica das folhas. a) Folha de uma planta tetraplóide. b e c) Folhas de plantas diplóides. Escala: cm. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2010.....	94
18. Determinação do número de embriões e capacidade de germinação de embriões do citrangeiro ‘Fepagro C 37’. a) Número de embriões; b) Germinação dos embriões em meio de cultivo; c) Germinação em substrato comercial. Escala: cm. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2009.....	109

## 1 INTRODUÇÃO

Entre as frutas para consumo *in natura*, os citros lideram em termos de quantidade de produção. A citricultura brasileira apresenta números expressivos com área plantada ao redor de um milhão de hectares e produção de frutas superando 21 milhões de toneladas, a maior no mundo há alguns anos. O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de suco de citros, responsável por cerca de 80% da produção, fazendo com que a indústria citrícola se destaque como uma das principais atividades no agronegócio brasileiro. Além disso, apresenta grande importância econômica e social no país devido ao valor de produção e geração de empregos.

Nos últimos anos, a produção brasileira de citros tem aumentado, porém, o incremento não está associado à elevação da produtividade, mas à implantação de novos pomares. Apesar do benefício econômico e das condições climáticas favoráveis encontradas em grande parte do território nacional, a produtividade média ainda é muito baixa quando comparada com outras importantes regiões produtoras, devido a problemas como a falta de irrigação, a fatores de ordem fitossanitária (doenças e pragas), ao manejo do pomar e à ausência de cultivares mais produtivas.

Programas de melhoramento convencional de citros têm sido desenvolvidos desde o século XIX, contudo inúmeras dificuldades são encontradas, em parte atribuídas a barreiras naturais relacionadas à biologia reprodutiva, à descontinuidade dos programas de melhoramento e ao longo ciclo vegetativo. Apesar de todos os entraves, alguns avanços foram obtidos, mas os desafios no melhoramento de citros persistem.

Em todas as regiões citrícolas do mundo há a tendência do emprego de poucos porta-enxertos. No Brasil isso é confirmado de maneira contundente, pois apesar de existir um número expressivo de resultados experimentais que possibilitam a diversificação das combinações copa/porta-enxerto, o citricultor insiste no uso excessivo de poucas variedades.

A história da citricultura no Brasil tem mostrado a importância da diversificação de porta-enxertos e do aumento da variabilidade genética em variedades melhoradas. Como exemplos de pragas que trouxeram graves problemas ao Brasil pode ser citado, na década de 40, o vírus da tristeza dos citros (CTV) e a leprose; nos anos 50 o cancro cítrico; nos anos 70 o declínio; nos anos 90 a clorose variegada dos citros e a pinta preta e, mais recentemente, a morte súbita dos citros (MSC) e o HLB (Huanglongbing).

Para evitar que pomares inteiros sejam dizimados por novas pragas, a diversificação dos porta-enxertos é uma necessidade urgente. Para isso, os programas de melhoramento genético de citros têm um importante papel na busca de alternativas à baixa diversidade genética e no desenvolvimento de variedades copa e porta-enxertos que sejam resistentes a doenças, tolerantes a fatores abióticos, mais adaptadas às distintas condições ambientais, mais produtivas, com frutos que se destaquem em termos de qualidade, além de produção de frutos sem sementes que é um dos grandes diferenciais no mercado de consumo *in natura*.

Porém, para desenvolver materiais superiores, o conhecimento do germoplasma existente em um programa de melhoramento genético de citros é fundamental. Análises citogenéticas são muito importantes, pois permitem selecionar materiais promissores, meioticamente estáveis e com alta viabilidade de pólen, e, além disso, ajudam no monitoramento de possíveis alterações da fertilidade dos genótipos.

Condições ambientais diferenciadas podem alterar características morfológicas e reprodutivas das plantas. A condução de plantas cítricas em ambiente protegido pode

modificar a morfologia das folhas, a produção e o tamanho dos frutos, o número de sementes, além de atuar no sistema reprodutivo como no processo meiótico, viabilidade dos grãos de pólen e nível de ploidia.

Assim sendo, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar o possível efeito do ambiente em características morfológicas e reprodutivas de alguns porta-enxertos de citros conduzidos a campo e em casa-de-vegetação.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- a) Analisar o comportamento meiótico, índice meiótico, viabilidade e capacidade de germinação dos grãos de pólen de porta-enxertos de citros mantidos a campo e em casa-de-vegetação;
- b) Comparar o nível de ploidia da progênie dos porta-enxertos conduzidos a campo e em casa-de-vegetação;
- c) Caracterizar os porta-enxertos Trifoliata, citrumeleiro ‘Swingle’ e os citrangeiros ‘Troyer’, ‘Fepagro C 13’, ‘Fepagro C 37’ e ‘Fepagro C 41’, conduzidos a campo e em casa-de-vegetação, quanto à morfologia das folhas e frutos, determinar o número de embriões por semente e a capacidade de germinação em meio de cultivo e em substrato comercial.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Centros de origem e taxonomia dos citros

Os citros pertencem à família Rutaceae, subfamília Aurantioideae, à subtribo Citrinae e tribo Citreae, a qual é dividida em gêneros e espécies. As principais plantas de interesse comercial pertencem aos gêneros *Citrus*, *Poncirus* e *Fortunella* (Swingle & Reece, 1967).

As plantas cultivadas do gênero *Citrus* e afins da família Rutaceae, especialmente *Poncirus* e *Fortunella*, e os diversos híbridos intergenéricos existentes são denominados de citros (Dornelles, 1988).

Estima-se a origem dos citros entre 20 e 30 milhões de anos atrás, nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia e no arquipélago Malaio, de onde se dispersaram para outras regiões do mundo (Swingle & Reece, 1967; Araújo & Roque, 2005).

O gênero *Citrus* é originário da região sudeste da Ásia, com ramos filogenéticos que se estendem do centro da China ao Japão e do leste da Índia a Nova Guiné, Austrália e África Tropical (Swingle & Reece, 1967; Davies & Albrigo, 1994; Donadio *et al.*, 2005). Contudo, outros centros de origem são descritos, como o norte da região Indo-Burma e a região de Yunnan, no centro sul da China (Donadio *et al.*, 2005).

O gênero *Fortunella* é originário do sul da China e o gênero *Poncirus* parece ser nativo do centro e norte daquele país (Swingle & Reece, 1967; Donadio *et al.*, 2005).

Discordâncias ocorrem quanto ao sistema de classificação taxonômico para a subfamília Aurantioideae, principalmente no gênero *Citrus*. Neste, a posição e o número de

espécies são controversos, e, atualmente, os principais sistemas de taxonomia são o de Swingle e o de Tanaka. Swingle (1967) subdividiu o gênero em *Citrus* e *Papeda*, onde *Citrus* é representado por dez espécies de frutos comestíveis e estames conados na base e *Papeda* por seis espécies de frutos acres, não comestíveis e estames livres. Tanaka (1977) dividiu o gênero *Citrus* nos subgêneros *Archicitrus* e *Metacitrus*, totalizando 162 espécies. A maior diferença entre estes dois sistemas diz respeito à classificação das tangerinas, visto que Swingle posicionou a maioria delas dentro de *Citrus reticulata*, enquanto que Tanaka separou-as em 36 espécies independentes (Hodgson, 1967; Koller, 1994; Davies & Albrigo, 1994; Araujo & Roque, 2005; Machado *et al.*, 2005).

A diferença existente no número de espécies, nos sistemas de classificação deste grupo de plantas parece estar associada à alta capacidade de intercruzamento entre espécies de *Citrus* e gêneros afins, originando híbridos férteis. Além disso, a alta frequência de mutações permite que novos biótipos sejam obtidos e, posteriormente, propagados vegetativamente, ampliando ainda mais o número de espécies e dificultando a classificação (Dornelles, 1988; Araujo & Roque, 2005; Machado *et al.*, 2005).

Os sistemas propostos por Tanaka e Swingle têm sido utilizados, porém, conforme Machado *et al.* (2005), nenhum deles resolve completamente os problemas de identificação e conceituação das espécies do grupo citros.

Atualmente, a reavaliação dos sistemas de classificação tem sido feita com base em estudos filogenéticos, apoiados por dados morfológicos, quimiotaxonômicos e moleculares. Diversas técnicas moleculares têm sido utilizadas com o objetivo de entender a filogenia e a diversidade de *Citrus* e gêneros afins, incluindo a análise de sítios de restrição, seqüenciamento, análises estruturais e reação em cadeia da polimerase (PCR), baseada em técnicas como RAPD (“*Random Amplified Polymorphic DNA*”), AFLPs (“*Amplified Fragment Length Polymorphism*”), SCAR (“*Sequence Characterized Amplified Regions*”) e SSR (“*Simple Sequence Repeat*”). Porém, apesar de todos os

trabalhos conduzidos, não há resultados conclusivos sobre qual sistema de classificação é mais preciso, ocorrendo, ainda, muitas divergências (Nicolosi *et al.*, 2000; Araujo & Roque, 2005; Corazza-Nunes *et al.*, 2005; Machado *et al.*, 2005).

## **2.2 Distribuição geográfica dos citros**

As principais regiões citrícolas do mundo situam-se entre os paralelos 20° e 40° de latitude norte e sul, onde as condições climáticas são adequadas para o seu desenvolvimento, com temperaturas que favorecem a produção e a qualidade dos frutos, pois nas maiores latitudes, a baixa temperatura pode ser um fator limitante à produção devido a danos e, até mesmo, à morte das plantas (Koller, 2006).

A introdução dos citros na Europa ocorreu possivelmente através de invasores, comerciantes árabes ou pelo exército muçulmano, sendo que há relatos que o primeiro fruto cítrico utilizado pelas civilizações europeias foi a cidra (*C. medica* L.), aproximadamente 310 anos antes de Cristo. Somente muitos séculos mais tarde tornou-se conhecida a laranjeira-azeda (*C. aurantium* L.) e, ao que tudo indica, a laranjeira-doce (*C. sinensis* L.) só foi introduzida na Europa por volta do ano 1400 (Webber *et al.*, 1967; Koller, 1994; Donadio *et al.*, 2005).

Na América, os citros foram introduzidos, possivelmente por Cristóvão Colombo no Haiti, em 1493. No Brasil, foram implantados no começo do século XVI, talvez a partir de 1530, quando teve início a colonização pelas primeiras expedições portuguesas, provavelmente no estado da Bahia (Koller, 1994; Donadio *et al.*, 2005). Posteriormente, o cultivo expandiu-se em todo o país devido às condições ideais para vegetar e produzir (Koller, 2006).

No Rio Grande do Sul, as plantas cítricas foram trazidas pelos açorianos para o vale do Rio Taquari, em 1760, como mudas de pé franco, e posteriormente se expandiram para o vale do Rio Caí. Entretanto, a região norte do Rio Grande do Sul havia sido colonizada

por jesuítas espanhóis muito antes dessa época, com a fundação dos Sete Povos das Missões, onde presumivelmente foi efetuada a introdução dos citros, cujo cultivo não deve ter evoluído face à destruição das reduções jesuíticas (Koller, 1994; Donadio *et al.*, 2005).

### **2.3 Importância econômica dos citros**

Dentre os principais grupos de frutas no mundo, os citros ocupam o primeiro lugar em volume de produção com aproximadamente 110 milhões de toneladas, ficando em segundo lugar a banana, seguido da uva e da maçã (FAO, 2011).

A citricultura destaca-se como uma das mais importantes atividades agrícolas mundiais e uma das mais competitivas agroindustriais. Laranjeiras, limoeiros e tangerineiras são as espécies cítricas de maior importância econômica, utilizadas para o consumo *in natura* e industrialização (Koller, 1994; Donadio *et al.*, 2005).

O parque citrícola brasileiro iniciou no final da década de 1920, com agricultores implantando pomares em larga escala, estimulados pela crise no setor do café. Porém, os maiores investimentos para a industrialização da laranja no país ocorreram a partir de 1962, incentivados pela queda da produção norte-americana devido às geadas. O destino inicial da produção era como fruta fresca; contudo, devido às condições naturais do Brasil, o parque citrícola mudou seu foco comercial para a produção de matéria prima utilizada na indústria processadora (Boteon & Neves, 2005). Atualmente, o país destaca-se como o maior produtor de citros, responsável por cerca de 19% da produção mundial, com aproximadamente 21 milhões de toneladas e o cultivo é feito em todas as regiões do país, com uma área implantada de aproximadamente um milhão de hectares (FAO, 2011).

O Brasil é o maior produtor e exportador de suco, com produção de aproximadamente 80% do suco consumido no mundo. Conforme Neves *et al.* (2001), cerca de 85% dos recursos obtidos com produtos cítricos estão associados à produção e à exportação de suco de laranja, contudo, outros produtos da citricultura nacional são

exportáveis, como o farelo de polpa cítrica, óleo essencial e em menor escala, a laranja fresca de mesa. Em termos de exportação de frutas *in natura*, esta é pequena, mas quando somada à fruta comercializada internamente, representa 30% da produção (Donadio *et al.*, 2005).

A citricultura brasileira representa importante segmento econômico na pauta de produtos agrícolas, não só por seu expressivo valor de produção, como por sua importância na geração de empregos diretos e indiretos, formação de capital e renda, agregação de valor regional e interiorização do desenvolvimento, podendo ser caracterizada como uma das mais típicas atividades agro-industriais do país (Neves *et al.*, 2001).

Embora ocupe uma posição de destaque no mercado e as condições edafoclimáticas favoreçam a cultura de citros no Brasil, o principal fator de crescimento da produção brasileira foi o aumento da área de cultivo, uma vez que a produtividade é considerada baixa, com média de duas caixas/planta/ano, quando comparada com outras regiões produtoras, como por exemplo, a Flórida, que alcança uma média de seis caixas/planta/ano. A baixa produtividade está associada à falta de irrigação nas lavouras, à ausência de maior número de cultivares copas e porta-enxertos, à suscetibilidade das plantas às várias pragas e anormalidades fisiológicas e pelo uso de variedades pouco produtivas (Machado *et al.*, 2005; Koller, 2006).

Algumas estratégias podem ser adotadas ou mesmo intensificadas para que a produção e a industrialização de produtos cítricos mantenham-se rentáveis no país, tais como: desenvolvimento de variedades mais produtivas e tolerantes a pragas e moléstias que acometem a cultura; redução das barreiras tarifárias e fitossanitárias; produção em escala e com preços competitivos e modernização da estrutura de beneficiamento e de comercialização. Além disto, o Brasil é um mercado potencial para o consumo de frutas frescas e por este motivo o incentivo ao consumo e investimentos na qualidade das frutas ofertadas são essenciais (Boteon & Neves, 2005).

## 2.4 Porta-enxertos de citros

Embora a enxertia dos citros já fosse conhecida desde o século V, considera-se que o principal indutor da transição da citricultura de pés francos para a de plantas enxertadas foi o surgimento da gomose de *Phytophthora* na Ilha dos Açores em 1842 e seu controle mediante porta-enxertos resistentes (Chapot, 1975; Davies & Albrigo, 1994; Koller, 1994).

A propagação via sementes é muito fácil, porém a aceitação da enxertia está associada às inúmeras vantagens que esta apresenta. Wutscher & Bistline (1988) relacionaram as principais razões para o uso das plantas cítricas enxertadas, como: frutificação precoce, supressão de problemas de juvenilidade, plantas de tamanho uniforme, controle da produção, controle da qualidade dos frutos, tolerância a fatores desfavoráveis no solo (salinidade, pH e encharcamento) e tolerância a *Phytophthora*, viroses e nematóides.

Os primeiros porta-enxertos utilizados na citricultura foram obtidos via métodos tradicionais de seleção de variedades e clones. Em 1893, na Flórida, Swingle e Webber e paralelamente na Califórnia, Frost e seus colaboradores iniciaram os primeiros trabalhos de melhoramento genético de porta-enxertos de citros através de inúmeros cruzamentos, entre as mais diversas espécies e gêneros, produzindo imensa variabilidade genética. Posteriormente, os híbridos que apresentavam características favoráveis, como a resistência ao frio, que é típica dos gêneros *Fortunella* e *Poncirus*, além da resistência ao vírus da tristeza e aos nematóides, e tolerância a solos encharcados, característicos do gênero *Poncirus* foram selecionados (Cameron & Frost, 1968; Davies & Albrigo, 1994; Pompeu Junior, 2005; Machado *et al.*, 2005).

Muitos dos genótipos desenvolvidos por estes dois programas são utilizados ou deram origem a materiais presentes nos bancos de germoplasma estabelecidos no Brasil, visto que os primeiros porta-enxertos utilizados na citricultura brasileira foram obtidos via

seleção varietal e clonal de variedades importadas, atendendo principalmente à convivência com as doenças *Phytophthora* e tristeza (Pompeu Junior, 2005).

Desde a introdução das plantas cítricas no Brasil até o início do século XX, a propagação destas foi efetuada por sementes, devido à facilidade e à vantagem da limpeza de vírus (Pompeu Junior, 2005). Contudo, no início do século passado, quando a indústria citrícola brasileira tornou-se importante no âmbito comercial, o uso de árvores enxertadas foi iniciado e a laranjeira ‘Caipira’ (*C. sinensis* L. Osbeck) foi o porta-enxerto mais utilizado, provavelmente pela facilidade de obtenção das sementes. Porém, devido à baixa resistência à gomose e à seca, passou-se a utilizar como porta-enxerto a laranjeira ‘Azeda’ (*C. aurantium*) (Pompeu Junior, 1991).

A grande preferência pela laranjeira ‘Azeda’ iniciou devido a sua boa afinidade com a maioria das variedades comerciais, resistência a moléstias graves, além da qualidade das frutas produzidas (Moreira, 1941). Porém, a introdução do vírus da tristeza dos citros (CTV), possivelmente através de material vegetativo infectado oriundo da África do Sul, no ano de 1937, no estado de São Paulo, causou a morte de árvores conduzidas sobre este material, que não é tolerante a este vírus; por isso, os pomares foram renovados com porta-enxertos de limoeiro ‘Cravo’, tangerineira ‘Cleópatra’, limoeiro ‘Rugoso’ e citrangeiro ‘Troyer’ (Pompeu Junior, 1991).

A partir dos anos 60, a citricultura brasileira foi novamente instalada praticamente sobre um só porta-enxerto, o limoeiro ‘Cravo’ (*C. limonia* Osbeck), genótipo este que corresponde a um possível híbrido natural entre o limoeiro verdadeiro (*C. limon* (L.) Burn) e a tangerineira (*C. reticulata* Blanco) e com provável origem na Índia (Hodgson, 1967).

Na década de 70, uma doença de etiologia desconhecida, “o declínio dos citros”, acometeu as plantas implantadas sobre o limoeiro ‘Cravo’ que é extremamente suscetível. Esta doença continua causando sérios danos à citricultura paulista, pois muitos pomares estavam alicerçados sobre este porta-enxerto. Os danos foram consideráveis, provocando

redução de produtividade, onerando os tratos culturais e abreviando a vida útil dos pomares (Dornelles, 1988; Koller, 1994; Pompeu Junior, 2005).

No Rio Grande do Sul os pomares são predominantemente formados por mudas enxertadas sobre *P. trifoliata*, que é uma espécie com origem provável no centro e norte da China e dispersa em todo o mundo, pois induz uma boa produtividade à copa e destaca-se pela alta qualidade conferida ao fruto, alto conteúdo em sólidos solúveis totais e boa coloração de casca, características estas que são desejáveis na produção destinada ao mercado de frutas *in natura* (Dornelles, 1988; Schäfer & Dornelles, 2000).

Entre os citros, a diversidade de gêneros, espécies, cultivares e clones é muito grande; no entanto, um número relativamente pequeno de porta-enxertos é utilizado nos plantios comerciais, devido a razões botânicas e históricas. Mas, a história da citricultura vem mostrando a importância da diversificação destes, além da necessidade de variedades melhoradas. Por exemplo, o fato da citricultura no sudeste brasileiro estar alicerçada em torno de 40% sobre o porta-enxerto limoeiro ‘Cravo’ (*C. limonia*) e a citricultura gaúcha com 90% sobre o *P. trifoliata*, implica em sérios riscos de ver-se repetida a destruição causada pelo vírus da “tristeza”, que dizimou milhões de plantas na década de 40 (Koller, 1994; Schäfer & Dornelles, 2000; Schäfer *et al.*, 2001; Machado *et al.*, 2005) e a morte súbita dos citros que destruiu pomares inteiros na última década (Machado *et al.*, 2005). Portanto, a utilização racional e a diversificação dos porta-enxertos permitirá que os pomares mantenham-se produtivos e não sejam dizimados por novas pragas e doenças (Pompeu Junior, 1991).

A influência do porta-enxerto na produção e qualidade dos frutos é muito marcante. Por isso a escolha do material a ser utilizado é uma fase muito importante no planejamento do pomar, devendo ser levadas em consideração características de clima, solo, variedade copa, manejo, entre outros (Schäfer & Dornelles, 2000; Schäfer *et al.*, 2001).



O porta-enxerto afeta mais de 20 características importantes da planta e dos frutos. Na planta, pode influenciar o vigor, tamanho, hábito de crescimento, profundidade de enraizamento, tolerância ao frio, adaptação a condições do solo, tolerância a salinidade, pH e estresse hídrico, resistência ou tolerância a doenças do solo, capacidade de absorção, síntese e utilização de nutrientes, composição química das folhas, fertilidade do pólen, precocidade de produção, produtividade, época de maturação e permanência dos frutos na planta. Nos frutos, pode influenciar o tempo de conservação após a colheita, o tamanho, a textura, a cor, a espessura da casca, o teor de suco, o sabor e a acidez, etc. (Hodgson, 1967; Pompeu Junior, 1991; Davies & Albrigo, 1994; Stuchi *et al.*, 1996; Schäfer & Dornelles, 2000; Pompeu Junior, 2005).

Alguns porta-enxertos são amplamente utilizados na citricultura mundial e já foram avaliados quanto à resistência a fatores bióticos e abióticos e principalmente quanto a influências na produtividade e qualidade conferida aos frutos da cultivar copa.

*P. trifoliata* é um porta-enxerto com potencial ananizante, induz a copa à produção de frutos com melhores características comerciais que as obtidas com outros porta-enxertos e induz à maturação mais tardia dos frutos da cultivar copa. É resistente ao frio, à gomose (*Phytophthora* ssp.) à tristeza (Citrus tristeza vírus, CTV), à xiloporose (viróide), ao nematóide dos citros (*Tylenchulus semipenetrans*) e adapta-se bem em solos argilosos e úmidos (Saunt, 1990; Davies & Albrigo, 1994). Porém, é suscetível ao exocorte (viróide) e ao declínio (anormalidade de causa desconhecida); apresenta baixo desenvolvimento em viveiro; é intolerante à seca e é incompatível com a laranjeira ‘Pêra’, limoeiros verdadeiros e tangoreiro ‘Murcott’. Entretanto, *P. trifoliata* possui vários genes de resistência a doenças e estresses que não são encontrados em *Citrus* (Dornelles, 1988; Schäfer & Dornelles, 2000; Schäfer *et al.*, 2001; Pompeu Junior, 2005; Chen *et al.*, 2008).

O citrangeiro ‘Troyer’ [*P. trifoliata* (L.) Raf. x *C. sinensis* (L.) Osb.] é um porta-enxerto que induz crescimento vigoroso das variedades copa em diversos tipos de solos. É

resistente à xiloporose e à tristeza, porém é pouco tolerante a solos salinos; é sensível à exocorte e apresenta menor resistência ao frio e à gomose de *Phytophthora* quando comparado com o *P. trifoliata*. No geral, induz à formação de plantas menores que as formadas sobre limoeiro ‘Cravo’ e apresenta boa compatibilidade com laranjeiras (Hodgson, 1967; Saunt, 1990; Davies & Albrigo, 1994).

O citrumeleiro ‘Swingle’ [*P. trifoliata* (L.) Raf x *C. paradisi*] é um porta-enxerto resistente à gomose, ao nematóide dos citros e ao frio. É menos tolerante a solos alcalinos que o citrangeiro ‘Troyer’ e tem mostrado grande tolerância ao declínio. A qualidade das laranjas produzidas sobre o citrumeleiro é ótima, com alto índice de açúcares, sabor excelente para o consumo *in natura* e alto rendimento de suco. O crescimento das laranjeiras enxertadas em citrumeleiro é mais vigoroso que as enxertadas em *P. trifoliata* e similar às enxertadas em citrangeiros (Saunt, 1990; Davies & Albrigo, 1994).

O citrangeiro ‘Fepagro C 13’ [*C. sinensis* (L.) Osb. cv. Pêra x *P. trifoliata* (L.) Raf]. é um porta-enxerto que apresenta boa resistência ao frio, porém baixa resistência a seca; alta tolerância à gomose; Induz alta precocidade de produção e alta produção; induz a produção de frutos com excelente qualidade; forma plantas de tamanho pequeno e com alta longevidade; e apresenta certa tolerância a solos úmidos (Souza *et al.*, 2010). Além destes, a Fepagro desenvolveu outros porta-enxertos denominados citrangeiros ‘Fepagro C 37’ e ‘Fepagro C 41’ [*C. sinensis* (L.) Osb. cv. Pêra x *P. trifoliata* (L.) Raf], porém estes ainda não foram avaliados quanto a descritores morfológicos e de produção.

## **2.5 Melhoramento genético de citros**

A partir de 1893, quando tiveram início os primeiros programas de melhoramento genético de citros, numerosos programas foram desenvolvidos a fim de atender diversos objetivos, como resistência ao frio e moléstias, produtividade, qualidade e coloração dos

frutos, ampliação do período de safra, menor porte, etc. (Moreira & Pio, 1991; Davies & Albrigo, 1994; Koller, 1994; Pompeu Junior, 2005; Machado *et al.*, 2005).

O melhoramento genético tradicional via hibridação sexual e seleção apresenta limitações à obtenção de variedades copa e porta-enxerto devido à descontinuidade nos programas estabelecidos e a fatores biológicos característicos das espécies, tais como: embriônia nucelar, auto-incompatibilidade, esterilidade, juvenilidade, entre outros, que dificultam e retardam o processo de melhoramento.

A embriônia nucelar, que consiste na formação de dois ou mais embriões na mesma semente, promove a concorrência por nutrientes entre embriões nucleares e zigótico, prejudicando o desenvolvimento deste e dando origem a muitas plantas idênticas à planta mãe. Este é um dos principais fenômenos que torna o melhoramento de citros complexo, por isso será discutido mais amplamente no decorrer desta revisão.

A auto-incompatibilidade é a incapacidade de estabelecer frutos por autopolinização, embora o pólen e a oosfera sejam funcionais em polinização cruzada. Em citros, Soost, em 1964, propôs o modelo de auto-incompatibilidade baseado no sistema gametofítico do alelo S, ou seja, o crescimento do tubo polínico é inibido quando o grão de pólen apresenta o mesmo alelo S expresso no pistilo (Frost & Soost, 1968; Machado *et al.*, 2005). A auto-incompatibilidade em plantas que não produzem frutos por partenocarpia pode ser um problema em pomares comerciais constituídos por clones, pois estas portam os mesmos genes, bem como apresentam grãos de pólen com o mesmo alelo S que o pistilo, inviabilizando a produção por falta de pólen compatível para o processo de fertilização. Porém é interessante em variedades partenocárpicas, pois dará origem a frutos sem semente, fator este relatado por Ye *et al.* (2009), em uma cultivar de tangerineira, sendo observada a presença de auto-incompatibilidade gametofítica.

A esterilidade em citros resulta de problemas de macho-esterilidade, onde não há produção de pólen viável, ou fêmea-esterilidade, por má-formação do pistilo ou ovário

conduzindo à ausência ou à formação de gametas femininos inviáveis. Este fenômeno ocorre com relativa frequência e tem como principal consequência a produção de frutos sem sementes por partenocarpia (Frost & Soost, 1968; Machado *et al.*, 2005).

A duração do período juvenil é variável entre as espécies cítricas e é influenciada pelas condições ambientais. A maioria dos genótipos tem longo período juvenil, levando de cinco a 13 anos desde a implantação da semente até a floração. Além disso, para melhor caracterização da produção, as avaliações devem ser feitas após o segundo ou terceiro ano de floração. Isso torna o melhoramento de citros via hibridação uma atividade de longo prazo e cara, além de exigir grandes áreas de terra para a manutenção das plantas até a seleção (Frost & Soost, 1968; Davies & Albrigo, 1994; Koller, 1994; Machado *et al.*, 2005). Há de se considerar ainda que a juvenilidade em citros está associada à presença de espinhos e crescimento vigoroso, resultando em plantas com porte excessivo e de difícil manejo (Frost & Soost, 1968; Machado *et al.*, 2005).

Outra dificuldade encontrada no processo de seleção por técnicas de melhoramento genético convencional é o fato de muitas características possuírem herança quantitativa, ou seja, determinadas por vários genes (Machado *et al.*, 2005).

Devido às dificuldades provocadas pelos fatores inerentes da biologia dos citros acima descritos, que prejudicam e retardam o processo de seleção, o melhoramento tem sido mais uma atividade de coleta e seleção massal de variantes espontâneos do que uma atividade de melhoramento tradicional via cruzamentos e seleção, o que explica o fato da maioria das variedades utilizadas comercialmente serem originadas de mutações. Além disso, práticas como a enxertia e a estaquia, muito utilizadas em espécies cítricas, facilitam a conservação de mutações (Garcia *et al.*, 1999; Davies & Albrigo, 1994; Machado *et al.*, 1997; Machado *et al.*, 2005).

Frost & Krug (1942) chamam a atenção para a enorme diversidade observada em citros, associada possivelmente a altas frequências de mutações. Mudanças repentinas em

caracteres herdáveis, observadas sob a forma de variações em gemas, ramos ou plântulas, podem dar origem a genótipos que mantêm as características originais da variedade, mas que apresentam alterações em caracteres como produção, qualidade de frutos ou resistência a doenças. Estas mutações, quando benéficas, promovem com frequência o surgimento de novas variantes que se tornam variedades comerciais (Davies & Albrigo, 1994).

Segundo Hodgson (1967), cerca de 24% das variedades de laranjeiras doces originaram-se de mutações de gemas, 23% através de mutações de plântulas e o restante têm origem desconhecida. No Brasil, exemplos de seleção de mutações são a laranjeira de umbigo ‘Bahia’, que resultou de alteração em uma laranjeira comum no estado da Bahia e no Rio Grande do Sul, merece destaque a tangerineira ‘Montenegrina’, um híbrido espontâneo descoberto no Vale do Caí na década de 40 (Rodrigues & Dornelles, 1999).

Apesar das dificuldades, muitos programas de melhoramento genético de citros são baseados em métodos tradicionais para o desenvolvimento de cultivares copa e porta-enxerto, através de polinização manual e seleção dos genótipos superiores. Bons resultados têm sido obtidos via hibridação sexual, como o tangoreiro ‘Murcott’ [*C. reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osbeck], que apresenta boas características e expressão significativa no mercado de fruta *in natura* (Davies & Albrigo, 1994; Machado *et al.*, 2005).

Os programas de melhoramento genético de citros devem atender objetivos específicos de acordo com o local onde estão inseridos (Davies & Albrigo, 1994). No Brasil, os objetivos para as variedades copa são plantas que produzam frutos com pouca ou nenhuma semente, boa coloração, bom rendimento de suco, produtividade e resistência a doenças como o cancro cítrico e o declínio e tolerância à tristeza (Koller, 1994; Mourão Filho *et al.*, 2002).

Para os porta-enxertos, os programas de melhoramento buscam plantas resistentes ou tolerantes a fatores bióticos, como a tristeza, gomose, nematóides, declínio e a morte súbita; tolerantes a fatores abióticos, como temperatura, salinidade, pH do solo, déficit

hídrico e encharcamento, de fácil propagação, compatíveis com as variedades copa, bom vigor e induzam à alta produtividade e qualidade aos frutos (Mourão Filho, 1996; Mourão Filho *et al.*, 2002; Pompeu Junior, 2005).

## **2.6 Apomixia, poliembrionia e identificação de híbridos**

Apomixia em plantas com flores é definida como a formação assexual de um embrião do tecido do óvulo materno, na ausência total ou parcial de meiose e fertilização (Bickneel & Koltunow, 2004). Trata-se de um mecanismo natural que permite a reprodução clonal através de sementes, gerando progênie estritamente idêntica à planta mãe, devido a não contribuição do genótipo paterno (Grossniklaus *et al.*, 1998).

As espécies de *Citrus* e gêneros relacionados podem se reproduzir por via sexuada e assexuada. Sexuadamente, por meio de autopolinização em face da concomitância da deiscência das anteras e receptividade do estigma em suas flores hermafroditas ou via polinização cruzada, através de agentes polinizadores, como o vento ou insetos. Nestas duas vias, os embriões zigóticos resultam da fusão de gametas masculinos e femininos (Machado *et al.*, 2005). Por via assexuada, um ou mais embriões são formados sem fertilização, caracterizando o fenômeno da apomixia (Koltunow, 1993).

Em citros, a apomixia é do tipo nucelar, facultativa e esporofítica, isto é, ocorre formação de embriões sem redução meiótica e fora do saco embrionário. Os embriões apomíticos ou nucleares (termo mais comumente utilizado na literatura) são formados a partir de células individuais do tecido somático do óvulo ou do integumento interno. Esses iniciam seu desenvolvimento independente da fertilização, embora este processo pareça ser necessário para a formação do endosperma, visto que, na ausência de fertilização, os embriões nucleares iniciam o seu desenvolvimento, mas não o completam devido à ausência de nutrientes e hormônios essenciais (Kultunow, 1993; Garcia *et al.*, 1999; Spielman *et al.*, 2003; Machado *et al.*, 2005).

Células nucelares destinadas a se tornarem embriões são morfologicamente diferentes, apresentando núcleos maiores e citoplasma mais denso, contudo os mecanismos que determinam que estas darão origem aos embriões nucelares ainda não são conhecidos (Kultunow, 1993; Koltunow *et al.*, 1995).

Em citros, plantas monoembriônicas produzem sementes com um único embrião e este é derivado da reprodução sexual, enquanto que as poliembriônicas produzem sementes que portam, além do embrião sexual, outros formados por apomixia (Koltunow, 1993; Koltunow *et al.*, 1995). A presença de embriões extras (nucelares), além do sexual, leva ao uso do termo poliembrionia, ou seja, o desenvolvimento de dois ou mais embriões na mesma semente (Garcia *et al.*, 1999).

A maioria das espécies cítricas são poliembriônicas, porém cidras (*C. medica* L.), toranjas [*C. grandis* (L.) Osb.] e algumas tangerineiras, como as clementinas (*C. clementina* Hort. Ex Tan.) são monoembriônicas, produzindo apenas um embrião de origem sexual por semente (Machado *et al.*, 2005; Aleza *et al.*, 2010). Estas plantas são de grande interesse para uso como parentais femininos em cruzamentos, visto que darão origem a embriões zigóticos (Chen *et al.*, 2008). Porém, eventualmente, pode ocorrer o desenvolvimento de mais de um embrião zigótico, pela formação de dois sacos embrionários em um único óvulo ou pela clivagem do embrião zigótico, originando neste caso, dois embriões idênticos (Moreira *et al.*, 1947; Medina Filho *et al.*, 1993; Cristofani *et al.*, 2001).

A ocorrência destes fenômenos foi registrada por Medina Filho *et al.* (1993) que, na análise de 633 híbridos de porta-enxertos de citros, identificaram a presença de 12 pares de plantas cuja origem foi associada à clivagem do embrião zigótico, além de duas plantas originadas pela formação de dois sacos embrionários em um único óvulo.

