

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO**

**ESTIMATIVA DO TAMANHO ÓTIMO DE AMOSTRA NA ANÁLISE DE
CARACTERES AGRONÔMICOS EM PROGÊNIES DE CITROS,
CONSIDERANDO O GRAU DE HOMOZIGOSIDADE DOS PARENTAIS**

Leandro Ribeiro dos Santos

Cruz das Almas - Bahia

2016

**ESTIMATIVA DO TAMANHO ÓTIMO DE AMOSTRA NA ANÁLISE DE
CARACTERES AGRONÔMICOS EM PROGÊNIES DE CITROS,
CONSIDERANDO O GRAU DE HOMOZIGOSIDADE DOS PARENTAIS**

LEANDRO RIBEIRO DOS SANTOS

Licenciado em Biologia
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), 2014

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: **Dr. Walter dos Santos Soares Filho**
Co-orientador: **Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo**
Dr. Abelmon da Silva Gesteira

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
MESTRADO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CRUZ DAS ALMAS - BA - 2016

FICHA CATALOGRÁFICA

S237 Santos, Leandro Ribeiro dos.

Estimativa do tamanho ótimo de amostra na análise de caracteres agronômicos em progênies de citros, considerando o grau de homoziguidade dos parentais / Leandro Ribeiro dos Santos. – Cruz das Almas, BA, 2016.

97f. il.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais)-
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2016.

1. Fruta cítrica. 2. Melhoramento vegetal. I. Soares Filho, Walter dos Santos Soares. II. Ledo, Carlos Alberto da Silva Duarte. III. Gesteira, Abelmon da Silva. IV. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia V. Título.

CDD: 634.304

Ficha catalográfica elaborada por Lucidalva R. G. Pinheiro- Bibliotecária CRB51161 –
Embrapa Mandioca e Fruticultura

COMISSÃO ORGANIZADORA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO ALUNO
LEANDRO RIBEIRO DOS SANTOS

Dr. Walter Dos Santos Soares Filho
Embrapa Mandioca e Fruticultura
(Orientador)

Prof(a). Dr(a). Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
(Examinadora)

Prof. Dr. Ricardo Franco Cunha Moreira
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
(Examinador)

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Recursos
Genéticos Vegetais em,
conferindo o Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais em
.....

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra primeiramente a Deus por manter-me firme e perseverante em toda minha caminhada. Segundo, a minha mãe Maria da Conceição Ribeiro dos Santos, ao meu pai Evangivaldo de Jesus dos Santos e aos meus irmãos Evandro Henrique Ribeiro dos Santos e Leonardo Ribeiro dos Santos, esses que são a minha base segura.

AGRADECIMENTO

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram com este trabalho de dissertação. Agradeço especialmente ao Deus que habita em mim por proporcionar-me todo amor, perseverança e oportunidade, por abrir caminhos por onde passar e sempre permitir seguir em frente na trajetória da vida. Aos meus pais, irmãos e demais familiares, meus sinceros agradecimentos por toda ajuda. Aos amigos queridos, toda minha gratidão.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF), pelo apoio institucional e infraestrutura de trabalho;

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida;

À equipe de Melhoramento Genético de Citros da Embrapa mandioca e Fruticultura. Em especial para Edson, Magno, seu Antônio e Lizziane, por colaborarem nas avaliações feitas além de toda ajuda intelectual necessária para realização desse trabalho;

Ao Dr. Walter dos Santos Soares Filho, meu orientador, por todo o empenho, presteza e atenção dada a este trabalho. Tenho certeza que sem a sua ajuda e todo o seu conhecimento esse projeto não se concluiria. Essa pessoa que hoje é o meu exemplo do que venha a ser um bom profissional, uma boa pessoa, um excelente pesquisador;

Aos meus co-orientadores Carlos Alberto da Silva Ledo e Albelmon da Silva Gesteira todo o meu agradecimento pelas várias colaborações e ajuda intelectual;

Por fim, agradeço a todos aqueles que não pude citar os nomes, porque são vários, mas quero desejar toda a minha gratidão pela participação nessa conclusão de trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO-----	01
CAPÍTULO 1	
TAMANHO ÓTIMO DA AMOSTRA EM FUNÇÃO DOS CARACTERES: ALTURA DA PLANTA, DIÂMETRO DO TRONCO E VIGOR VISUAL EM PROGÊNIES DE CITROS -----	19
CAPÍTULO 2	
TAMANHO ÓTIMO DA AMOSTRA EM FUNÇÃO DO CARÁTER POLIEMBRIONIA EM PROGÊNIES DE CITRO-----	36
CAPÍTULO 3	
TAMANHO ÓTIMO DA AMOSTRA EM FUNÇÃO DOS CARACTERES: BROTAÇÃO E TOLERÂNCIA À SECA EM PROGÊNIES DE CITROS-----	52
CONSIDERAÇÕES FINAIS-----	68
ANEXO A-----	67
ANEXO B-----	70

ESTIMATIVA DO TAMANHO ÓTIMO DE AMOSTRA NA ANÁLISE DE CARACTERES AGRONÔMICOS EM PROGÊNIES DE CITROS, CONSIDERANDO O GRAU DE HOMOZIGOSIDADE DOS PARENTAIS

Autor: Leandro Ribeiro dos Santos

Orientador: Walter dos Santos Soares Filho

Co-orientador: Carlos Alberto da Silva Ledo e Abelmon da Silva Gesteira

RESUMO: No melhoramento genético de citros, a obtenção de indivíduos de interesse agronômico, mediante hibridação, exige a geração de progênies com elevado número de indivíduos. Para isso, diversos caracteres são avaliados, incluindo aqueles relacionados ao vigor de planta, tolerância à seca, grau de poliembrionia, entre outros. Portanto, metodologia que permita determinar com precisão o tamanho ideal de amostra se torna muito importante. O objetivo desse trabalho foi determinar o tamanho ótimo de amostra para caracteres agronômicos em três progênies de citros. O trabalho foi realizado na Embrapa Mandioca e Fruticultura, no município de Cruz das Almas-Ba. Avaliou-se as progênies TRKFL x (LCR x TR), TSKFL x CTSW e TSKFL x TRBK no período de 2009 a 2016. O tamanho ótimo de amostra foi calculado pelo Método da Máxima Curvatura Modificada, pela ferramenta estatística R. Avaliou-se: diâmetro do tronco, altura de planta, vigor visual, poliembrionia, enrolamento foliar e brotação. Os maiores tamanhos de amostras foram de seis plantas para o caráter vigor visual para a progênie TSKFL X (LCR x TR) e TSKFL x CTSW nos anos de 2015 e 2011, respectivamente; seis plantas para o caráter altura de planta no ano de 2010 nas duas progênies; diâmetro do tronco com 15 plantas no ano de 2010 para a progênie TSKFL x CTSW; sete plantas para poliembrionia no ano de 2016 na progênie TSKFL x CTSW; sete plantas para enrolamento foliar no ano de 2010 para a progênie TSKFL X (LCR x TR) e nove plantas para o caráter brotação para a progênie TSKFL x CTSW no ano de 2013. Concluiu-se que fatores, como heteroziguidade dos parentais, base genética dos caracteres, além de fatores climáticos influenciam diretamente no tamanho ótimo de amostra.

Palavras-chave: Heteroziguidade, caracteres agronômicos, melhoramento genético.

ESTIMATED SIZE GREAT SAMPLE THE ANALYSIS AGRONOMIC CHARACTERS IN CITRUS PROGENIES, WHEREAS THE PARENTAL HOMOZYGOSITY DEGREE

Author: Leandro Ribeiro dos Santos

Adviser: Walter dos Santos Soares Filho

Co-adviser: Carlos Alberto da Silva Ledo and Abelmon da Silva Gesteira

ABSTRACT: In the genetic improvement of citrus, the obtaining of individuals of agronomic interest, through hybridization, requires the generation of progenies with high number of individuals. For this, several characters are evaluated, including those related to plant vigor, drought tolerance, degree of polyembryony, among others. Therefore, a methodology that allows the precise determination of the ideal sample size becomes very important. The objective of this work was to determine the optimal sample size for agronomic traits in three citrus progenies. The work was carried out at Embrapa Mandioca and Fruticultura, in the municipality of Cruz das Almas-Ba. The progenies TRKFL x (LCR x TR), TSKFL x CTSW and TSKFL x TRBK were evaluated in the period from 2009 to 2016. The optimum sample size was calculated by the Modified Maximum Curvature Method, by the statistical tool R. It was evaluated: Trunk diameter, plant height, visual vigor, polyembryony, foliar winding and sprouting. The largest sample sizes were of six plants for the visual vigor character for the progeny TSKFL X (LCR x TR) and TSKFL x CTSW in the years of 2015 and 2011, respectively; Six plants for the character plant height in the year 2010 in the two progenies; Trunk diameter with 15 plants in the year 2010 for progeny TSKFL x CTSW; Seven plants for polyembryony in the year 2016 in the progeny TSKFL x CTSW; Seven plants for foliar winding in the year 2010 for the progeny TSKFL X (LCR x TR) and nine plants for the sprouting character for the progeny TSKFL x CTSW in the year 2013. It was concluded that factors, such as heterozygosity of the parents, genetic basis Character, as well as climatic factors directly influence the optimal sample size.