Casos de poliembrionia em genótipos monoembriônicos de citros foram relatados por Aleza *et al.* (2010), que observaram a presença de mais de um embrião zigótico em

sementes obtidas de cruzamento utilizando como genitor feminino cinco genótipos da variedade monoembriônica ‘Clementina’, (*C. clementina*), sendo eles: ‘Bruno’, ‘Fina’, ‘Hernandina’, ‘Clemenules’ e ‘Tomatera’. Análises moleculares confirmaram a origem zigótica das plantas, permitindo concluir que se tratava de um processo de clivagem do embrião zigótico dando origem a duas plantas com mesma constituição genética, contudo, as causas que levaram a clivagem do embrião não são conhecidas.

Em citros, a poliembrião pode ou não ser vantajosa, dependendo dos objetivos a serem alcançados. A embrião nucelar é de grande interesse para os melhoristas, uma vez que permite a renovação dos bancos de germoplasma, conservando as características da planta mãe (Cameron & Soost, 1969). É vantajosa também para o sistema de produção de porta-enxertos, pois as plantas apresentam o mesmo vigor e mantêm as características da planta mãe, permitindo, desta forma, que os pomares apresentem uniformidade quanto ao tamanho e às características da copa (Machado *et al.*, 2005). No entanto, em programas de melhoramento que tem como objetivo a produção de híbridos, a embrião nucelar é uma das grandes barreiras ao desenvolvimento de novos genótipos de citros (Machado *et al.*, 2005). Em algumas espécies cítricas a competição entre embriões nucleares e zigóticos é tanta, que o embrião sexual é eliminado ou apresenta desenvolvimento lento e frágil, reduzindo a frequência de genótipos recombinantes para a seleção e impossibilitando a obtenção de novas cultivares com constituição genética distinta (Koltunow, 1993; Ruiz *et al.*, 2000; Cristofani *et al.*, 2001; Ramos *et al.*, 2006). Como alternativa para minimizar a perda dos embriões zigóticos, que em condições de campo são dominados pelo maior vigor dos nucleares, o resgate *in vitro* destes têm sido recomendado (Koller, 1994).

A proporção de embriões nucleares parece variar entre as espécies cítricas, sendo que fatores ambientais, nutrição da planta, cultivar, forma de polinização e variedade polinizadora atuam diretamente no tamanho e no número de embriões contidos em uma semente (Frost & Soost, 1968; Garcia *et al.*, 1999).



A determinação do número de embriões pode ser feita direta ou indiretamente. Conforme Moreira *et al.* (1947), o método direto consiste na contagem do número de embriões presentes e o método indireto é baseado no número de embriões que conseguem germinar de cada semente. Além disso, os autores descreveram metodologia para calcular a percentagem de poliembrionia, a qual é realizada através da frequência de sementes com dois ou mais embriões no total de sementes do experimento.

Diferenças no número de embriões podem ser observadas em função do método utilizado. Moreira *et al.* (1947), em limoeiro ‘Cravo’ (*C. reticulata*), limoeiro ‘Comum’ (*C. limon*) e *P. trifoliata* observaram pelo método direto a média de 1,7; 1,7 e 2,6 embriões por semente, enquanto que pelo método indireto observaram 1,1; 1,1 e 1,5, respectivamente.

O método direto de determinação do número de embriões é mais preciso, embora seja mais trabalhoso. Rodrigues *et al.* (1999), através do método direto, avaliaram as tangerineiras ‘Cai’ e ‘Montenegrina’ (*C. deliciosa* Tenore), ‘Poncã’ (*C. reticulata* Blanco) e ‘King’ (*C. nobilis* Loureiro) quanto ao número de embriões por semente e observaram valores médios de 5,74; 5,65; 7,66 e 3,24, respectivamente. Soares Filho *et al.* (2000), através do método direto, avaliaram o número de embriões por semente e a taxa de poliembrionia em tangerineiras ‘Clementina’ e ‘Sunki’ e em limoeiros ‘Cravo’ e ‘Volkameriano’, observando uma média de embriões de 1,0; 1,3; 1,5 e 2,1 e a percentagem de poliembrionia foi de 1,4%; 15,9%; 35,2% e 58,6%, respectivamente.

O método indireto também é muito utilizado por ser menos trabalhoso, contudo, apresenta menor precisão. Soares Filho *et al.* (2002) observaram através do método indireto, a média de embriões por semente de 1,07 em tangerineira ‘Clementina’, 1,15 em tangerineira ‘Sunki’, 2,60 em limoeiro ‘Volkameriano’, 2,56 em laranjeira-azeda ‘Comum’ e 4,29 em laranjeira-azeda ‘Double cálice’ e a percentagem de poliembrionia foi de 1,5%, 8,3%, 79,2%, 76,4% e 90,50%, respectivamente. Ramos *et al.* (2006) avaliaram, pelo método indireto, o número médio de embriões por semente e a percentagem de

poliembrião em citrumeleiro 'Swingle' e *P. trifoliata* e observaram valores médios de 1,6 e 1,4 embriões por semente e 48,1% e 31,5% na taxa de poliembrião, respectivamente.

Em citros, quando se objetiva selecionar apenas as plantas zigóticas, a identificação de híbridos e a eliminação precoce de plantas nucelares resulta em economia de recursos e tempo (Ballve *et al.*, 1997). Porém a distinção entre embriões zigóticos e nucelares em estádios iniciais de desenvolvimento é difícil, pois a maioria dos caracteres morfológicos apresentam herança aditiva, são poligênicos e altamente influenciados pelo ambiente; além disso, híbridos obtidos via cruzamento podem ser muito semelhantes ao parental feminino dificultando a seleção precoce destes (Teich & Spiegel-Roy, 1972; Ballve *et al.*, 1997; Ruiz *et al.*, 2000).

A identificação de híbridos cítricos zigóticos por marcadores morfológicos é mais efetiva quando as características são visualmente diferenciáveis. Um dos primeiros métodos utilizados para distinguir plântulas zigóticas de nucelares foi realizado com base em um gene marcador dominante, codificador da característica 'trifoliolada', expressa em *P. trifoliata*. Assim, em cruzamentos entre plantas dos gêneros *Citrus* e *Poncirus* os indivíduos zigóticos apresentavam folhas trifolioladas (Cameron & Frost, 1968).

A caracterização morfológica de plantas híbridas de citros tem sido útil em análises preliminares, reduzindo o número de genótipos a serem avaliados por técnicas mais caras, como os marcadores moleculares. Teich & Spiegel-Roy (1972) descreveram um índice utilizando a razão entre o comprimento e a largura da folha para identificar híbridos derivados do cruzamento entre a tangerineira 'King' (*C. nobilis* Lour.) (genitor materno) e laranjeiras, tangeleiros e tangerineiras. Plântulas que apresentaram índice similar a 'King' foram consideradas nucelares e as com índice diferente, híbridos, porém, a confiabilidade deste método não foi avaliada.

Ballve *et al.* (1997) avaliaram a progênie obtida via cruzamentos controlados entre *C. limonia* x *C. aurantium*, *C. sunki* x *C. aurantium* e cruzamentos recíprocos, além de *C.*

*sunki* x *C. sinensis*. O marcador tamanho das asas do pecíolo foi utilizado, visto que *C. limonia* e *C. sunki* apresentam asas estreitas e *C. aurantium* e *C. sinensis* asas amplas. Nas avaliações morfológicas de um total de 1024 plantas, 504 foram caracterizadas fenotipicamente como de origem zigótica. Posteriormente, análises izoenzimáticas permitiram identificar 561 híbridos. Portanto, as análises morfológicas foram eficientes na caracterização de 90% dos híbridos, demonstrando ser este um método prático e fácil devido à presença de distinto marcador morfológico.

Oliveira *et al.* (2002) pré-selecionaram plantas possivelmente zigóticas de citros através da análise do ápice das folhas de plântulas obtidas do cruzamento entre o tangoreiro 'Murcott' (*C. reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) e a laranjeira 'Pêra' (*C. sinensis* (L.) Osb.). A análise visual indicou que as folhas de 'Pêra' (doadora de pólen) e dos possíveis híbridos apresentavam ápices pontiagudos, enquanto que 'Murcott' (planta mãe) e possíveis plântulas nucelares apresentavam formato redondo. Na avaliação de 99 plântulas, 52 foram classificadas como de origem zigótica e 47 nucelar, sendo estas posteriormente confirmadas por análises moleculares com marcadores microssatélites (SSR). Portanto, a seleção via marcadores morfológicos pode ser eficiente e permite reduzir os custos de genotipagem de um grande número de plantas, muitas das quais de origem nucelar.

Oliveira *et al.* (2000) pré-selecionaram via marcadores morfológicos, híbridos provenientes do cruzamento entre tangerineira 'Cravo' (*C. reticulata* Blanco) e laranjeira 'Pêra' [*C. sinensis* (L.) Osbeck]. As plantas foram conduzidas em tubetes e canteiros e classificadas em dois grupos: plantas com menor altura (<12 cm) e folhas de coloração verde-escura (seleção A) e plantas com comprimento, largura das folhas ou forma da asa do pecíolo distintos do parental feminino (seleção B). Via marcadores moleculares do tipo RAPD, das plantas pré-selecionadas e conduzidas em tubetes 46,5% e 55,6% eram híbridas e para as plantas conduzidas em canteiros 8,3% e 80,4% foram caracterizadas como

zigóticas. Estes resultados permitiram concluir que a identificação de híbridos baseada exclusivamente em caracteres morfológicos é difícil, principalmente quando as espécies parentais são semelhantes fenotipicamente, mas constitui importante ferramenta para a redução de custos com análises laboratoriais.

Técnicas moleculares são utilizadas na seleção precoce de plantas híbridas em citros. O uso desta ferramenta oferece algumas vantagens, tais como: rapidez e precisão da análise, grande número de marcadores existentes, necessidade de pequena quantidade de DNA e não interferência de fatores ambientais (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

Entre os métodos baseados em DNA, análises com marcadores do tipo RAPD e SSR destacam-se em citros. Marcadores moleculares do tipo RAPD utilizam um conjunto de *primers* universais, dominantes e que podem ser usados para análise genômica em uma ampla variedade de espécies. Os SSR são marcadores co-dominantes, multialélicos, altamente informativos e de ampla utilização na maior parte das culturas, além de permitir o uso de *primers* desenvolvidos para espécies relacionadas (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

Marcadores do tipo RAPD foram utilizados por Bastianel *et al.* (1998) para a identificação de embriões zigóticos obtidos do cruzamento entre as tangerineiras ‘Montenegrina’ (*C. deliciosa* Tenore) e ‘King’ (*C. nobilis* Loureiro). Das 202 plantas avaliadas, 54 (26,73%) foram caracterizadas como de origem sexual. Enquanto que Schäfer *et al.* (2004) identificaram duas (3,23%) plantas zigóticas de uma população de 62 genótipos obtidos via polinização aberta de *P. trifoliata*.

Cristofani *et al.* (2001), com o uso de marcadores moleculares RAPD e SSR avaliaram 282 plantas obtidas de cruzamento controlado entre laranjeira ‘Caipira’ [*C. sinensis* (L.) Osbeck] e laranjeira ‘Azeda’ (*C. aurantium* L.) e identificaram 17 (6%) plantas zigóticas. No cruzamento entre laranjeira ‘Caipira’ e limoeiro ‘Cravo’ (*C. limonia* Osbeck) avaliaram 83 plantas, e destas, oito (9,6%) eram de origem sexual. Weiler *et al.* (2010) confirmaram a origem híbrida de 93 plantas obtidas pelo cruzamento da

tangerineira ‘Clementina Fina’ (*C. clementina* Hort. ex Tan.) e ‘Montenegrina’ (*C. deliciosa* Ten.), com marcadores moleculares SSR.

Portanto, marcadores moleculares estão sendo eficientes na identificação de indivíduos zigóticos, permitindo que estes sejam selecionados precocemente.

## **2.7 Citogenética de citros**

Estudos citogenéticos compreendem todo e qualquer estudo relativo ao cromossomo isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, no que diz respeito à morfologia, organização, função e replicação, bem como na sua variação e evolução (Guerra, 1988).

Segundo Sybenga (1998), análises citogenéticas são utilizadas para a determinação do número cromossômico, nível de ploidia, análise do comportamento cromossômico na meiose e fertilidade de pólen. Em programas de melhoramento genético são muito importantes, pois permitem selecionar materiais promissores que possam ser utilizados em cruzamentos dirigidos, além de ajudar no monitoramento de possíveis alterações da fertilidade dos indivíduos e do nível de ploidia.

A determinação do número cromossômico é muito importante no melhoramento e pode ser feita através da contagem de cromossomos em células somáticas de ponta de raiz ou células gaméticas, ou ainda de modo alternativo, especialmente quando se trabalha com um grande número de plantas, por citometria de fluxo.

A citometria de fluxo é um método que mede a quantidade de DNA e infere sobre níveis de ploidia. A medida da quantidade de DNA ocorre nas seguintes etapas: isolamento mecânico dos núcleos intactos das plantas; coloração dos núcleos com fluorocromo que é adicionado às células para que estas possam ser detectadas e quantificadas devido à fluorescência emitida pelo fluorocromo; passagem em alta velocidade desta suspensão de células diante de uma fonte de luz ultravioleta. A passagem das partículas pelo foco de luz

convertidos em pulsos é eletronicamente processada para produzir sinais, cuja distribuição é integrada em uma área, na forma de picos. A fluorescência obtida no foco de luz é proporcional à quantidade de DNA nuclear e a posição do pico reflete o nível de ploidia (Doležel *et al.*, 1994; Bennet & Leicht, 1995).

A estimativa de nível de ploidia através da citometria de fluxo tem várias vantagens, como: rapidez, conveniência e sensibilidade, além de permitir que seja analisado um grande número de amostras a partir de diversos tipos de tecidos vegetais, em um curto período de tempo, contudo há certos inconvenientes, como imprecisões nos resultados e alto custo do equipamento e reagentes (Bennett & Leicht, 1995; Saito *et al.*, 2003).

O processo meiótico consiste na divisão e formação de gametas haplóides a partir de células diplóides. Durante a reprodução sexual, a união de dois esporos haplóides restaura o complemento cromossômico diplóide de um indivíduo, mantendo o número cromossômico constante de geração em geração (Singh, 2003). As anormalidades meióticas influenciam negativamente a fertilidade dos indivíduos.

Análises da viabilidade dos grãos de pólen, pelo método de coloração dos grãos ou através da capacidade de germinação *in vitro* em meio de cultivo são muito importantes, pois podem contribuir, por exemplo, para a taxonomia (Rodrigues *et al.*, 1999), mas, principalmente, para a determinação da fertilidade masculina (Agarwal, 1989), pois, em espécies cítricas, a presença de grãos de pólen viáveis é necessária para a fertilização e formação das sementes (Koltunow *et al.*, 1995).

Em citros, os primeiros estudos citogenéticos foram conduzidos por Strasburger em 1907 e por Osawa em 1912 e estes descreveram erroneamente o número haplóide  $n=8$  para o gênero. A contagem equivocada deve, possivelmente estar associada a limitações das técnicas utilizadas e ao pequeno tamanho dos cromossomos que variam de 1 a  $3,5\mu\text{m}$  e da morfologia (meta e submetacêntricos) muito semelhante. Somente em 1925, Frost,

determinou corretamente o número cromossômico básico em meiócitos de laranjeiras-doce e pomeleiros como  $n=9$  ( $2n=18$ ), com a ocorrência de nove cromossomos bivalentes em células mãe-de-pólen (Lee, 1988; Davies & Albrigo, 1994).

A predominância de plantas diplóides em citros foi confirmada por Guerra *et al.* (1997) que ao estudar de 51 acessos de *Citrus*, *P. trifoliata* e sete híbridos interespecíficos observaram a presença de células com  $2n=18$  cromossomos.

Estudos de análise do comportamento meiótico foram desenvolvidos objetivando identificar o grau de normalidade na microsporogênese de citros. Raghuvanshi (1962) avaliou algumas espécies de *Citrus* quanto ao comportamento meiótico e observou meiose regular, com a formação de nove cromossomos bivalentes. Algumas alterações, como pontes em anáfase, cromossomos univalentes e fragmentos foram observadas, estando estas associadas possivelmente à freqüente ocorrência de inversões nas espécies.

Agarwal (1987) através de análises do comportamento meiótico de três híbridos de citros: citrumeleiro (*C. paradise* x *P. trifoliata*), citrangeiro (*C. sinensis* x *P. trifoliata*) e kumquateiro (*C. aurantifolia* x *Fortunella*) observou formação de nove bivalentes em metáfase I e alta fertilidade de pólen com 77,1%, 95,4% e 96,1%, respectivamente.

Agarwal (1989) avaliou o comportamento meiótico de híbridos de porta-enxertos considerados promissores obtidos através de cruzamentos intergenéricos de *Citrus* e *Poncirus* e genéricos de *Citrus*. Poucas irregularidades cromossômicas foram observadas com predomínio de nove bivalentes em metáfase. A viabilidade do pólen foi elevada com variações de 73,9 a 87,7% de grãos viáveis.

Sellito-Boaventura & Pio (1989) avaliaram o comportamento meiótico de três cultivares de laranjeiras-doce [*C. sinensis* (L.) Osbeck] 'Pineapple', 'Ruby' e 'Moro'. As três cultivares eram diplóides  $n=9$  ( $2n=18$ ) e apresentaram diferenças na percentagem de anormalidades meióticas. Em 'Pineapple', 14% das células durante a metáfase I apresentaram univalentes; em anáfase I, 6% continham retardatários e pontes

cromossômicas e 16% das células em anáfase II mostravam retardatários e pontes. Na cultivar ‘Ruby’, em metáfase I, 12,5% das células apresentaram separação precoce dos cromossomos e 6,2% tinham a presença de um cromossomo a mais (9II+1I); em anáfase I, 20,2% demonstravam disjunção irregular; 6,8% com cromossomos retardatários e 2,0% com um cromossomo a mais ( $2n=19$ ); em anáfase II, 31,0% das células mostraram disjunção irregular e 3,0% cromossomos retardatários. Na cultivar ‘Moro’, 16,5% das células apresentaram separação precoce de um cromossomo e em 8,7% observou-se a presença de um cromossomo a mais (9II+1I); em anáfase I e II, 53,0% e 57,7% respectivamente, continham cromossomos retardatários. A percentagem de tétrades normais e viabilidade dos grãos de pólen foram de 75,2% e 64,4% para ‘Pineapple’, 59,8% e 33,0% para ‘Ruby’ e 56,4% e 2,4% para ‘Moro’, respectivamente.

Cavalcante *et al.* (2000) avaliaram o comportamento meiótico em 70 plantas de uma população de tangerineira ‘Lee’ [*C. Clementina* x (*C. paradisi* x *C. tangerina*)]. Todas as plantas avaliadas eram diplóides ( $2n=18$ ). A maioria (84,3%) apresentou meiose regular com nove bivalentes em metáfase I e segregação normal nas fases de anáfase/telófase I e II. Baixas percentagens de irregularidades foram observadas, como aderência e presença de univalentes e tetravalentes em metáfase I, cromossomos retardatários e pontes cromossômicas em anáfase/telófase I e estas anormalidades podem estar associadas à falta de homologia entre os cromossomos. O índice meiótico variou de 38 a 100%, e foi observada a presença de micrócitos em células em fase de tétrades, porém 94% das plantas apresentaram índice meiótico superior a 90%, demonstrando ser esta uma população meioticamente estável. Na estimativa da viabilidade dos grãos de pólen com o corante carmim propiônico foram observados valores de 9,9% a 98,0% de viabilidade, enquanto que em análises de capacidade de germinação *in vitro* dos grãos, a percentagem de germinação variou de 1,5% a 91,5%. Correlação positiva e significativa (0,80) foi obtida



através da comparação entre a viabilidade avaliada pelo método de coloração com corante carmim propiônico e germinação *in vitro* de pólen.

Ye *et al.* (2009) avaliaram o comportamento meiótico da cultivar Shatangju e de uma nova cultivar de tangerineira sem semente denominada ‘Wuzishatangju’ (*C. reticulata* Blanco), proveniente de mutação de ramo. Não foram observadas diferenças entre a nova cultivar e sua genitora, visto que ambas apresentaram elevada presença de células normais em meiose. A viabilidade dos grãos de pólen foi similar entre as duas, com valores de 83,94% para ‘Wuzishatangju’ e de 92,58% ‘Shatangju’ e a capacidade de germinação *in vitro* foi de 41,6% e de 47,8%, respectivamente. A elevada percentagem de grãos viáveis e que germinaram são um indicio de que há pólen suficiente para o processo de fertilização, estando à ausência de sementes, na nova cultivar, associada a outro fator.

Brugnara *et al.* (2008) determinaram o nível de ploidia e estimaram a viabilidade dos grãos de pólen de 31 plantas de uma população obtida pelo cruzamento de tangerineira ‘Montenegrina’ (*C. deliciosa* Ten.) com a tangerineira ‘King’ (*C. nobilis* Lour.) e ‘Montenegrina’ com a laranjeira ‘Caipira’ (*C. sinensis* (L.) Osb.). Toda a população avaliada era diplóide ( $2n=18$ ). A fertilidade de pólen dos genitores foi de 58%, 79% e 47% para ‘Montenegrina’, ‘King’ e ‘Caipira’, respectivamente. Nos 21 híbridos avaliados do cruzamento entre ‘Montenegrina’ e ‘King’, os valores variaram de 42 a 98% e nos dez híbridos do cruzamento de ‘Montenegrina’ e ‘Caipira’ a variação foi de zero a 95% de viabilidade. Esta variação sugere que efeitos genéticos e ambientais estejam interagindo.

Weiller *et al.* (2011) determinaram o nível de ploidia e estimaram a viabilidade do pólen de uma população híbrida obtida pelo cruzamento de tangerineira ‘Clementina Fina’ (*C. clementina* Hort) x tangerineira ‘Montenegrina’ (*C. deliciosa* Ten.) e observaram que as 52 plantas avaliadas, além dos genitores eram diplóides ( $2n=18$ ). Na estimativa da viabilidade dos grãos de pólen, variações entre 79,04% e 98,08% foram observadas, o que também sugere a influência de fatores genéticos e ambientais sobre a viabilidade do pólen.

Hu *et al.* (2007) avaliaram a viabilidade dos grãos de pólen de uma cultivar de tangerineira (*C. suavissima* Hort. ex. Tanaka) e de uma nova cultivar obtida via mutação, denominada 'Ougan'. Dois métodos foram utilizados, coloração com iodeto de potássio (1%) e fluoresceína (FDA) e os valores observados foram de 84,5% e 71,4%, respectivamente na planta genitora, porém na cultivar mutante 'Ougan' não foram observados grãos viáveis, o que foi associado à limitação no acúmulo de lipídios em células do tapeto, o que possivelmente promoveu danos ao desenvolvimento dos micrósporos e provocou o aborto dos grãos de pólen. A ausência de pólen viável pode estar influenciando o reduzido número de sementes da nova cultivar.

Moreira & Gurgel (1941), em estudo com 27 variedades de laranjeiras, observaram grãos de pólen bem corados, pouco corados, não corados e vazios, através da coloração com carmin acético 40%. Com estas mesmas variedades, porém no experimento de germinação *in vitro*, foi possível observar que apenas os grãos bem corados germinaram.

Kobayaschi *et al.* (1995) avaliaram a capacidade de germinação *in vitro* dos grãos de pólen em quatro híbridos somáticos obtidos pela hibridação entre tangerineira 'Satsuma' (*C. unshiu* Marc. cv. Hayashi) + laranjeira 'Navel' (*C. sinensis* Osb. cv. brasiliensis); toranjeira (*C. paradisi* Macf. cv. Marsh) + laranjeira 'Navel'; tangoreiro Murcott [*C. reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osbeck] + laranjeira 'Navel'; e Yuzu (*C. junus* Sieb) + laranjeira 'Navel' e observaram valores de 11,7%, 9,9%, 13,5% e 27,0%, respectivamente de germinação dos grãos, sendo este um indicativo que a viabilidade dos grãos de pólen é reduzida nestes híbridos.

## **2.8 Poliploidia e sua ocorrência em citros**

A poliploidia, ou seja, a existência de três ou mais conjuntos cromossômicos no mesmo núcleo é de ocorrência comum nas plantas, tendo desempenhado um importante papel na origem e evolução das espécies vegetais, além de ser um mecanismo de adaptação

e especiação (Ramsey & Schemske, 1998; Otto & Whitton, 2000). Poliplóides em geral são bons colonizadores, podendo ocupar habitats pioneiros nos quais os ancestrais diplóides não são bem sucedidos, pois por possuírem mais cópias genômicas do que os diplóides podem acumular mais variabilidade encoberta (De Wet, 1980; Schifino-Wittmann, 2004), ou devido à chance de carregar novos alelos benéficos, podem ser favorecidos no estabelecimento em novas áreas (Otto & Whitton, 2000).

Poliplóides formados por conjuntos cromossômicos idênticos são referidos como autopoliplóides e os que surgem por hibridação interespecífica são denominados alopoliplóides (Ramsey & Schemske, 1998; Otto & Whitton, 2000; Soltis & Soltis, 2009).

Em análises citogenéticas, o comportamento cromossômico em função da origem dos poliplóides pode ser diferenciado. Na meiose, em autopoliplóides recém formados, espera-se pareamento cromossômico em multivalentes, pois estes apresentam cópias iguais de um mesmo genoma, enquanto que em alopoliplóides espera-se a formação de bivalentes intragenômicos, devido à existência de genomas distintos (Ramsey & Schemske, 1998; Otto & Whitton, 2000). Entretanto, devido ao processo de diploidização (tanto gênico como cromossômico) autopoliplóides tendem a ter seu pareamento cromossômico regularizado em bivalentes (Ramsey & Schemske, 2002).

Alguns mecanismos citológicos que induzem a poliploidia em plantas são conhecidos, dentre eles: formação de organismos poliplóides via gametas não-reduzidos ( $2n$ ) durante a micro e megasporogênese e duplicação somática em embriões jovens, gerando esporófitos completamente poliplóides ou em porções do tecido das plantas, gerando quimeras mixoplóides (Ramsey & Schemske, 1998).

Em citros, plantas com número cromossômico diferenciado podem ser encontradas naturalmente em populações consideradas diplóides, como triplóides ( $2n=3x=27$ ), tetraplóides ( $2n=4x=36$ ), etc. (Davies & Albrigo, 1994; Koller, 1994; Guerra *et al.*, 1997;

Araujo & Roque, 2005) e estas podem ocorrer por duas formas distintas, ou seja, via somática ou sexual (Lee, 1998; Machado *et al.*, 2005).

Em citros, os poliplóides de origem somática podem surgir por processos naturais de mutação de gema pela duplicação dos cromossomos nas células nucleares e não divisão destas em duas durante a mitose, dando origem a plantas tetraplóides. As plantas obtidas por este processo são denominadas ‘poliplóides espontâneos’ (Cameron & Frost, 1968; Lee, 1988; Machado *et al.*, 2005; Zeng *et al.*, 2006).

Poliplóides naturais de origem sexual podem ser obtidos pela fusão de gametas não-reduzidos e estes têm origem em um processo meiótico anormal em que a redução do número cromossômico gamético não ocorre (Ramsey & Schemske, 1998; Schifino-Wittmann & Dall’Agnol, 2001). A fusão de um gameta não-reduzido com um haplóide normal ou de dois gametas não-reduzidos resultará em plantas poliplóides (Frost & Soost, 1968; Cameron & Frost, 1968; Lee, 1988; Machado *et al.*, 2005).

Estudos citogenéticos sugerem que híbridos cítricos triplóides ( $2n=3x=27$ ), uma das formas poliplóides de maior interesse em programas de melhoramento devido à formação de frutos sem sementes, podem ser obtidos pela união de gametas  $n$  e gametas  $2n$ , através do cruzamento de indivíduos diplóides com tetraplóides (Frost & Soost, 1968; Cameron & Frost, 1968; Lee, 1988; Machado *et al.*, 2005). Um exemplo de cultivar triplóide espontânea com valor comercial é a limeira ácida ‘Tahiti’, que é altamente produtiva e não produz sementes, sendo que a ausência de sementes em triplóides é associada ao número cromossômico diferenciado e a incapacidade de emparelhamento destes durante o processo meiótico (Del Bosco *et al.*, 2007; Dutt *et al.*, 2010).

Plantas cítricas tetraplóides naturais ( $2n=4x=36$ ) podem ser obtidas pela fusão de dois gametas não reduzidos (Cameron & Frost, 1968). Estas são valiosas no melhoramento, uma vez que em cruzamentos com diplóides podem produzir variedades

triplóides sem sementes, além de apresentarem potencial interesse para uso direto como porta-enxertos ananizantes (Cameron & Frost, 1968; Lee, 1988).

Fatores como hibridação interespecífica, grau de ploidia e a natureza mono/poliembriônica da variedade podem contribuir para a frequência dos poliplóides em citros (Guerra *et al.*, 1997; Machado *et al.*, 2005). Além destes, fatores ambientais e diferentes variedades também podem ter influência na origem destas plantas, fato este comprovado por Schwarz (2001), que observou plantas tetraplóides em progênes de citros diplóides, com frequência variando em função do ambiente e do genótipo.

A identificação de plantas poliplóides é muito importante em programas de melhoramento genético de citros. Porém, como as formas naturais não são muito comuns, técnicas de hibridação somática via fusão de protoplastos e indução por agentes químicos, como a colchicina, têm sido utilizadas objetivando obter plantas autotetraplóides ou alotetraplóides que possam ser utilizadas em cruzamentos ou como porta-enxertos.

Guo *et al.* (2006) avaliaram plantas obtidas via hibridação somática com calos embriogênicos do tangeleiro 'Orlando' (*C. paradisi* Macf. x *C. reticulata* Blanco) e protoplastos de mesófilo do limoeiro 'Rugoso da Flórida' (*C. jambhiri* Lush) e identificaram 52 plantas tetraplóides. Destas, seis foram avaliadas via marcadores moleculares, sendo quatro caracterizadas como alotetraplóides.

A duplicação cromossômica induzida por colchicina foi testada por Zeng *et al.* (2006) que obtiveram 19,23% de plantas duplicadas via protoplastos de Kumquat (*Fortunella crassifolia*) e calos embriogênicos de laranjeira 'Navel' (*C. sinensis* Osbeck). Já Dutt *et al.* (2010) observaram variação de 2,7% a 34,7% de plantas autotetraplóides em suspensão de células de óvulos de tangerineira 'Ponkan' (*C. reticulata* Blanco), sendo a variação na percentagem de plantas duplicadas associada às doses de colchicina utilizadas.

Alguns estudos do comportamento meiótico foram realizados em poliplóides induzidos. Del Bosco *et al.* (1999) observaram muitas irregularidades meióticas como a

presença de univalentes, tetravalentes e multivalentes no híbrido alotetraplóide, obtido via fusão de protoplasto de laranja 'Valência' (*C. sinensis* L. Osbeck) e limoeiro 'Femminello' (*C. limon* L. Burm. f.). Elevada presença de díades, tríades e pentades comprometeram o índice meiótico do híbrido, que apresentou 20,0% de células normais, enquanto nos genitores os valores variaram de 48,41% a 61,39%.

Chen *et al.* (2004) observaram anormalidades na meiose de um híbrido alotetraplóide obtido via fusão de protoplasto entre laranja 'Hamlin' [*C. sinensis* L. Osbeck] e limoeiro 'Rough' (*C. jambhiri* Lush). Em metáfase I foram identificadas 78,1% de células com univalentes; em anáfase I e II, 64,8% e 75,8% de células com retardatários. As anormalidades comprometeram o índice meiótico, pois apenas 13,2% das células em tetrade eram normais. Nos genitores poucas anormalidades foram observadas.

Chen *et al.* (2004) identificaram 78,8% de células com univalentes em metáfase I; 68,0% e 72,0% de células com retardatários em anáfase I e II, respectivamente, em um híbrido alotetraplóide obtido via fusão de protoplasto entre laranja 'Key' (*C. aurantifolia* Swing.) e laranja 'Valência' (*C. sinensis*). Estas anormalidades comprometeram o índice meiótico, pois apenas 18,0% das células na fase de tetrade eram normais.

Por outro lado, Kamiri *et al.* (2011) observaram poucas irregularidades meióticas em um híbrido alotetraplóide obtido via fusão de protoplasto entre *C. reticulata* Blanco e *C. limon* (L.) Burm. O híbrido apresentou predomínio de bivalentes (76,0%), baixas frequências de univalentes (8,0%), trivalentes (4,0%), tetravalentes (11,0%) e hexavalentes (1,0%). Poucas células com retardatários em anáfase/telófase I e baixas frequências de células com anormalidade na fase de tétrades foram observadas.

A produção de plantas tetraplóides com o uso de técnicas de hibridação somática via fusão de protoplastos ou colchicina tem apresentado certa eficiência, contudo outra barreira observada é a alta percentagem de irregularidades meióticas nas plantas obtidas, o que pode ser um limitante ao uso destas em cruzamentos dirigidos.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho foi desenvolvido a campo na Fazenda Panoramas Citros, localizada no Município de Butiá, RS com latitude 29°57'S e longitude 51°40'W e em casa-de-vegetação na EEA-UFRGS (Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Município de Eldorado do Sul, RS, à latitude de 30°29'S e longitude 51°06'W.

As análises citológicas foram realizadas no Laboratório de Citogenética do Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia (DPFA), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS.

As análises moleculares foram conduzidas no Laboratório de Análises Genéticas do Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia (DPFA), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS.

A propagação das plantas, análises morfológicas e avaliações da capacidade de germinação das sementes foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia em Horticultura e em casa-de-vegetação no Departamento de Horticultura e Silvicultura (DHS), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) Porto Alegre, RS.

A determinação do nível de ploidia, através de citometria de fluxo, foi realizada no IAC (Instituto Agronômico de Campinas) - Centro APTA Citros Sylvio Moreira, Cordeirópolis, SP.

Para a condução dos experimentos foram utilizados os porta-enxertos de citros Trifoliata, citrumeleiro ‘Swingle’ [*C. paradisi* Macf. x *P. trifoliata* (L.) Raf] e citrangeiro ‘Troyer’ (*C. sinensis* x *P. trifoliata*). Além destes, a FEPAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, RS), unidade de Taquari, desenvolveu híbridos-matrizes, denominados citrangeiros ‘Fepagro C 13’, ‘Fepagro C 37’ e ‘Fepagro C 41’ [*C. sinensis* (L.) Osb. cv. Pêra x *P. trifoliata* (L.) Raf], que também foram utilizados nos estudos. Os porta-enxertos avaliados e a localização são indicados na Tabela 1.

TABELA 1. Porta-enxertos de citros conduzidos a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá -RS e em ambiente protegido na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, utilizados para o desenvolvimento deste estudo nos anos de 2008, 2009, 2010 e 2011.