Keywords: Heterozygosity, agronomic characters, genetic improvement.

INTRODUÇÃO

Tamanho ótimo da amostra: conceitos e métodos

No melhoramento genético dos citros, a exemplo de outras culturas perenes, a obtenção de indivíduos de interesse agrônômico, mediante hibridação, exige a geração de progênes com elevado número de indivíduos, em razão da alta heterozigosidade presente na maioria das espécies, situação agravada pelo longo período pré-reprodutivo apresentado por boa parte dos indivíduos obtidos, que não raramente dão início à produção de frutos após cinco ou mais anos de idade (SOARES FILHO et al., 2013).

A avaliação de progênes, visando identificar cruzamentos promissores, dá-se com base em diversos caracteres, incluindo aqueles relacionados à resistência a doenças, tolerância a fatores abióticos, como tolerância à seca, vigor de planta, grau de poliembrionia, entre outros (SOARES FILHO et al., 2013). Nesse sentido, a determinação do tamanho ótimo da amostra de indivíduos dentro de progênes, mínimo necessário para a caracterização do comportamento destas em relação a caracteres de interesse agrônômico, constitui uma demanda de grande importância. Metodologias que permitam essa determinação facilitarão em muito a identificação de cruzamentos que melhor atendam aos interesses do melhoramento genético, com economia de tempo e de trabalho.

O tamanho ótimo da amostra pode ser entendido como um recurso estatístico capaz de determinar o número de indivíduos necessários para representar uma determinada progênie ou população de indivíduos, em conformidade com o caráter analisado. Segundo Silva et al. (2012) o estabelecimento do tamanho ótimo se configura como uma das maneiras de aumentar a precisão experimental e maximizar as informações obtidas. De acordo com Oliveira e Estefanel (1995) o aumento da precisão no experimento é decorrente da redução do erro experimental, que pode ser alcançada pelo uso da técnica experimental do tamanho ótimo da amostra.

Vale salientar que a maioria dos trabalhos publicados com a técnica que dá base a esta dissertação tem por objetivo definir tamanhos e formas de parcelas e não tamanho de amostras. Todavia, tais métodos podem ser utilizados em ambas as

finalidades, sem quaisquer prejuízos à precisão matemática no tratamento dos dados, somente dependendo da influência ambiental sobre os caracteres focalizados e da constituição genética (nível de homoziguidade) dos parentais empregados nos cruzamentos que darão origem às progênie que se pretende obter.

Portanto, as explicações e exemplos apresentados neste estudo, embora embasados em processos estatísticos que em princípio tratam da determinação do tamanho ótimo de parcelas experimentais, também servirão à definição de tamanhos ótimos de amostras de indivíduos que representem uma dada progênie em relação à manifestação de um determinado caráter.

Os métodos utilizados para determinar o tamanho ótimo da parcela têm como base o coeficiente de variação ($CV = \frac{S}{\bar{X}} 100$), que é uma medida que relaciona o desvio padrão em termos de porcentagem da média aritmética e as médias obtidas (BANZATTO e KRONKA, 2008). Ou seja, o CV é uma estimativa do erro experimental, em relação à média geral do ensaio (CARGNELUTTI FILHO e STORK, 2007). Trata-se de uma estatística bastante utilizada como medida de avaliação da qualidade experimental (CARGNELUTTI FILHO e STORK, 2007; BANZATTO e KRONKA, 2008). Entende-se que à medida que o CV diminui, aumenta-se o ganho na precisão do experimento e vice-versa. Assim, quanto maior a precisão experimental (maior qualidade), menores diferenças entre estimativas de médias serão significativas (CARGNELUTTI FILHO e STORK, 2007). De modo geral, o pesquisador deve buscar sempre o equilíbrio entre a precisão experimental e o custo da avaliação, sendo essa equidade um dos objetivos de tal método.

Apesar da importância do procedimento, os pesquisadores ainda hoje usam da experiência e do conhecimento que possuem a respeito da cultura com a qual trabalham para definir o tamanho e as formas das parcelas. Entretanto, muitos trabalhos já utilizam e recomendam tais ferramentas estatísticas para auxiliar neste processo.

Smith (1938) foi um dos primeiros a utilizar o método do tamanho ótimo de parcelas. Seu método consiste na lei da variância, no qual se calcula um coeficiente de regressão entre o logaritmo da variância da unidade básica e do número de unidades:

$$VU(x) = \frac{V_1}{X^b}$$

Em que: $VU(x)$ corresponde à variância por unidade básica, calculada entre as parcelas de X unidades básicas; V_1 à variância dos valores de parcelas constituídas de uma unidade básica; X é o número de unidades básicas que compõem a parcela no i -ésimo tamanho de parcela considerando, $i = 1, 2, 3, n$ e $b =$ índice de heterogeneidade do solo, sendo $0 \leq b \leq 1$ (ZANON e STORCK, 2000). Após as contribuições de Smith muitos outros autores utilizaram e modificaram a metodologia original, aperfeiçoando-a e permitindo sua utilização para diversas culturas de plantas.

O Método da Máxima Curvatura Modificado

São mencionados na literatura diferentes métodos para definição do tamanho ótimo de parcelas em culturas diferentes, cada um com sua especificidade. Zanon e Storck (2000) citam vários métodos para determinação do tamanho ótimo, tais como: Método da Máxima Curvatura, *Método* de H. Fairfield Smith, Método da Máxima Curvatura Modificado, Método da Informação Relativa, Método da Regressão Múltipla, Método de W. H. Hatheway, Método de Pimentel Gomes etc.

Apesar dessa diversidade de métodos, a determinação do tamanho ótimo de parcela parte de um princípio básico que é comum a todos os métodos propostos. Primeiramente, todos levam em consideração o coeficiente de variação da unidade básica. Posterior a isso o método consiste em montar e conduzir um experimento em branco (LORENTZ et al., 2012), onde se avaliam os dados, define-se a unidade básica (UB) do experimento e com base nos dados das UBs obtêm-se as médias.

Em seguida são calculados os coeficientes de variância em função das simulações de parcelas de tamanhos e formas diferentes, por meio da soma da produção das parcelas contíguas (LORENTZ et al., 2012). A leitura dos dados se faz a partir de gráficos onde é apresentada uma curva de dispersão, adotando-se como tamanho ótimo da parcela o valor correspondente ao ponto de inflexão da curva (LORENTZ et al., 2012; PARANAÍBA et al., 2009).

Importante estimativa do tamanho ótimo de parcela é dada pelo Método da Máxima Curvatura, que consiste em encontrar o ponto da máxima distância entre a curva formada pelos valores estimados com base na Lei de Variância de Smith

(1938) (LORENTZ et al., 2012). Uma variação desse método foi proposta por Lessman e Atkins (1963), o Método da Máxima Curvatura Modificada, que tem por base representar graficamente os coeficientes de variação de cada parcela contra os respectivos tamanhos (LUIZ da SILVA et al., 2003). O tamanho ótimo é definido algebricamente, relacionando-se o coeficiente de variância e o tamanho de parcela (NETO et al., 2004). Segundo Viana et al (2005), esse método pode proporcionar resultados mais confiáveis, por levar em consideração uma equação de regressão para explicar a relação entre os coeficientes de variação e os respectivos tamanhos de parcelas.

De acordo com Lessman e Atkins (1963), o Método da Máxima Curvatura Modificada caracteriza-se pela representação da relação entre o coeficiente de variação (CV experimental) e o tamanho da parcela, a partir da equação de regressão do tipo $Y = aX - b$, onde a variável Y representa o coeficiente de variação experimental e a variável X representa o tamanho da parcela. De acordo com a função de curvatura, determina-se o valor da abscissa, ponto em que se observa a máxima curvatura, conforme apresentado por Meier e Lessman (1971), por meio da equação:

$$X_{MC} \left[\frac{a^2 b^2 (2b-1)}{(b-2)} \right] \frac{1}{(b-2)}$$

Na qual X_{MC} representa o valor da abscissa no ponto de máxima curvatura, que corresponde à estimativa do tamanho ótimo da parcela experimental, o valor de a é uma constante da regressão e b é o coeficiente de regressão (SILVA et al., 2003).

Diversos estudos foram publicados utilizando tais métodos em diferentes culturas como: Eucalipto (*Eucalyptus saligna* Smith), batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.) Lam. var. *batatas*], café (*Coffea arabica* L.), milho (*Zea mays* L.), arroz (*Oryza sativa* L.), rabanete (*Raphanus sativus* L.) e citros (*Citrus* spp) (respectivamente, ZANON e STORCK, 2000; OLIVEIRA e ESTEFANEL, 1995; PIRES et al., 2009; RESENDE e JUNIOR, 1997; PARANAÍBA et al., 2009; OLIVEIRA da SILVA et al., 2012; SANTOS et al., 2015). Apesar da existência de vários artigos publicados com diversas culturas ainda são escassos na literatura relatos sobre estratégias de planejamento experimental para progênies de citros.

De modo geral tais métodos utilizam algoritmos para calcular o tamanho e forma das parcelas no programa Excel (Microsoft office). Entretanto propõe-se utilizar o Método da Máxima Curvatura Modificada com o auxílio de programa estatístico R para definir o tamanho da amostra em progênies de citros. Acredita-se que essa proposta possa tornar esse método ainda mais confiável, justamente por utilizar um programa estatístico em detrimento dos utilizados em planilhas de Excel. É possível que com a utilização do programa R obtenha-se mais rapidez de execução e maior confiabilidade nos trabalhos direcionados à definição do tamanho ótimo de amostras.

Altura de planta, diâmetro do tronco e vigor visual em progênies de citros

Os caracteres altura de planta, diâmetro do tronco e vigor são altamente correlacionados (BORDIGNON et al., 2003). Tais caracteres são governados por vários genes, o que os tornam altamente influenciados pelo ambiente. Isso permite antever que grandes variações na expressão fenotípica desses caracteres podem ser observadas a campo. Assim, variações nutricionais do solo, na disponibilidade de água e luz, bem como fatores bióticos, podem ser cruciais no comportamento dessas variáveis, em razão da grande influência de fatores ambientais em caracteres quantitativos.

Estudos realizados em citros por Scivittaro et al. (2004), tendo por base o trifoliata como porta-enxerto [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], demonstraram que a elevação na dose de fertilizantes de liberação lenta e o uso de fertilizantes solúveis promoveram aumento no diâmetro do tronco e de outras características nas plantas estudadas. O diâmetro do tronco pode sofrer influência direta da escassez de água na planta. Segundo Taiz e Zeigar (2009), o diâmetro de caule é resultado do crescimento do meristema secundário, que é formado por vasos condutores. Portanto, menor suprimento de água na planta leva a um menor diâmetro, por resultar em uma menor formação dos vasos condutores. Soares et al. (2015) observaram que o menor percentual de evapotranspiração real, que representa menor disponibilidade de água para cultura, em porta-enxertos de limoeiro 'Cravo

Santa Cruz' (*Citrus limonia* Osbeck) e híbrido trifoliado HTR-069, limitou o crescimento secundário em diâmetro de tais porta-enxertos.

Em citros, e em outras culturas que se baseiam em combinações copa/porta-enxerto, as interações porta-enxerto e copa também se configuram como fatores importantes na determinação de vigor, altura e diâmetro de planta. Segundo Scharfe et al. (2001), os porta-enxertos afetam diretamente o vigor das variedades copa enxertadas, influenciando seu tamanho. Reportando-se ao vigor de progênes, Soares Filho et al. (2007) mostraram que a tangerineira 'Sunki' [*C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka], seleções comum e 'da Flórida', como parentais femininos, possibilitaram a produção de progênes vigorosas.

Esposti e Siqueira (2004) verificaram, em relação ao crescimento de alguns limoeiros e tangerineiras, utilizados como porta-enxertos, que doses de nitrogênio, aplicadas em cobertura na forma de ureia, determinaram maiores altura de planta e diâmetro do caule nos primeiros, que alcançaram mais rapidamente o ponto de enxertia, sendo os limoeiros, nesse caso, considerados mais vigorosos que as tangerineiras nesse sistema de cultivo. Porta-enxertos como o trifoliata e alguns dos seus híbridos induzem menor vigor à copa, em comparação com porta-enxertos como o limoeiro 'Cravo' (SCHARFE et al., 2001). Segundo Carlos et al. (1997), o citrumelo 'Swingle' (*C. paradisi* Macfad. x *P. trifoliata*) relaciona-se à formação de indivíduos vigorosos.

Alguns porta-enxertos, como híbridos de microtangerinas, a exemplo da 'Sunki' e da 'Cleópatra' (*C. reshni* hort. ex Tanaka) cruzadas com *P. trifoliata*, são conhecidos por seu comportamento ananicante, em combinação com diferentes variedades copa (POMPEU JUNIOR e BRUMER, 2009). Tais indivíduos, naturalmente, dão formação a plantas de porte baixo, condição genética a eles associada, característica esta de interesse agrônômico, pois permite maiores adensamentos de plantio e reduções no uso de mão de obra, especialmente na colheita de frutos.

Espera-se que as variações, encontradas nesses caracteres, tenham influência direta no tamanho da amostra. Pois, pelo que se sabe, o tamanho ótimo sofre influências tanto de fatores ambientais, como dos materiais biológicos em si, assim como em função da base genética do caráter analisado.

Estresse hídrico e brotação em progênies de citros

A citricultura nordestina está concentrada nos Tabuleiros Costeiros, onde o déficit hídrico é presente em boa parte do ano, de novembro a março, período esse associado a altas temperaturas (PEIXOTO et al., 2006). Além disso, devido a camada de impedimento, formada pela própria gênese dos solos dessa grande unidade de paisagem, as plantas cítricas desenvolvem um sistema radicular pouco profundo, o que as tornam mais susceptíveis a esse estresse abiótico (PEIXOTO et al., 2006). Sabe-se que a utilização de porta-enxertos tolerante à seca, necessários em regiões com escassez hídrica regular, situação esta potencializada no semiárido, são essenciais à sustentabilidade econômica dos pomares cítricos (PEIXOTO et al., 2006).

O conhecimento das relações hídricas, das interações causadas pelo déficit hídrico no desenvolvimento das plantas e dos processos fisiológicos envolvidos é de fundamental importância, uma vez que o entendimento dos efeitos do déficit hídrico sobre os processos fisiológicos das plantas pode levar à identificação de mecanismos de adaptação.

Com base em diferenças relacionadas ao consumo de água pela planta, em diferentes estádios de desenvolvimento, é possível realizar inferências sobre aspectos fisiológicos envolvidos nesse processo, assim como sobre suas consequências (PEIXOTO et al., 2006). Sendo o estresse hídrico um caráter multigênico, quantitativo, é desafiador o entendimento de sua interferência nas reações das plantas (AMUDHA e BALASUBRAMANI, 2011).

Em se tratando da cultura dos citros, faz-se necessário conhecer a influência do porta-enxerto, na combinação copa/porta-enxerto, em relação à reação ao estresse hídrico. É interessante, também, avaliar a interferência do porta-enxerto na manifestação de brotações da variedade copa em período imediato à incidência de déficits hídricos.

As respostas observadas podem possibilitar inferências a respeito do aproveitamento da água disponível, partindo-se do pressuposto de que porta-enxertos, per se, ou combinações copa/porta-enxerto, que emitem brotações mais prontamente e em maior intensidade relacionem-se a uma maior eficiência no uso da água (SOARES FILHO et al., 2013).

O limoeiro 'Cravo' é conhecido, dentre outros atributos agrônômicos, por sua tolerância ao estresse hídrico, devido ao vigor, profundidade efetiva de seu sistema radicular e condutividade hidráulica das raízes (POMPEU JUNIOR, 2005). Em relação a esse limoeiro, a tangerineira 'Sunki', segundo Pompeu Junior (2005), possui menor tolerância à seca, enquanto que o trifoliata e o citrumelo 'Swingle' são mais suscetíveis (BASTOS et al., 2014; POMPEU JUNIOR et al., 2001). Quanto ao citrumelo 'Swingle', cabe acrescentar, o estresse hídrico severo leva variedades copa nele enxertadas a uma massiva queda de folhas, embora as plantas se recuperem muito bem durante as primeiras chuvas após a seca (brotações), característica esta importante para porta-enxertos (CARLOS et al., 1997).