FAZENDA PANORAMAS CITROS	EEA-UFRGS
Trifoliata ( <i>Poncirus trifoliata</i> )	Trifoliata ( <i>Poncirus trifoliata</i> )
Citrumeleiro ‘Swingle’ ( <i>Citrus paradisi</i> x <i>P. trifoliata</i> )	Citrumeleiro ‘Swingle’ ( <i>Citrus paradisi</i> x <i>P. trifoliata</i> )
Citrangleiro ‘Troyer’ ( <i>Citrus sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i> )	Citrangleiro ‘Troyer’ ( <i>Citrus sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i> )
Citrangleiro ‘Fepagro C 13’ ( <i>Citrus sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i> )	Citrangleiro ‘Fepagro C 13’ ( <i>Citrus sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i> )
Citrangleiro ‘Fepagro C 37’ ( <i>Citrus sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i> )	Citrangleiro ‘Fepagro C 37’ ( <i>Citrus sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i> )
-----	Citrangleiro ‘Fepagro C 41’ ( <i>Citrus sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i> )

As plantas conduzidas a campo estão enxertadas sobre o citrumeleiro ‘Swingle’ e são submetidas às condições climáticas naturais, com adubação a base de NPK a cada 90 dias. Em ambiente protegido as plantas são conduzidas em casa-de-vegetação com estrutura metálica e revestida por plástico. Estas estão enxertadas sobre *P. trifoliata* e são mantidas em vasos de 100 L, contendo substrato a base de solo, resíduo de casca de acácia e casca de arroz carbonizada (2:2:1-v:v:v). A irrigação é diária sob o sistema de gotejamento e a fertilização é feita a cada 15 dias. Para melhor entendimento, o material e métodos será subdividido em quatro tópicos: análises citogenéticas; determinação do nível



de ploidia; caracterização morfológica de plantas diplóides e poliplóides e caracterização dos porta-enxertos.

### 3.1 Análises citogenéticas

A descrição do esquema de coleta adotado nos anos de 2008, 2009 e 2010 pode ser observado na Figura 1.

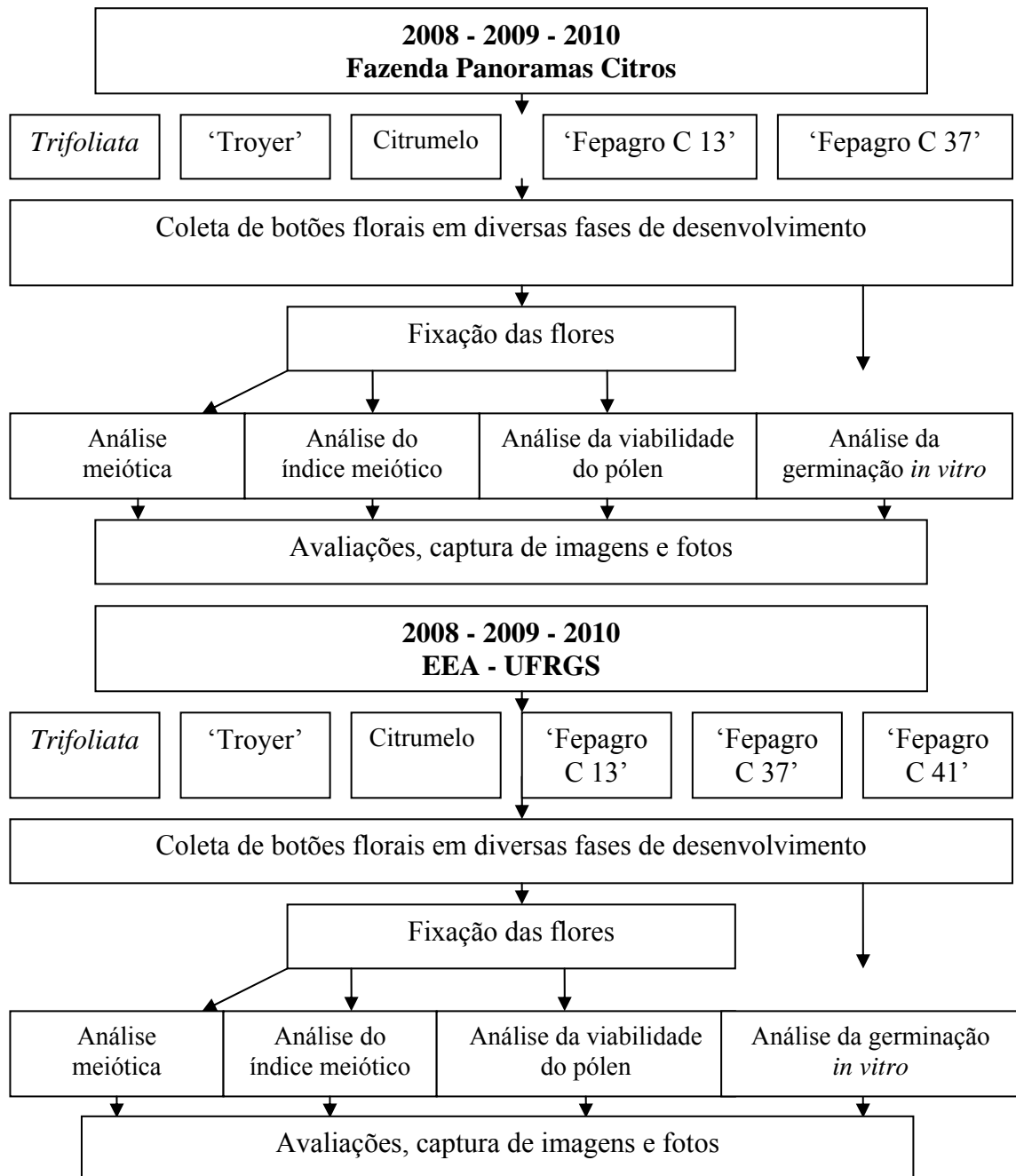


FIGURA 1. Esquema dos locais, porta-enxertos e procedimentos de coleta e fixação para as análises citogenéticas nos anos de 2008, 2009 e 2010 na Fazenda Panoramas Citros, Butiá - RS e na EEA-UFRGS, Eldorado do Sul - RS.

### **3.1.1 Análise meiótica, índice meiótico e viabilidade do pólen**

Para a análise do comportamento meiótico, índice meiótico e viabilidade dos grãos de pólen, foram coletadas flores em diversos estádios de desenvolvimento de plantas já estabelecidas a campo na Fazenda Panoramas Citros e em casa-de-vegetação na EEA-UFRGS (Tabela 1), nos anos de 2008, 2009 e 2010.

As flores foram coletadas em várias datas e fixadas em solução de álcool e ácido acético na proporção 3:1. O material foi mantido em temperatura ambiente por 24 horas, posteriormente transferido para álcool 70% e armazenado em congelador para o preparo das lâminas.

Para as análises, as lâminas foram preparadas com todas as anteras de cada flor, as quais foram separadas, cortadas e maceradas com bastão de vidro, sendo retirado da lâmina o excesso de tecido vegetal, sobre a qual foi adicionada uma gota do corante carmim propiônico (2%). Posteriormente, adicionou-se uma lamínula sobre a lâmina e esta foi pressionada com a extremidade mais larga de uma agulha histológica para obter um bom espalhamento das células. Depois de confeccionadas, as lâminas foram seladas com luto (breu e cera de abelha, na proporção de 3:1), identificadas e observadas em microscópio ou colocadas em caixas e armazenadas em geladeira para avaliação no dia seguinte.

Para o estudo do comportamento meiótico, foram analisados dez botões florais por porta-enxerto/local e avaliadas, no mínimo, dez células meióticas com bom espalhamento dos cromossomos em cada lâmina. A análise foi realizada em todas as células-mãe-de-pólen (CMP) possíveis e em todas as fases da meiose I: metáfase, anáfase e telófase e meiose II: metáfase, anáfase e telófase, com especial atenção para as configurações cromossômicas em metáfase I e disjunção em anáfase I e II. As células que apresentavam todos os cromossomos em associações bivalentes e sem retardatários foram consideradas normais e as que apresentavam cromossomos univalentes, trivalentes, quadrivalentes,

associações múltiplas, retardatários e pontes cromossômicas foram consideradas como irregulares.

Para a determinação do índice meiótico foram avaliados dez botões florais em estágio intermediário, ou seja, botões maiores do que aqueles utilizados para as análises do comportamento meiótico e menores do que aqueles com grãos de pólen, e analisadas 100 células por lâmina, perfazendo um total de 1000 células/porta-enxerto/local. As tétrades foram consideradas normais quando apresentavam os quatro micrósporos de igual tamanho e anormais aquelas com número diferente de quatro, com a presença de micronúcleos ou tamanho diferenciado. O índice meiótico foi calculado conforme sugerido por Löve (1949), ou seja, pela percentagem de tétrades normais.

A análise da viabilidade dos grãos de pólen foi conduzida com botões florais bem desenvolvidos, mas ainda fechados. Para cada indivíduo foram analisadas dez lâminas, contando 1.000 grãos aleatoriamente por lâmina, perfazendo um total de 10.000 grãos por porta-enxerto/local. Os grãos foram considerados viáveis quando se apresentavam bem corados e inviáveis quando vazios ou incolores, sendo a viabilidade estimada em percentagem. Foram realizadas medições do comprimento e largura de 20 grãos considerados normais, em dez grãos pequenos e dez grãos de tamanho superior ao normal. A avaliação de grãos maiores consiste na hipótese de que estes sejam não reduzidos.

### **3.1.2 Análise da germinação *in vitro* dos grãos de pólen**

A análise da capacidade de germinação *in vitro* dos grãos de pólen foi realizada em 2010 (Figura 1), através da avaliação de grãos de pólen dos porta-enxertos descritos na Tabela 1 de plantas conduzidas a campo e em casa-de-vegetação.

O meio de cultivo utilizado foi o descrito por Sahar & Spiegel-Roy (1984), com 1% de agar, 15% de sacarose, 100ppm  $H_3BO_3$ , 1000ppm  $Ca(NO_3)_4 \cdot 4H_2O$ , 300ppm  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  e 100ppm  $KNO_3$ . Os componentes do meio de cultivo foram adicionados em

um recipiente de vidro e misturados em água estéril para um volume final de 10ml. A solução foi aquecida em microondas por 20 minutos em temperatura média até a dissolução total dos reagentes e procedeu-se a adição de uma gota do meio de cultivo em lâminas previamente identificadas.

Flores com os grãos de pólen maduros, porém com as pétalas fechadas, foram coletadas, identificadas, acondicionadas em sacos plásticos e mantidas em geladeira por dez horas. Após, as pétalas foram retiradas e as anteras expostas à luz incandescente por 20 minutos para promover a liberação de pólen. Na abertura das anteras, os grãos foram distribuídos em lâminas contendo uma gota do meio de cultivo e adicionou-se uma lamínula sobre o meio. As lâminas foram mantidas em B.O.D. (25°C) por 24 horas e após procedeu-se a avaliação.

A análise do número de grãos de pólen foi feita em quatro lâminas por porta-enxerto/local, através de contagem aleatória do número de grãos germinados e não germinados em 250 grãos por lâmina/porta-enxerto/local, totalizando 1000 grãos. Foram considerados germinados os grãos que apresentavam o comprimento do tubo polínico superior ao diâmetro do grão de pólen. Além disso, em cada lâmina, foram medidos o comprimento do tubo polínico de dez grãos germinados e a medição estendeu-se desde a camada externa do grão (exina) até a porção extrema do tubo germinado.

As avaliações de comportamento meiótico, índice meiótico, estimativa da viabilidade dos grãos de pólen, germinação *in vitro*, comprimento do tubo polínico e análises mitóticas de ponta de raiz (item 3.2.2) foram realizadas diretamente em microscópio óptico. As imagens foram obtidas por uma câmera fotográfica ou através de um sistema de captação de imagens.

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste de Tukey 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SAS.

### 3.2 Determinação do nível de ploidia por citometria de fluxo e caracterização molecular dos genótipos poliplóides

A Figura 2 esquematiza os procedimentos adotados nos anos de 2008, 2009 e 2010, desde a marcação das flores até a caracterização molecular da progênie.

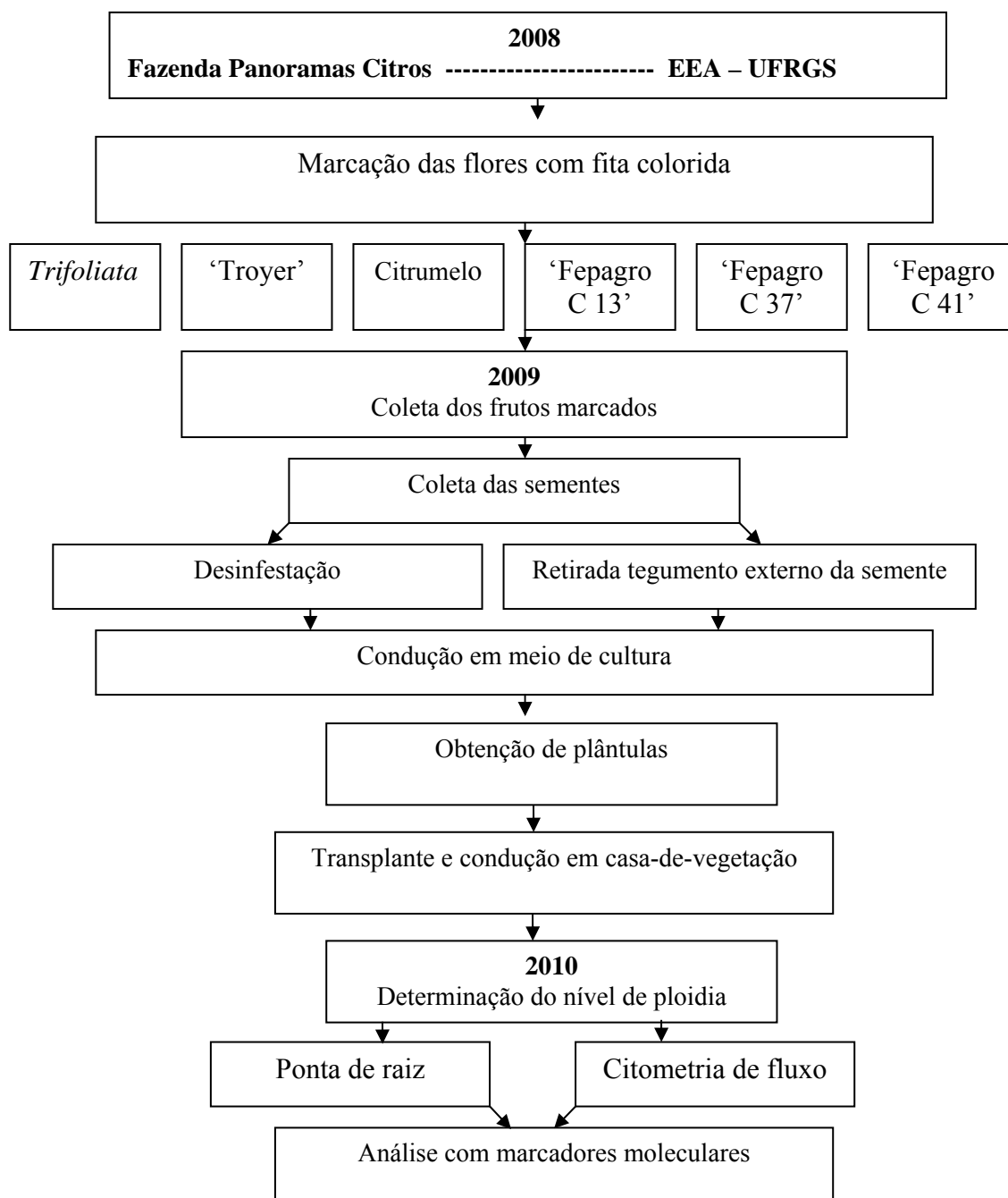


FIGURA 2. Esquema dos procedimentos adotados desde a marcação das flores até a obtenção da progênie que foi avaliada quanto ao nível de ploidia e caracterização com marcadores moleculares nos anos de 2008, 2009 e 2010 na Fazenda Panoramas Citros, Butiá - RS e na EEA-UFRGS, Eldorado do Sul - RS.

### **3.2.1 Marcação de flores, colheita dos frutos e inoculação em meio de cultivo**

Para a análise do nível de ploidia, no ano de 2008, flores em estágio de pré-antese, dos porta-enxertos descritos na Tabela 1, foram marcadas a campo na Fazenda Panoramas Citros e em casa-de-vegetação na EEA-UFRGS, com fitas de diversas cores, com uma cor para cada data de condução do trabalho em todos os genótipos (Figura 3a).

A marcação ocorreu nos dias: 25/08; 27/08; 02/09; 09/09; 17/09 e 19/09, sendo colocadas fitas coloridas no maior número possível de flores em cada um dos porta-enxertos. Porém, o número exato de flores marcadas, em cada data de trabalho, não foi determinado, pois houve variações na disponibilidade destas em estágio de desenvolvimento adequado, ao longo da florada.

A polinização das flores marcadas ocorreu de forma natural, ou seja, foi aberta, sem ser identificado qual genótipo contribuiu com o pólen para efetuar a fertilização.

Para a avaliação deste experimento, com intuito de observar a possível relação dos diferentes ambientes de cultivo sobre o nível de ploidia, além da marcação das flores em diversas datas, a temperatura ambiente e a umidade relativa do ar foram monitoradas durante todo o período de florescimento, em 2008, nos dois ambientes de desenvolvimento do estudo. O monitoramento a campo na Fazenda Panoramas Citros foi realizado através da estação meteorológica da EEA-UFRGS e dentro da casa-de-vegetação da EEA-UFRGS, pela instalação de um termohigrógrafo (Apêndice 1).

Os frutos obtidos de flores marcadas (Figura 3b) permaneceram no pé até atingirem maturação plena (Figura 3c). Em 2009, estes foram colhidos, identificados conforme a marcação da cor da fita e levados ao laboratório para as avaliações.

Em laboratório, os frutos foram lavados e esfregados com detergente neutro e escova, e, após, efetuou-se a sua desinfestação pela imersão em álcool 70% durante dez minutos, seguidos da imersão em solução de hipoclorito de sódio (2% de ingrediente ativo)

por cinco minutos e pela tríplice lavagem com água deionizada autoclavada. Após a secagem completa da casca dos frutos em temperatura ambiente, estes foram abertos e tiveram suas sementes coletadas, contadas, classificadas e selecionadas. A seleção consistiu na escolha de diversos tipos e formatos de sementes, desde murchas e enrugadas até sementes bem desenvolvidas e cheias.



FIGURA 3. Marcação das flores. a) Flores marcadas com fitas de diversas cores; b) Fruto em estágio inicial de desenvolvimento; c) Fruto em estágio de maturação. EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, 2008/2009.

As sementes selecionadas foram desinfestadas pela imersão em álcool 70% por 30 segundos, seguida da imersão em solução de hipoclorito de sódio (2% de ingrediente ativo) por dez minutos, seguida da tríplice lavagem com água destilada. O processo de desinfestação das sementes foi realizado em câmara de fluxo laminar, em condições assépticas, utilizando vidraria previamente esterilizada. A limpeza das superfícies da câmara foi efetuada com álcool 70% e exposição à luz ultravioleta por 30 minutos.

Em câmara de fluxo laminar realizou-se a retirada do tegumento externo (casca) e do tegumento interno (tégmen) que envolvem a semente (Figura 4) e procedeu-se a inoculação destas em tubos de ensaio contendo 30ml de meio de cultivo MS. O meio de cultivo foi preparado conforme metodologia descrita por Murashige & Skoog (1962). O pH do meio foi estabilizado em 6,4 e os tubos foram, posteriormente, autoclavados.

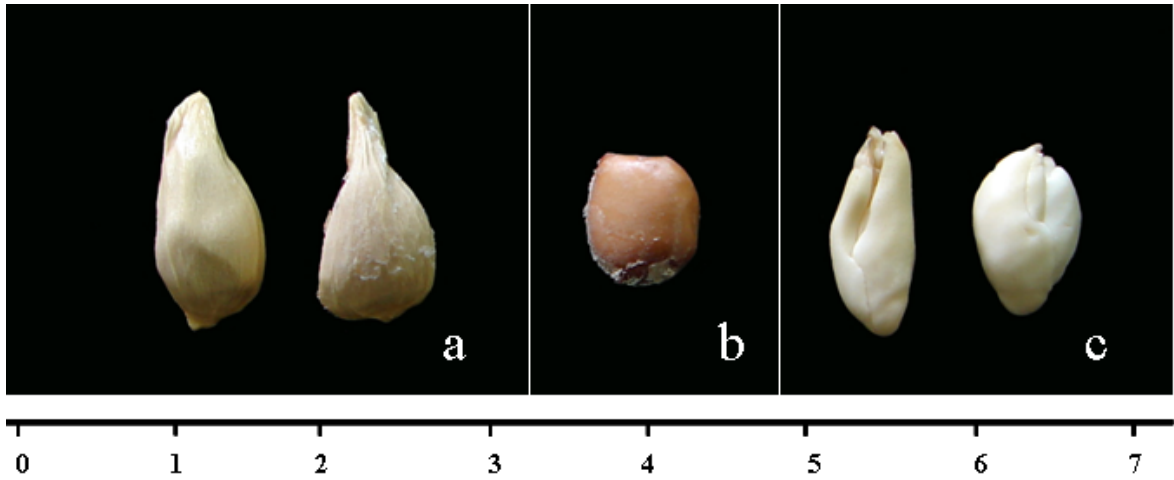


FIGURA 4. Sementes obtidas de frutos que tiveram as flores marcadas. a) Sementes quando coletadas; b) Semente já desprovida do tegumento externo (casca); c) Sementes já desprovidas do tegumento interno (tégmen). Escala: cm. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2009.

Após a inoculação, as sementes foram mantidas em tubos com meio de cultivo e em ambiente controlado, com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , durante o período de germinação até as plantas atingirem cerca de dez centímetros de altura. Após, foram transplantadas para vasos contendo substrato para citros da marca comercial Rendimax e aclimatadas por três semanas com a abertura gradual dos sacos plásticos envoltos aos vasos (Figura 5). As plantas permaneceram na casa-de-vegetação até a avaliação do nível de ploidia.

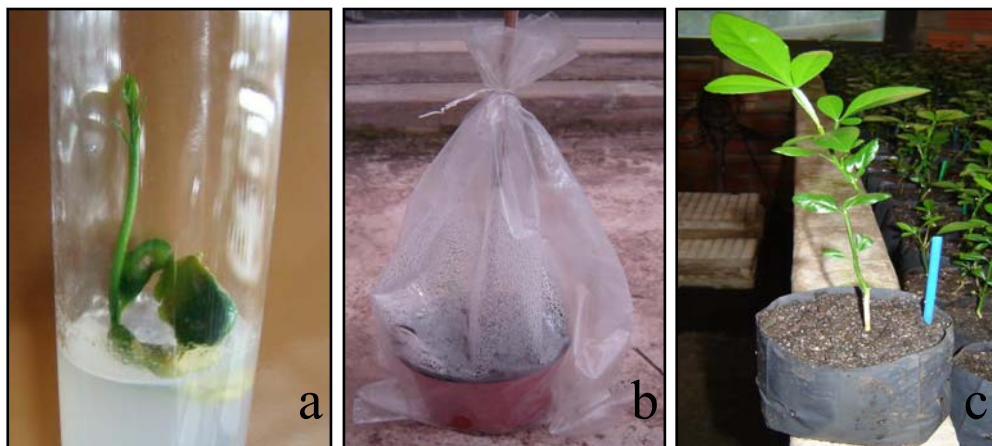


FIGURA 5. Estádios de desenvolvimento das plantas. a) Germinação dos embriões em meio de cultivo; b) Aclimação das plantas; c) Desenvolvimento inicial das plantas em casa-de-vegetação. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2009.



### 3.2.2 Análises para a determinação do nível de ploidia

A determinação do nível de ploidia, pela técnica de citometria de fluxo, foi realizada em julho de 2010, com o auxílio de um citômetro “Cy Flox Ploidy Analyser” da Partec. Foram avaliados os porta-enxertos descritos na Tabela 1, três plantas cujo nível de ploidia já era conhecido (testemunhas diplóide, triplóide e tetraplóide) e a progênie obtida de frutos que tiveram as flores marcadas em 2008.

Aproximadamente  $1\text{cm}^2$  de material vegetal de cada planta foi macerado em placa de petri contendo  $100\mu\text{l}$  de buffer de extração por 30 a 60 segundos com auxílio de uma lâmina. Após a maceração, adicionou-se  $400\mu\text{l}$  da solução de coloração (Staining solution) e  $600\mu\text{l}$  do fluido (Sheath) e as amostras permaneceram nesta por cerca de 60 segundos. A solução contendo as células foi separada do tecido vegetal remanescente através de um filtro de  $30\mu\text{m}$  de diâmetro (Figura 6) e na sequência as amostras foram inseridas no citômetro, procedendo-se a leitura dos picos obtidos de plantas diplóides e poliplóides.



FIGURA 6. Preparo do material para análises via citometria de fluxo. a) Material vegetal ( $1\text{cm}^2$ ); b) Material vegetal macerado; c) Filtragem em filtro de  $30\mu\text{m}$  de diâmetro. IAC, Cordeirópolis - SP, 2010.

As plantas poliplóides identificadas por citometria de fluxo tiveram o número cromossômico confirmado pela contagem de cromossomos em células somáticas de ponta de raiz. Além destas, outras 28 plantas foram avaliadas via células somáticas, as quais não haviam sido avaliadas em citômetro de fluxo.

Para a análise via contagem de cromossomos em células somáticas, raízes foram coletadas, pré-tratadas com solução de paradiclorobenzeno por 18-20h a 4°C, fixadas em 3:1 (etanol-ácido acético) por 12-24h e estocadas em álcool 70% em congelador. As lâminas foram preparadas com hidrólise das raízes em HCl 1N a 60°C por dez minutos, coradas com Feulgen (24h), pré-tratadas com pectinase (2%), esmagadas em carmim propiônico (2%) e, posteriormente, lâmina e lamínula foram seladas com breu. Foram analisadas no mínimo dez células com bom espalhamento dos cromossomos.

### **3.2.3 Análises com marcadores moleculares**

O perfil molecular das plantas poliplóides e dos genitores foi estabelecido por marcadores moleculares do tipo SSR.

O protocolo para a extração foi o de Ferreira & Grattapaglia (1996), com modificações. Para a extração de DNA foram coletadas duas folhas jovens de cada planta. Cerca de 100mg de folhas foram macerados em cadinho com nitrogênio líquido. O macerado foi transferido para tubo de microcentrifuga de 2ml ocupando  $\frac{1}{4}$  do volume. Em seguida foi adicionado 600 $\mu$ l do tampão de extração (Tris-HCl 100mM pH 8,0; NaCl 1,4M; EDTA 0,02M; CTAB 2%;  $\beta$ -mercaptoetanol 0,5%; PVP-40 1%) e após agitação completa foi adicionado 140 $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol e 10 $\mu$ l de proteinase K (10mg/ml). As amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C por cinco minutos, agitadas levemente e mantidas em banho-maria a 65°C por 30 minutos e agitados levemente a cada dez minutos. Após, as amostras foram resfriadas em agitador orbital por 30 minutos. Após o resfriamento, foi realizada a desproteinização, adicionando-se 600 $\mu$ l de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram agitados novamente no agitador orbital por 30 minutos e centrifugados por 15 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para um novo tubo de 2ml e foi adicionado 600 $\mu$ l de isopropanol gelado para precipitar o DNA, sendo os tubos invertidos gentilmente por alguns segundos. As amostras foram

colocadas no freezer (-20°C) por 24 horas. Após, os tubos foram centrifugados por dez minutos a 13000 rpm e o sobrenadante foi retirado e deixando-se secar. Após a secagem, o 'pellet' foi lavado com 500µl de solução de lavagem (acetato de amônio e álcool) por 20 minutos, as amostras foram centrifugadas por cinco minutos a 13000 rpm e o sobrenadante foi novamente descartado e os ácidos nucléicos mantidos em temperatura ambiente para secarem. Posteriormente, estes foram ressuspensos em 100µl de água miliq no banho-maria por 5 minutos a 65°C, adicionou-se 2µl de RNase (10mg/ml), acrescentou-se 50µl de acetato de amônio 7,5M e 375µl de etanol e inverteu-se gentilmente. As amostras foram centrifugadas por dez minutos a 13000 rpm, descartou-se o sobrenadante e deixou-se em temperatura ambiente para secar. Quando seco, o DNA foi ressuspensionado com 50µl de água miliq e mantido em geladeira por 24 horas.

Quantidade e qualidade do DNA das amostras foram determinadas conforme metodologia descrita por Sambrook *et al.* (1989), com modificações. As amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% e coradas com brometo de etídio (0,5ng/ml) e submetidas à eletroforese por uma hora a 110 V. A quantificação foi realizada através de comparações com padrões de concentração conhecidos (Lambdas λ50, λ100, λ200 e λ500) e a qualidade do DNA foi avaliada pela ausência de rastros. Após a quantificação, uma alíquota foi diluída em água estéril dando origem à solução trabalho com concentração de 20ng/µl. O restante do DNA foi armazenado constituindo a solução estoque.

As reações de amplificação foram preparadas utilizando *primers* de microssatélites desenvolvidos no IAC (Tabela 2), os quais foram identificados a partir do genoma da laranjeira-doce (*C. sinensis* Osb.) de prefixo CCSM e de sequências expressas (ESTs) de citros com prefixo CCSME. As reações foram preparadas em tubos de 0,6ml, com volume total da reação de 24µl contendo 0,3µl da enzima taq polimerase (5U/µl); 1,0µl de dNTP mix (dATP, dTTP, dCTP, dGTP à 10mM); 2,5µl de tampão de reação 10X (10 mM tris-

HCl 9 pH 8,3); 1,0µl de MgCl (50mM); 2µl de *primer* R e 2µl de *primer* F; 5,0µl de DNA genômico (20ng/ml) e 10,2µl de água.

TABELA 2. Relação dos 18 *primers* polimórficos de microssatélite utilizados para a caracterização da progênie. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2010.

<i>Primers</i>	Seqüência F (5' - 3')	Seqüência R (5' - 3')
CCSM 01	CAGCTCCAAGAAACCCTA	GCCAATATATCATGCAGGTA
CCSM 03	GCAATGCACCTTGTCATTAG	CATCACAGGCACTTATGCAG
CCSM 06	ATCTGTGTGAGGACTGAA	CCTCTATTAATGTGCCTG
CCSM 12	GATTGAATCTTCTGTAGCTC	ATCATCATCTAGTGTCACTG
CCSM 18	AACAGTTGATGAAGAGGAAG	GTGATTGCTGGTGTCGTT
CCSM 28	CTTGACATAATAGAGTGGAG	TCGTTTCATGTACTCTCCATT
CCSM 49	ACCGATCAGCAGAAGAGG	TTGCTGTTGCTTCTGTTG
CCSME 54	ACGCTCTCTCCACTATCCGA	CTGCAGCCGAAGATATGTGA
CCSME 60	CTTGAGGAAAACAGCAGAGG	CGAATTGGAATCAAAGGCAT
CCSME 62	TTCGATAGCGCTGTTGTTTG	CACCATCACCATCACGGTAG
CCSME 63	GGTGGCGAGATTATGCTGTT	TGCAGTCCAACAAAAACAA
CCSM 90	GTGCAGTTGCATATGAG	CTGTAAGTCAAACGGAAG
CCSM 129	GTATGTGGAGAGATGTTC	ATCTGCTCTTATGACCAC
CCSM 146	TGGTTAGAAGGTGAACAG	ACATAGAGGTTTGCTTACC
CCSM 147	AGACTCACGTAACCTACTTC	GCATTGTTATGATACGTCTG
CCSM 150	TCAGACAATGTGTTAGAGAG	TCGGTTGCTACTTGTATC
CCSM 156	GTCTCTGTTGTGTGTCGGTT	ACGAAGTGAAGTGTGTAATG
CCSM 170	AGTTGAGTACTGTGTGCGAA	CTAATGGCTGAGAGAGTTGC

A amplificação das regiões específicas foi realizada com a utilização da técnica de PCR (“Polymerase Chain Reaction”) em termociclador submetendo as amostras a 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 65-56°C por 30 segundos (“touchdown” de 0,3°C a cada ciclo), 72°C por cinco segundos e mantidas a 4° até a retirada das amostras. As amplificações foram efetuadas em termociclador PTC-100 (Programmable Thermal Controller MJ Research, INC.).

Após a amplificação foi adicionado em cada amostra 5µl de azul de bromofenol e, em seguida, aplicadas em gel de agarose 3,0%. Em cada gel aplicava-se as amostras mais o padrão de fragmentos de tamanho conhecido (Gibco BRL com 100 pares de base). Para visualização das bandas no gel foi adicionado 8µl de brometo de etídeo (0,4µl/ml). Na cuba foi colocado solução tampão TBE 1X suficiente para cobrir o gel e favorecer a corrente elétrica. O tempo para a separação eletroforética foi de duas horas, a 110 volts. Ao término de cada corrida, os géis foram fotografados sob luz ultravioleta e os fragmentos determinados por comparação com o padrão 100pb, utilizando-se o programa Kodak EDAS 290 (Electrophoresis Documentation and Analysis System).

A confirmação da origem nucelar das plantas poliplóides foi realizada pela avaliação do perfil molecular de cada planta comparado com o da planta genitora (testemunha) em todas as combinações de primers.

### **3.3 Avaliações do desenvolvimento e caracterização morfológica de plantas diplóides e poliplóides**

Após a determinação do nível de ploidia por citometria de fluxo e ponta de raiz, plantas poliplóides e diplóides, oriundas da mesma semente foram transplantadas para vasos maiores com capacidade de três litros, preenchidos com substrato para citros da marca comercial Rendimax e mantidas lado a lado em casa-de-vegetação.

As comparações foram feitas entre uma planta poliplóide com uma planta diplóide oriunda da mesma semente, sendo cada conjunto destas, para efeito de nomenclatura neste trabalho, identificado como um acesso. Um total de oito acessos, ou seja, oito sementes de quatro porta-enxertos que produziram concomitantemente plantas diplóides e poliplóides foram avaliadas. Todas as poliplóides identificadas foram tetraplóides (4x) e a descrição de cada acesso juntamente com o porta-enxerto de origem são apresentados na Tabela 3.

TABELA 3. Acessos de plantas diplóides e tetraplóides provenientes da mesma semente cultivadas em vasos em casa-de-vegetação para realização de avaliações comparativas de desenvolvimento e caracterização morfológica. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2010/2011.

<b>Acesso</b>	<b>Porta-enxerto</b>	<b>Nível de ploidia de cada planta</b>	
1	Citrumeleiro ‘Swingle’	2x	4x
2	Citranceiro ‘Troyer’	2x	4x
3	Citranceiro ‘Fepagro C 13’	2x	4x
4	Citranceiro ‘Fepagro C 13’	2x	4x
5	Citranceiro ‘Fepagro C 13’	2x	4x
6	Citranceiro ‘Fepagro C 13’	2x	4x
7	Citranceiro ‘Fepagro C 13’	2x	4x
8	Citranceiro ‘Fepagro C 37’	2x	4x

Não foi possível avaliar todas as plantas poliplóides, pois estas não apresentavam plantas diplóides obtidas na mesma semente, o que poderia comprometer as comparações, pois plantas oriundas de sementes diferentes poderiam ter sido beneficiadas pelas condições do ambiente, bem como, pela quantidade de reservas da própria semente.

O desenvolvimento das plantas foi monitorado pelo período de um ano, com nove avaliações, sendo a primeira em 03 de agosto de 2010 e as demais em intervalos de 45 dias, em 17/09/2010, 01/11/2010, 16/12/2010, 31/01/2011, 17/03/2011, 02/05/2011, 16/06/2011 e 01/08/2011. As plantas foram analisadas quanto à altura com auxílio de uma régua graduada, medindo-se desde a superfície do substrato até o ponto de crescimento no ápice.

Também nestas datas, com o auxílio de um paquímetro foram feitas as medições de três folhas completamente expandidas de cada planta e os respectivos folíolos, através da mensuração do comprimento do pecíolo, largura (feita no ponto mais largo da lâmina foliar) e comprimento da folha. A cada avaliação as folhas mensuradas eram marcadas e as folhas acima destas eram avaliadas.