Os estresses provocados pela insuficiência de água nas plantas levam a uma série de reações fisiológicas, principalmente queda na produção de frutos, enrolamento foliar, abscisão das folhas e redução da área foliar (TAIZ e ZEIGAR 2009). Em espécies de citros essa redução da área foliar e o enrolamento das folhas são características marcantes quando submetidas a longos períodos de tempo sem chuva e calor intenso, o que pode ocasionar redução da taxa fotossintética e, conseqüentemente, diminuição na produção de frutos (LECHINOSKI et al., 2007).

Poliembrionia em progênies de citros

A taxa de poliembrionia é um caráter de extrema importância na escolha de um porta-enxerto comercial. Quanto mais elevada, maiores são as chances de um porta-enxerto, quando propagado por semente, originar indivíduos de origem nucelar, semelhantes, portanto, à planta-mãe (PASSOS et al., 2006). Portanto, na formação de mudas comerciais de citros, onde se procura a maior uniformidade possível entre plantas, porta-enxertos cujas sementes possuam elevadas taxas de poliembrionia são de grande importância (PASSOS et al., 2006). Além disso, elevadas taxas de poliembrionia, devido à embriogenia nucelar, são uma garantia da formação de porta-enxertos que preservam as características da variedade que se quer propagar (CARLOS et al., 1997).

Segundo Aleza et al. (2010), o fenômeno da poliembrionia foi originalmente identificado por Leeuwenhoek em 1719, que percebeu a formação de duas ou mais

plântulas em uma mesma semente de citros. De acordo com esses autores, a poliembrião pode ser dividida em gametofítica, onde se incluem a apogamia e a aposporia, e em esporofítica, que engloba a clivagem nucelar, integumentar, monozigótica e a poliembrião de endosperma.

Trata-se de um fenômeno que ocorre em várias espécies cítricas, caracterizado pela diferenciação de células somáticas do nucelo (tecido que envolve o saco embrionário), formando, a par do embrião zigótico, um ou mais embriões, denominados nucleares, que possuem a mesma constituição genética da planta-mãe (CARLOS et al., 1997).

Kepiro e Roose (2010) estudaram a herança da frequência de poliembrião em 88 progênies de um cruzamento de [*Citrus maxima* (Burm.) Merr.] (espécie monoembriônica) × *Poncirus trifoliata* (espécie poliembriônica) e deduziram que esse caráter é dominado por poucos genes. Portanto, pode se tratar de um caráter oligogênico, que por consequência tende a sofrer reduzidas influências ambientais. A esse respeito, Soost e Roose (1996) indicaram que as espécies de *Citrus* (L.), em sua maioria, são poliembriônicas, sendo esse caráter controlado por um ou dois genes dominantes.

Em estudos realizados por Rodrigues et al. (2015) foram encontrados 100% de poliembrião para citrandarins 'Indio' e 87,5% a 58,53% para citrumelo 'Swingle' e limoeiro 'Cravo Santa Cruz', respectivamente. Entretanto, de acordo com Soares Filho et al. (2000) o limão 'Cravo', possui em média e 1,5 embrião por semente e 35,2% de sementes poliembriônicas. Já para o *P. trifoliata* a porcentagens de poliembrião é por volta de 31,5%, e números de embriões por semente de 1,4 (RAMOS et al., 2006).

Geralmente, genótipos com poliembrião intermediária tendem a apresentar maiores variações em seus valores, tendendo a ser mais estável quando apresentam poliembrião alta (acima de 90%) ou baixa (igual ou inferior a 10%). Apesar de ser dominado por poucos genes, um ou dois genes, existem variações ambientais interferindo nas porcentagens de poliembrião, possivelmente devido a ação de genes menores. Fatores ambientais são relatados como responsáveis pela variação no número de embriões por semente, o que possivelmente pode explicar as diferenças nas taxas de poliembrião encontradas pelos mencionados autores, conforme Soares Filho et al. (2000).

Santos et al. (2015), estudando o tamanho ótimo de amostra de frutos e sementes para determinação da poliembrião separaram os genótipos estudados em cinco grupos com base nas porcentagens: 12% a 30%: tangerineira 'Sunki da Flórida'; 31% a 49%: limoeiro 'Cravo Santa Cruz' e 50% a 68%: híbridos HTR-001 e HTR-054; 69% a 87%: limoeiros 'Rugoso' (*C. jambhiri* Lush.) comum e 'Jambhiri'; e 88% a 100%: limoeiro 'Rugoso da Flórida' e tangerineiras 'Cleópatra', 'Sunki Maravilha', 'Sunki Tropical' e 'Dancy' (*C. reticulata* Blanco).

Assim, variedades como o limoeiro Rugoso da Flórida e as tangerineiras Cleópatra, 'Sunki Maravilha', 'Sunki Tropical' e 'Dancy', cujas sementes apresentam alta poliembrião, possuem capacidade de dar formação a elevadas quantidades de *seedlings* (pés-francos ou plantas oriundas da germinação de sementes) de origem nucelar (SANTOS et al., 2015). Todavia, para fins de melhoramento genético, onde o interesse é a obtenção de híbridos, ou indivíduos de natureza zigótica, tais genótipos mostram-se inadequados, ao contrário da tangerineira 'Sunki da Flórida', por exemplo, cujas sementes possuem baixas taxas de poliembrião, o que a qualifica como bom parental feminino, em razão de sua capacidade de, em hibridações, dar formação a elevadas quantidades de indivíduos zigóticos (SANTOS et al., 2015).

Origem, classificação dos citros e níveis de homoziguidade

O gênero *Citrus* e seus parentes são nativos do sul e do leste da Ásia, Malásia, Nova Caledônia e Austrália (RAMADUGO et al., 2013). As espécies de tangerineiras (*C. reticulata*) têm sua provável origem no sul da China e Indonésia, a limeira ácida [*C. aurantiifolia* (Christm.) Swingle] e a toranjeira (*C. maxima*) são oriundas do Arquipélago Leste Indiano e o limoeiro verdadeiro [*C. limon.* (L.) Burm.f.] e o pomeleiro (*C. paradisi*) têm seus centros de origem ainda indefinidos. As demais espécies de *Citrus* e outros gêneros têm como centro de origem a província chinesa de Yunnan e áreas adjacentes do sul da China e norte da Indochina (CUNHA SOBRINHO et al., 2013).

O termo citros engloba espécies de seis gêneros intimamente relacionados, *Citrus*, *Poncirus* (Raf.), *Fortunella* (Swingle), *Eremocitrus* (Swingle), *Microcitrus* (Swingle) e *Clymenia* (Swingle), que fazem parte da família Rutaceae (KIM et al.,

2007). Os principais representantes desses grupos são: laranja doce [*C. sinensis* (L.) Osbeck], tangerineira (*C. reticulata*, *C. deliciosa* Ten., *C. unshiu* Marcow. e *C. clementina* hort. ex Tanaka), limoeiros verdadeiros, limeiras ácidas, como o 'Tahiti' [*C. latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka] e o galego (*C. aurantiifolia*), limeiras doces, como a lima-da-Pérsia (*Citrus limettoides* Tanaka), pomeleiros, cidreira (*C. medica* L.), laranja azeda (*C. aurantium* L.) e toranjeiras (POMPEU JUNIOR et al., 2005).

A classificação botânica atual é: "divisão Magnoliophyta, subdivisão Magnoliophytina, classe Magnoliopsida, subclasse Rosidae, ordem Sapindales subordem Geranineae, família Rutaceae, subfamília Aurantioideae, tribo Citreae e subtribo Citrineae" (PASSOS et al., 2006).

Segundo alguns autores, existem apenas três espécies verdadeiras ou espécies básicas no gênero *Citrus* sensu Swingle: citrons (*C. medica* L.) e mandarinas (*C. reticulata* Blanco) Pummelos (*Citrus maxima* (L.) Osb.) (SCORA, 1975; RAMADUGU et al., 2013). Estando as demais espécies existentes resultantes de cruzamentos dessas três espécies ou com espécies de outros gêneros. Estudos da fração I das proteínas de folhas também levaram Handa et al. (1986) a chegarem a essa afirmação. Mais recentemente em estudos feito com bandejamento cromossômico constatou-se que existem, na verdade, quatro espécies biológicas verdadeiras: *C. sunki*, *C. reshni*, *C. deliciosa* e *C. reticulata* 'Cravo' (MAHONEY e SPRINGER, 2009).

A espécie *C. 'sunki'*, parental feminino estudado neste trabalho, demonstra grande uniformidade em campo, resultado do seu maior grau de homozigidade. Condição constatada por Soares Filho et al. (2007), com estudos relacionados a frequência e vigor de híbridos. Os autores acreditam que essa espécie deve possuir níveis de homozigose mais elevados em relação à maioria das espécies do gênero *Citrus*. Estudos baseados em técnicas de bandejamento cromossômico, realizados por Cornélio et al. (2003), confirmam essa alta homozigidade.

A alta variabilidade encontrada por Barrett e Rhodes (1976), entre seleções de *P. trifoliata*, além da predominância de reproduções apomícticas levaram os autores a sugerirem que o *P. trifoliata* pode ser uma espécie oriunda de pelo menos duas raças distintas. Isso permite sugerir que possui um maior grau de heterozigidade em relação a *C. 'sunki'*, por exemplo. Por fim, acredita-se que o híbrido de limoeiro 'Cravo' comum com *P. trifoliata* (LCR x TR), parental masculino estudado, apresente o maior grau de heterozigidade entre os parentais estudados.

Acredita-se que a grande diversidade observada nas diferentes espécies cultivadas de citros seja proveniente de mutações e de alterações cromossômicas estruturais ancestrais, conservada através da embrião nucelar (IWAMASA e NITO, 1988). Em adição a essa observação, cabe destacar que a quase totalidade das espécies botânica de *Citrus* tem natureza híbrida, o que confirma a alta heterozigosidade observada nas diversas espécies.

Parentais das progênies estudadas

As progênies de citros que fundamentaram este estudo provieram de cruzamentos tendo como parental feminino a tangerineira 'Sunki', seleção 'da Flórida'. Como parentais masculinos foram utilizados o citrumelo 'Swingle' (CTSW), a seleção 'Benecke' de *P. trifoliata* (TRBK) e híbrido de limoeiro 'Cravo' comum com *P. trifoliata* (LCR x TR).

A tangerineira 'Sunki', supostamente originária da Índia, trata-se de uma microtangerina (CUNHA SOBRINHO et al., 2013). É tolerante à tristeza-dos-citros e seus frutos apresentam poucas sementes (1 a 3), tendo estas baixa poliembrião, da ordem de 8% (CASTLE e GMITTER JUNIOR, 1999; SOARES FILHO et al., 2003). Está entre as variedades porta-enxerto alternativas ao limoeiro 'Cravo', em virtude de sua tolerância ou resistência ao declínio e à morte-súbita-dos-citros e de manifestar bom comportamento agrônômico em combinação com diversas variedades copa. Sua suscetibilidade à gomose-de-*Phytophthora*, entretanto, limita seu uso como porta-enxerto (CARVALHO et al., 1997).

Essa tangerineira, a exemplo de diversas outras variedades de citros, possui variações ou seleções, em geral resultantes de mutações naturais. A 'Sunki da Flórida' é uma delas, ao lado de outras, como a 'Sunki Maravilha' (SOARES FILHO et al., 2002) e a 'Sunki Tropical' (SOARES FILHO et al., 2003).

Referindo-se ao citrumelo 'Swingle', este resultou de cruzamento envolvendo o pomelo 'Duncan' (*C. paradisi*) e *P. trifoliata*, tendo sido obtido por Walter Tennyson Swingle, em 1907 (HUTCHISON, 1974; CUNHA SOBRINHO et al., 2013). Trata-se de porta-enxerto resistente ao vírus-da-tristeza-dos-citros, a nematóides e à gomose de *Phytophthora*, além de tolerante ao frio (CASTLE e STOVER, 2001). Tem sido

muito utilizado pela citricultura brasileira, notadamente no Estado de São Paulo, em razão de sua tolerância à morte-súbita-dos-citros, entre outros atributos agrônômicos. A susceptibilidade à seca é um de seus maiores entraves (MOLINARI et al., 2003). A planta tem porte médio e seus frutos possuem grande número de sementes, 20 a 24, com alta poliembrionia (85% a 95%) (HUTCHISON, 1974).

O híbrido LCR x TR tem como parental feminino o limoeiro 'Cravo', porta-enxerto mais utilizado no Brasil, devido a diversas características desejáveis, como indução de precocidade de produção de frutos, bom desempenho em solos arenosos e argilosos, compatibilidade com a maioria das variedades copa, além da tolerância à tristeza e à seca (POMPEU JUNIOR, 2005; CUNHA SOBRINHO et al., 2013).

Quanto ao parental masculino trifoliata (*P. trifoliata*), sua utilização como porta-enxerto é expressiva no Rio Grande do Sul. As copas nele enxertadas apresentam diâmetro de tronco menor que a do porta-enxerto, o que não significa exatamente incompatibilidade (POMPEU JUNIOR, 2005). A resistência à gomose-de-*Phytophthora* é uma de suas principais características, além de menor tolerância à seca (CUNHA SOBRINHO et al., 2013). Conforme já mencionado, é comum, em citros, a ocorrência, em nível de uma dada variedade, de diferentes seleções. Os trifoliatas, nesse sentido, apresentam dezenas de seleções, dentre as quais uma é a 'Benecke'.

REFERÊNCIAS

ALEZA P, JUÁREZ J, OLLITRAULT P, NAVARRO L. Polyembryony in non-apomictic citrus genotypes. **Annals of Botany**, v. 106, p.533–545, jul 2010.

AMUDHA, J.; BALASUBRAMANI, G. Recent molecular advances to combat abiotic stress tolerance in crop plants. **Biotechnology and Molecular Biology Review**. Kota Kinabalu, v. 6, p. 31-58, 2011.

BANZATTO, D.A; KRONKA, S.N. Experimentação Agrícola. FUNESP. 4.ed, 2º impressão–Jaboticabal, 2008p. 237.

- BARRETT, H. C.; RHODES, A. M. A Numerical Taxonomic Study of Affinity Relationships in Cultivated Citrus and Its Close Relatives. **Systematic Botany**. v.2, p. 105-136, 1976.
- BASTOS, D. C.; FERREIRA, E. A.; PASSOS, O. S.; SÁ, J. F. de; ATAÍDE, E. M.; CALGARO, M. Cultivar copa e porta-enxertos para a citricultura brasileira. **Informe agropecuário**. Belo Horizonte, v. 35, n. 281, p. 36-45, 2014.
- BORDIGNON, R.; MEDINA FILHO, H. P.; SIQUEIRA, W. J.; PIO, R. M. Características da laranjeira 'valência' sobre clones e híbridos de porta-enxertos tolerantes à tristeza. **Bragantia**, Campinas, v.62, n.3, p.381-395, 2003.
- BLUMER, S.; POMPEU JUNIOR, J. Avaliação de citrandarins e outros híbridos de trifoliata como porta-enxertos para citros em São Paulo. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 32. n. 3, 2011.
- CARLOS, E. F.; STUCHI, E. S.; DONADIO, L. C. Porta-enxerto para a citricultura paulista. Jaboticabal : **Funep**, Boletim Citrícola, 1. 47 p. 1997.
- CARVALHO, M. R. T.; BORDIGNON, R.; BALLVÉ, R. M. L PINTO-MAGLIO, C. A. F e MEDINA FILHO, H. P. Aspectos biológicos do reduzido número de sementes da tangerina 'Sunki'. **Bragantia**, Campinas v. 56, n. 1, 1997.
- CASTLE, W. S.; GMITTER JUNIOR, F. G. Rootstock and scion selection. In: TIMMER, L. W.; DUNCAN, L. W. (Ed). **Citrus health management**. Lake Alfred: University of Florida, p. 21-34, Florida, 1999.
- CASTLE, WS, E STOVER. Update on use of Swingle citrumelo rootstock. unspecified HS-801, Univ of Florida, IFAS, Dept of Hort Sci/CE. 2001. Disponível em: <http://ufdcimages.uflib.ufl.edu/IR/00/00/16/62/00001/CH14800.pdf>. Acesso em: 03 de fevereiro de 2017.
- CORNÉLIO, M. T. M. N.; FIGUEIRÔA, A. R. S.; SANTOS, K. G. B.; CARVALHO, R.; SOARES FILHO, W. S.; GUERRA, M. Chromosomal relationships among cultivars of *Citrus reticulata* Blanco, its hybrids and related species. **Plant Systematics and Evolution**, Viena, v. 240, p. 149-161, 2003.
- CUNHA SOBRINHO, A. P. C.; MAGALHÃES, A. F. de J.; SOUZA, A. S.; PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W S. **Cultura dos citros**. Brasília, DF: EMBRAPA, v.1, p. 61-102, 2013.
- CARGNELUTTI FILHO, A.; STORCK, L. Estatísticas de avaliação da precisão experimental em ensaios de cultivares de milho. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.42, n.1, p.17-24, 2007.
- ESPOSTI, M. D. D.; SIQUEIRA, D. L. Doses de uréia no crescimento de porta-enxertos de citros produzidos em recipientes. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 26, n. 1, p. 136-139, Abril 2004.

HANDA, T., ISHIZAWA, Y., OOGAKI, C. Phylogenetic study of fraction I protein in the genus *Citrus* and its close related genera. **Japan Journal of Genetics**, Tokyo, n.61, p.15-24,1986.