As folhas foram avaliadas e classificadas conforme as classes da Tabela 4, quanto ao tipo, cor, comprimento do pecíolo em relação ao limbo, pecíolo alado, forma do pecíolo e do limbo e formato da margem conforme os descritores propostos pelo International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR, 1988).

TABELA 4. Descritores morfológicos de folhas e suas classes utilizadas na caracterização morfológica de plantas diplóides e poliplóides de acordo com o IPGRI, 1988. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2010/2011.

<b>Característica</b>	<b>Classes</b>
Tipo	Simple, Trifoliolada
Cor	Verde-claro, Verde, Verde-escuro
Relação pecíolo x limbo	Séssil, Brevipéciolada, Longipéciolada
Pecíolo alado	Ausente, Estreito, Largo
Forma do pecíolo	Cordiforme, Deltóide, Obovado
Forma do limbo	Elipsóide, Ovada, Obovada, Lanceolada, Orbiculada
Forma da margem	Crenada, Dentada, Inteira, Ondulada

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste de Tukey 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SAS.

### **3.4 Caracterização morfológica e determinação do número de embriões por semente em porta-enxertos de citros**

#### **3.4.1 Caracterização de folhas e frutos**

Folhas completamente desenvolvidas e frutos em fase de maturação plena dos porta-enxertos descritos na Tabela 1, foram colhidos na EEA-UFRGS e na Fazenda Panoramas Citros no ano de 2009. Os procedimentos para a caracterização morfológica das folhas estão esquematizados na Figura 7.

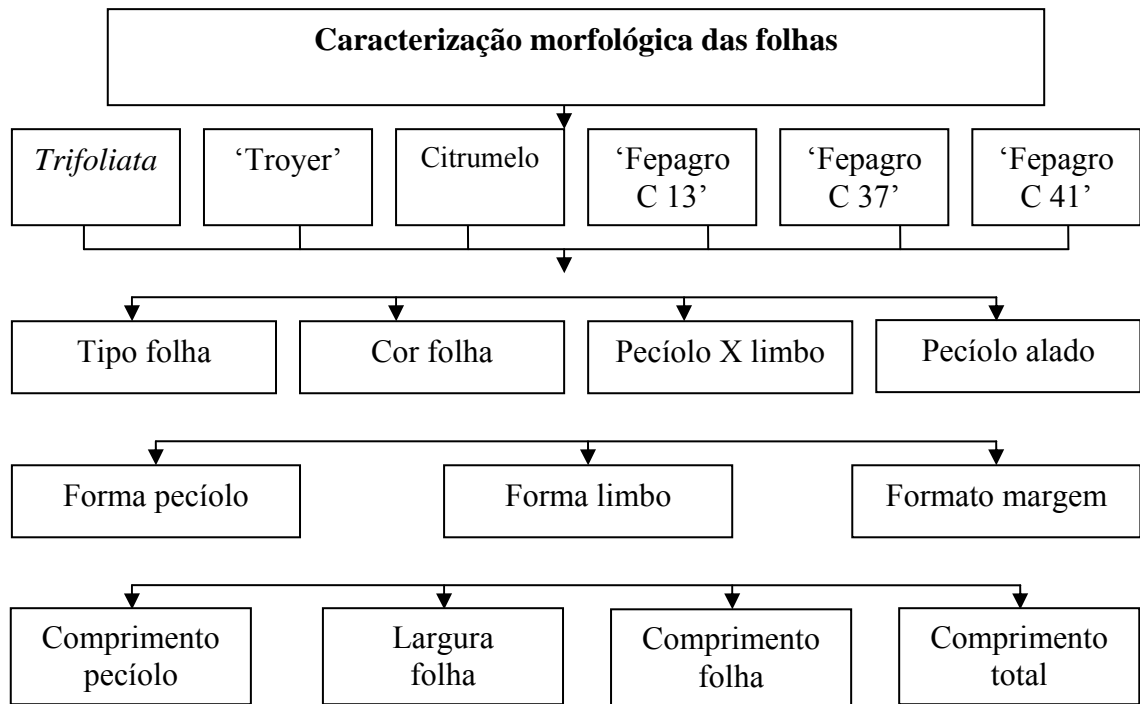


FIGURA 7. Esquema dos procedimentos para a caracterização morfológica das folhas dos porta-enxertos de citros conduzidos a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá -RS e em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, em 2009.

Folhas, num total de 20 por porta-enxerto/local, coletadas cinco em cada quadrante, foram analisadas e classificadas conforme as classes descritas na Tabela 4, quanto ao tipo, cor, comprimento do pecíolo em relação ao limbo, pecíolo alado, forma do pecíolo, forma do limbo e formato da margem, de acordo com o descrito no IBPGR (1988).

Com um paquímetro foram feitas as medições das folhas, sendo mensurado o comprimento do pecíolo em relação ao limbo, a largura (feita no ponto mais largo da lâmina foliar), o comprimento da folha e o comprimento total (limbo mais pecíolo). Nas folhas trifolioladas, as análises foram conduzidas no folíolo central, ou seja, no maior deles.

Os procedimentos para a caracterização dos frutos estão esquematizados na Figura 8.



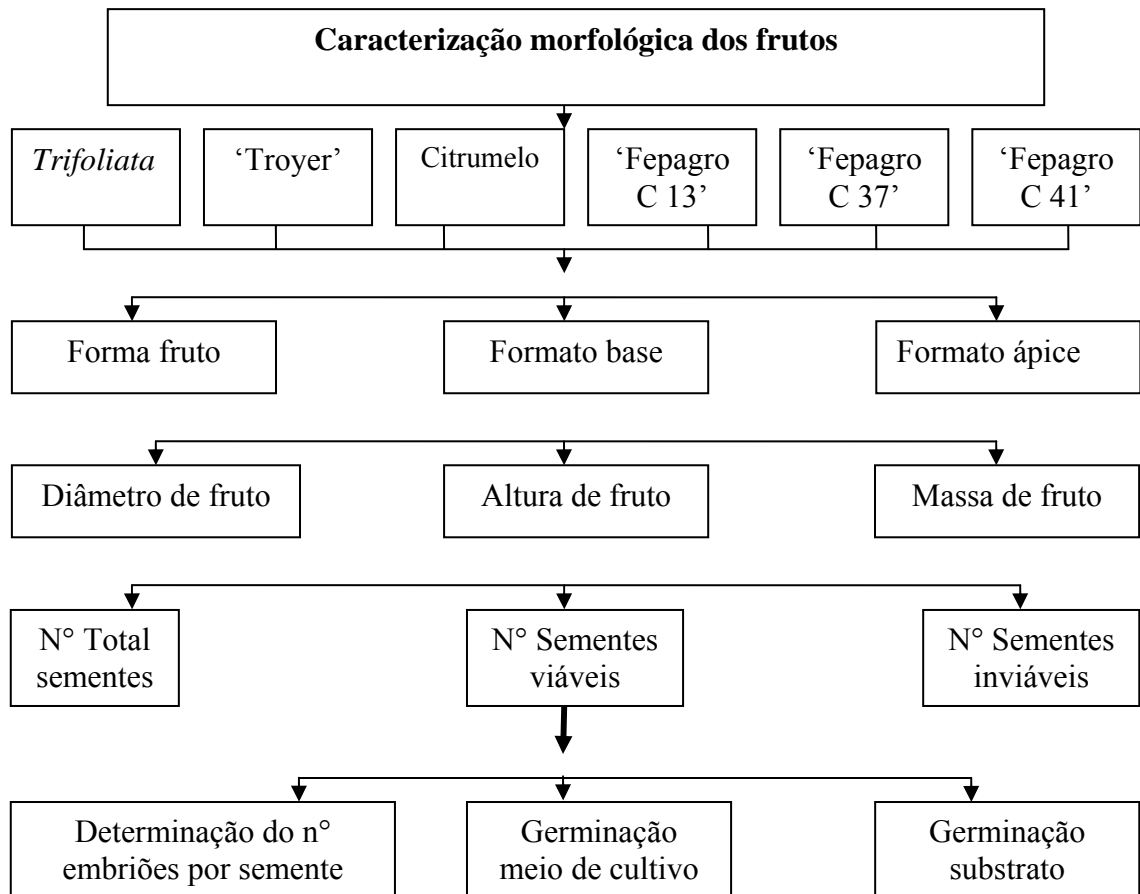


FIGURA 8. Esquema dos procedimentos para a caracterização morfológica dos frutos dos porta-enxertos de citros conduzidos a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá -RS e em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul - RS, em 2009.

Os frutos, num total de dez por porta-enxerto/local, coletados cinco em cada lado da linha de plantas, foram colhidos quando se encontravam em fase de maturação plena. Os parâmetros avaliados foram: forma, formato da base e formato do ápice, conforme as classes da Tabela 5, de acordo com o descrito no IBPGR (1988).

Com um paquímetro foram feitas as medições do diâmetro e altura dos frutos e em balança de precisão foi mensurada a massa destes. Procedeu-se a abertura transversal com um bisturi, fêz-se a extração individual de todas as sementes, as quais foram contadas e classificadas em viáveis ou inviáveis.

TABELA 5. Descritores morfológicos de frutos e suas classes utilizadas para a classificação de frutos de porta-enxertos conduzidos a campo e em casa-de-vegetação (IPGRI, 1988). UFRGS, Porto Alegre – RS, 2009.

<b>Característica</b>	<b>Classes</b>
Forma	Esferóide, Elipsóide, Periniforme, Oblíquo, Achatado, Ovóide-Oblíquo, Ovóide
Formato da base	Com pescoço, Convexo, Achatado, Côncavo, Com colarinho, Colarinho com pescoço
Formato do ápice	Mamílfome, Angular, Convexo, Retilíneo, Deprimido

### **3.4.2 Determinação do número de embriões e potencial de germinação**

Em 2009, frutos em estágio de maturação plena foram coletados a campo na Fazenda Panoramas Citros de cada um dos porta-enxertos descritos na Tabela 1, sendo que as sementes destes foram extraídas para a condução dos experimentos.

A determinação do número de embriões por semente foi efetuada através da análise de 100 sementes de cada um dos porta-enxertos. Com o auxílio de pinça e bisturi e sob lupa, o tegumento externo (casca) e o tegumento interno (tégmen) foram retirados e procedeu-se a separação e a contagem do número de embriões.

Para a avaliação da capacidade de germinação dos embriões, 200 sementes de cada um dos porta-enxertos conduzidos na Fazenda Panoramas Citros foram selecionadas. A metodologia utilizada para a desinfestação das sementes é descrita no item 3.2.1. Após a desinfestação, as sementes foram submetidas a um processo de escarificação, utilizando-se o tratamento químico de referência (TQR) descrito por Oliveira *et al.* (2006), onde as 200 sementes foram imersas, sob agitação por 45 minutos, em solução contendo 0,5 litro de hipoclorito de sódio (NaClO) a 12%, 3ml de ácido clorídrico (HCl) e 20g de hidróxido de sódio comercial (NaOH), dissolvidos em um litro de água. Após a agitação, as sementes foram lavadas com água corrente e procedeu-se a remoção do tegumento externo

esfregando-se as sementes umas sobre as outras, no interior de um pano úmido. Destas sementes, 100 foram selecionadas para a implantação em meio de cultivo e 100 para a implantação em substrato.

Em câmara de fluxo laminar, 100 sementes de cada um dos porta-enxertos foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 30ml de meio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962). O pH do meio foi estabilizado em 6,4 e os tubos foram posteriormente autoclavados. O delineamento experimental foi completamente casualizado, onde quatro repetições com 25 tubos de ensaio compunham cada tratamento. As sementes foram mantidas em tubos com meio de cultivo em ambiente controlado com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  por 60 dias. Após, procederam-se as avaliações através da retirada do material do tubo, separação e contagem do número de plantas germinadas.

Em bandejas de germinação preenchidas com substrato comercial para citros, 100 sementes de cada um dos porta-enxertos foram postas a germinar. O delineamento experimental foi completamente casualizado, onde quatro repetições com 25 alvéolos compunham cada tratamento. As sementes foram mantidas em casa-de-vegetação por 60 dias. Posteriormente, as plântulas foram retiradas dos alvéolos, separadas e avaliadas quanto ao número de plantas germinadas.

A taxa de poliembrionia foi calculada em percentagem conforme metodologia descrita por Moreira *et al.* (1947).

Os resultados da caracterização morfológica das folhas, frutos, determinação do número de embriões por semente e capacidade de germinação foram analisados pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SAS.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análises citogenéticas

#### 4.1.1 Análise meiótica, índice meiótico e viabilidade do pólen

Para a análise do comportamento meiótico, um dos principais problemas na condução do estudo foi a determinação exata do tamanho dos botões florais em que se encontravam as fases de meiose I e II.

Em 2008, botões florais que se encontravam em meiose I apresentavam tamanho médio de 0,2 a 0,3cm e em meiose II de 0,4 a 0,5cm. Porém, no segundo ano de avaliação, em 2009, os botões eram maiores, com 0,3 a 0,4cm para meiose I e 0,4 a 0,6cm para meiose II. Já no terceiro ano, em 2010, o tamanho médio foi novamente de 0,2 a 0,3cm para meiose I e de 0,4 a 0,5cm para meiose II.

Todos os porta-enxertos avaliados eram diplóides  $n=9$  ( $2n=2x=18$ ). Estes dados confirmam a predominância deste nível de ploidia em citros, concordando com os resultados obtidos por Agarwal (1987; 1989) e Guerra *et al.* (1997) em *Citrus* e gêneros afins.

Nos três anos de avaliação do comportamento meiótico, células normais (Figura 9) e células com irregularidades (Figura 10) foram observadas nos dois ambientes onde as plantas são conduzidas, contudo maiores frequências de células com anormalidades foram identificadas em flores de plantas mantidas em casa-de-vegetação (Tabelas 6, 7 e 8).

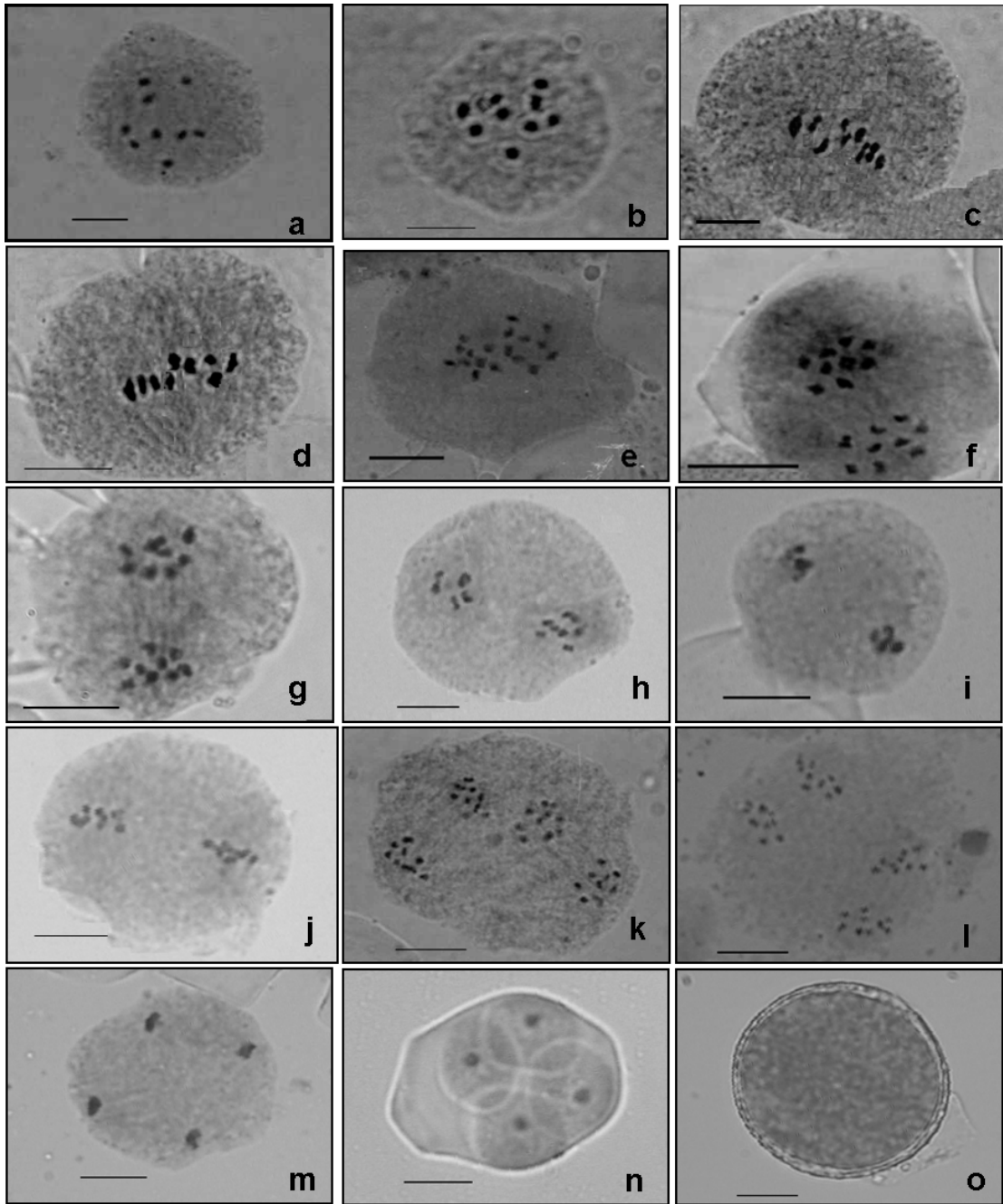


FIGURA 9. Caracterização de células normais desde a meiose I até o estágio de pólen. a, b) Diacinese com 9 II (bivalentes); c, d) Metáfase I com 9 II; e, f, g) Anáfase I com disjunção normal; h, i) Telófase I; j) Metáfase II; k, l) Anáfase II; m) Telófase II; n) Tétrade; o) Grão de pólen viável. Escala: 10 $\mu$ m. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2008, 2009 e 2010.

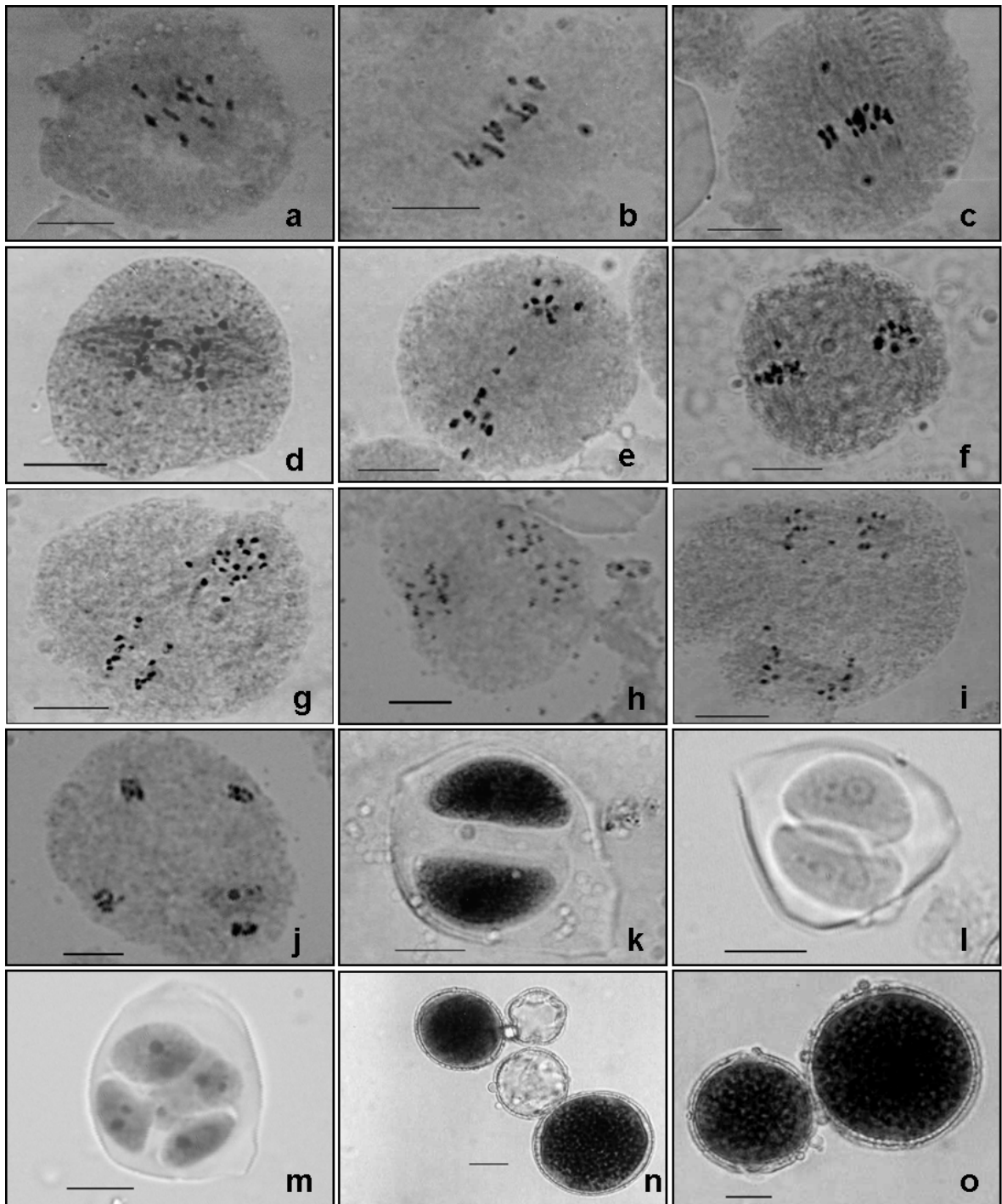


FIGURA 10. Caracterização de células com irregularidades desde a meiose I até o estágio de pólen. a) Diacinese com 8 II (bivalentes) e 2 I (univalentes); b) Metáfase I com 8 II e 2I; c) Metáfase I com 6 II, 2 I e 1 IV (quadrivalente); d) Anáfase I com retardatários; e) Telófase I com retardatários; f) Metáfase II com disjunção irregular; g, h, i) Anáfase II com disjunção irregular; j) Telófase II com micronúcleos; k) Díade; l) Tríade; m) Pentade; n) Grãos de pólen normais e inviáveis; o) Grão de pólen viável de tamanho normal e grão de pólen viável maior que o normal, porém não reduzido. Escala: 10 $\mu$ m. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2008, 2009 e 2010.

TABELA 6. Análise meiótica de cinco porta-enxertos de citros conduzidos a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá - RS e de seis porta-enxertos de citros conduzidos em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, em 2008.

Porta-enxerto	Metáfase I <sup>a</sup>	Anáfase/ Telófase I <sup>b</sup>	Met./ Anáf./ Telófase II <sup>b</sup>	Nº total células	% Células normais
<b>Fazenda Panoramas citros</b>					
Trifoliata	9II (61) 8II + 2I (43)	34(15)	23(12)	188	62,77 aA
‘Swingle’	9II (48) 6II + 2I + 1IV (22)	41(35)(5*)	14(15)	180	57,22 cA
‘Troyer’	9II (62) 8II + 2I (41)	25(17)	20(8)	173	61,85 abA
‘Fepagro C 13’	9II (60) 7II + 4I (45)	37(24)(4*)	26(8)	204	60,29 abA
‘Fepagro C 37’	9II (46) 6II + 6I (34) 7II + 1IV (1)	28(23)	37(22)	191	58,12 bcA
<b>Média</b>	-----	-----	-----	-----	<b>60,05</b>
<b>Estação Experimental Agronômica</b>					
Trifoliata	9II (60) 7II + 4I (48)	22(17)	21(8)	176	58,52 aB
‘Swingle’	9II (49) 8II + 2I (53) 5II + 2IV(2)	15(19)(1*)	13(12)	164	46,95 cB
‘Troyer’	9II (75) 8II + 2I (58)	26(17)	14(12)	202	56,93 abB
‘Fepagro C 13’	9II (56) 8II + 2I (40)	25(19)	20(18)	178	56,74 abB
‘Fepagro C 37’	9II (81) 8II + 2I (71) 6II + 2I + 1IV (1)	45(37)(2*)	16(22)	275	51,64 bB
‘Fepagro C 41’	9II (48) 7II + 4I (62)	33(32)(2*)	20(24)	221	45,70 c
<b>Média</b>	-----	-----	-----	-----	<b>52,75</b>

<sup>a</sup> Número de células com associações nos parênteses; <sup>b</sup> Número de células com irregularidades nos parênteses; \* Pontes cromossômicas; I Univalente; II Bivalentes; IV Quadivalentes. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente, dentro de local, pelo teste de Tukey (p>0,05). Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente, na comparação do mesmo porta-enxerto, mas em locais diferentes, pelo teste de Tukey (p>0,05).

TABELA 7. Análise meiótica de cinco porta-enxertos de citros conduzidos a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá - RS e de seis porta-enxertos de citros conduzidos em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, em 2009.

Porta-enxerto	Metáfase I <sup>a</sup>	Anáfase/ Telófase I <sup>b</sup>	Met./ Anáf./ Telófase II <sup>b</sup>	Nº total células	% Células normais
<b>Fazenda Panoramas citros</b>					
Trifoliata	9II (55) 8II + 2I (49) 7II + 4I (3)	37(37)(2*)	20(28)	231	48,48 aA
‘Swingle’	9II (54) 7II + 4I (72)	32(47)(2*)	13(26)	246	40,24 cA
‘Troyer’	9II (53) 8II + 2I (56) 5II + 2IV(1)	42(43)(3*)	12(19)	229	46,72abA
‘Fepagro C 13’	9II (43) 8II + 2I (52)	32(39)	15(19)	200	45,00 bA
‘Fepagro C 37’	9II (42) 8II + 2I (45) 6II + 2I (7)	29(40)(4*)	23(35)	225	41,78 cA
<b>Média</b>	-----	-----	-----	-----	<b>44,44</b>
<b>Estação Experimental Agronômica</b>					
Trifoliata	9II (30) 8II + 2I(36) 7II + 4I (22) 6II+2I+1IV(1)	23(30)(3*)	7(19)	170	35,29 aB
‘Swingle’	9II (28) 8II + 2I (66) 6II + 6I (4)	25 (56)(6*)	15 (35)	235	28,94 cB
‘Troyer’	9II (34) 8II + 2I (64)	20 (43)	12 (35)	208	31,73 bB
‘Fepagro C 13’	9II (32) 7II + 4I (49) 5II + 8I (6)	20 (50)(2*)	10 (31)	200	31,00 bB
‘Fepagro C 37’	9II (27) 8II + 2I (65) 7II + 4I(3)	32 (47)	11 (45)	230	30,43 bcB
‘Fepagro C 41’	9II (29) 8II + 2I(53) 6II + 6I (4)	21 (45)(3*)	12 (52)	219	28,31 c
<b>Média</b>	-----	-----	-----	-----	<b>30,95</b>

<sup>a</sup> Número de células com associações nos parênteses; <sup>b</sup> Número de células com irregularidades nos parênteses; I Univalente; II Bivalentes; IV Quadrivalentes. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente, dentro de local, pelo teste de Tukey (p>0,05). Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente, na comparação do mesmo porta-enxerto, mas em locais diferentes, pelo teste de Tukey (p>0,05).



TABELA 8. Análise meiótica de cinco porta-enxertos de citros conduzidos a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá - RS e de seis porta-enxertos de citros conduzidos em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, em 2010.

Porta-enxerto	Metáfase I <sup>a</sup>	Anáfase/ Telófase I <sup>b</sup>	Met./ Anáf./ Telófase II <sup>b</sup>	Nº total células	% Células normais
<b>Fazenda Panoramas citros</b>					
Trifoliata	9II (58) 7II + 4I (25) 6II + 6I (7) 5II + 2IV (3)	51(32)	30(19)	225	61,78 aA
‘Swingle’	9II (52) 8II + 2I (32) 5II + 2IV (5)	40(28)(3*)	38(28)	226	57,52 bA
‘Troyer’	9II (58) 8II + 2I (23) 7II + 1IV (11) 6II + 6I (4)	36(16)(5*)	37(24)	214	61,21 aA
‘Fepagro C 13’	9II (56) 8II + 2I (30) 7II + 1IV (5) 5II + 2IV(3)	40(29)	43(22)	228	60,96 abA
‘Fepagro C 37’	9II (60) 8II + 2I (34) 7II + 4I (8)	45 (31)(1*)	34(22)	235	59,15 abA
<b>Média</b>	-----	-----	-----	-----	<b>60,12</b>
<b>Estação Experimental Agronômica</b>					
Trifoliata	9II (58) 8II + 2I (39) 7II + 4I (3)	42(32)	32(30)	236	55,93 aB
‘Swingle’	9II (44) 8II + 2I (37) 6II + 2I+ 1IV(1)	34(23)(9*)	29(30)	207	51,69 bB
‘Troyer’	9II (64) 8II + 2I (48) 6II +2I+1IV(4)	33(27)(1)	32(22)	231	55,84 aB
‘Fepagro C 13’	9II (53) 8II + 2I (33) 7II + 1IV (3)	45(34)(4*)	25(29)	226	54,42 aB
‘Fepagro C 37’	9II (62) 8II + 2I (55) 6II + 6I (2)	43(32)(3*)	31(30)	258	52,71 bB
‘Fepagro C 41’	9II (51) 6II + 6I (57) 5II + 2IV (5)	43(40)(5*)	31(38)	270	46,30 c
<b>Média</b>	-----	-----	-----	-----	<b>52,82</b>

<sup>a</sup>Número de células com associações nos parênteses; <sup>b</sup>Número de células com irregularidades nos parênteses; I Univalente; II Bivalentes; IV Quadrivalentes. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente, dentro de local, pelo teste de Tukey (p>0,05). Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente, na comparação do mesmo porta-enxerto, mas em locais diferentes, pelo teste de Tukey (p>0,05).

Em 2008, a maior percentagem de células normais em meiose dos porta-enxertos conduzidos a campo foi de 62,77% em Trifoliata e a menor 57,22% em citrumeleiro 'Swingle'. Para os porta-enxertos conduzidos em casa-de-vegetação, a maior percentagem foi de 58,52% em Trifoliata e a menor 45,70% em citrangeiro 'Fepagro C 41'. A percentagem média de células normais em plantas conduzidas a campo foi de 60,05% e em casa-de-vegetação foi inferior, com valores de 52,75% (Tabela 6).

Em 2009, a maior percentagem de células normais em meiose dos porta-enxertos conduzidos a campo foi de 48,48% em Trifoliata e a menor de 40,24% em citrumeleiro 'Swingle'. Para os porta-enxertos conduzidos em casa-de-vegetação a maior percentagem foi de 35,29% em Trifoliata e a menor de 28,31% em citrangeiro 'Fepagro C 41'. A percentagem média de células normais em plantas conduzidas a campo foi de 44,44% e em casa-de-vegetação foi inferior, com valores de 30,95% (Tabela 7).

Em 2010, a maior percentagem de células normais em meiose dos porta-enxertos conduzidos a campo foi de 61,78% em Trifoliata e a menor de 57,52% em citrumeleiro 'Swingle'. Para os porta-enxertos conduzidos em casa-de-vegetação a maior percentagem foi de 55,93% em Trifoliata e a menor de 46,30% em citrangeiro 'Fepagro C 41'. A percentagem média de células normais em plantas conduzidas a campo foi de 60,12% e em casa-de-vegetação foi inferior, com valores de 52,82% (Tabela 8).

Para a análise do índice meiótico (Tabelas 9, 10 e 11), variações no tamanho dos botões florais em estágio de tétrade foram observadas. Nos anos de 2008 e 2010, botões com tamanho entre 0,5 e 0,6cm estavam em estágio ideal para as análises, porém no ano de 2009, eram botões com 0,7 a 0,8cm.

Neste estudo, células com tétrades normais foram observadas (Figura 9), porém muitas irregularidades, como a presença de díades, tríades, pentades e células contendo micrócitos foram identificadas (Figura 10) e (Tabelas 9, 10 e 11).

TABELA 9. Índice meiótico de cinco porta-enxertos de citros conduzidos a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá - RS e de seis porta-enxertos de citros conduzidos em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, em 2008.

Porta-enxerto	N° Tétrades	N° Díades	N° Triádes	Outras*	N° Total células	Índice meiótico (%)
<b>Fazenda Panoramas Citros</b>						
Trifoliata	645	196	121	42	1004	64,24 aA
‘Swingle’	587	82	234	97	1000	58,70 bA
‘Troyer’	662	103	184	117	1066	62,10 abA
‘Fepagro C 13’	719	58	184	204	1165	61,72 abA
‘Fepagro C 37’	597	113	126	165	1001	59,64 bA
<b>Média</b>	-----	-----	-----	-----	-----	<b>61,28</b>
<b>Estação Experimental Agronômica</b>						
Trifoliata	704	73	124	232	1133	62,14 aA
‘Swingle’	484	104	176	258	1022	47,36 dB
‘Troyer’	672	97	142	198	1109	60,60 abA
‘Fepagro C 13’	551	107	135	218	1011	54,50 cB
‘Fepagro C 37’	542	94	158	206	1000	54,20 cB
‘Fepagro C 41’	489	112	138	307	1046	46,75 d
<b>Média</b>	-----	-----	-----	-----	-----	<b>54,26</b>

\* Outras irregularidades observadas como a presença de poliádes, micrócitos e micrósporos com tamanhos desiguais. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente, dentro de local, pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ). Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente, na comparação do mesmo porta-enxerto, mas em locais diferentes, pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ).

TABELA 10. Índice meiótico de cinco porta-enxertos de citros conduzidos a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá - RS e de seis porta-enxertos de citros conduzidos em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, em 2009.

Porta-enxerto	Nº Tétrades	Nº Díades	Nº Tríades	Outras*	Nº Total células	Índice meiótico (%)
<b>Fazenda Panoramas Citros</b>						
Trifoliata	524	96	136	245	1001	52,35 aA
‘Swingle’	485	164	212	308	1169	41,49 cA
‘Troyer’	491	119	184	231	1025	47,90 bA
‘Fepagro C 13’	491	97	138	329	1055	46,54 bA
‘Fepagro C 37’	438	98	187	289	1001	43,28 cA
<b>Média</b>	-----	-----	-----	-----	-----	<b>46,31</b>
<b>Estação Experimental Agronômica</b>						
Trifoliata	396	124	284	318	1122	35,29 aB
‘Swingle’	360	156	278	375	1169	30,80 bB
‘Troyer’	376	212	287	326	1201	31,31 bB
‘Fepagro C 13’	342	133	194	362	1031	33,17 abB
‘Fepagro C 37’	398	128	304	375	1205	33,03 abB
‘Fepagro C 41’	287	192	252	335	1066	26,92 c
<b>Média</b>	-----	-----	-----	-----	-----	<b>31,75</b>

\* Outras irregularidades observadas como a presença de poliades, micrócitos e micrósporos com tamanhos desiguais. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente, dentro de local, pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ). Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente, na comparação do mesmo porta-enxerto, mas em locais diferentes, pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ).

TABELA 11. Índice meiótico de cinco porta-enxertos de citros conduzidos a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá - RS e de seis porta-enxertos de citros conduzidos em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, em 2010.