HUTCHISON, D. J. Swingle citrumelo--a promising rootstock hybrid. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v.87, p.89-91, 1974.

IWAMASA M, NITO N. Cytogenetics and the evolution of modern cultivated citrus. In: Goren R, Mendel K (ed) Proc 6th Int: **Citrus Cong Margraf Scientific Books**, Weikersheim, p. 265–275, 1988.

KEPIRO, J.L. & ROOSE, M.L. AFLP markers closely linked to a major gene essential for nucellar embryony (apomixis) in *Citrus maxima* × *Poncirus trifoliata*. **Tree Genetics & Genomes**, V.6, p.1–11, 2010.

KIM, C. C.; BOWMAN, Y. A. C. P. M; DANG, M. N. R. S. H. J. R; SONEJI, T; GREG, M. C. F. G; GMITTER, JR. EST-SSR genetic maps for *Citrus sinensi* sand *Poncirus trifoliata*. **Tree Genetics & Genomes**, v.4, p.1-10, January 2007.

LECHINOSKI, A. L.; FREITAS, J. M. N.; CASTRO, D. S.; LOBATO, A. K. DA S.; OLIVEIRA NETO, C. F.; CUNHA, R. L. M.; COSTA, R. C. L. Influência do estresse hídrico nos teores de proteínas e aminoácidos solúveis totais em folhas de Teca (*Tectona grandis* L. f.). **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, p.927-929, 2007.

LESSMAN, K. J.; ATKINS, R. E. Optimum plot size and relative efficiency of lattice designs for grain sorghum yield tests. **Crop Sci**. Madison, v.3, n.5, p.477-481, 1963.

LORENTZ, L. H; ERICHSEN, R.; LÚCIO, A. DAL' COL. Proposta de método para estimação de tamanho de parcela para culturas agrícolas. **Rev. Ceres**, Viçosa, v.59, n.6, p. 772-780, nov/dez 2012.

Luiz da SILVA, R.; XAVIER, A.; GARCIA, H. L.; PIRES, I. E. Determinação do tamanho ótimo da parcela experimental pelos métodos da máxima curvatura modificado, do coeficiente de correlação intra-classe e da análise visual em testes clonais de eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, vol.27, n.5, p.669-676, setembro-outubro 2003.

MEIER, V.D.; LESSMAN, K.J. Estimation of optimum field plot shape and size for testing yield in *Crambe abyssinica* Hochst. **American Society of Agronomy**, Madison, v.11, n.5, p.648-650, 1971.

MOLINARI, H. B. C; BESPALHOK, J. C.; KOBAYASHI, A. K.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L.G.E. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Swingle citrumelo (*Citrus paradisi* Macf. X *Poncirus trifoliata* L. Raf.) using thin epicotyl sections. **Scientia Horticulturae**, p.379-385, 2003.

MAHONEY, CONNER L. AND SPRINGER, DOUGLAS A. GENETIC DIVERSITY. **Genetic Variation-genetics**, New York, v.1, 2009.

NETO, D. H.; SEDIYAMA, T.; SOUZA, M. A.; CECON, P. R.; YAMANAKA, C. H.; SEDIYAMA, M. A. N.; VIANA, A. E. S. Tamanho de parcelas em experimentos com trigo irrigado sob plantio direto e convencional. **Pesq. agropec. bras**, Brasília, v.39, n.6, p.517-524, jun 2004.

NEVES, F. M.; TROMBIN, V. G.; KALAKI, R. B.; LOPES, F. F. A Laranja, do campo ao Copo. Ed.1^o. **Atlas**. São Paulo, P.248, 2012.

OLIVEIRA, P. H; ESTEFANEL, V. Tamanho e forma ótima da parcela para avaliação do rendimento em experimento com batata. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.25, n.2, p. 205 – 208, 1995.

OLIVEIRA da SILVA, . L. F.; ALVES, C. K.; MORAIS, A. R.,; DINIZ, C. F.; RUIZ, Z. C. Tamanho ótimo de parcela para experimentos com rabanetes. **Rev. Ceres**, Viçosa, v.59, n.5, p. 624-629, out 2012.

PASSOS, O. S.; PEIXOTO, L. S.; SANTOS, L. C.; CALDAS, R. C.; SOARES FILHO, W. S. Caracterização de híbridos de *Poncirus trifoliata* e de outros porta-enxertos de citros no Estado da Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, p.410-413, 2006.

PARANAÍBA, P.F.; FERREIRA, D.F.; MORAIS, A.R. de. Tamanho ótimo de parcelas experimentais: proposição de métodos de estimação. **Revista Brasileira de Biometria**, v.27, p.255-268, 2009.

PEIXOTO, C. P.; CERQUEIRA, E. C.; SOARES FILHO, W. S.; CASTRO NETO, M. T.; LEDO, C. A. S.; MATOS, F. S.; OLIVEIRA, J. G. Análise de crescimento de diferentes genótipos de citros cultivados sob déficit hídrico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, p.439-443, 2006.

POMPEU JUNIOR J. Porta-enxertos. In: Mattos Junior D, De Negri JD, **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, p.63-104, 2005.

POMPEU JUNIOR, J E.; BLUMER ,S. Híbridos de trifoliata como porta-enxertos para a laranjeira 'Valência'. **Pesq. agropec. bras**. Brasília, v.44, n.7, p.701-705, 2009.

POMPEU JUNIOR, J.; LARANJEIRA, F.F. e BLUMER, S. Laranjeiras 'Valência' enxertadas em híbridos de trifoliata em Pirassununga-SP. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.35, p.27-35, 2001.

RAMADUGU, C.; PFEIL, B.E.; KEREMANE, M.L.; LEE, R.F.; MAUREIRA-BUTLER, ROOSE M.L. A six nuclear gene phylogeny of Citrus (Rutaceae) taking into account hybridization and lineage sorting. **PLOS One**, v.8, n.7, p.68-410, 2013.

RAMOS, J.D.; ARAÚJO NETO, S.E.; CASTRO, N.E.A.; MARTINS, P.C.C.; CORREIA, M.G. Poliembrião e caracterização de frutos de citrumelo 'Swingle' e de *Poncirus trifoliata*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.1, p.88-91, 2006.

RESENDE, M. D. V.; JÚNIOR, C. L. S. Número de repetições e tamanho da parcela para seleção de progênies de milho em solos sob cerrado e fértil. **Pesq agropec Bra**, Brasília, v.32, n.8, p.781-788, ago. 1997.

RODRIGUES, M. J. S.; LEDO, C. A. S.; GIRARDI, E. A.; ALMEIDA, L. A. da H.; SOARES FILHO, W. S. Caracterização de frutos e propagação de porta-enxertos híbridos de citros em ambiente protegido. **Rev. Bras. Frutic.** v. 37, n. 2, p. 457-470, 2015.

PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. Citros: o produtor pergunta, a Embrapa responde. Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**. 1º ed. p. 219, 2005.

SANTOS, C. Q. J.; GIRARDI, E. A.; VIEIRA, E. L.; LEDO, C. A. S.; FILHO, W. S. S. Tamanho ótimo de amostras de frutos e de sementes para determinação da poliembrionia em citros. **Rev. Bras. Frutic**, Jaboticabal - SP, v. 37, n. 1, p. 172-178, Março 2015.

SCIVITTARO, W. B.; OLIVEIRA, R. P. RADMANN, E. B. Doses de fertilizante de liberação lenta na formação do porta enxerto 'trifoliata. **Rev. Bras. Frutic**, Jaboticabal - SP, v. 26, n. 3, p. 520-523, Dezembro 2004.

SCORA, R. W. IX. On the history and origin of citrus. Bulletin of the Torrey **Botanical Club**, v.102, p.369 – 375, 1975.

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

LUIZ DA SILVA, ROGÉRIO; ALOISIO, X.; LEITE, H. G.; PIRES, I. E. Determinação do tamanho ótimo da parcela experimental pelos métodos da máxima curvatura modificado, do coeficiente de correlação intraclasse e da análise visual em testes clonais de eucalipto. **R. Árvore**, Viçosa-MG, v.27, n.5, p.669-676, 2003.

SILVA, Luiz Fernando de Oliveira da et al. Tamanho ótimo de parcela para experimentos com rabanetes. **Revista Ceres**, v. 59, n. 5, p.624-629, out 2012.

SOARES FILHO, W. S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. C.; PASSOS, O. S.; MOITINHO, E. D. B. 'MARAVILHA': uma nova seleção de tangerina 'Sunki'. **Rev. Bras. Frutic**, Jaboticabal - SP, v.25, n.2, p.268-271, Agosto 2003.

SOARES FILHO, W. S.; DIAMANTINO, M. S. A. S.; MOITINHO, E. D. B.; CUNHA SOBRINHO, A. P. DA.; PASSOS, O. S. 'Tropical': uma nova seleção de tangerina 'Sunki'. **Rev. Bras. Frutic**, Jaboticabal, vol. 24, n.1, Apr 2002.

SOARES FILHO, W. S.; LEDO, C. A. S.; QUINTELA, M. P.; MATTOS, L. A.; PASSOS, O. S.; SOUZA, A. S. Cruzamentos em citros: frequência e vigor de híbridos. **Rev. Bras. Frutic**, Jaboticabal – SP, v.29, n.2, p.393-398, Aug 2007.

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

SOARES, L. A. A.; BRITO, M. E. B.; FERNANDES, P. D.; LIMA,.; SOARES FILHO, W. S.; OLIVEIRA, E. S. Crescimento de combinações copa - porta-enxerto de citros sob estresse hídrico em casa de vegetação. **R. Bras. Eng. Agríc Ambiental**, v.19, n.3, p.211–217, 2015.

SOOST, R. K.; ROOSE M.L. **Citrus**. In: Janick J, Moore J. N (eds) Fruit breeding vol I: tree and tropical fruits. Wiley, New York, v. 6, p. 257–323, 1996.

SWINGLE, W. T. A new taxonomic arrangement of the Orange subfamily, Aurantioideae . **J. Wash. Acad**, v.28, p.530 -533, 1938.

SWINGLE, W. T. The botany of Citrus and its wild relatives of the orange subfamily. In: **The Citrus Industry**. Webber, H. J., and L. D. Batchelor, eds. University of California Pres. Berkeley, p. 129-474, 1946.

Taiz, L.; Zeiger, E. Fisiologia Vegetal. 4. ed, Porto Alegre: **Art Med**. 2009. p.819.

TANAKA, T. Taxonomic problem of Citrus fruits in the Orient. Bull. Univ. Osaka Pref. Ser. B. v.21, p.133-138, 1969.

VIANA, A. E. S.; SEDIYAMA, T.; CECON, P. R.; LOPES, S. C.; SEDIYAMA, M.A. N. Estimativas de tamanho de parcelas em experimentos com mandioca. **Hortic. Bras**, Brasília, v.20, n.1, p.58-63, 2005.

WEBBER, H. J. Result sof crossing Navel oranges. **Proc. Fla. State Hort**, v.7, p.749-826, 1894.

ZANON, M. L. B.; STORCK, L. Tamanho ótimo de parcelas experimentais para *Eucalyptus saligna* Smith em dois estádios de desenvolvimento. **CERNE**, v.6, n.2, p.104-111, 2000.

Capítulo 1

TAMANHO ÓTIMO DE AMOSTRA EM FUNÇÃO DOS CARACTERES: ALTURA DA PLANTA, DIÂMETRO DO TRONCO E VIGOR VISUAL EM PROGÊNIES DE CITROS

TAMANHO ÓTIMO DE AMOSTRA EM FUNÇÃO DOS CARACTERES: ALTURA DA PLANTA, DIÂMETRO DO TRONCO E VIGOR VISUAL EM PROGÊNIAS DE CITROS

Autor: Leandro Ribeiro dos Santos

Orientador: Walter dos Santos Soares Filho

Co-orientador: Carlos Alberto da Silva Ledo e Abelmon da Silva Gesteira

RESUMO: As progênies de citros apresentam base genética ampla, muito refletida em caracteres quantitativos, tais como: altura de planta e diâmetro do tronco, que possuem grandes variabilidades em pomares de citros. A alta heterozigosidade das espécies cítricas e a base genética do caráter poligênico tem influência direta no tamanho ótimo de amostra. Objetivou-se definir o tamanho ótimo de amostra para as variáveis altura de planta, diâmetro do tronco e vigor visual em três progênies de citros. O trabalho foi realizado na Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizado no Município de Cruz das Almas-Ba. Avaliaram-se três progênies oriundas dos cruzamentos do parental feminino 'Sunki da Flórida' com os respectivos parentais masculinos: o híbrido limoeiro 'Cravo' comum x *Poncirus trifoliata* TRKFL x (LCR x TR), citrumelo 'Swingle' (CTSW) e *P. trifoliata* seleção 'Benecke' (TRBK) no período de 2009 a 2016. O tamanho ótimo de amostra foi calculado pelo Método da Máxima Curvatura Modificada, com o auxílio do programa estatístico R. O maior tamanho de amostra para a variável altura de planta foi de seis, seis e cinco plantas no ano de 2010 para as três progênies. Para o caráter diâmetro do tronco o maior tamanho de amostra foram de sete e quinze plantas no ano de 2010 nas três progênies, respectivamente. Já a variável vigor visual apresentou tamanhos de amostras iguais a seis, seis e cinco plantas nos anos de 2015, 2011 e 2016 para as três progênies, respectivamente. Concluiu-se que fatores genéticos, homozigosidade, fatores ambientais e idade das plantas podem influenciar no tamanho ótimo da amostra.

Palavras-chave: homozigosidade, caráter quantitativo e progênies.

GREAT SAMPLE SIZE IN CHARACTER FUNCTION: PLANT HEIGHT, TRUNK DIAMETER AND VISUAL VALIDITY IN CITRUS PROGENIES

Author: Leandro Ribeiro dos Santos

Adviser: Walter dos Santos Soares Filho

Co-adviser: Carlos Alberto da Silva Ledo and Abelmon da Silva Gesteira

ABSTRACT: The citrus progenies have a broad genetic base, much reflected in quantitative traits such as: plant height and trunk diameter, which have great variability in citrus orchards. The high heterozygosity of the citrus species and the genetic basis of the polygenic character have a direct influence on the optimal sample size. The objective of this study was to define the optimal sample size for plant height, trunk diameter and visual vigor in three citrus progenies. The work was carried out at Embrapa Mandioca and Fruticultura, located in the Municipality of Cruz das Almas-Ba. Three progenies from the crosses of the 'Sunki' female parental of Florida were evaluated with the respective male parentheses: the common 'Cluster' lemon hybrid x *Poncirus trifoliata* TRKFL x (LCR x TR), 'Swingle' citrumelo (CTSW) and *P. Trifoliata* 'Benecke' (TRBK) in the period from 2009 to 2016. The optimum sample size was calculated by the Modified Maximum Curvature Method, with the aid of the statistical program R. The largest sample size for the plant height variable was Six, six and five plants in the year 2010 for the three progenies. For the trunk diameter character the largest sample size were seven and fifteen plants in the year 2010 in the three progenies, respectively. The visual vigor variable presented sample sizes of six, six and five plants in the years of 2015, 2011 and 2016 for the three progenies, respectively. It was concluded that genetic factors, homozygosity, environmental factors and plant age may influence the optimal sample size.

Keywords: homozygosity, quantitative character and progenies.

INTRODUÇÃO

O melhoramento genético de citros possui particularidades que o diferem de outros programas de melhoramento. As espécies de citros, em geral, possuem alta heterozigosidade, mantida, ao longo do tempo, pelo fenômeno da embrião nucelar, além da inexistência de barreiras reprodutivas entre espécies de alguns gêneros, longo período reprodutivo das plantas oriundas de sementes e a ocorrência de várias mutações que foram fixadas nas diversas espécies de citros ao longo do seu processo evolutivo (SOARES FILHO et al., 2013).

O parental 'Sunki da Flórida' é considerado uma espécie de citros verdadeira, conhecido por apresentar alta homozigosidade, o que reflete na grande uniformidade de suas plantas em campo (CORNÉLIO et al., 2003; SOARES FILHO et al., 2007). O *Poncirus trifoliata*, apesar de apresentar boa uniformidade em suas plantas, acredita ser mais heterozigoto em comparação à 'Sunki da Flórida', possivelmente um híbrido proveniente do cruzamento entre, pelo menos, duas raças distintas (BARRETT e RHODES, 1976). Acredita-se que o híbrido de limoeiro 'Cravo' comum com *P. trifoliata* (LCR x TR), apresente o maior grau de heterozigosidade entre os parentais estudados. Por serem heterozigóticas, as espécies de citros, com raras exceções, apresentam alta taxa de segregação genética (BASTIANEL et al., 2006). Como consequência, é grande a desuniformidade das progênies a campo, além das variações encontradas em muitos descritores agronômicos.

Sabe-se que características como altura de planta, diâmetro do tronco e vigor visual, este último por levar em conta todo o aspecto da planta, são características determinadas por vários genes e, portanto, apresentam grande variação. Além dos efeitos que diferentes genes somam para a variação de um fenótipo poligênico de importância agronômica, fatores ambientais diversos também podem contribuir para essa variabilidade (BENIN et al., 2005; PIMENTEL et al., 2013).