Porta-enxerto	Nº Tétrades	Nº Diades	Nº Triades	Outras*	Nº Total células	Índice meiótico (%)
<b>Fazenda Panoramas Citros</b>						
Trifoliata	655	158	77	132	1022	64,09 aA
‘Swingle’	609	147	88	196	1040	58,56 bA
‘Troyer’	635	142	114	127	1018	62,38 abA
‘Fepagro C 13’	598	156	92	122	968	61,78 abA
‘Fepagro C 37’	602	152	78	178	1010	59,60 bA
<b>Média</b>	-----	-----	-----	-----	-----	<b>61,28</b>
<b>Estação Experimental Agronômica</b>						
Trifoliata	724	189	114	129	1156	62,63 aA
‘Swingle’	477	158	146	219	1000	47,70 cB
‘Troyer’	624	118	107	189	1038	60,12 aA
‘Fepagro C 13’	578	128	125	224	1055	54,79 bB
‘Fepagro C 37’	584	145	118	220	1067	54,73 bB
‘Fepagro C 41’	472	148	131	257	1008	46,83 c
<b>Média</b>	-----	-----	-----	-----	-----	<b>54,47</b>

\* Outras irregularidades observadas como a presença de poliades, micrócitos e micrósporos com tamanhos desiguais. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente, dentro de local, pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ). Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente, na comparação do mesmo porta-enxerto, mas em locais diferentes, pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ).

Em 2008, o maior índice meiótico em porta-enxertos conduzidos a campo foi 64,24% em Trifoliata e o menor de 58,70% em citrumeleiro 'Swingle'. Para os porta-enxertos conduzidos em casa-de-vegetação, o maior índice foi 62,14% em Trifoliata e o menor de 46,75% em citrangeiro 'Fepagro C 41'. Na média, o índice meiótico das plantas conduzidas a campo foi de 61,28% e em casa-de-vegetação foi de 54,26% (Tabela 9).

Em 2009, o maior índice meiótico em porta-enxertos conduzidos a campo foi 52,35% em Trifoliata e o menor de 41,49% em citrumeleiro 'Swingle'. Para os porta-enxertos conduzidos em casa-de-vegetação, o maior índice foi 35,29% em Trifoliata e o menor de 26,92% em citrangeiro 'Fepagro C 41'. Na média, o índice meiótico das plantas conduzidas a campo foi de 46,31% e em casa-de-vegetação foi de 31,75% (Tabela 10).

Em 2010, o maior índice meiótico em porta-enxertos conduzidos a campo foi 64,09% em Trifoliata e o menor de 58,56% em citrumeleiro 'Swingle'. Para os porta-enxertos conduzidos em casa-de-vegetação o maior índice foi 62,63% em Trifoliata e o menor de 46,83% em citrangeiro 'Fepagro C 41'. Na média, o índice meiótico das plantas conduzidas a campo foi de 61,28% e em casa-de-vegetação foi de 54,47% (Tabela 11).

Para a análise da viabilidade dos grãos de pólen nos anos de 2008, 2009 e 2010 foram utilizados botões florais com tamanho superior a 0,8cm e que se apresentavam ainda fechados.

Nos três anos de desenvolvimento do estudo foram identificados grãos normais (Figura 9o) e grãos inviáveis (Figura 10n) nos dois ambientes de estudo. Porém as maiores percentagens destes foram observadas em flores de plantas conduzidas em casa-de-vegetação (Tabelas 12, 13 e 14).

TABELA 12. Tamanho dos grãos e estimativa da viabilidade do pólen de cinco porta-enxertos de citros conduzidos a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá - RS e de seis porta-enxertos de citros conduzidos em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, em 2008.

Porta enxerto	Tamanho e estimativa da viabilidade dos grãos de pólen								
	Grão normal		Grão pequeno		Grão grande		Fertilidade pólen		
	E.T.	E.L.	E.T.	E.L.	E.T.	E.L.	Min.	Max.	F.P
	( $\mu\text{m}$ )	( $\mu\text{m}$ )	( $\mu\text{m}$ )	( $\mu\text{m}$ )	( $\mu\text{m}$ )	( $\mu\text{m}$ )			(%)
<b>Fazenda Panoramas Citros</b>									
Trifoliata	11,3	11,9	9,4	9,8	12,4	13,2	43,3	97,5	95,12 aA
‘Swingle’	11,0	12,1	10,1	10,8	12,5	13,1	45,9	91,2	85,46 dA
‘Troyer’	11,0	11,2	10,1	10,1	12,8	13,0	41,8	96,7	93,11 abA
‘Fepagro C 13’	11,3	11,8	9,8	10,1	13,1	13,7	53,4	94,3	90,47 bcA
‘Fepagro C 37’	11,1	11,6	9,5	9,8	12,5	13,1	56,3	90,9	87,24 cdA
<b>Média</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	<b>90,28</b>
<b>Estação Experimental Agronômica</b>									
Trifoliata	11,2	11,6	9,2	9,6	13,0	13,2	32,4	94,2	68,13 bcB
‘Swingle’	11,4	12,3	10,4	11,2	13,0	13,3	43,5	90,3	52,08 dB
‘Troyer’	11,2	11,8	9,8	10,3	13,0	13,1	38,9	91,7	71,15 bB
‘Fepagro C 13’	10,6	11,1	8,8	9,4	13,0	13,4	50,6	92,6	75,46 aB
‘Fepagro C 37’	11,2	11,7	9,5	9,9	13,1	13,3	48,1	89,7	65,31 cB
‘Fepagro C 41’	11,2	11,7	9,8	10,2	13,0	13,2	42,9	79,2	53,42 d
<b>Média</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	<b>64,25</b>

E.T. Eixo transversal; E.L. Eixo longitudinal; Min. Valor mínimo de viabilidade observado; Max. Valor máximo de viabilidade observado; F.P. Percentagem de viabilidade de pólen observada. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente, dentro de local, pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ). Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente, na comparação do mesmo porta-enxerto, mas em locais diferentes, pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ).

TABELA 13. Tamanho dos grãos e estimativa da viabilidade do pólen de cinco porta-enxertos de citros conduzidos a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá - RS e de seis porta-enxertos de citros conduzidos em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, em 2009.

<b>Tamanho e estimativa da viabilidade dos grãos de pólen</b>									
Porta enxerto	Grão normal		Grão pequeno		Grão grande		Fertilidade pólen		
	E.T. (µm)	E.L. (µm)	E.T. (µm)	E.L. (µm)	E.T. (µm)	E.L. (µm)	Min.	Max.	F.P (%)
<b>Fazenda Panoramas Citros</b>									
Trifoliata	11,3	11,9	10,2	10,5	12,0	13,1	26,5	81,2	63,47 aA
‘Swingle’	11,8	12,1	10,8	11,1	13,3	13,7	0	74,4	49,32 dA
‘Troyer’	11,1	11,5	10,1	10,2	12,4	12,6	0	79,8	59,55 bA
‘Fepagro C 13’	11,5	12,0	10,2	10,5	13,3	13,7	0	58,2	57,12 bcA
‘Fepagro C 37’	11,3	11,8	10,0	10,3	13,5	14,0	12,9	87,3	51,72 dA
<b>Média</b>	----	----	-----	----	-----	-----	-----	-----	<b>56,23</b>
<b>Estação Experimental Agronômica</b>									
Trifoliata	11,7	12,0	10,1	10,3	12,5	13,14	12,2	85,8	49,45 aB
‘Swingle’	11,4	11,9	10,1	10,7	13,9	14,32	0	80,2	36,70 cB
‘Troyer’	10,2	11,0	10,0	10,0	13,0	13,76	0	60,3	48,62 aB
‘Fepagro C 13’	11,6	11,9	10,3	10,6	13,0	13,5	0	65,7	42,69 bB
‘Fepagro C 37’	11,6	12,1	10,6	10,9	13,0	13,4	0	74,7	38,41 cB
‘Fepagro C 41’	11,2	11,5	10,2	10,7	13,0	13,6	0	58,0	32,60 d
<b>Média</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	<b>41,41</b>

E.T. Eixo transversal; E.L. Eixo longitudinal; Min. Valor mínimo de viabilidade observado; Max. Valor máximo de viabilidade observado; F.P. Percentagem de viabilidade de pólen observada. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente, dentro de local, pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ). Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente, na comparação do mesmo porta-enxerto, mas em locais diferentes, pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ).



TABELA 14. Tamanho dos grãos e estimativa da viabilidade do pólen de cinco porta-enxertos de citros conduzidos a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá - RS e de seis porta-enxertos de citros conduzidos em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, em 2010.

<b>Tamanho e estimativa da viabilidade dos grãos de pólen</b>									
Porta enxerto	Grão normal		Grão pequeno		Grão grande		Fertilidade pólen		
	E.T. (µm)	E.L. (µm)	E.T. (µm)	E.L. (µm)	E.T. (µm)	E.L. (µm)	Min.	Max.	F.P (%)
<b>Fazenda Panoramas Citros</b>									
Trifoliata	11,3	11,9	10,1	10,4	13,0	13,1	57,2	97,0	97,76 aA
‘Swingle’	11,8	12,0	10,8	10,9	13,8	14,0	0	81,4	55,11 dA
‘Troyer’	11,3	11,5	10,1	10,2	12,4	12,7	0	89,3	79,52 bA
‘Fepagro C 13’	11,4	11,5	10,0	10,2	13,0	13,6	69,7	85,2	77,22 bA
‘Fepagro C 37’	11,7	11,8	10,5	10,6	13,3	13,6	73,8	82,5	64,08 cA
<b>Média</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	<b>74,74</b>
<b>Estação Experimental Agronômica</b>									
Trifoliata	11,5	11,6	10,0	10,2	13,0	13,7	36,3	92,6	78,40 aB
‘Swingle’	11,8	11,9	10,7	10,9	13,3	13,8	69,2	88,8	57,96 dA
‘Troyer’	11,5	11,6	10,5	10,6	13,0	13,5	60,1	80,1	71,39 bB
‘Fepagro C 13’	11,7	11,8	10,6	10,8	13,4	13,8	23,6	81,2	68,54 bcB
‘Fepagro C 37’	11,8	12,0	10,5	10,8	13,5	13,7	56,8	81,2	61,11 cA
‘Fepagro C 41’	11,5	11,8	10,3	10,4	13,0	13,8	0	85,8	62,83 c
<b>Média</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	<b>66,71</b>

E.T. Eixo transversal; E.L. Eixo longitudinal; Min. Valor mínimo de viabilidade observado; Max. Valor máximo de viabilidade observado; F.P. Percentagem de viabilidade de pólen observada. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente, dentro de local, pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ). Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente, na comparação do mesmo porta-enxerto, mas em locais diferentes, pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ).

Em 2008, a maior percentagem de viabilidade de pólen em porta-enxertos conduzidos a campo foi de 95,12% em Trifoliata e a menor de 85,46% em citrumeleiro

‘Swingle’. Para os porta-enxertos conduzidos em casa-de-vegetação a maior percentagem de viabilidade foi de 75,46% em citrangeiro ‘Fepagro C 13’ e a menor de 52,08% em citrumeleiro ‘Swingle’. A média de viabilidade das plantas conduzidas a campo foi de 90,28% e em casa-de-vegetação foi de 64,25% (Tabela 12).

Em 2009, a maior percentagem de viabilidade de pólen em porta-enxertos conduzidos a campo foi de 63,47% em Trifoliata e a menor de 49,32% em citrumeleiro ‘Swingle’. Para os porta-enxertos conduzidos em casa-de-vegetação a maior percentagem foi de 49,45% em Trifoliata e a menor de 32,60% em citrangeiro ‘Fepagro C 41’. A média de viabilidade das plantas conduzidas a campo foi de 56,23% e em casa-de-vegetação foi de 41,41% (Tabela 13).

Em 2010, a maior percentagem de viabilidade de pólen em porta-enxertos conduzidos a campo foi de 97,76% em Trifoliata e a menor de 55,11% em citrumeleiro ‘Swingle’. Para os porta-enxertos conduzidos em casa-de-vegetação a maior viabilidade foi de 78,40% em Trifoliata e a menor de 57,96% em citrumeleiro ‘Swingle’. A média de viabilidade das plantas conduzidas a campo foi de 74,74% e em casa-de-vegetação foi de 66,71% (Tabela 14).

No processo meiótico, a predominância de bivalentes reflete o nível de homologia entre os cromossomos parentais, porém, em citros, anormalidades na meiose como a presença de univalentes, pontes e retardatários é muito comum (Raghuvanshi, 1962).

Neste estudo, muitas células com irregularidades em meiose foram observadas nos três anos de avaliação (Tabelas 6, 7 e 8).

Agarwal (1987) observou processo meiótico regular em citrumeleiro, citrangeiro e kumquateiro e sugeriu que a normalidade está associada à alta homeologia cromossômica entre os gêneros *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus*. Entretanto Agarwal (1989) observou poucas irregularidades em metáfase I, em híbridos intergenéricos do cruzamento entre

*Citrus* e *Poncirus*, porém identificou elevada presença de células com separação cromossômica desuniforme em anáfase, o que está de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho.

Neste estudo, foram observadas elevadas frequências de células anormais com univalentes (Tabelas 6, 7 e 8). A presença deste tipo de irregularidade também foi descrita por Sellito-Boaventura & Pio (1989), que em três cultivares de laranja-doce (*C. sinensis*) identificaram univalentes em 12,5%, 14,0% e 16,5% das células e sugeriram que a presença destes esteja associada à disjunção precoce dos cromossomos.

Raghuvanshi (1962) sugere duas hipóteses para a presença de univalentes em citros. A primeira, estando associada a inversões, translocações e hibridações e, a segunda, devido à falta de homologia nos diferentes cromossomos, conduzindo à separação precoce dos bivalentes. Portanto, a elevada presença de univalentes e retardatários observada neste trabalho (Tabelas 6, 7 e 8) pode estar associada à falta de homeologia entre os cromossomos que constituem os genótipos utilizados no estudo, bem como, devido ao processo de hibridação, visto que, dos seis porta-enxertos avaliados, cinco foram obtidos por hibridação entre dois gêneros distintos, ou seja, *Citrus* e *Poncirus*, concordando com as hipóteses sugeridas por Raghuvanshi (1962).

Nas Tabelas 6, 7 e 8, pode-se observar a baixa frequência de pontes cromossômicas, com valores inferiores a 5,0%, porém muitas células com retardatários em anáfase/telófase I e II foram identificadas. A presença destas irregularidades foi relatada por Sellito-Boaventura & Pio (1989), que observaram elevada frequência de pontes cromossômicas e retardatários em três cultivares de laranja-doce, com variações de 6,0% a 53,0% em anáfase I e de 16% a 57% em anáfase II. Bem como no trabalho desenvolvido por Cavalcante *et al.* (2000), em que quatro plantas híbridas de tangerineira 'Lee' mostraram percentagens entre 50 e 67% de células irregulares em anáfase I e uma planta com 60% das células com anormalidades em anáfase/telófase II.

A análise do índice meiótico foi sugerida por Löve (1949) como alternativa à avaliação do comportamento meiótico quando se trabalha com grande número de plantas. Neste estudo, na comparação entre os resultados obtidos pela análise da meiose (Tabelas 6, 7 e 8) e do índice meiótico (Tabelas 9, 10 e 11), similaridade foi observada, ou seja, plantas que apresentaram as menores percentagens de células normais na meiose, também mostraram os menores valores de índice meiótico. Resultados estes que concordam com a alternativa proposta por Löve (1949) que, na impossibilidade de condução de análises meióticas, a avaliação do índice meiótico pode ser uma opção.

Löve (1949) descreve que as plantas que apresentam índice meiótico superior a 90% podem ser consideradas meioticamente estáveis. Nos três anos de condução deste trabalho, muitas células em díade, tríade, pentade e com micrócitos foram observadas (Tabelas 9, 10 e 11), levando a um índice meiótico inferior a 65%, demonstrando que estas são meioticamente instáveis.

Na análise da viabilidade de pólen, considerável presença de grãos inviáveis foi observada em todos os anos de desenvolvimento do estudo (Tabelas 12, 13 e 14). Em muitos genótipos, a percentagem mínima de viabilidade foi zero, ou seja, em algumas flores não foi observada a presença de grãos viáveis.

A presença de grãos anormais está associada a irregularidades no processo meiótico (Tabelas 6, 7 e 8) e ao baixo índice meiótico (Tabelas 9, 10 e 11) observados em todos os anos de condução deste estudo, concordando com o que é proposto por Chen *et al.* (2004) e Kamiri *et al.* (2011), que sugerem que em citros as anormalidades como os univalentes e retardatários na meiose I não migram para os pólos e permanecem como cromossomos perdidos em meiose II, resultando em células anormais em fase de tétrade e, posteriormente, em grãos inviáveis de pólen.

Frost & Soost (1968) afirmam que as anormalidades no processo meiótico, que são comuns em citros, como a presença de univalentes, pontes e retardatários, além da falta de

afinidade genômica conduzem à formação de gametas anormais ou inviáveis. Agarwal (1987) sugere que a frequência de univalentes apresenta correlação positiva com a esterilidade do pólen em citros, ou seja, quanto maior a presença de células irregulares em meiose, maiores as percentagens de grãos inviáveis.

Reduzida viabilidade de pólen foi observada neste estudo, onde em 2008, a média das plantas conduzidas a campo foi de 90,28% e em casa-de-vegetação foi de 64,25% (Tabela 12). Em 2009, a média a campo foi de 56,23% e em casa-de-vegetação de 41,41% (Tabela 13) e em 2010, as médias foram de 74,74% e 66,71% em campo e em casa de vegetação, respectivamente (Tabela 14).

Valores inferiores de fertilidade dos grãos de pólen aos observados neste estudo são relatados por Sellito-Boaventura & Pio (1989) em laranjeira-doce, com variações entre 2,4% e 64,4%. Por outro lado, valores superiores foram observados por Agarwal (1987) que na análise de três híbridos: citrumeleiro, citrangeiro e kumquateiro obteve valores de 77,1%, 95,4% e 96,1%, respectivamente e por Agarwal (1989) que em híbridos intergenéricos de *Citrus* e *Poncirus* e genéricos de *Citrus* observou variações de 73,9 a 87,7% de viabilidade.

Neste estudo, diferenças foram observadas entre porta-enxertos conduzidos no mesmo ambiente nas três características avaliadas, ou seja, comportamento meiótico (Tabelas 6, 7 e 8), índice meiótico (Tabelas 9, 10 e 11) e viabilidade do pólen (Tabelas 12, 13 e 14). Estes resultados podem estar associados à variabilidade genética dos genótipos e que estes respondam de forma diferenciada às condições ambientais e de manejo a que são submetidos.

A variação na constituição genética dos materiais é descrita por Bodanese-Zanettini (1982) em trigo como a responsável por alterações na frequência de pontes cromossômicas

e de células com univalentes, sendo que as anormalidades parecem variar conforme o genótipo das plantas.

Em citros, a constituição genética dos genótipos parece atuar nas taxas de irregularidades na meiose e viabilidade do pólen. Cavalcante *et al.* (2000), na análise de uma população de tangerineiras oriundas do mesmo cruzamento, observaram meiose regular em 67 plantas, porém três genótipos apresentaram altas percentagens de univalentes com valores entre 76,5% a 80,95%; enquanto que na análise da viabilidade de pólen, as variações na população foram amplas com valores de 9,9% a 98,0%.

Brugnara *et al.* (2008) observaram diferenças na viabilidade de pólen entre genótipos obtidos pelo cruzamento das tangerineiras ‘Montenegrina’ e ‘King’ com valores de 42% a 98% e de zero a 95% em híbridos entre ‘Montenegrina’ e laranjeira ‘Caipira’. Weiller *et al.* (2011) observaram variações de 70% a 98,08% na viabilidade do pólen em população obtida pelo cruzamento das tangerineiras ‘Clementina Fina’ e ‘Montenegrina’, o que permitiu aos autores sugerirem que fatores genéticos estejam atuando.

Neste estudo, foram observadas diferenças para os mesmos porta-enxertos, porém quando conduzidos em ambientes distintos, ou seja, a campo e em casa-de-vegetação, nas três características avaliadas: comportamento meiótico (Tabelas 6, 7 e 8), índice meiótico (Tabelas 9, 10 e 11) e viabilidade do pólen (Tabelas 12, 13 e 14) nos três anos de estudo, com maiores percentagens de anormalidades meióticas, menores índices meióticos e menor fertilidade de pólen nas plantas conduzidas em casa-de-vegetação.

Estes resultados indicam que as condições ambientais ou algum fator específico na casa-de-vegetação estejam influenciando as características analisadas e comprometendo à fertilidade masculina. Alguns fatores são sugeridos como responsáveis pelas anormalidades observadas, como: falhas no sistema de irrigação em ambiente protegido, problemas na adubação das plantas conduzidas em vasos e a maior temperatura ou a

oscilação desta em casa-de-vegetação (Apêndice 1), porém a definição do fator ou fatores não foi possível.

Nos três anos de estudo, os porta-enxertos citrumeleiro ‘Swingle’ e o citrangeiro ‘Fepagro C 41’ apresentaram as maiores percentagens de irregularidades em todas as características avaliadas, ficando evidente que estes genótipos são instáveis nas características citogenéticas.

Alguns fatores são descritos na literatura como agentes responsáveis por danos ao processo meiótico e a viabilidade do pólen. Conforme Nishiyama (1976), em diversas culturas, temperaturas abaixo da considerada ideal durante o processo meiótico promovem injúrias às células do tapeto, comprometendo a nutrição, o desenvolvimento dos micrósporos, o comportamento meiótico e a viabilidade do pólen. Porém, temperaturas acima da ideal também podem promover lesões como as descritos no estudo desenvolvido por Takagi *et al.* (1982), em *C. unshiu*, que evidenciaram danos no ovário e aos grãos de pólen, provocados possivelmente pela alta temperatura em ambiente controlado. Isto está de acordo com os resultados obtidos por Nava *et al.* (2009) que observaram o comprometimento da viabilidade de pólen em pessegueiro provocados pela alta temperatura.

A hipótese sugerida de falhas no sistema de irrigação com deficiência hídrica nas plantas conduzidas em casa-de-vegetação provocando danos à fertilidade masculina estaria de acordo com o que é proposto por Saini (1997) de que a fase de microsporogenese é muito sensível a deficiência hídrica e que esta pode provocar danos irreversíveis as anteras. Lalonde *et al.* (1997) observaram que a deficiência hídrica durante o processo meiótico promoveu a redução na produção e esterilidade dos grãos de pólen em *Triticum aestivum* L. e por Liu *et al.* (2006) em arroz.

A influência do ambiente sobre a viabilidade dos grãos de pólen também foi relatada por Moreira & Gurgel (1941) que observaram variação de 36 a 49% em plantas clones de laranjeira 'Pêra' conduzidas em ambientes distintos.

Neste estudo, diferenças foram observadas entre os anos de condução do experimento. Em 2008, 2009 e 2010, a média de células normais das plantas conduzidas a campo foram respectivamente de 60,05%, 44,44% e 60,12% e em casa-de-vegetação foi de 52,75%, 30,95% e 52,82%. O índice meiótico a campo foi de 61,28%, 46,31% e 61,28% e em casa-de-vegetação de 54,26%, 31,75% e 54,47%, respectivamente. A percentagem de viabilidade do pólen a campo foi de 90,28%, 56,23% e 74,74% e em casa-de-vegetação foi de 64,25%, 41,41% e 66,71%.

Influências de fatores externos sobre o processo meiótico devem ter ocorrido de forma mais intensa em 2009, visto que, neste ano, as percentagens de células normais na meiose, índice meiótico e viabilidade do pólen foram inferiores quando comparadas com os dados obtidos em 2008 e 2010. Embora não se possa afirmar com certeza, a análise dos dados de temperatura e precipitação (dados não mostrados), nos meses de floração dos citros, ou seja, agosto e setembro apresentaram variações nos três anos de estudo. A temperatura média em 2009 foi superior (16,3°C) na comparação com 2008 (14,9°C) e 2010 (14,8°C), bem como, a precipitação, sendo que na soma dos meses de agosto e setembro os valores obtidos em 2009 (618,5mm) foram superiores na comparação com 2008 (308,4mm) e 2010 (304,9mm). Portanto, estes fatores podem ter atuado nos resultados obtidos neste trabalho.

Diversos fatores parecem influenciar a viabilidade dos grãos de pólen de espécies cítricas, tais como: local de coleta, variedade, ano e ambiente de cultivo (Moreira & Gurgel, 1941). Estes autores relataram diferenças de viabilidade de pólen entre ramos da mesma planta, em diferentes plantas da mesma variedade, em plantas de distintas origens, em genótipos implantados sob diferentes porta-enxertos e em diferenciadas épocas de



coleta. Porém, Latado *et al.* (2004), não observaram diferenças na viabilidade de grãos de pólen de plantas mutantes de laranjeira ‘Pêra’, em trabalho conduzido em anos distintos, indicando que as condições climáticas diferenciadas nos anos de avaliação não foram suficientes para alterar a viabilidade do pólen.

A cor das anteras serve como um indicativo inicial da viabilidade do pólen. Neste trabalho, muitas flores apresentavam anteras de cor amarela (Figura 11a), enquanto outras mostravam cor branca (Figura 11b). Nas análises, as anteras amarelas apresentavam grãos viáveis, enquanto que nas de cor branca, baixa ou nenhuma viabilidade foi observada.

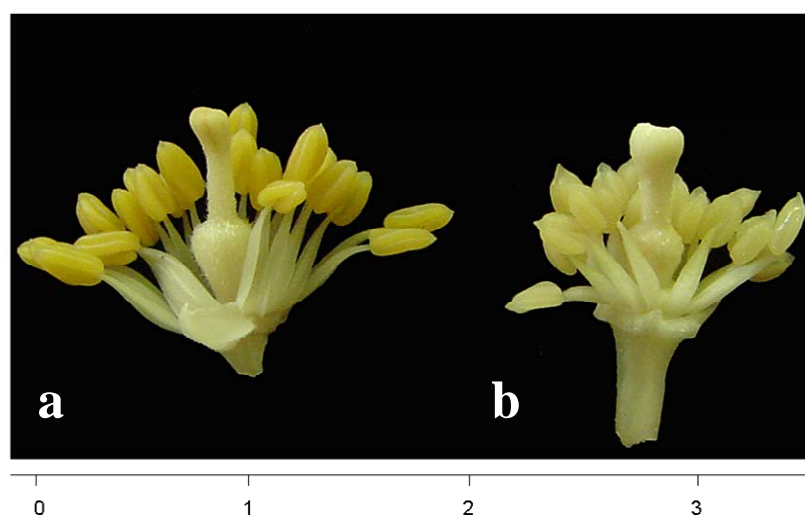


FIGURA 11. Flores do citrangeiro ‘Fepagro C 37’. a) Flor obtida a campo com antera de coloração amarela normal; b) Flor obtida em casa-de-vegetação com antera de coloração branca anormal. Escala: cm. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2009.

Cores distintas em anteras também foram descritas por Frost & Soost (1968) em laranjeira de umbigo ‘Washington’, onde anteras maduras de cor amarela e brilhantes produziram grãos de pólen férteis, enquanto que anteras brancas ou creme-pálidas não produziram grãos viáveis. Variação na coloração e morfologia das anteras também foi descrita por Brugnara *et al.* (2008), que observaram que estas, quando de coloração parda e enrugadas não produziram grãos de pólen viáveis em uma planta híbrida de tangerineira.

Diferenças na forma e coloração das anteras podem estar associadas a características genéticas da planta ou serem alteradas por fatores ambientais. Em trigo, Subedi *et al.* (1998) observaram que, sob baixas temperaturas, as anteras sofrem danos como: redução no tamanho, estrutura enrugada, indeiscência e coloração amarelo-pálida ao invés de amarela, o que compromete a viabilidade do pólen.

Portanto, flores dos porta-enxertos de citros conduzidos em casa-de-vegetação podem ter sofrido algum estresse, os quais alteraram a coloração das anteras e comprometeram a viabilidade do pólen. Além disso, as alterações foram em algumas flores, visto que nos mesmos porta-enxertos foram observadas flores com anteras de coloração normal e flores com anteras de cor diferenciada.

Neste trabalho foram feitas medições do tamanho dos grãos de pólen normais, pequenos e grandes (Tabelas 12, 13 e 14) objetivando identificar grãos não reduzidos, os quais apresentam tamanho em torno de 30 a 40% maior do que os considerados normais (Hermsen, 1984; Ramanna, 1992; Ramsey & Schemske, 1998; Simioni *et al.*, 2004). Conforme Ramsey & Schemske (1998), gametas não reduzidos ocorrem de forma espontânea em praticamente todas as populações naturais de plantas, mas em geral, em reduzidas percentagens, em torno de 1% ou menos. Em citros Brugnara *et al.* (2008) e Weiller *et al.* (2011) identificaram percentagens inferiores a 1% de grãos de pólen não reduzidos. Porém, neste trabalho, a presença destes não foi identificada, embora alguns grãos tenham se aproximado dos valores mínimos de grãos não reduzidos. Este resultado pode estar associado à amostragem utilizada e que esta tenha sido baixa, não permitindo a identificação destes.

#### **4.1.2 Análise da germinação *in vitro* dos grãos de pólen**

Os resultados obtidos na avaliação dos grãos de pólen das plantas conduzidas a campo e em casa de vegetação podem ser observados na Tabela 15.

TABELA 15. Percentagem média de germinação e comprimento do tubo polínico de grãos de pólen coletados de plantas conduzidas a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá - RS e em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, em 2010.

Porta-enxerto	Fazenda Panoramas Citros		Casa-de-vegetação	
	Germinação (%)	Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	Germinação (%)	Comprimento ( $\mu\text{m}$ )
Trifoliata	47,49 aA	48,58 aA	43,12 aB	24,36 aB
‘Swingle’	35,92 cA	44,30 abA	31,44 deB	19,43 bcB
‘Troyer’	46,52 aA	46,70 abA	41,56 bB	23,60 abB
‘Fepagro C 13’	44,00 bA	45,98 abA	38,23 cB	23,17 abB
‘Fepagro C 37’	35,12 cA	43,30 bA	32,40 dB	21,89 abcB
‘Fepagro C 41’	-----	-----	31,18 e	19,24 c
<b>Média</b>	<b>41,81</b>	<b>45,59</b>	<b>36,32</b>	<b>21,78</b>

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente, dentro de local, pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ). Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente, na comparação do mesmo porta-enxerto, mas em locais diferentes, pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ).

Todos os porta-enxertos apresentaram grãos de pólen germinados, o que permitiu a contagem e a medição do comprimento do tubo polínico. Exemplos de grãos germinados e não germinados podem ser visualizados na Figura 12.

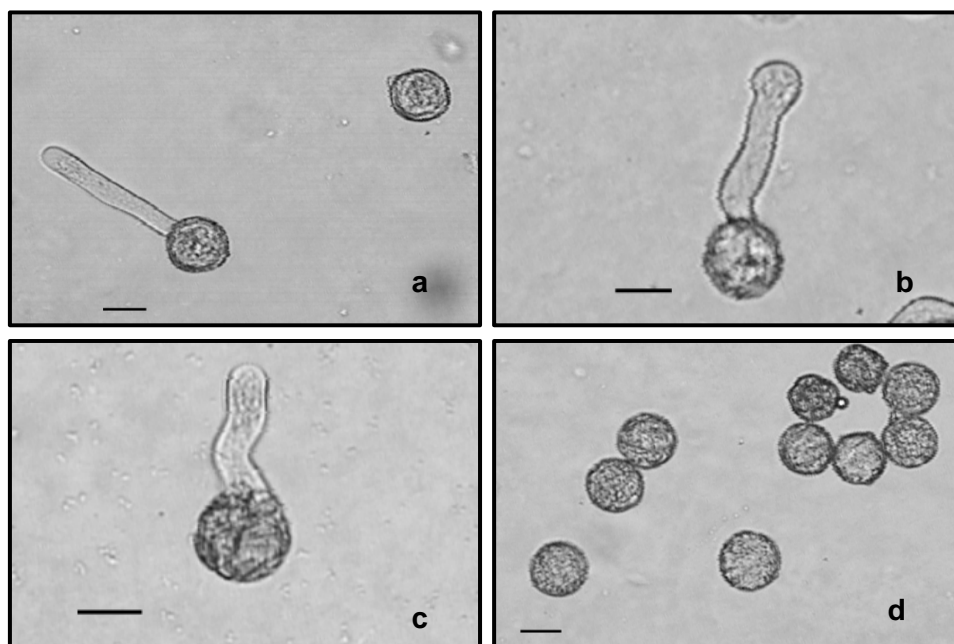


FIGURA 12. Germinação *in vitro* de grãos de pólen de citros. a e b) Grãos de pólen do porta-enxerto Trifoliata conduzido a campo. c e d) Grãos de pólen do porta-enxerto Trifoliata conduzido em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, em 2010. Escala: 10  $\mu\text{m}$ .

Os resultados obtidos pela germinação *in vitro* permitiram observar diferenças entre os genótipo e também entre os locais onde estes são conduzidos. Das plantas mantidas a campo, a maior percentagem de grãos germinados foi em Trifoliata com 47,49% e a menor em citrangeiro ‘Fepagro C 37’ com 35,12%. O comprimento do tubo polínico também apresentou variação, com a maior média em Trifoliata com 48,58 $\mu$ m e a menor em citrangeiro ‘Fepagro C 37’ e citrumeleiro ‘Swingle’ com 43,3 $\mu$ m. Neste ambiente, a média de todos os porta-enxertos para a germinação foi de 41,81% e a média do comprimento do tubo polínico foi de 45,59 $\mu$ m (Tabela 15).

Em casa-de-vegetação, a maior percentagem de grãos germinados foi em Trifoliata com 43,12% e a menor em citrangeiro ‘Fepagro C 41’ com 31,18%. Em relação ao comprimento do tubo polínico, a maior média foi de 24,36 $\mu$ m em Trifoliata e a menor de 19,24 $\mu$ m em citrangeiro ‘Fepagro C 41’. A média de germinação dos porta-enxertos foi de 36,32% e a média do comprimento do tubo polínico foi de 21,78 $\mu$ m (Tabela 15).

Na comparação entre os porta-enxertos conduzidos em distintos ambientes, diferenças significativas ocorreram e as menores percentagens de germinação de pólen foram observadas em plantas conduzidas em casa-de-vegetação e isto pode estar associado a limitações na reserva de nutrientes essenciais durante a formação dos grãos (Tabela 15). Este resultado concorda com os obtidos por Hedhly *et al.* (2004), que observaram redução na produção e capacidade de germinação dos grãos de pólen de cerejeira (*Prunus avium* L.), em ambiente protegido, em comparação a plantas conduzidas a campo, evidenciando que algum fator presente em casa-de-vegetação atue na germinação do pólen.

Aloni *et al.* (2001) observaram danos na formação e redução no potencial de germinação dos grãos de pólen de pimentões sob altas temperaturas. Srinivasan *et al.* (1999) afirmam, que o estresse por frio, durante a formação dos grãos de pólen, pode comprometer o acúmulo de energia e nutrientes, como carboidratos e aminoácidos em diversas plantas, reduzindo seu potencial germinativo.

Estresse de frio pode ter ocorrido em 2010 e ter atuado nos resultados obtidos no presente trabalho, comprometendo a germinação e o comprimento do tubo polínico (Tabela 15). Os melhores resultados obtidos nesta análise com o porta-enxerto Trifoliata podem estar associados a este apresentar a característica de resistência ao frio, portanto, sofrendo menores danos que os demais genótipos.

Neste estudo, maior percentagem de viabilidade de pólen foi obtida através do método de coloração com carmim propiônico (Tabela 14) em comparação a germinação *in vitro* (Tabela 15), em 2010. Este resultado concorda com o que foi sugerido por Moreira & Gurgel (1941), de que as análises via coloração podem superestimar a viabilidade destes.

Os resultados estão de acordo também com o que foi observado por Cavalcante *et al.* (2000) em uma população de tangerineira 'Lee', que identificaram diferenças significativas entre os métodos de análise, com viabilidade de 9,9% a 98,0% com o corante carmim propiônico e de 1,25% a 91,5% por germinação *in vitro*.

Portanto, os dados citogenéticos mostram claramente haver um desempenho diferenciado entre distintos genótipos nos dois ambientes e que também algum ou alguns fatores ambientais em casa-de-vegetação influem desfavoravelmente na fertilidade das plantas.

#### **4.2 Determinação do nível de ploidia e caracterização molecular dos genótipos poliplóides**

Em abril de 2009 foram colhidos 121 frutos a campo e 44 em casa-de-vegetação, oriundos da marcação conduzida em agosto e setembro de 2008 (Tabela 16).

TABELA 16. Frutos colhidos em 2009 na Fazenda Panoramas Citros, Butiá - RS e na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, oriundos de flores marcadas em agosto/setembro de 2008.

Porta-enxerto	Número de Frutos	
	Fazenda Panoramas Citros	EEA/UFRGS
Trifoliata	35	6
‘Swingle’	18	5
‘Troyer’	22	11
‘Fepagro C 13’	24	10
‘Fepagro C 37’	22	8
‘Fepagro C 41’	----	4
<b>Total</b>	<b>121</b>	<b>44</b>
<b>Total do ano</b>	<b>165</b>	

Baixo vingamento de frutos foi observado neste trabalho, pois das flores marcadas, poucas se mantiveram e deram origem a frutos. Embora a marcação tenha sido a mesma ou até mais intensa em casa-de-vegetação, devido ao menor porte das plantas, o que facilitava as atividades, a produção de frutos em ambiente protegido foi menor (Tabela 16).

A reduzida frutificação dos porta-enxertos de citros observada neste trabalho está de acordo com os resultados obtidos por Malerbo-Souza *et al.* (2003) em dois anos de avaliação da laranjeira ‘Pêra Rio’ [*C. sinensis* L. Osb.] sob condições naturais, onde observaram que no primeiro ano 88,10% dos botões fecundaram, porém nenhum resultou em fruto e no segundo 40,60% fecundaram e apenas 6,33% transformaram-se em frutos.

Os resultados obtidos no presente trabalho deixam claro que a frutificação em citros é reduzida, constatação esta feita por Spiegel-Roy & Goldschmidt (1996) que descrevem que a percentagem de flores que dão origem a frutos em citros pode variar de 0,1 a 10%.

A menor produção de frutos em casa-de-vegetação pode estar associada à ausência de agentes polinizadores, como o vento e insetos, embora em citros a reprodução possa ocorrer via autopolinização ou via polinização cruzada, o que concorda com o estudo descrito por Malerbo-Souza *et al.* (2003) que observaram que em laranjeira ‘Pêra-Rio’ o

maior vingamento de frutos (35,30%) ocorreu em flores de polinização livre, quando comparado com flores protegidas da fecundação cruzada.

Nos dados obtidos pela viabilidade de pólen (Tabelas 12, 13 e 14), observa-se que apesar da percentagem de grãos normais ser inferior em casa-de-vegetação, existe pólen viável para o processo de fertilização, o que permite deduzir que outros fatores atuam na redução de frutos em ambiente protegido, tais como: ausência de polinizadores, sistema reprodutivo feminino com danos, ausência de condições adequadas para a germinação do tubo polínico e fertilização, etc.

Em diversas espécies, estresse de temperatura durante o estágio reprodutivo induz ao aborto e abscisão das flores, esterilidade de pólen, alterações no tubo polínico, aborto do óvulo e frutificação reduzida (Thakur *et al.*, 2010). Estresse de temperatura pode ter ocorrido dentro da casa-de-vegetação e ter promovido anormalidades no processo meiótico, reduzida viabilidade dos grãos de pólen e comprometido o processo de fertilização e produção de frutos, visto que, em ambiente protegido, não há agentes polinizadores. No monitoramento da temperatura (Apêndice 1), observou-se que em ambiente protegido a temperatura máxima no ano de 2008 (45,0°C) foi superior aos valores observados a campo (29,3°C).

#### **4.2.1 Determinação do nível de ploidia**

Das sementes inoculadas foram obtidas 878 plantas, destas, 850 foram analisadas via citometria de fluxo e 28 por células somáticas de ponta de raiz, quanto ao nível de ploidia. Os resultados obtidos via citometria de fluxo da progênie de plantas conduzidas a campo e em casa-de-vegetação podem ser observados nas Tabela 17 e 18, respectivamente. Os resultados obtidos pela contagem dos cromossomos de células somáticas podem ser observados na Tabela 19 e Figura 13.

TABELA 17. Análise por citometria de fluxo de plantas obtidas de sementes de frutos que tiveram as flores marcadas a campo em 2008 na Fazenda Panoramas Citros, Butiá – RS. IAC, Cordeirópolis – SP, 2010.

Porta-enxerto	Datas	N° Plantas avaliadas	Diplóides		Poliplóides	
			N°	%	N°	%
Trifoliata	1	10	10	100	0	0
Trifoliata	2	12	11	91,67	1	8,33
Trifoliata	3	15	15	100	0	0
Trifoliata	4	8	8	100	0	0
Trifoliata	5	4	4	100	0	0
Trifoliata	6	9	9	100	0	0
<b>Total</b>	-----	<b>58</b>	<b>57</b>	<b>98,28</b>	<b>1</b>	<b>1,72</b>
‘Swingle’	1	22	22	100	0	0
‘Swingle’	2	24	23	95,83	1	4,16
‘Swingle’	3	4	4	100	0	0
‘Swingle’	4	26	26	100	0	0
‘Swingle’	5	6	6	100	0	0
‘Swingle’	6	14	14	100	0	0
<b>Total</b>	-----	<b>96</b>	<b>95</b>	<b>98,96</b>	<b>1</b>	<b>1,04</b>
‘Troyer’	1	15	15	100	0	0
‘Troyer’	2	17	16	94,12	1	5,88
‘Troyer’	3	11	11	100	0	0
‘Troyer’	4	5	5	100	0	0
‘Troyer’	5	9	9	100	0	0
‘Troyer’	6	12	12	100	0	0
<b>Total</b>	-----	<b>69</b>	<b>68</b>	<b>98,55</b>	<b>1</b>	<b>1,45</b>
‘Fepagro C 13’	1	19	18	94,74	1	5,26
‘Fepagro C 13’	2	17	16	94,12	1	5,88
‘Fepagro C 13’	3	9	9	100	0	0
‘Fepagro C 13’	4	13	13	100	0	0
‘Fepagro C 13’	5	18	18	100	0	0
‘Fepagro C 13’	6	22	22	100	0	0
<b>Total</b>	-----	<b>98</b>	<b>96</b>	<b>97,96</b>	<b>2</b>	<b>2,04</b>
‘Fepagro C 37’	1	25	25	100	0	0
‘Fepagro C 37’	2	23	21	91,30	2	8,69
‘Fepagro C 37’	3	17	17	100	0	0
‘Fepagro C 37’	4	11	11	100	0	0
‘Fepagro C 37’	5	6	6	100	0	0
‘Fepagro C 37’	6	12	12	100	0	0
<b>Total</b>	-----	<b>94</b>	<b>92</b>	<b>97,87</b>	<b>2</b>	<b>2,12</b>
<b>Total Geral:</b>	-----	<b>415</b>	<b>408</b>	<b>98,31</b>	<b>7</b>	<b>1,69</b>



TABELA 18. Análise por citometria de fluxo de plantas obtidas de sementes de frutos que tiveram as flores marcadas em casa-de-vegetação em 2008 na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS. IAC, Cordeirópolis – SP, 2010.

Porta-enxerto	Data	N° Plantas avaliadas	Diplóides		Poliplóides	
			N°	%	N°	%
Trifoliata	1	23	22	95,65	1	4,35
Trifoliata	2	14	13	92,86	1	7,14
Trifoliata	3	11	11	100	0	0
Trifoliata	4	8	8	100	0	0
Trifoliata	5	5	5	100	0	0
Trifoliata	6	2	2	100	0	0
<b>Total</b>	-----	<b>63</b>	<b>61</b>	<b>96,83</b>	<b>2</b>	<b>3,17</b>
‘Swingle’	1	18	18	100	0	0
‘Swingle’	2	10	9	90,00	1	10,00
‘Swingle’	3	8	8	100	0	0
‘Swingle’	4	8	8	100	0	0
‘Swingle’	5	10	10	100	0	0
‘Swingle’	6	6	6	100	0	0
<b>Total</b>	-----	<b>60</b>	<b>59</b>	<b>98,33</b>	<b>1</b>	<b>1,66</b>
‘Troyer’	1	16	16	100	0	0
‘Troyer’	2	21	20	95,24	1	4,76
‘Troyer’	3	2	2	100	0	0
‘Troyer’	4	13	13	100	0	0
‘Troyer’	5	11	11	100	0	0
‘Troyer’	6	4	4	100	0	0
<b>Total</b>	-----	<b>67</b>	<b>66</b>	<b>98,51</b>	<b>1</b>	<b>1,49</b>
‘Fepagro C 13’	1	18	15	83,33	3	16,67
‘Fepagro C 13’	2	32	26	81,25	6	18,75
‘Fepagro C 13’	3	28	24	85,71	4	14,29
‘Fepagro C 13’	4	24	21	87,50	3	12,50
‘Fepagro C 13’	5	9	8	88,89	1	11,11
‘Fepagro C 13’	6	5	4	80,00	1	20,00
<b>Total</b>	-----	<b>116</b>	<b>98</b>	<b>84,48</b>	<b>18</b>	<b>15,52</b>
‘Fepagro C 37’	1	20	18	90,00	2	10,00
‘Fepagro C 37’	2	32	28	87,50	4	12,50
‘Fepagro C 37’	3	15	15	100	0	0
‘Fepagro C 37’	4	12	12	100	0	0
‘Fepagro C 37’	5	11	11	100	0	0
‘Fepagro C 37’	6	10	10	100	0	0
<b>Total</b>	-----	<b>100</b>	<b>94</b>	<b>94,00</b>	<b>6</b>	<b>6,00</b>
‘Fepagro C 41’	1	9	8	88,89	1	11,11
‘Fepagro C 41’	2	7	7	100	0	0
‘Fepagro C 41’	3	6	6	100	0	0
‘Fepagro C 41’	4	4	4	100	0	0
‘Fepagro C 41’	5	3	3	100	0	0
‘Fepagro C 41’	6	0	0	100	0	0
<b>Total</b>	-----	<b>29</b>	<b>28</b>	<b>96,55</b>	<b>1</b>	<b>3,44</b>
<b>Total Geral:</b>	-----	<b>435</b>	<b>406</b>	<b>93,33</b>	<b>29</b>	<b>6,66</b>

TABELA 19. Análise de células somáticas de ponta de raiz de plantas obtidas de frutos de flores marcadas em 2008 a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá – RS e em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2010 e 2011.

<b>Porta-enxerto</b>	<b>Data</b>	<b>Células avaliadas</b>	<b>Nível Ploidia</b>
<b>Fazenda Panoramas Citros</b>			
Trifoliata	1	10	2 X
Trifoliata	1	14	2 X
Trifoliata	1	16	2 X
Trifoliata	1	13	2 X
Trifoliata	1	17	2 X
‘Fepagro C 13’	2	14	2 X
‘Fepagro C 13’	2	11	2 X
‘Fepagro C 13’	2	16	2 X
‘Fepagro C 13’	2	15	2 X
‘Fepagro C 13’	2	20	2 X
‘Fepagro C 13’	2	12	2 X
‘Fepagro C 13’	2	11	2 X
‘Fepagro C 13’	2	10	2 X
‘Fepagro C 13’	2	14	2 X
‘Fepagro C 13’	3	10	2 X
‘Swingle’	4	24	2 X
‘Swingle’	4	13	2 X
‘Swingle’	4	12	2 X
‘Swingle’	4	22	2 X
<b>Casa-de-vegetação</b>			
‘Troyer’	2	13	2 X
‘Troyer’	2	28	2 X
‘Troyer’	2	15	2 X
‘Troyer’	2	17	2 X
‘Troyer’	2	12	2 X
‘Fepagro C 13’	2	19	2 X
‘Fepagro C 13’	2	20	2 X
<b>‘Fepagro C 13’</b>	<b>2</b>	<b>20</b>	<b>4 X</b>
‘Swingle’	4	16	2 X

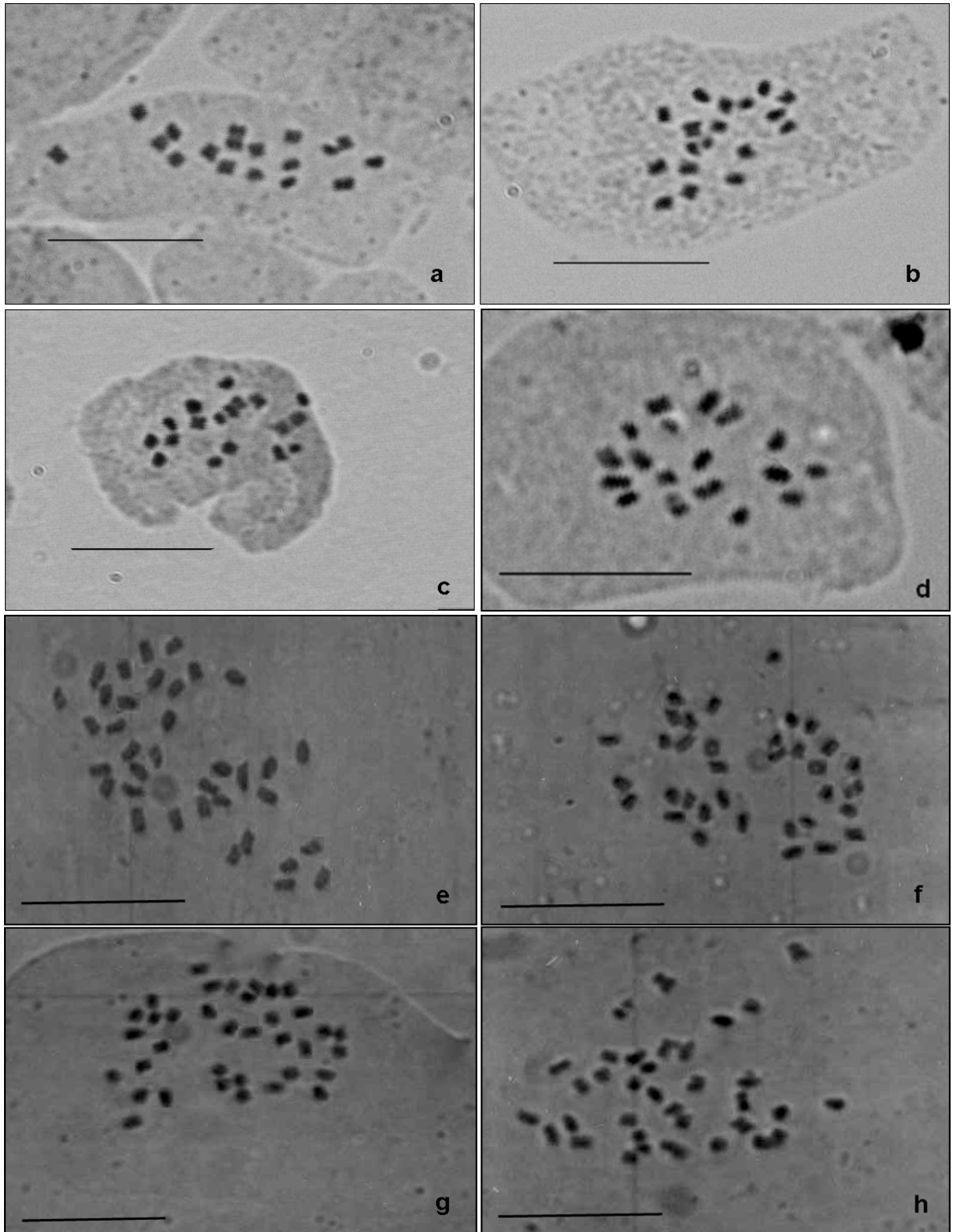


FIGURA 13. Cromossomos somáticos de citros obtidos de células de ponta de raiz. a, b, c e d) Células mitóticas com 18 cromossomos ( $2n=18$ ) do porta-enxerto citrangeiro 'Fepagro C 13'; e, f, g e h) Células mitóticas com 36 cromossomos ( $2n=36$ ) de plântulas obtidas de flores marcadas do porta-enxerto citrangeiro 'Fepagro C 13' conduzido em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS em 2009. Escala:  $10\mu\text{m}$ . UFRGS, Porto Alegre – RS, 2010 e 2011.

Das 850 plantas da progênie analisadas por citometria de fluxo, 415 foram obtidas de genótipos conduzidos a campo e destas 408 (98,31%) eram diplóides ( $2n=18$ ) e sete (1,69%) tetraplóides ( $2n=36$ ) (Tabela 17). Enquanto que, das 435 plantas avaliadas da progênie obtidas em casa-de-vegetação, 406 (93,33%) eram diplóides ( $2n=18$ ) e 29 (6,66%) tetraplóides ( $2n=36$ ) (Tabela 18).

Exemplo dos histogramas obtidos nas avaliações via citometria de fluxo podem ser observados na Figura 14.

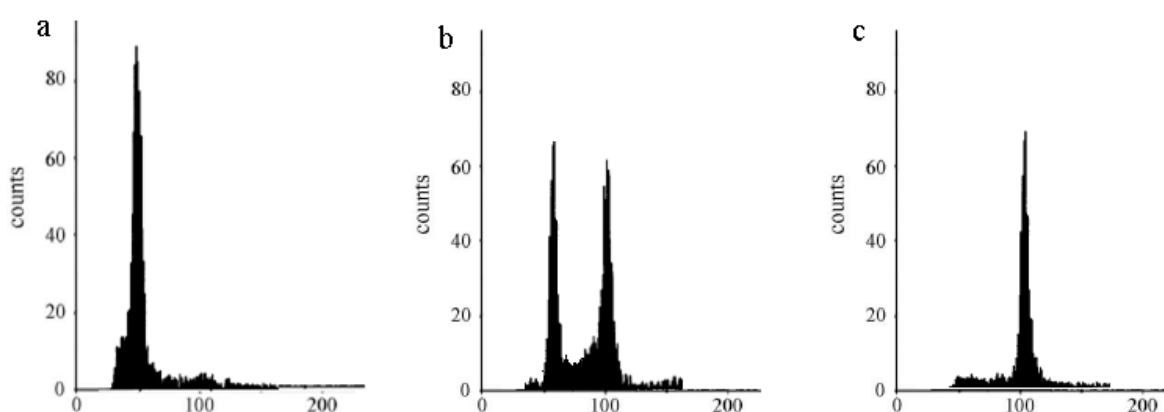


FIGURA 14. Determinação do nível de ploidia por citometria de fluxo. a) Testemunha diplóide (tangerineira); b) Citrangeiro ‘Fepagro C 13’ diplóide e uma planta tetraplóide obtida da progênie; c) Planta tetraplóide da população avaliada. IAC, Cordeirópolis – SP, 2010.

Nas plântulas obtidas de genótipos conduzidos a campo foram identificadas sete tetraplóides (1,69%), com a maior quantidade de poliplóides nas progênies do citrangeiro ‘Fepagro C 37’ (2,12%) e citrangeiro ‘Fepagro C 13’ (2,04%) (Tabela 17).

Em plântulas obtidas de genótipos conduzidos em casa-de-vegetação foram identificadas 29 tetraplóides (6,66%) com maior percentagem de poliplóides em progênies do citrangeiro ‘Fepagro C 13’ (15,52%) e citrangeiro ‘Fepagro C 37’ (6,0%) (Tabela 18).

Na análise de células somáticas de ponta de raiz, das 28 plantas avaliadas, 27 (96,43%) eram diplóides ( $2n=18$ ) e uma (3,57%) tetraplóide ( $2n=36$ ), sendo esta resultante

da progênie do citrangeiro ‘Fepagro C 13’, conduzido em casa-de-vegetação e originou-se de semente de um fruto cuja flor foi marcada na segunda data (Tabela 19).

Com relação às datas de marcação, maiores percentagens de plantas com alteração no nível de ploidia foram observadas em flores que estavam em pré-antese nas primeiras datas (Tabelas 17 e 18). Na primeira data foram obtidas uma planta poliplóide a campo e sete em casa-de-vegetação. Na segunda foram obtidas seis plantas a campo e 13 em casa-de-vegetação. Na terceira, quarta, quinta e sexta datas não foram identificadas plantas poliplóides a campo, enquanto que em casa-de-vegetação, na terceira e quarta data foram obtidas quatro e três, respectivamente e na quinta e sexta data uma planta. A maior frequência de plantas poliplóides em flores que estavam em pré-antese nas primeiras datas de marcação são um indício de que algum fator do ambiente, como a oscilação da temperatura máxima (Apêndice 1b) no período subsequente a antese tenha induzido a poliploidização nestas, do que nas demais datas.

Neste estudo, em oito sementes foram identificadas uma plântula tetraplóide e diversas diplóides na mesma semente, porém não foi constatada a presença de mais de uma planta tetraplóide da mesma semente, fato este observado por Aleza *et al.* (2011), que identificaram mais de duas plantas tetraplóides na mesma semente.

A taxa de formação de poliplóides em plantas parece variar com a origem híbrida ou não do material, de acordo com os genótipos parentais e com as condições ambientais, especialmente a temperatura (Otto & Whitton, 2000).

Barrett & Hutchison (1978), na análise de 42 populações de *Citrus*, *Poncirus* e híbridos identificaram maiores frequências de plântulas tetraplóides nucleares nos híbridos.

Neste trabalho, a taxa de formação de poliplóides parece ser mais frequente em plantas híbridas, concordando com a hipótese sugerida por Otto & Whitton (2000), pois as maiores percentagens de plantas duplicadas foram identificadas nos híbridos citrangeiro ‘Fepagro C 13’ e citrangeiro ‘Fepagro C 37’ (Tabelas 17 e 18) na comparação com *P.*

trifoliata que é uma espécie de citros, podendo ser esta uma evidência de que a hibridação esteja contribuindo para o incremento na taxa de poliploidia. Porém não apresenta relação com os resultados obtidos para o citrangeiro ‘Troyer’ e o citrumeleiro ‘Swingle’ que também são híbridos, mas mostraram baixas frequências de plantas duplicadas.

A diferença na taxa de poliploidia entre os genótipos deste estudo (Tabelas 17 e 18) em que a frequência de plantas duplicadas foi mais intensa nos citrangeiros ‘Fepagro C 13’ e ‘Fepagro C 37’ está de acordo com a afirmação feita por Otto & Whitton (2000) e Aleza *et al.* (2011) de que a frequência de tetraplóides obtidas de plantas apomíticas diplóides pode variar conforme a constituição genética dos materiais.

Este também pode ser o fator responsável pelas diferentes percentagens de plantas poliplóides observadas por Barrett e Hutchison (1978), que obtiveram 0,2% de plantas duplicadas em limoeiro ‘Rough’ e 3,3% na limeira ‘Key’ conduzidas no mesmo ambiente.

Variações na percentagem de plantas tetraplóides também foram relatadas por Saleh *et al.* (2008) em *P. trifoliata* (5,4%); citrangeiro ‘Carrizo’ [*C. sinensis* [(L.) Osbeck × *P. trifoliata*] (7%) e tangerineira ‘Cleópatra’ (*C. reshni* Hort.) (4%). Aleza *et al.* (2011) obtiveram média de 1,8% de plantas poliplóides, porém variações na percentagem de plantas tetraplóides ocorreram entre os genótipos: *C. sinensis* (0,8%); *C. paradisi* (2,8%); *C. reticulata* (3,0%); e nos híbridos *C. reticulata* × *C. sinensis* (3,5%) e *C. reticulata* × *C. paradisi* (2,5%), evidenciando uma possível relação genética para esses resultados.

Para Barrett & Hutchison (1978), a capacidade de produzir mudas tetraplóides em genótipos apomíticos de citros é uma característica genética e influenciada pelo ambiente, por isso são observadas variações entre os locais de origem. Essas variações foram observadas em *Citrus*, *Poncirus* e híbridos, com frequências de 0,75% de poliplóides em sementes obtidas de frutos colhidos na Flórida e 0,90% em plântulas de frutos da Califórnia.

Variações genéticas e ambientais podem ter atuado nos resultados de porcentagem de poliplóides em Trifoliata (1,72%) quando comparados com os resultados obtidos por Saleh *et al.* (2008) em *P. trifoliata* (5,4%), pois além das condições ambientais, os genótipos utilizados no estudo podem ter constituição genética distinta devido às freqüentes mutações que ocorrem em citros.

Neste estudo foram identificadas diferenças na taxa de poliploidia em porta-enxertos mantidos em ambientes distintos. Da progênie obtida dos genótipos conduzidos a campo, 1,69% eram tetraplóides (Tabela 17), enquanto que em casa-de-vegetação este índice foi de 6,66% (Tabela 18). Estes resultados são um indicativo de que o ambiente está influenciando a duplicação e que as plantas conduzidas em local protegido estão mais propensas a darem origem a poliplóides do que as conduzidas a campo.

Baixas temperaturas são sugeridas como um dos fatores que atuam na poliploidização de citros. Isto foi inferido por Aleza *et al.* (2011), que observaram maiores porcentagens de plântulas tetraplóides oriundas de frutos do porta-enxerto citrangeiro ‘Carrizo’ colhidos em regiões frias. Os autores citam valores de 12,1% na Córsega; 8,8% na Califórnia; 19,2% em Valência; 13,3% no Uruguai; 6,2% na África do Sul; 2,5% na Flórida; 1,9% em São Paulo e 0,9% na Bahia. Esta hipótese também foi sugerida por Galán-Sauco *et al.* (2001), em manga (*Mangifera indica* L.), pois foram identificadas plantas tetraplóides oriundas de genótipos conduzidos em regiões de baixas temperaturas, enquanto que, em genótipos de regiões mais quentes, não foram identificados poliplóides.

Os resultados obtidos neste trabalho (Tabelas 17 e 18), quanto à frequência de plantas poliplóides não concordam com a hipótese sugerida por Galán-Sauco *et al.* (2001) e Aleza *et al.* (2011) de que as baixas temperaturas atuam na duplicação das plantas, visto que a temperatura mínima nos dois ambientes foi similar, ou seja, 2,2°C a campo e 2,0°C em casa-de-vegetação (Apêndice 1), porém a amplitude das variações da temperatura em

casa-de-vegetação foi maior do que a campo, podendo sugerir que esta variação na amplitude tenha alguma influência sobre o nível de ploidia das plântulas avaliadas. Entretanto, não é possível concluir com certeza qual o fator, ou fatores, que realmente tenham influenciado na poliploidização das plantas deste estudo, tendo em vista as diversas variáveis envolvidas.

#### 4.2.2 Caracterização molecular dos genótipos poliplóides

Neste trabalho, através da análise molecular com 18 primers polimórficos de SSR ficou evidenciado que as plantas tetraplóides têm origem através da duplicação dos cromossomos em células nucleares, devido ao mesmo padrão de bandas encontrado no genitor e na progênie (Figura 15).

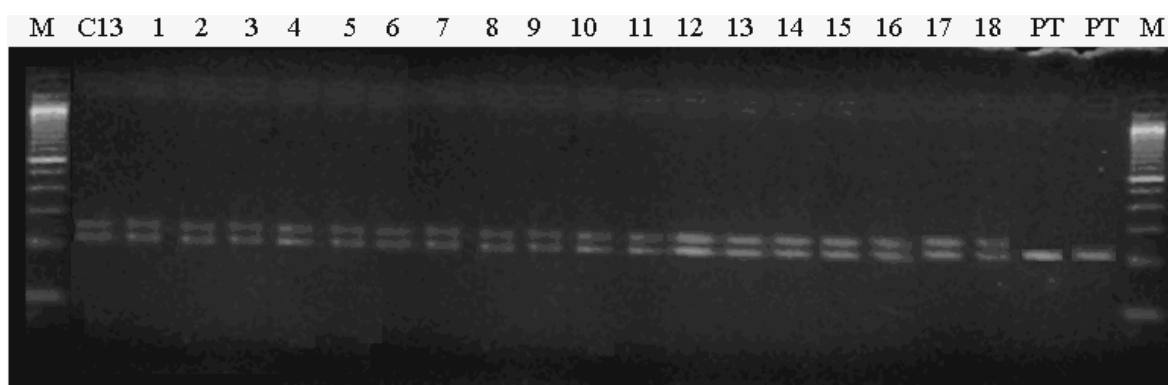


FIGURA 15. Gel de agarose 3%. Amplificação de fragmentos de DNA utilizando microssatélite CCSM 06. M=Marcador molecular; C13= Citrangeiro 'Fepagro C 13' (genitor); 1 a 18= Progênie obtida do citrangeiro 'Fepagro C13'; PT= Trifoliata (testemunha). UFRGS, Porto Alegre – RS, 2011.

O resultado obtido neste trabalho está de acordo com o que é relatado por Allario *et al.* (2011) e Hussain *et al.* (2011), de que as plantas tetraplóides em citros resultantes da duplicação dos cromossomos de células nucleares são consideradas geneticamente idênticas à planta mãe, apresentando as mesmas características morfológicas e o mesmo perfil genético.



Conforme Cristofani-Yaly *et al.* (2010), primers desenhados para uma determinada espécie de citros podem ser utilizados em espécies relacionadas, reduzindo assim, custos para o desenvolvimento destes. Esta constatação foi feita após a avaliação de 24 iniciadores de SSR em 12 genótipos de *Citrus*, *Poncirus* e híbridos, o que permitiu constatar que estes marcadores desenvolvidos para a cultivar laranjeira ‘Pêra’ (*C. sinensis* L. Osbeck) foram eficientes e podem ser utilizados para a análise de outras espécies de citros. Desta forma a utilização destes, neste trabalho, garante os resultados obtidos.

Saleh *et al.* (2008) utilizaram marcadores SSR com cinco primers para comparar plântulas tetraplóides e diplóides de *P. trifoliata*, citrangeiro ‘Carrizo’ [*C. sinensis* L. Osbeck × *P. trifoliata*] e tangerineira ‘Cleopatra’ (*C. reshni* Hort.). Allario *et al.* (2011) utilizaram dez primers de SSR para o estabelecimento do perfil molecular de plantas diplóides e tetraplóides do limoeiro ‘Cravo’ (*C. limonia* Osbeck). Aleza *et al.* (2011), avaliaram 80 plantas tetraplóides de 30 genótipos de citros com 24 primers de SSR para estabelecer o perfil molecular e comparar com os parentais diplóides.

Nos trabalhos de Saleh *et al.* (2008), Allario *et al.* (2011) e Aleza *et al.* (2011), assim como neste estudo (Figura 15), o perfil molecular das plantas tetraplóides foi idêntico ao das diplóides, provando que os genótipos poliplóides são tetraplóides decorrentes da duplicação do conjunto de cromossomos de células somáticas do genótipo diplóide.

#### **4.3 Avaliações do desenvolvimento e caracterização morfológica de plantas diplóides e poliplóides**

Nas avaliações do desenvolvimento foram observadas variações quanto à altura entre as plantas diplóides e tetraplóides, sendo que as diplóides foram sempre superiores (Figura 16).

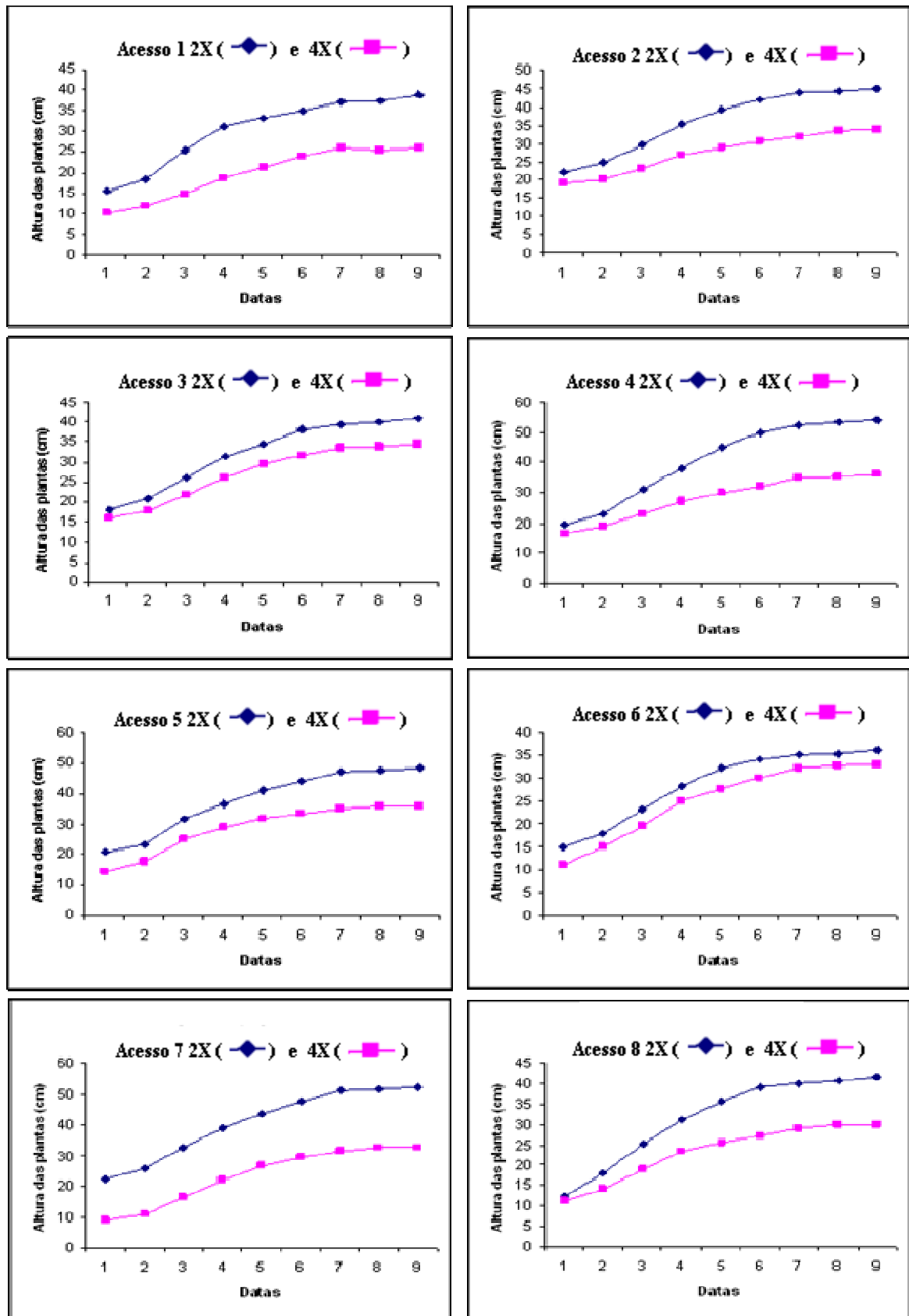


FIGURA 16. Comparação do desenvolvimento de oito acessos de plantas diplóides e tetraplóides oriundas da mesma semente (acesso) em nove avaliações no período de um ano. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2010/2011.

A maior altura inicial em plantas diplóides foi no acesso sete com 22,4cm na primeira e 52,0cm na última avaliação, enquanto que o acesso tetraplóide apresentou 9,1cm e 32,7cm, respectivamente (Figura 16 e Apêndice 2).

A menor altura inicial em plantas diplóides foi de 12,4cm no acesso oito na primeira avaliação e 41,5cm na última, enquanto que no acesso tetraplóide a altura foi de 11,2cm e 30,0cm, respectivamente (Figura 16 e Apêndice 2).

Na caracterização morfológica, todas as plantas apresentaram folhas do tipo dois, ou seja, trifolioladas (Figura 17 e Tabela 20).

Quanto à cor, as plantas diplóides apresentaram coloração verde, enquanto as tetraplóides apresentaram um verde visivelmente mais intenso (Figura 17), sendo consideradas como de cor verde escuro (Tabela 20). As plantas tetraplóides apresentaram folhas mais coriáceas que as diplóides (Figura 17).

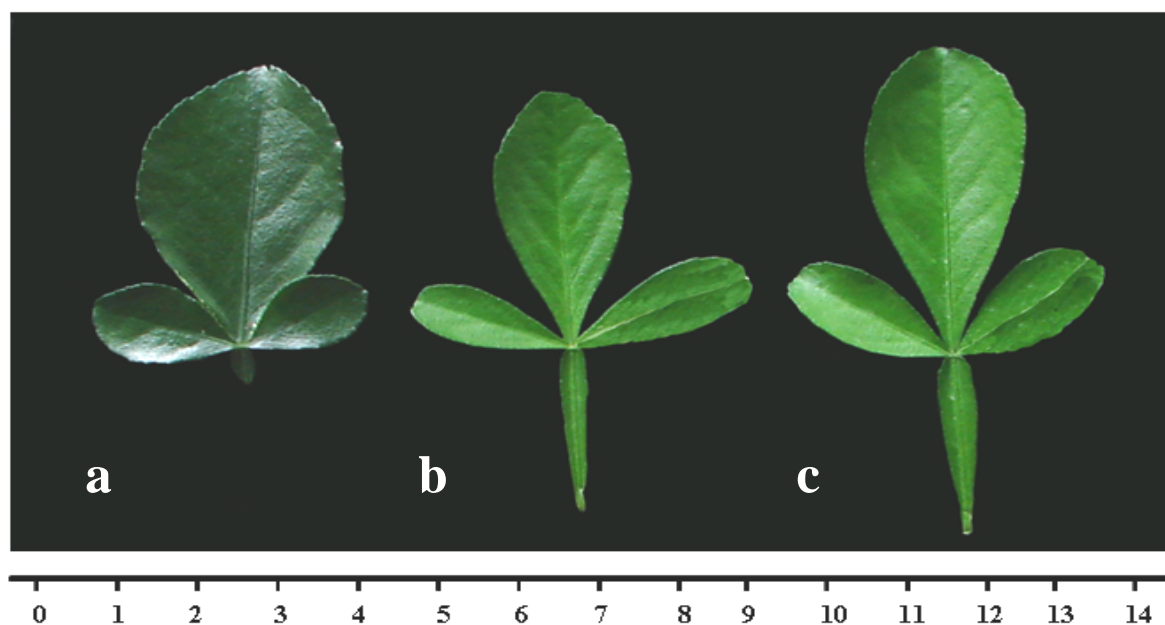


FIGURA 17. Caracterização morfológica das folhas. a) Folha de uma planta tetraplóide. b e c) Folhas de plantas diplóides. Escala: cm. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2010.

Para a característica comprimento do pecíolo em relação ao limbo, todas as plantas eram brevipeciouladas, com pecíolo estreito e de formato obovado. Quanto ao formato do

limbo, as folhas das plantas diplóides foram classificadas como elipsóides, enquanto que as dos indivíduos tetraplóides apresentaram variação entre elipsóide, ovada e orbiculada. Quanto ao formato da margem, todas apresentaram folhas com borda dentada (Tabela 20).

TABELA 20. Caracterização morfológica em folhas de oito acessos de plantas diplóides e tetraplóides conduzidos em casa-de-vegetação. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2010/2011.

Acesso	Ploidia	Tipo	Cor	Pecíolo x Limbo	Pecíolo alado	Forma pecíolo	Forma limbo	Formato margem
1	2X	2	Verde	Brevip.	Estreito	Obovado	Elipsóide	Dentada
	4X	2	Verde- escuro	Brevip.	Estreito	Obovado	Elipsóide	Dentada
2	2X	2	Verde	Brevip.	Estreito	Obovado	Elipsóide	Dentada
	4X	2	Verde- escuro	Brevip.	Estreito	Obovado	Elipsóide	Dentada
3	2X	2	Verde	Brevip.	Estreito	Obovado	Elipsóide	Dentada
	4X	2	Verde- escuro	Brevip.	Estreito	Obovado	Ovada	Dentada
4	2X	2	Verde	Brevip.	Estreito	Obovado	Elipsóide	Dentada
	4X	2	Verde- escuro	Brevip.	Estreito	Obovado	Orbiculada	Dentada
5	2X	2	Verde	Brevip.	Estreito	Obovado	Elipsóide	Dentada
	4X	2	Verde- escuro	Brevip.	Estreito	Obovado	Elipsóide	Dentada
6	2X	2	Verde	Brevip.	Estreito	Obovado	Elipsóide	Dentada
	4X	2	Verde- escuro	Brevip.	Estreito	Obovado	Elipsóide	Dentada
7	2X	2	Verde	Brevip.	Estreito	Obovado	Elipsóide	Dentada
	4X	2	Verde- escuro	Brevip.	Estreito	Obovado	Ovada/ Orbiculada	Dentada
8	2X	2	Verde	Brevip.	Estreito	Obovado	Elipsóide	Dentada
	4X	2	Verde- escuro	Brevip.	Estreito	Obovado	Elipsóide	Dentada

Folha tipo 2= Folha trifoliolada. Brevip.= Brevipéculada.

Na comparação entre os acessos de plantas diplóides e tetraplóides foram observadas variações quanto ao tamanho de pecíolo, comprimento e largura de folha (Tabela 21).

TABELA 21. Comparação de oito acessos de plantas diplóides e tetraplóides quanto ao comprimento de pecíolo, comprimento de folha (limbo) e largura de folha de plantas cultivadas em vasos e mantidas em casa de vegetação. UFRGS, Porto Alegre-RS, 2010/2011.

Acesso	Comprimento de pecíolo (cm)		Comprimento de folha (cm)		Largura de folha (cm)	
	Planta 2x	Planta 4x	Planta 2x	Planta 4x	Planta 2x	Planta 4x
1	2,02 a	1,39 b	2,49 b	3,08 a	1,39 b	1,89 a
2	1,62 a	1,10 b	2,18 b	2,84 a	1,21 b	1,66 a
3	1,75 a	0,79 b	2,24 a	2,69 a	1,28 b	1,67 a
4	1,45 a	0,85 b	2,56 b	3,18 a	1,53 a	1,86 a
5	1,43 a	0,81 b	2,23 b	2,81 a	1,34 a	1,64 a
6	1,63 a	1,09 b	2,26 b	3,3 a	1,31 b	1,7 a
7	1,94 a	0,70 b	2,29 b	2,88 a	1,22 a	1,47 a
8	2,37 a	1,23 b	2,27 b	2,82 a	1,33 a	1,66 a
Média	1,78 a	0,99 b	2,32 b	2,95 a	1,33 a	1,69 a

Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha na comparação entre os acessos diplóide e tetraplóide não diferem significativamente, pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Na comparação entre plantas diplóides e tetraplóides oriundas da mesma semente, em todas as avaliações o pecíolo das plantas diplóides foi superior em comprimento (Tabela 21). Nas diplóides, o menor tamanho de pecíolo foi de 1,43cm no acesso cinco, enquanto que o acesso tetraplóide apresentou 0,81cm. O maior tamanho de pecíolo nas plantas diplóides foi no acesso oito com 2,37cm, enquanto que o acesso tetraplóide apresentou 1,23cm (Tabela 21). Na média geral dos oito acessos diplóides e tetraplóides, houve diferenças estatísticas significativas e as plantas diplóides apresentaram pecíolos mais compridos com média de 1,78cm, enquanto as tetraplóides apresentaram média de 0,99 cm (Tabela 21).

Na análise do comprimento das folhas, na maioria das avaliações, as folhas de indivíduos diplóides apresentaram menor comprimento ao das tetraplóides. Nas plantas diplóides, o menor comprimento foi de 2,18cm no acesso dois, enquanto que o tetraplóide apresentou 2,84cm e o maior comprimento de folha foi de 2,56cm no acesso quatro, enquanto que o tetraplóide apresentou 3,18cm (Tabela 21). Na média geral dos oito acessos diplóides e tetraplóides, houve diferenças estatísticas significativas e as plantas tetraplóides apresentaram maior comprimento de folha com média de 2,95cm e as diplóides com média de 2,32cm (Tabela 21).

Quanto a largura das folhas, na maioria das avaliações, plantas diplóides apresentaram menor largura que as tetraplóides. Em diplóides, a menor largura foi de 1,21cm no acesso dois, enquanto o acesso tetraplóide apresentou 1,66cm e a maior largura foi de 1,53cm no acesso quatro, enquanto o acesso tetraplóide apresentou 1,86cm (Tabela 21). Contudo, na média geral dos oito acessos, não houve diferenças estatísticas significativas entre as plantas diplóides e tetraplóides, mesmo que estas apresentassem uma tendência a folhas de maior largura com média de 1,69cm e as diplóides com 1,33cm (Tabela 21).

Neste trabalho, na caracterização para o tipo de folha observou-se que todas as plantas possuíam folhas do tipo 2, ou seja, trifolioladas (Tabela 20 e Figura 17). Este resultado era esperado, pois as plantas avaliadas foram obtidas do cruzamento com o porta-enxerto *P. trifoliata*, que apresenta folhas deste tipo, sendo esta característica governada por um gene dominante (Cameron & Frost, 1968; Saunt, 1990).

Quanto à coloração das folhas, neste estudo observou-se que as plantas tetraplóides apresentavam folhas de coloração mais escura do que as diplóides (Figura 17), concordando com o que foi descrito por Ollitrault & Jacquemond (1994), Moreira & Pio

(1991) e Machado *et al.* (2005), que relatam a diferenciação na cor em função do nível de ploidia.

Neste trabalho, nas análises de crescimento das plantas tetraplóides, observou-se que estas apresentaram menor tamanho e forma mais compacta (Figura 16), concordando com Cameron & Frost (1968) e Lee (1988), de que as características morfológicas são diferenciadas entre plantas com distinto nível de ploidia. Os resultados do presente trabalho estão de acordo com os dados obtidos por Allario *et al.* (2011), que na comparação da altura entre plantas diplóides e tetraplóides oriundas da mesma semente, de frutos do porta-enxerto limoeiro ‘Cravo’ (*C. limonia*, Osbeck) observaram que as plântulas poliplóides eram menores. Estes autores verificaram também que as plantas tetraplóides apresentaram folhas com coloração mais intensa, o que está de acordo com o que foi constatado neste trabalho (Figura 17).

Os resultados obtidos com as avaliações de altura das plantas diplóides e tetraplóides de citros ao longo de um ano (Figura 16) concordam com o que é proposto por Frost & Soost (1968), que descrevem que, em termos citogenéticos, a única variação entre plantas cítricas autotetraplóides e seus irmãos diplóides está no número duplicado de cromossomos. Porém em caracteres morfológicos, variações podem ser observadas no crescimento e comportamento, pois as plantas tetraplóides apresentam crescimento mais lento, formato compacto, com menos brotações e de menor vigor. Conforme Syvertsen *et al.* (2000), as menores taxas de crescimento observadas em mudas cítricas tetraplóide estão associadas às taxas reduzidas de transpiração devido ao menor número de estômatos.

Com relação ao pecíolo, Frost & Soost (1968) sugerem que plantas poliplóides apresentam pecíolo mais largos que as diplóides. Neste estudo não foram observadas diferenças nesta característica, porém variações no comprimento foram identificadas, pois as diplóides apresentaram pecíolos com maior tamanho que as tetraplóides (Tabela 21).

Nas avaliações, as plantas tetraplóides apresentaram folhas com maior comprimento e maior largura (Tabela 21), o que está de acordo com o que foi relatado por Frost & Soost (1968), Moreira & Pio (1991) e Machado *et al.* (2005) de que as plantas tetraplóides de citros apresentam folhas de maior tamanho, mais espessas, largas e de coloração mais escura do que as folhas de plantas diplóide.

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo também com o que foi descrito por Latado *et al.* (2007), em plantas autotetraplóides de laranja 'Pêra-de-abril' e de tangoreiro 'Murcott', que observaram folhas com maior espessura, menor relação comprimento/largura (C/L) e coloração mais intensa. Estas variações também são descritas em outras espécies frutíferas como em mangífera (*Mangifera indica* L.), onde plantas tetraplóides apresentam folhas mais compridas e largas, pecíolos mais compridos, folhas mais coriáceas e com frutos maiores que as diplóides (Galán-Sauco *et al.*, 2001).

#### **4.4 Caracterização morfológica e determinação do número de embriões por semente em porta-enxertos de citros**

##### **4.4.1 Caracterização de folhas e frutos**

De acordo com IBPGR (1988), a caracterização morfológica consiste na adoção de descritores botânicos herdáveis facilmente visíveis e mensuráveis, que a princípio, são expressos em todos os ambientes.

A utilização desta metodologia na diferenciação das plantas é mais rápida, fácil e de menor custo, contudo a eficiência está associada à presença de marcadores morfológicos distintos, pois em cultivares com grande semelhança fenotípica, podem ocorrer limitações na discriminação destas (Oliveira *et al.*, 2002).

Neste trabalho, na caracterização morfológica, os porta-enxertos apresentaram folhas do tipo 2, ou seja, trifolioladas, de cor verde, brevipéculadas para o comprimento



do pecíolo em relação ao limbo, com a presença de pecíolo estreito e de formato obovado. No formato da margem, todos apresentaram margem dentada. Porém, foram observadas variações quanto ao formato do limbo, onde o porta-enxerto Trifoliata apresentou folhas orbiculadas nos dois ambientes, sendo que, nas demais, o formato foi elipsóide (Tabela 22).

TABELA 22. Caracterização morfológica das folhas de plantas matrizes dos porta-enxertos de citros conduzidos a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá - RS e em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, em 2009.

Porta-enxerto	Tipo	Cor	Pecíolo x limbo	Pecíolo alado	Forma pecíolo	Forma limbo	Formato margem
<b>Fazenda Panoramas Citros</b>							
Trifoliata	2	verde	brevipecioladas	estreito	obovado	orbiculada	dentada
‘Fepagro C 13’	2	verde	brevipecioladas	estreito	obovado	elipsóide	dentada
‘Fepagro C 37’	2	verde	brevipecioladas	estreito	obovado	elipsóide	dentada
‘Swingle’	2	verde	brevipecioladas	estreito	obovado	elipsóide	dentada
‘Troyer’	2	verde	brevipecioladas	estreito	obovado	elipsóide	dentada
<b>Casa-de-vegetação</b>							
Trifoliata	2	verde	brevipecioladas	estreito	obovado	orbiculada	dentada
‘Fepagro C 13’	2	verde	brevipecioladas	estreito	obovado	elipsóide	dentada
‘Fepagro C 37’	2	verde	brevipecioladas	estreito	obovado	elipsóide	dentada
‘Fepagro C 41’	2	verde	brevipecioladas	estreito	obovado	elipsóide	dentada
‘Swingle’	2	verde	brevipecioladas	estreito	obovado	elipsóide	dentada
‘Troyer’	2	verde	brevipecioladas	estreito	obovado	elipsóide	dentada

Folhas tipo 1= simples; Folha tipo 2= trifoliolada.

Na comparação entre os ambientes, variações nos parâmetros médios de largura, comprimento e comprimento total foram observadas (Tabela 23).

TABELA 23. Caracterização morfológica das folhas dos porta-enxertos conduzidos a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá - RS e em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, em 2009.

Porta-enxerto	Largura folha (cm)	Comprimento folha (cm)	Comprimento total (limbo + pecíolo) (cm)
<b>Fazenda Panoramas Citros</b>			
Trifoliata	2,61 cA	5,64 cA	6,97 cA
‘Fepagro C 13’	3,96 bA	6,68 bcA	8,56 bA
‘Fepagro C 37’	4,14 aA	7,38 bA	9,48 bA
‘Swingle’	3,75 bA	8,61 aA	10,71 aA
‘Troyer’	3,70 bA	6,38 bcA	8,43 bA
<b>Casa-de-vegetação</b>			
Trifoliata	2,41 cA	4,16 cB	5,97 dA
‘Fepagro C 13’	3,72 abA	6,11 bcA	7,37 cB
‘Fepagro C 37’	3,49 bB	7,15 aA	9,46 aA
‘Fepagro C 41’	3,97 a	7,30 a	9,16 a
‘Swingle’	3,46 bA	6,65 abB	8,60 bB
‘Troyer’	3,64 abA	6,22 bcA	8,03 bA

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente, dentro de local, pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ). Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente, na comparação do mesmo porta-enxerto, mas em locais diferentes, pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ).

Com relação à média da largura das folhas, o maior valor observado a campo foi de 4,14cm no citrangeiro ‘Fepagro C 37’ e o menor de 2,61cm em Trifoliata. Nas plantas conduzidas em casa-de-vegetação o maior valor foi de 3,97cm em citrangeiro ‘Fepagro C 41’ e o menor de 2,41cm em Trifoliata. Foram observadas diferenças significativas entre ambientes, a exceção do citrangeiro ‘Fepagro C 37’, que apresentou folhas de menor largura em casa-de-vegetação do que a campo (Tabela 23).

Com relação à média do comprimento das folhas, o maior valor a campo foi de 8,61cm no citrumeleiro ‘Swingle’ e o menor de 5,64cm em Trifoliata. Nas plantas conduzidas em casa-de-vegetação, o maior valor foi de 7,30cm em citrangeiro ‘Fepagro C

41' e o menor de 4,16cm em Trifoliata. Foram identificadas diferenças significativas entre ambientes, em Trifoliata e citrumeleiro 'Swingle' que apresentaram folhas de menor comprimento em casa-de-vegetação (Tabela 23).

Na média do comprimento total das folhas (pecíolo e limbo), o maior valor a campo foi de 10,71cm em citrumeleiro 'Swingle' e o menor de 6,97cm em Trifoliata. Em casa-de-vegetação, o citrangeiro 'Fepagro C 37' apresentou maior comprimento total com 9,46cm e o menor valor foi de 5,97cm em Trifoliata. Entre ambientes ocorreram diferenças significativas em citrangeiro 'Fepagro C 13' e citrumeleiro 'Swingle', que apresentaram folhas de menor comprimento total em casa-de-vegetação (Tabela 23).

Na comparação entre os ambientes, todas as plantas conduzidas a campo apresentaram maiores valores nos parâmetros avaliados do que as conduzidas em casa-de-vegetação, embora alguns não tenham diferido estatisticamente (Tabela 23).

Hodgson (1967) propôs o uso de descritores morfológicos de frutos para a tipificação varietal. Os principais referem-se a características internas e externas dos frutos, como cor, superfície, forma, tamanho, base, cálice, pedicelo, ápice, espessura do albedo, número e características de sementes, etc. Com base nisto, no presente trabalho, alguns destes parâmetros foram avaliados a fim de caracterizar os frutos dos porta-enxertos e muita variação foi observada em características externas e internas (Tabelas 24 e 25).

Neste estudo, na caracterização morfológica dos frutos (Tabela 24), os porta-enxertos Trifoliata, citrangeiros 'Fepagro C 13', 'Fepagro C 37', 'Fepagro C 41' e 'Troyer' apresentaram frutos de forma esferóide e com formato da base e do ápice convexo, não apresentando variações nestas características quando conduzidos em distintos ambientes, ou seja, a campo e em casa-de-vegetação.

O porta-enxerto citrumeleiro 'Swingle' não apresentou variações nestas características quando conduzido em distintos ambientes, mas apresentou frutos com

características diferenciadas aos demais. Quanto à forma, apresentou-se como periniforme e quanto ao formato da base apresentou fruto com pescoço e com formato do ápice convexo (Tabela 24).

TABELA 24. Caracterização morfológica dos frutos dos porta-enxertos conduzidos a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá - RS e em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, em 2009.

Planta	Forma	Formato da base	Formato do ápice
<b>Fazenda Panoramas Citros</b>			
Trifoliata	Esferóide	Convexo	Convexo
‘Fepagro C 13’	Esferóide	Convexo	Convexo
‘Fepagro C 37’	Esferóide	Convexo	Convexo
‘Swingle’	Periniforme	Com pescoço	Convexo
Citrangreiro ‘Troyer’	Esferóide	Convexo	Convexo
<b>Casa-de-vegetação</b>			
Trifoliata	Esferóide	Convexo	Convexo
‘Fepagro C 13’	Esferóide	Convexo	Convexo
‘Fepagro C 37’	Esferóide	Convexo	Convexo
‘Fepagro C 41’	Esferóide	Convexo	Convexo
‘Swingle’	Periniforme	Com pescoço	Convexo
‘Troyer’	Esferóide	Convexo	Convexo

Foram observadas variações nas características avaliadas dos frutos de plantas distintas conduzidas em um mesmo ambiente. As variações eram esperadas e devem estar associadas à diferenciada constituição genética, que, possivelmente, influenciou as características dos frutos (Tabela 25).

TABELA 25. Valores médios da caracterização dos frutos dos porta-enxertos conduzidos a campo na Fazenda Panoramas Citros, Butiá - RS e em casa-de-vegetação na EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS em 2009.

Porta-enxerto	Diâmetro (cm)	Altura (cm)	Massa (g)	Nº Sem.	Sem. viáv.	Sem. inviáv.
<b>Fazenda Panoramas Citros</b>						
Trifoliata	4,74 cA	4,68 cA	38,47 cA	39,60 aA	38,20 aA	1,60 cA
‘Fepagro C 13’	5,22 bA	4,84 cA	52,84 bA	24,22 dA	19,20 cA	3,00 bB
‘Fepagro C 37’	5,96 aA	5,16 bA	74,06 aA	35,00 bA	21,20 cA	13,80 aA
‘Swingle’	6,46 aA	6,64 aA	85,58 aA	38,80 aA	23,20 bA	15,60 aB
‘Troyer’	5,30 bA	5,42 bA	53,10 bA	30,60 cA	16,60 dA	14,00 aA
<b>Casa-de-vegetação</b>						
Trifoliata	3,99 cB	4,51 cA	33,22 dB	21,80 bB	21,00 aB	0,80 dB
‘Fepagro C 13’	3,51 dB	3,29 dB	39,72 cB	22,40 bB	8,90 dB	13,50 bA
‘Fepagro C 37’	5,08 bB	4,67 cB	63,98 bB	19,70 bB	8,00 dB	11,70 bB
‘Fepagro C 41’	6,12 a	6,49 a	116,9 a	20,40 b	16,80 b	3,20 c
‘Swingle’	5,47 bB	5,57 bB	73,88 bB	31,80 aB	13,20 cB	18,60 aA
‘Troyer’	4,22 cB	4,95 cB	40,02 cB	22,60 bB	9,00 dB	13,60 bA

Nº Sem.: Número médio total de sementes por fruto; Sem. Viáv.: Número médio de sementes viáveis por fruto; Sem. Inviáv.: Número médio de sementes inviáveis por fruto. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente, dentro de local, pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ). Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente, na comparação do mesmo porta-enxerto, mas em locais diferentes, pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ).

A campo, o maior diâmetro foi observado em citrumeleiro ‘Swingle’ com 6,46cm e o menor em Trifoliata com 4,74cm. A maior altura foi em citrumeleiro ‘Swingle’ com 6,64cm e a menor de 4,68cm em Trifoliata. A maior massa foi de 85,58g em citrumeleiro ‘Swingle’ e a menor de 22,84g em citrangeiro ‘Fepagro C 13’. O maior número de sementes viáveis foi de 38,20 em Trifoliata e o menor 16,60 em citrangeiro ‘Troyer’. O maior número de sementes inviáveis foi de 15,60 em citrumeleiro ‘Swingle’ e o menor de 1,60 em Trifoliata (Tabela 25).

Em casa-de-vegetação, o maior diâmetro foi observado em citrangeiro ‘Fepagro C 41’ com 6,12cm e o menor em citrangeiro ‘Fepagro C 13’ com 3,51cm. A maior altura foi em citrangeiro ‘Fepagro C 41’ com 6,49cm e a menor de 3,29cm em citrangeiro ‘Fepagro C 13’. A maior massa foi de 116,9g em citrangeiro ‘Fepagro C 41’ e a menor de 19,72g em citrangeiro ‘Fepagro C 13’. O maior número de sementes foi de 31,80 em citrumeleiro ‘Swingle’ e o menor de 19,70 em citrangeiro ‘Fepagro C 37’. O maior número de sementes viáveis foi de 21,00 em Trifoliata e o menor 8,00 em citrangeiro ‘Fepagro C 37’. O maior número de sementes inviáveis foi de 18,60 em citrumeleiro ‘Swingle’ e o menor de 0,80 em Trifoliata (Tabela 25).

Foram observadas diferenças significativas em quase todos os parâmetros avaliados entre os mesmos genótipos quando conduzidos em ambientes diferenciados (Tabela 25).

Para as características diâmetro, altura e massa, os frutos do citrumeleiro ‘Swingle’ conduzido a campo apresentaram maiores valores com 6,46cm, 6,64cm e 85,58g, respectivamente. Enquanto que, os frutos deste mesmo porta-enxerto, quando conduzido em casa-de-vegetação, apresentaram valores inferiores com 5,47cm, 5,57cm e 73,88g, respectivamente (Tabela 25). Na característica altura, o porta-enxerto Trifoliata apresentou frutos mais altos quando conduzidos a campo, porém não ocorreu diferenças significativas entre os ambientes.

O maior número de sementes a campo foi observado em Trifoliata com média de 39,60 sementes/fruto e neste, em casa-de-vegetação, foi de 21,8 sementes/fruto, sendo que todos os genótipos a campo apresentaram maior número de sementes (Tabela 25).

A maior média de sementes viáveis a campo foi identificada em Trifoliata com 38,20 e em casa-de-vegetação este genótipo apresentou média de 21,00 sementes viáveis por fruto. A maior média de sementes inviáveis a campo foi 15,60 em citrumeleiro ‘Swingle’ e em casa-de-vegetação este genótipo teve média de 18,6 sementes

inviáveis/fruto. As plantas conduzidas a campo apresentaram maior número de sementes viáveis que as conduzidas em casa-de-vegetação com diferenças significativas entre eles, enquanto que, para o número de sementes inviáveis, não houve diferenças significativas para o citrumeleiro ‘Swingle’ e os citrangeiros ‘Fepagro C 13’ e ‘Troyer’ (Tabela 25).

Frutos das plantas conduzidas a campo apresentaram valores superiores com diferenças significativas em quase todos os parâmetros avaliados, o que permite sugerir que algum fator presente em casa-de-vegetação atue sobre estas características, reduzindo o tamanho, massa, altura, número de sementes, etc. ou também, que diferenças no manejo promovam o maior desenvolvimento de frutos das plantas a campo (Tabela 25).

Em citros, os marcadores morfológicos apresentam facilidade e rapidez nas avaliações, contudo para a caracterização de híbridos no gênero *Citrus*, marcadores morfológicos que possam distinguir os genótipos são escassos devido à elevada similaridade entre a progênie obtida dos cruzamentos (Ballve *et al.*, 1997).

Neste estudo, a caracterização morfológica das folhas foi eficiente, pois os genótipos apresentaram características distintas e diferenças significativas entre os ambientes (Tabelas 22 e 23).

Apesar da limitação no número de marcadores morfológicos em híbridos de citros, bons resultados foram obtidos por Koehler-Santos *et al.* (2003) na distinção de 34 variedades de tangerineiras através da avaliação de folhas e por Weiler *et al.* (2011) na diferenciação de plantas de uma progênie obtida pelo cruzamento de tangerineira ‘Clementina Fina’ e ‘Montenegrina’.

No presente trabalho, para a caracterização morfológica dos frutos, foram obtidos bons resultados, pois os genótipos apresentaram ampla variação nas características avaliadas (Tabelas 24 e 25).

Domingues *et al.* (1999) obtiveram resultados significativos na avaliação de características morfológicas dos frutos em dez variedades de tangerineiras. A distinção dos genótipos foi possível devido à acentuada variabilidade fenotípica, verificando-se que muitos caracteres agrônômicos desejáveis encontravam-se dispersos entre os acessos, podendo virem a ser aproveitados em programas de melhoramento.

Neste estudo foram observadas variações nos frutos dos distintos genótipos quando conduzidos no mesmo ambiente e estas foram relacionadas à diferenciada constituição genética dos materiais, bem como, variações nos parâmetros avaliados nos mesmos genótipos, porém quando conduzidos em diferentes ambientes, o que permitiu levantar a hipótese de que o ambiente em casa-de-vegetação estivesse atuando nos resultados (Tabelas 24 e 25). As hipóteses sugeridas para as diferenças aqui observadas estão de acordo com o que é proposto por Stuchi *et al.* (1996) e Soares Filho *et al.* (2000), os quais inferiram que variações na morfologia do fruto, número total de sementes e percentagem de sementes viáveis em citros está associada a fatores genéticos e ambientais.

As condições ambientais e de manejo em casa-de-vegetação podem ter atuado nos resultados obtidos (Tabelas 24 e 25). A temperatura em casa-de-vegetação foi superior que a campo, além de apresentar maior oscilação (Apêndice 1), podendo ser um dos fatores a atuar nos resultados obtidos, porém outros podem ser sugeridos, tais como: problemas na adubação, deficiências no processo de irrigação e o fato de os porta-enxertos estarem enxertados sobre distintos genótipos, visto que, as plantas conduzidas em casa-de-vegetação estão alicerçadas sobre o porta-enxerto Trifoliata, que induz menor tamanho à cultivar copa, enquanto que os porta-enxertos conduzidos a campo estão enxertados sobre o porta-enxerto citrumeleiro 'Swingle' que é mais vigoroso que aquele.

Na caracterização de frutos, Passos *et al.* (2006) avaliaram os porta-enxertos *P. trifoliata*, citrumeleiro 'Swingle' e citrangeiro 'Troyer' quanto à altura, diâmetro, massa e



quantificaram o número de sementes por frutos e obtiveram valores inferiores aos resultados obtidos neste trabalho (Tabela 25), sendo que as diferenças poderiam estar relacionadas a fatores de ambiente e ao manejo das plantas.

Os frutos obtidos de plantas conduzidas a campo apresentaram maior diâmetro, altura, massa e número de sementes na comparação com os dados obtidos de frutos colhidos em casa-de-vegetação (Tabela 25). Estas diferenças podem estar associadas a fatores ambientais, ou devido à ausência de polinização cruzada em casa-de-vegetação, hipótese esta que está de acordo com os resultados obtidos por Malerbo-Souza *et al.* (2003) em laranjeira (*C. sinensis* cultivar Pêra Rio) de que os frutos obtidos de polinização cruzada são mais pesados do que os frutos obtidos por autopolinização. Além disso, sob polinização aberta observaram que o número de sementes por gomo foi significativamente maior.

O menor tamanho dos frutos e o menor número de sementes viáveis observados em casa-de-vegetação pode estar associado a danos no processo de polinização. A fertilização produz sementes viáveis e estas atuam diretamente na síntese de giberelina, que por sua vez, promovem o maior desenvolvimento dos frutos. Portanto, o menor tamanho dos frutos em casa-de-vegetação pode estar associado ao menor número de sementes viáveis com menor síntese de giberelinas, e o menor número destas deve estar associado a falhas no processo de fertilização (Agusti, 2000).

Neste estudo, a média do número de sementes para os porta-enxertos citrangeiro ‘Troyer’, citrangeiro ‘Fepagro C 13’ e citrumeleiro ‘Swingle’ foi de 30, 24 e 38, respectivamente (sob condições de campo) (Tabela 25), valores estes superiores aos descritos por Koller (1994) que encontrou, nos mesmos porta-enxertos, 15, 15 e 18 sementes/fruto, respectivamente.

Moreira *et al.* (2010), em citrumeleiro ‘Swingle’, identificaram 58 sementes, sendo 26 viáveis e 32 inviáveis. Porém neste estudo foram observados valores inferiores para o mesmo porta-enxerto, com 38 sementes, sendo 22 viáveis e 16 inviáveis (Tabela 25).

#### 4.4.2 Determinação do número de embriões e capacidade de germinação em meio de cultivo e substrato

Foram observadas diferenças no número de embriões de acordo com o método utilizado. Os resultados obtidos pelos métodos direto e indireto podem ser observados na Tabela 26 e Figura 18.

TABELA 26. Determinação do número médio de embriões pelos métodos direto e indireto, capacidade de germinação destes em meio de cultura e em substrato comercial para citros e taxa de poliembrionia em cinco porta-enxertos de citros. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2009.

Porta-enxerto	Nº de embriões (Mínimo)	Nº de embriões (Máximo)	Nº de embriões (Média)	Germin (meio)	Taxa Poliemb (%)	Germin (substr)	Taxa Poliemb (%)
Trifoliata	1,0	5,0	2,30 bc	1,91 bc	52	1,22 bc	14
‘Fepagro C 13’	1,0	12,0	5,04 a	1,18 c	84	1,09 c	19
‘Fepagro C 37’	1,0	9,0	3,09 ab	2,97 ab	92	1,33 ab	36
‘Swingle’	1,0	6,0	2,03 c	3,08 a	94	1,45 a	45
‘Troyer’	1,0	8,0	3,17 ab	2,49 ab	89	1,28 ab	33

\* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



FIGURA 18. Determinação do número de embriões e capacidade de germinação de embriões do citrangeiro ‘Fepagro C 37’. a) Número de embriões; b) Germinação dos embriões em meio de cultivo; c) Germinação em substrato comercial. Escala: cm. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2009.

Pelo método direto de determinação do número de embriões, o citrumeleiro ‘Swingle’ apresentou à menor média com 2,03 e o citrangeiro ‘Fepagro C 13’ a maior com 5,04 embriões/semente (Tabela 26). Porém foi observada variação de um embrião/semente (em todos os genótipos) a 12 embriões/semente em citrangeiro ‘Fepagro C 13’. Foram observadas também variações na taxa de poliembrião, com valores de 52% em Trifoliata e 94% em citrumeleiro ‘Swingle’ (Tabela 26).

Pelo método indireto, em meio de cultura, os valores mínimos e máximos foram de 1,18 em citrangeiro ‘Fepagro C 13’ e 3,08 plantas/semente em citrumeleiro ‘Swingle’. Enquanto que em substrato, os valores foram de 1,09 em citrangeiro ‘Fepagro C 13’ e 1,45 plantas/semente em citrumeleiro ‘Swingle’. As variações na taxa de poliembrião foram de 14% em Trifoliata e 45% em citrumeleiro ‘Swingle’ (Tabela 26).

Na determinação do número médio de embriões observou-se que o Trifoliata apresentou 2,30 embriões/semente, valor este inferior aos obtidos em citrangeiro ‘Fepagro C 13’ (5,04) e citrangeiro ‘Fepagro C 37’ (3,09), os quais apresentam grande potencial para uso na sustentação de novos pomares (Tabela 26). Portanto, esta característica é favorável ao uso destes porta-enxertos por viveiristas para a formação de mudas de citros.

A diferença no número de embriões dos distintos genótipos (Tabela 26) deve estar associada a inúmeros fatores, tais como: cultivar, espécie polinizadora, estado nutricional, disponibilidade hídrica, condições climáticas, etc. podendo ocorrer variações em frutos da mesma planta no mesmo ano e entre as plantas em anos distintos (Ramos & Pasqual, 1992 apud Rodrigues *et al.*, 1999; Moreira *et al.*, 2010).

Fatores ambientais são sugeridos como os responsáveis por variações no número de embriões/semente por Soares Filho *et al.* (2000) em tangerineira ‘Clementina’, tangerineira ‘Sunki’, limoeiro ‘Cravo’ e limoeiro ‘Volkameriano’ e por Aleza *et al.* (2011) em uma tangerineira que mostrou variação de 2 a 29 embriões/semente.

Neste trabalho, foram observadas diferenças na comparação entre os métodos, sendo o método direto mais eficiente (Tabela 26). Estas diferenças devem-se pelo método direto permitir a contagem de todos os embriões, independente do seu tamanho (pequenos), localização (às vezes dentro dos cotilédones dos embriões maiores) e formação (que não estão completamente formados).

A maior precisão do método direto neste estudo está de acordo com o observado por Moreira *et al.* (1947), que por este método obtiveram número médio de embriões em limoeiro 'Cravo' de 1,7, em limoeiro 'Comum' 1,7 e em *P. trifoliata* 2,6. Com o método indireto observaram o número médio de embriões e a percentagem de poliembrionia, de 1,1 e 7,9% em limoeiro 'Cravo'; 1,1 e 13,1% em limoeiro 'Comum' e 1,5 e 39,3% em citrange (*P. trifoliata* x *C. sinensis*), respectivamente. Concordando também com Domingues *et al.* (1998), que observaram variações de 1,4 a 6,2 embriões/semente pelo método direto e 1,0 a 2,3 pelo indireto em laranjeira 'Pêra'.

Porém, devido à facilidade na condução, o método indireto é utilizado. Neste estudo foram observadas na média, em Trifoliata, 1,22 plantas/semente através da germinação em substrato (Tabela 26), valor este superior ao observado por Oliveira *et al.* (2003), que identificaram média de 1,07 plantas/semente germinadas em tubetes e conduzidos em viveiro telado.

Resultados obtidos no presente trabalho evidenciam que, em meio de cultivo, maior número de embriões consegue germinar devido às condições ideais de temperatura, umidade e nutrientes, comparado à germinação em substrato comercial, por isso a taxa de poliembrionia foi superior em meio de cultivo (Tabela 26).

Neste trabalho, o número médio de plântulas germinadas em substrato em citrumeleiro 'Swingle' e Trifoliata mostrou valores de 1,45 e 1,22, respectivamente (Tabela 26). Contudo, valores superiores de plântulas pelo método indireto (germinação) nos mesmos porta-enxertos foram obtidos por Ramos *et al.* (2006), que observaram valores

de 1,6 e 1,4 embriões/semente, respectivamente. Mas estes autores, pelo método direto, encontraram ampla variação no número máximo de embriões, com valores de até cinco embriões/sementes em 'Swingle' e de quatro embriões/sementes de *P. trifoliata*, ficando evidente que muitos dos embriões presentes na semente não conseguem germinar e dar origem a plântulas em condições de campo ou casa-de-vegetação.

Um dos fatores que pode ser limitante à germinação é a presença do tegumento nas sementes, fator este relatado por Moreira *et al.* (2010), que observaram maior germinação em sementes sem tegumento em porta-enxertos de citros e isto está associado possivelmente à limitação hídrica promovida pelo tegumento.

Outro fator que pode ser limitante à germinação é a competição por nutrientes e espaço entre os embriões em condições de campo. Aleza *et al.* (2011) observaram germinação de 6,6 plântulas/semente em meio de cultivo, enquanto que, em casa-de-vegetação, a média foi de apenas de 1,5. Estes resultados são semelhantes aos observados neste estudo (Tabela 26), onde maior número de embriões germinados/semente foi observado em meio de cultura. Além disso, os resultados obtidos por Aleza *et al.* (2011) confirmam que a presença de embriões nas sementes é superior ao número de plântulas que conseguem germinar em substrato, evidenciando que a análise de embriões pelo método direto é mais precisa.

## 5 CONCLUSÕES

Houve um desempenho citogenético distinto entre diferentes porta-enxertos conduzidos no mesmo ambiente;

As condições de ambiente protegido foram desfavoráveis às características citogenéticas analisadas;

O citrumeleiro 'Swingle' teve o pior desempenho citogenético nos dois ambientes;

Menor vingamento de frutos foi observado em plantas conduzidas em casa-de-vegetação;

A progênie obtida de plantas conduzidas em casa-de-vegetação apresentou maior percentagem de plantas tetraplóides do que a progênie obtida de plantas conduzidas a campo;

Todas as plantas tetraplóides eram de origem nucelar e apresentaram crescimento mais lento, pecíolos menores e folhas maiores do que plantas diplóides;

Os porta-enxertos conduzidos a campo apresentaram frutos com maior diâmetro, altura e maior número de sementes viáveis do que os porta-enxertos conduzidos em casa-de-vegetação;

Houve variação na média do número de embriões entre os genótipos do estudo pelo método direto e indireto; onde o método direto apresentou maior eficiência;

A germinação média dos embriões foi superior em meio de cultura do que em substrato comercial para citros;

Maior taxa de poliembrionia foi identificada em sementes germinadas em meio de cultivo;

A implantação e condução de plantas cítricas em ambiente protegido apresenta limitações ao comportamento meiótico, índice meiótico, viabilidade do pólen e produção de frutos.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, P.K. Cytogenetical investigations in Rutaceae II. Meiotic studies in three intergeneric hybrids of *Citrus*. **Cytologia**, Tokyo, v.52, n.4, p.757-760, 1987.
- AGARWAL, P.K. Cytogenetical investigations in Rutacea V. Cytomorphology of the three intergeneric hybrids of *Citrus* and *Poncirus*. **Cytologia**, Tokyo, v.54, n.4, p.705-708, 1989.
- ALEZA, P. et al. Tetraploidization events by chromosome doubling of nucellar cells are frequent in apomictic citrus and are dependent on genotype and environment. **Annals of Botany**, London, v.108, n.1, p.37-50, 2011.
- ALEZA, P. et al. Polyembryony in non-apomictic citrus genotypes. **Annals of Botany**, London, v.106, n.4, p.533-545, 2010.
- ALLARIO, T. et al. Large changes in anatomy and physiology between diploid Rangpur lime (*Citrus limonia*) and its autotetraploid are not associated with large changes in leaf gene expression. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.62, n.8, p.2507-2519, 2011.
- ALONI, B. et al. The effect of high temperature and high atmospheric CO<sub>2</sub> on carbohydrate changes in bell pepper (*Capsicum annuum*) pollen in relation to its germination. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.112, n.4, p.505-512, 2001.
- ARAÚJO, E.F.; ROQUE, N. Taxonomia dos citros. In: **CITROS**. Campinas: Instituto Agrônômico : Fundag, 2005. p.125-145.
- AGUSTI, M. **Citricultura**. Espanha: Grupo Mundi-Prensa, 2000. 416p.
- BALLVÉ, R.M.L.; MEDINA-FILHO, H.P.; BORDIGNON, R. Identification of reciprocal hybrids in citrus by the broadness of leaf petiole wing. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.20, n.4, p.697-702, 1997.
- BARRETT, H.C.; HUTCHISON, D.J. Spontaneous tetraploidy in apomictic seedlings of *Citrus*. **Economic Botany**, Bronx, v.32, n.1, p.27-45, 1978.
- BASTIANEL, M. et al. Identification of zygotic and nucellar tangerine seedlings (*Citrus* spp.) using RAPD. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirao Preto, v.21, n.1, p.123-127, 1998.
- BENNET, M.D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amount in angiosperms. **Annals of Botany**, Bristol, v.76, p.113-176, 1995.



BICKNELL, R.A.; KOLTUNOW, A.M. Understanding Apomixis: Recent Advances and Remaining Conundrums. **The Plant Cell**, Rockville, v.16, n.1, p.228-245, 2004.

BODANESE-ZANETTINI, M.H. **Comportamento meiótico em cultivares de trigo submetidas a diferentes condições ambientais**. 1982. 213p. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-Graduação em Genética, Faculdade de Biologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1982.

BOTEON, M.; NEVES, E.M. Citricultura brasileira: aspectos econômicos. In: **CITROS**. Campinas: Instituto Agrônomo : Fundag, 2005. p.19-36.

BRUGNARA, E.C. et al. Ploidia e fertilidade de pólen em progênes de citros. **Bragantia**, Campinas, v.67, n.3, p.599-602, 2008.

CAMERON, J.W.; FROST, H.B. Genetics, breeding, and nucellar embryony. In: **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1968. v.2, p.325-370.

CAMERON, J.W.; SOOST, R.K. **Characters of new populations of Citrus polyploids, and the relation between tetraploidy in the pollen parent and hybrid tetraploid progeny**. In: PROCEEDINGS of the International Citric Symposium. California: University of California, 1969. v.1, p.199-205.

CAVALCANTE, H.C.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; DORNELLES, A.L.C. Meiotic behaviour and pollen fertility in an open-pollinated population of “Lee” mandarin [*Citrus clementina* x (*C. paradise* x *C. tangerina*)]. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.86, n.2, p.103-114, 2000.

CHAPOT, H. The citrus plant. In: HAFLIGER, E. (Ed.). **Citrus**. Basileia: Ciba-Geigy Agrochemicals, 1975. p. 6-13.

CHEN, C.L. et al. Cytogenetic analysis of two interspecific Citrus allotetraploid somatic hybrids and their diploid fusion parents. **Plant Breeding**, Berlin, v.123, n.4, p.332-337, 2004.

CHEN, C. et al. Origin and frequency of 2n gametes in *Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata* and their reciprocal crosses. **Plant Science**, Limerick, v.174, n.1, p.1-8, 2008.

CORAZZA-NUNES, M.J. et al. Aurantioideae: uma revisão da taxonomia e filogenia, com as contribuições da sistemática molecular. **Laranja**, Cordeirópolis, v.26, n.2, p.359-374, 2005.

CRISTOFANI, M. et al. Identificação de híbridos de cruzamentos interespecíficos em citros utilizando marcadores RAPD e SSR. **Laranja**, Cordeirópolis, v.22, n.1, p.231-241, 2001.

CRISTOFANI-YALY, M. et al. Transferability and level of heterozygosity of microsatellite markers in *Citrus* species. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v.29, n.2. p.418-423, 2010.

DAVIES, F. S.; ALBRIGO, L. G. **Citrus**. Wallingford: CABI, 1994. 254p.

DE WET, J.M.J. Origins of polyploids. In: LEWIS, W.H. (Ed.) **Polyploidy: biological relevance**. New York: Plenum, 1980. p.3-15.

DEL BOSCO, S.F. et al. Production and characterization of new triploid seedless progenies for mandarin improvement. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.114, n.4, p.258-262, 2007.

DEL BOSCO, S.F.; TUSA, N.; CONICELLA, C. Microsporogenesis in a *Citrus* interspecific tetraploid somatic hybrid and its fusion parents. **Heredity**, London, v.83, n.4, p.373-377, 1999.

DOLEŽEL, J.; LUCRETTI, S.; SCHUBERT, I. Plant chromosome analysis and sorting by flow cytometry. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Florida, v.13, n.3, p.275-309, 1994.

DOMINGUES, E.T. **Caracterização morfológica, agronômica, isoenzimática e por RAPD de variedades de laranja doce – *Citrus sinensis* (L.) Osbeck**. 1998. 246f. Tese (Doutorado em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

DOMINGUES, E.T. et al. Caracterização morfológica de tangerinas do banco de germoplasma de citros do centro de citricultura Sylvio Moreira/IAC. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.56, n.1, p.197-206, 1999.

DONADIO, L.C.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MOREIRA, C.S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: **CITROS**. Campinas: Instituto Agrônomo : Fundag, 2005. v.1, p.1-18.

DORNELLES, C. **Introdução a citricultura**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1988. 92p.

DUTT, M.; VASCONCELLOS, M.; SONG, K.J.; In vitro production of autotetraploid Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) using cell suspension cultures. **Euphytica**, Wageningen, v.173, n.2, p.235-242, 2010.

FAO. **Faostat agriculture data, agricultural production, crops primary**. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em: 20 maio 2011.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA – CENARGEM, 2 ed. 1996. 220p.

FROST, H.B.; KRUG, C.A. Diploid – tetraploid periclinal chimeras as bud variants in citrus. **Genetics**, New York, v.27, n.1, p.619-634, 1942.

FROST, H.B.; SOOST, R.K. Seed reproduction: Development of gametes and embryos. In: W. Reuther; L.D. Batchelor ; H.J. Webber (Eds.). **The citrus industry II**, Berkeley: California Univ. Press, 1968. p.290-324.

GALÁN-SAUICO, V. et al. Occurrence of spontaneous tetraploid nucellar mango plants. **HortScience**, Alexandria, v.36, n.4, p.755-757, 2001.

GARCIA, M.R. et al. Genetic analysis of apomixis in *Citrus* and *Poncirus* by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.99, n.3-4, p.511-518, 1999.

GROSSNIKLAUS, U.; JEFFERSON, R.; FOUN, R. A bright future for apomixis. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.3, n.11, p.415-416, 1998.

GUERRA, A. et al. Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a *Citrus* germoplasma bank. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.20, n.3, p.489-496, 1997.

GUERRA, M. **Introdução a Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1988.142p.

GUO, W.W. et al. Molecular analysis revealed autotetraploid, diploide and tetraploid cybrid plants regenerated from an interspecific somatic fusion in *Citrus*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.108, n.2, p.162-166, 2006.

HEDHLY, A.; HORMAZA, J.I.; HERRERO, M. Effect of temperature on pollen tube kinetics and dynamics in sweet cherry, *Prunus avium* (Rosaceae). **American Journal of Botany**, Ohio, v.91, n.4, p.558-564, 2004.

HERMSEN, J.G. Mechanisms and genetics implications of 2n-gamete formation. **Iowa State Journal of Research**, Ames, v.58, n.4, p.421-434, 1984.

HODGSON, R. W. Horticultural varieties of citrus. In: REUTHER, W.; WEBBER, H. J.; BATCHELOR, L. D. (Ed.). **The citrus industry**. Riverside: University of California, 1967, v.1, p.431-591.

HU, Z. et al. Abnormal microspore development leads to pollen abortion in a seedless mutant of 'Ougan' mandarin (*Citrus suavissima* Hort. ex Tanaka). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.132, n.6, p.777-782, 2007.

HUSSAIN, S. et al. Facultative apomixis and chromosome doubling are sources of heterogeneity in citrus rootstock trials: Impact on clementine production and breeding selection. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.130, n.4, p.815-819, 2011.

IBPGR - International Board for Plant Genetic Resources . **Descriptors for Citrus**. Rome, 1988, 27p.

KAMIRI, M. et al. Evidence for non-disomic inheritance in a *Citrus* interspecific tetraploid somatic hybrid between *C. reticulata* and *C. limon* using SSR markers and cytogenetic analysis. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.30, n.8, p.1415-1425, 2011.

KOBAYASHI, S. et al. Fruit characteristics and pollen fertility of *Citrus* somatic hybrids. **Journal of Japan Society of Horticultural Science**, Tokyo, v.64, n.2, p.283-289, 1995.

KOEHLER-SANTOS, P.; DORNELLES, A.L.C.; FREITAS, L.B. Characterization of mandarin citrus germplasm from Southern Brazil by morphological and molecular analyses. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.7, p.797-806, 2003.

KOLLER, O. C. **Citricultura: laranja, limão e tangerina**. Porto Alegre: Editora Rigel, 1994. 446p.

KOLLER, O. C. Clima e solo. In: KOLLER, O. C. (Org.) **Citricultura**: 1. laranja: tecnologia de produção, pós-colheita, industrialização e comercialização. Porto Alegre: Editora Cinco Continentes, 2006. p.27-40.

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

KOLTUNOW, A.M. et al. Anther, ovule, seed and nucellar embryo development in *Citrus sinensis* cv. Valencia. **Canadian Journal of Botany**, Canadá, v.73, n.10, p.1567-1582, 1995.

LALONDE, S.; BEEBE, D.U.; SAINI, H.S. Early signs of disruption of wheat anther development associated with the induction of male sterility by meiotic-stage water deficit. **Sexual plant reproduction**, New York, v.10, n.1, p.40-48, 1997.

LATADO, R.R. et al. Correlações entre viabilidade de pólen e características de frutos em mutantes de laranjeira 'Pêra'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.10, p.961-965, 2004.

LATADO, R.R. et al. 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**, Victoria, v.39, n.1, p.735-747, 1988.

LIU, J.X. et al. Genetic variation in the sensitivity of anther dehiscence to drought stress in rice. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.97, n.1, p.87-100. 2006

LÖVE, R.M. **Estudos citológicos preliminares de trigos rio-grandenses**. Porto Alegre: Secretaria do Estado dos Negócios da Agricultura, Indústria e Comércio, 1949. 23p. (Circular, 74).

MACHADO, M.A. et al. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: **CITROS**. Campinas: Instituto Agrônomo : Fundag, 2005. v.1, p.221-277.

MACHADO, M.A. et al. Diagnóstico do vírus da tristeza com diferentes anticorpos monoclonais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, n.2, p.191-194, 1997.

MALERBO-SOUZA, D.T.; NOGUEIRA-COUTO, R.H.; COUTO, L.A. Pollination in orange sweet crop (*Citrus sinensis* L. Osbeck, var. Pera-rio). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.40, n.4, p.237-242, 2003.

MEDINA-FILHO, H.P. et al. Genetic proof of the occurrence of mono and dizygotic hybrid twins in citrus rootstocks. **Revista Brasileira Genética**, Ribeirão Preto, v.16, n.3, p.703-711, 1993.

MOREIRA, C.S.; PIO, R.M. Melhoramento de citros. In: **Citricultura Brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v.1, p.116-152.

MOREIRA, R.A.; RAMOS, J.D.; CRUZ, M.C.M. Caracterização de frutos e poliembrião em sementes de 'flying dragon' e de híbridos de porta-enxerto de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.32, n.2, p.486-492, 2010.

MOREIRA, S. Experiências de cavalos para citros I. **Bragantia**, Campinas, v.1, n.8-9, p.525-544, 1941.

MOREIRA, S.; GURGEL, J.T.A. A fertilidade do pólen e sua correlação com o número de sementes em espécies e formas do gênero *Citrus*. **Bragantia**, Campinas, v.1, n.11-12, p.669-711, 1941.

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

MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; DONADIO, L.C. Citros. In: **Melhoramento De Fruteiras Tropicais**. UFV, 2002. cap.6, p.177-224.

MOURÃO FILHO, F.A.A. Produção de híbridos somáticos em citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.17, n.1, p.179-197, 1996.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. **Physiology Plant**, Berne, v.15, n.3, p. 473-497, 1962.

NAVA, G.A. et al. Effect of high temperatures in the pre-blooming and blooming periods on ovule formation, pollen grains and yield of 'Granada' peach. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.122, n.1, p.37-44, 2009.

NEVES, E.M. et al. Citricultura brasileira: Efeitos econômico-financeiros, 1996–2000, **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.2, p.432-436, 2001.

NICOLOSI, E. et al. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.100, n.8, p.1155-1166, 2000.

NISHIYAMA, I. Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants. **Proceedings of the Crop Science Society of Japan**, Tokyo, v.45, n.2, p.254-262, 1976.

OLIVEIRA, A.C. et al. Identification of sexual and nucellar citrus seedlings through single and duplex PCR of simple sequence repeat *loci*. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, Califórnia, v.1, n.1, p.138-141, 2000.

OLIVEIRA, A.C. et al. Identification of citrus hybrids through the combination of an leaf apex morphology and SSR markers. **Euphytica**, Wageningen, v.128, n.3, p.397-403, 2002.

OLIVEIRA, R. P.; NOVELLI, V. M.; MACHADO, M.A. Frequência de híbridos em cruzamento entre tangerina 'cravo' e laranja 'pêra': Análise de marcadores morfológicos e RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.9, p.1895-1903, 2000.

OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W.B.; RADMANN, E.B. Escarificação química da semente para favorecer a emergência e o crescimento do porta-enxerto Trifoliata. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.9, p.1429-1433, 2006.

OLIVEIRA, R.P.; SCIVITTARO, W.B.; RADMANN, E.B. Quantificação e método para seleção de plantas nucelares de *Poncirus trifoliata*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.10, p.1173-1177, 2003.

OLLITRAULT, P.; JACQUEMOND, C. Facultative apomixis, spontaneous polyploidization and inbreeding in *Citrus volkameriana* seedlings. **Fruits**, France, v.49, n.5-6, p.479-480, 1994.

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

PASSOS, O.S. et al. Caracterização de híbridos de *Poncirus trifoliata* e de outros porta-enxertos de citros no estado da Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, n.3, p.410-413, 2006.

POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: **CITROS**. Campinas: Instituto Agrônomo : Fundag, 2005. v.1, p.61-104.

POMPEU JÚNIOR, J. Porta-enxertos. In: **CITRICULTURA** Brasileira. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v.1, p. 265-280.

RAGHUVANSHI, S.S. Cytogenetical evolution in genus *Citrus*. **Cytologia**, Japan, v.27, n.2, p.172-187, 1962.

RAMANNA, M.S. The use of 2n gametes in breeding polysomic polyploid species; some achievements and perspectives. In: MARIANI, A.; TAVOLETTI, S. (Eds.) **Gametes with somatic chromosome number in the evolution and breeding of polyploid polysomic species: achievements and perspectives**. Perugia: Forage Plant Breeding Institute, 1992. p. 91-99.

RAMOS, J.D. et al. Poliembrião e caracterização de frutos de citrumelo swingle e de *Poncirus trifoliata*. **Ciência agrotécnica de Lavras**, Lavras, v.30, n.1, p.88-91, 2006.

RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D.W. Neopolyploidy in flowering plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v.33, n.1, p.589-639. 2002.

RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D.W. Pathways, mechanisms, and rates of polyploidy formation in flowering plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v.29, n.1, p.467-501, 1998.

RODRIGUES, L. R.; DORNELLES, A. L. C. Origem e caracterização horticultural da tangerineira 'Montenegrina'. **Laranja**, Cordeirópolis, v.20, n.1, p.167-185, 1999.

RODRIGUES, L. R.; DORNELLES, A. L. C.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Poliembrião e número de sementes por fruto de quatro cultivares de tangerineira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.3, p.469-474, 1999.

RUIZ, C.; PAZ BRETO, M.; ASÍNS, M.J. A quick methodology to identify sexual seedlings in citrus breeding programs using SSR markers. **Euphytica**, Wageningen, v.112, n.1, p.89-94, 2000.

SAHAR, N.; SPIEGEL-ROY, P. In vitro germination of avocado pollen. **HortScience**, Alexandria, v.19, n.6, p.886-888, 1984.

SAINI, H.S. Effects of water stress on male gametophyte development in plants. **Sexual Plant Reproduction**, New York, v.10, n.2, p.67-73. 1997.

SAITO, H. et al. Ploidy estimation in *Hemerocallis* species and cultivars by flow cytometry. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.97, p.185-192, 2003.

SALEH, B. et al. Tetraploid citrus rootstocks are more tolerant to salt stress than diploid. **Compets Rendus Biologies**, London, v.331, n.9, p.703-710, 2008.

SAMBROOK, J.; FRISCH, E.F.; MANIATS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. (Não paginado)

SAUNT, J. **Citrus varieties of the world: and illustrated guide**. Norwick: Sinclair International, 1990. 128p.

SCHÄFER, G.; BASTIANEL, M.; DORNELLES, A. L. C. Diversidade genética de porta-enxertos baseada em marcadores moleculares RAPD. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.5, n.34, p.1437-1442, 2004.

SCHÄFER, G.; BASTIANEL, M.; DORNELLES, A. L. C. Porta-enxertos utilizados na citricultura. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.4, p.723-733, 2001.

SCHÄFER, G.; DORNELLES, A. L. C. Produção de mudas cítricas no Rio Grande do Sul – Diagnóstico da região produtora. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.4, p.587-592, 2000.

SCHIFINO-WITTMANN, M.T., DALL'AGNOL, M. Gametas não-reduzidos no melhoramento de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.1, p.169-175, 2001.

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.

SCHWARZ, S.F. **Autotetraplóides espontaneos em patrones de cítricos: incidência, características y comportamiento em vivero y campo**. 2001. 176p. Tese (Doutorado) – Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, 2001.

SELITO-BOAVENTURA, Y.M.; PIO, R.M. Análise citogenética em três cultivares de laranja doce (*C. sinensis* (L.) Osbeck). **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.12, n.1, p.117-126, 1989.

SIMIONI, C. et al. Selection for increasing 2n gametes production in red clover. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v.4, n.4, p.477-483, 2004.

SINGH, R J. **Plant Cytogenetics**. Boca Raton: CRC PRESS, 2003. 463p.

SOARES FILHO, W.S. et al. Programa de melhoramento genético de citros da Embrapa-mandioca e Fruticultura: obtenção de híbridos. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS: MELHORAMENTO, 7, 2002, Bebedouro. **Anais...** Bebedouro, 2002.p.1-38.

SOARES FILHO, W.S. et al. Poliembrionia e frequência de híbridos em *citrus* ssp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.4, p.857-864, 2000.

SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D.E. The role of hybridization in plant speciation. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.60, n.1, p.561-588, 2009.

SOUZA, P.V. et al. **Indicações técnicas para a citricultura do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Fepagro, 2010.126p.

SPIEGEL-ROY, P.; GOLDSCHMIDT, E.E. **Biology of citrus**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. 230p.

SPIELMAN, M.; VINKENOOG, R.; SCOTT, R.J. Genetic mechanisms of apomixis. **Philosophical Transactions of Biological Science**, Gainesville, v.358, n.1434, p.1095-1103, 2003.

SRINIVASAN, A.; SAXENA, N.P.; JOHANSEN, C. Cold tolerance during early reproductive growth of chickpea (*Cicer arietinum* L): genetic variation in gamete development and function. **Field Crops Research**, Amsterdam v.60, n.3, p.209-222, 1999.

STUCHI, E.S.; SEMPIONATO, O.R.; SILVA, J.A.A. Influência dos porta-enxertos na qualidade dos frutos cítricos. **Laranja**, Cordeirópolis, v.1, n.17, p.159-178, 1996.

SUBEDI, K.D. et al. Cold temperatures and boron deficiency caused grain set failure in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). **Field Crops Research**, Amsterdam, v.57, n.3, p.277-288, 1998.

SWINGLE, W.T.; REECE, P.C. The botany of citrus and its wild relatives. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L. D. **The Citrus Industry**. Riverside: University of California, 1967, v.1, p.190-430.

SYBENGA, J. Forty years of cytogenetics in plant breeding: a personal view. In: LELLEY, T. (Ed.) **Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement**. Vienna : Ed. Universitäts Verlag, 1998. p.22-32.

SYVERTSEN, J.P.; 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**, Alexandria, v.125, n.2, p.228-234, 2000.

TAKAGI, T. et al. Effects of temperature before and after flowering on the development of flower and fruit in *Citrus unshiu*. **Journal of the Japanese Society for Horticulture Science**, Tokyo, v.51, n.3, p. 257-262, 1982.



THAKUR, P. et al. Cold stress effects on reproductive development in grain crops: An overview. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v.67, n.3, p.429-443, 2010.

TEICH, A.H.; SPIEGEL-ROY, E.P. Differentiation between nucellar and zygotic citrus seedlings by leaf shape. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.42, n.7, p.314-315, 1972.

WEBBER, H.J.; REUTHER, W.; LAWTON, H.W. History and Development of the citrus industry. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (Eds.) **The Citrus Industry**, Riverside: University of California, 1967, v.1, p.1-39.

WEILER, R.L. et al. Caracterização morfológica, determinação do nível de ploidia e viabilidade do pólen de uma progênie de tangerineira 'Clementina fina' e 'Montenegrina'. **Bragantia**, Campinas, v.70, n.3, p.502-511, 2011.

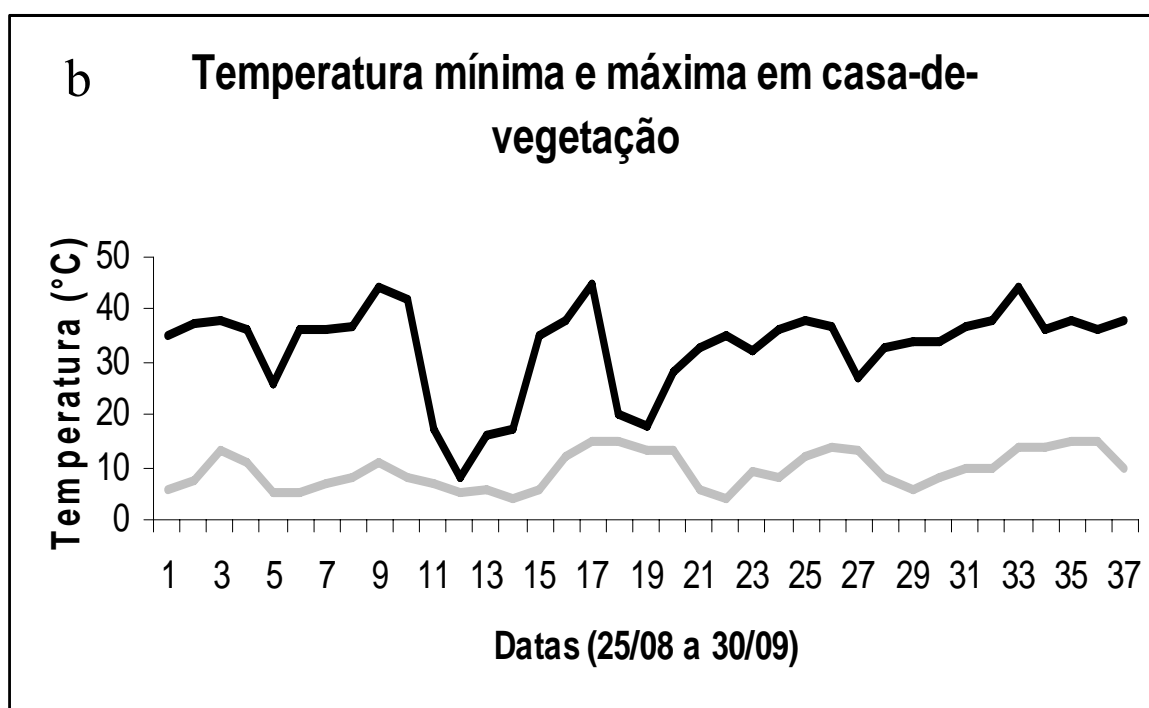
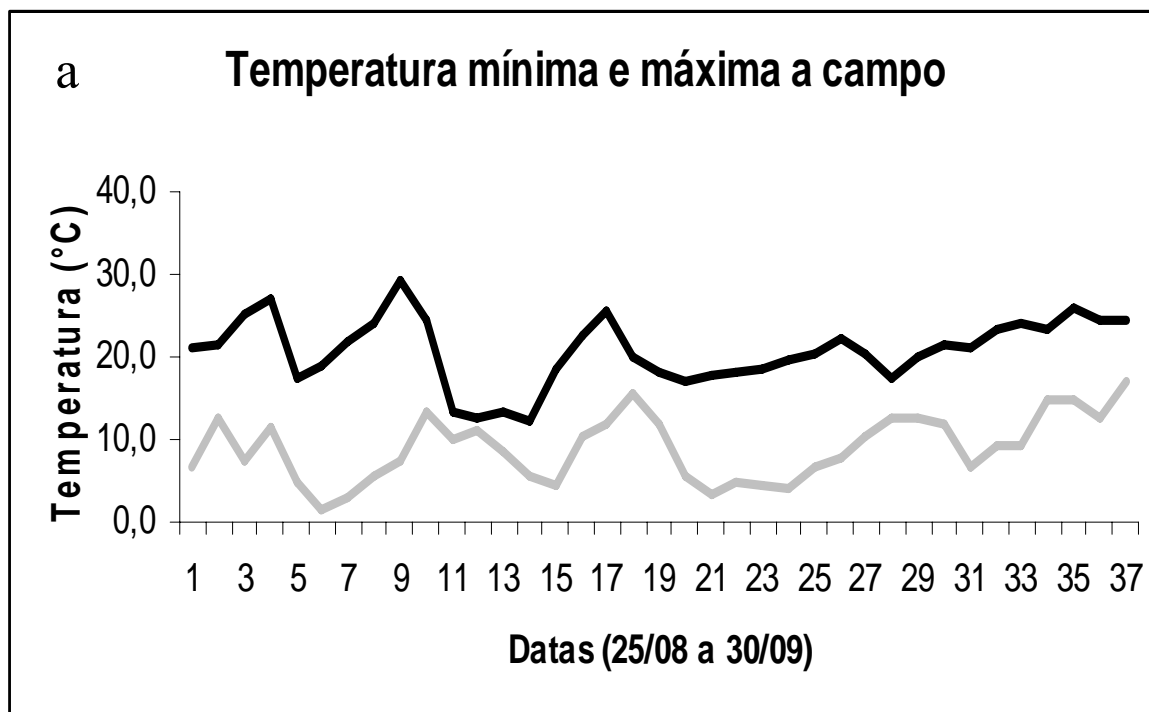
WEILER, R.L. et al. Caracterização molecular de uma progênie de tangerineira 'Clementina Fina' e 'Montenegrina'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.7, p.1523-1529, 2010.

WUTSCHER, H. K.; BISTLINE, F. W. Performance of "Hamlin" orange on 30 rootstocks in south Florida. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.113, n.4, p.493-497, 1988.

YE, W. et al. Seedless mechanism of a new mandarin cultivar 'Wuzishatangju' (*Citrus reticulata* Blanco). **Plant Science**, Limerick, v.177, n.1, p.19-27, 2009.

ZENG, S.H. et al. 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.

APÊNDICE 1. Temperatura mínima e máxima a campo e em casa-de-vegetação no período de 25 de agosto a 30 de setembro de 2008, obtidos através da estação meteorológica da EEA-UFRGS (campo) e termohigrógrafo (casa-de-vegetação). EEA/UFRGS, Eldorado do Sul – RS, 2008.



APÊNDICE 2. Medidas obtidas nas análises de altura das plantas diplóides e tetraplóides conduzidas lado a lado em casa-de-vegetação nas nove datas de avaliação. Porto Alegre – RS, 2010.

<b>Altura das plantas nas datas de avaliação</b>										
Acesso	Ploidia	03/08	17/09	01/11	16/12	31/01	17/03	02/05	16/06	01/08
1	2X	15,5	18,5	25,5	31,2	33,2	35,0	37,0	37,5	39,0
	4X	10,3	12,0	15,0	18,6	21,2	24,0	26,0	25,5	26,0
2	2X	22,2	25,0	29,5	35,3	39,2	42,0	44,0	44,3	45,0
	4X	19,2	20,2	23,1	26,7	29,0	30,6	32,0	33,5	34,0
3	2X	18,2	21,0	26,2	31,4	34,5	38,2	39,4	40,0	41,0
	4X	16,1	18,0	22,0	26,3	29,6	31,8	33,5	34,0	34,5
4	2X	19,6	23,0	31,1	38,0	45,0	49,8	52,2	53,0	54,0
	4X	16,8	19,0	23,1	27,0	30,0	32,0	35,0	35,3	36,0
5	2X	21,1	23,2	32,0	36,5	41,0	44,0	47,0	47,5	48,5
	4X	14,3	17,7	25,0	29,0	32,0	33,5	35,0	35,8	36,0
6	2X	15,1	18,0	23,1	28,2	32,0	34,0	35,0	35,3	36,0
	4X	11,0	15,0	19,5	25,0	27,6	30,0	32,0	32,7	33,0
7	2X	22,4	26,0	32,5	38,9	43,6	47,3	51,0	51,3	52,0
	4X	9,10	11,0	16,3	22,1	26,5	29,4	31,3	32,5	32,7
8	2X	12,4	18,0	25,3	31,0	35,6	39,2	40,0	40,5	41,5
	4X	11,2	14,3	19,0	23,5	25,5	27,3	29,0	29,8	30,0