Usualmente é impraticável observar uma população inteira de plantas, seja pelo alto custo ou por dificuldades operacionais. Além disso, é limitante a avaliação de grande número de genótipos devido à disponibilidade de tempo, mão de obra, recursos financeiros e humanos (SANTOS et al., 2015). Sobre tudo quando se trata de avaliações de experimentos em programas de melhoramento genético de citros,

em que é comum a análise de muitos caracteres em cada genótipo e que a quantidade de indivíduos é quase sempre muito grande. Por isso existe a necessidade do uso de técnicas de amostragem, que deve ser bastante representativa para que assim possa ser generalizada para toda a população de forma eficiente.

Na determinação do tamanho da amostra visam-se justamente à redução do erro experimental além da redução do número de indivíduos a serem avaliados, o que facilita e agiliza o processo de medições dos caracteres (STORCK et al., 2006).

Vários fatores influenciam na determinação do tamanho ótimo da amostra. De modo geral fatores como heterogeneidade do solo, do material vegetal, competições intraparcelar e interparcelar, amostragem na parcela além do carácter a ser analisado são alguns dos muitos fatores que podem influenciar nesse índice (STORCK et al., 2006).

Existem vários métodos citados na literatura, entretanto, o da máxima curvatura modificada proposto por Lessman e Atkins (1963) é o mais indicado para este trabalho por gerar resultados mais confiáveis (LUIZ da SILVA et al., 2003). Este método é fundamentado na modificação do método de Smith (1938), por meio do ajuste da equação geral $CV(x) = \frac{A}{x^b}$.

A partir desse método, a relação entre o coeficiente de variação (CV) e o tamanho de amostra com X unidades básicas é explicado pelo modelo $CV = aX - b$, em que a e b são os parâmetros a serem estimados. A partir da função de curvatura dado por esse modelo determina-se o valor da abscissa onde ocorre o ponto de máxima curvatura. Em que X_0 é o valor da abscissa no ponto de Máxima Curvatura, o qual corresponde à estimativa do tamanho ótimo da parcela experimental (LIMA et al., 2007).

Portanto, a fim de determinar o tamanho ótimo de amostra em três progênies de citros, tendo-se por base o grau de homozigidade dos parentais destas progênies o objetivo deste trabalho foi determinar o tamanho ótimo da amostra, a partir do Método da Máxima Curvatura Modificada, para os caracteres altura de planta, diâmetro do tronco e vigor visual de planta.

MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado na Embrapa Mandioca e Fruticultura, situado no Município de Cruz das Almas, Recôncavo Baiano nas coordenadas geográficas 12°40'19" de latitude sul, 39°06'23" de longitude oeste com altitude de 226 m, em ambiente representativo da grande unidade de paisagem de Tabuleiros Costeiros. Sendo que o plantio foi iniciado no mês de outubro de 2007 através de polinizações controladas, mantendo a individualidade dos parentais femininos e masculinos, utilizando os acessos do Banco Ativo de Germoplasma de citros (BAG citros).

O solo da área experimental é considerado bastante profundo, bem intemperizado, oriundo de sedimentos da formação Capim Grosso de baixa fertilidade química, classificado como Latossolo Amarelo distrófico típico, textura argilosa a moderada, ácido, com declividade entre 10% e 15% (SOARES FILHO et al., 2007). O clima da região é com evapotranspiração potencial média anual maior do que a precipitação média anual, estação seca de verão e temperatura média superior a 22°C no mês mais quente do ano, onde a umidade relativa média anual se encontra em torno de 80% (D'ANGIOLELLA et al., 1998 apud SOARES FILHO et al., 2007).

Foram utilizadas três progênies de citros oriundas dos cruzamentos do parental feminino 'Sunki da Flórida' com os respectivos parentais masculinos: 1 - o híbrido (limoeiro 'Cravo' comum x *Poncirus trifoliata*) ou TSKFL x (LCR x TR), 2 - Citrumelo 'Swingle' (CTSW) e 3 - *P. trifoliata* seleção 'Benecke' (TRBK).

Foram avaliados no período de 2009 a 2016 os caracteres: vigor visual, mediante o uso de uma escala de notas apresentada na Figura 1, altura da planta, com o auxílio de uma régua graduada (cm) e o diâmetro do caule, medida a 10 cm do colo da planta (zona de transição entre o sistema radicular e a parte aérea), com o auxílio de um paquímetro de madeira graduado (cm).



Figura 1: Escala de notas para avaliação do vigor visual considerando como mais vigorosos os indivíduos que, independente do tamanho da planta, apresentavam-se com muitas folhas, sem deficiência nutricional e sintomas de doenças. 1 (plantas independente da altura com vigor ruim), 2 (plantas independente da altura com vigor médio) e 3 (plantas independente da altura com vigor bom).

O espaçamento do experimento foi 2 x 3 metros, totalizando uma área de 2880 m². O delineamento foi inteiramente casualizado. Foram avaliadas 76 plantas para o cruzamento TRKFL x (LCR x TR), 195 plantas para o cruzamento TRKFL x CTSW e 50 plantas para o cruzamento TSKFL x TRBK. Em que cada planta foi considerado uma unidade básica.

Para a confirmação do grau de homozigidade dos parentais foi realizado a análise molecular, utilizando-se 12 *primers* do tipo microssatélites (k36, k54, k66, k72, k74, k76, k78, k 36, 109, 226, k28 e k30). A extração de DNA seguiu o protocolo Murray e Thompson (1980) com modificações. Foram coletadas em campo folhas jovens dos quatros parentais, as mesmas foram levadas ao laboratório onde foram lavadas com água corrente, enxaguada com água destilada e seca em papel toalha. Foram utilizados 10 amostras de DNA com três repetições totalizando 30 amostras. O programa de Power Marker foi utilizado para estimação número de alelos, frequência alélica e heterozigidade (LIU e MUSE, 2005).

O tamanho ótimo de amostra foi calculado pelo Método da Máxima Curvatura Modificado, proposto por Lessman e Atkins (1963), realizadas com o auxílio do programa estatístico R (R CORE TEAM, 2014).

Por esse método, a relação entre o coeficiente de variação (CV) e o tamanho da parcela com X unidades básicas é explicado pelo modelo $CV = aX - b$, em que a e b são os parâmetros a serem estimados. A partir da função de curvatura dada por esse modelo, determinou-se o valor da abscissa onde ocorre o ponto de

máxima curvatura, dada por: $X = \exp \left\{ \frac{1}{2b+2} \log \left[\frac{(ab)^2(2b+1)}{b+2} \right] \right\}$, em que X é o valor da abscissa no ponto de máxima curvatura, o qual corresponde à estimativa do tamanho ótimo da parcela experimental (MEIER e LESSMAN, 1971).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O valor de F (coeficiente de endogâmia) diz o quanto um genótipo é homozigoto a partir de uma escala que varia de zero a um, onde um é o maior grau de homozigose. Os estudos moleculares mostraram que o parental ‘Sunki da Flórida’ foi quem apresentou o maior grau de homozigosidade, com maior endogamia, condição esperada já que se trata de uma espécie verdadeira, seguido pelo *P. trifoliata* seleção ‘Benecke’, o híbrido LCR x TR e por último o citrumelo ‘Swingle’ (Tabela 1).

Tabela 1. – Resultado da análise molecular dos parentais estudados apresentando número de alelos encontrado, frequência alélica e coeficiente de endogamia.

Genótipos*	Número de Alelos	Maior frequência alélica	Valor de F**
TSKFL	3	0,375	1,000
CTSW	3	0,556	0,297
TRBK	2	0,750	0,615
LCR x TR	4	0,500	0,379
Média	3	4,000	0,580

*Tangerineira ‘Sunki’, seleção ‘da Flórida’ (TSKFL), citrumelo ‘Swingle’ (CTSW), seleção ‘Benecke’ de *P. trifoliata* (TRBK) e híbrido de limoeiro ‘Cravo’ comum com *P. trifoliata* (LCR x TR). **Coeficiente de endogamia.

Foi observado que o maior tamanho da amostra para a progênie TSKFL x (LCR x TR) foi obtido no ano de 2010, para o caráter diâmetro do tronco com sete plantas (Tabela 2). Resultado parecido foi encontrado por Zanon e Storck (2000), para o mesmo caráter com a espécie *Eucalyptus saligna* Smith.

Tabela 2 - Estimativas dos parâmetros a e b , tamanho ótimo da amostra (X_0) de indivíduos da progênie tangerineira ‘Sunki da Flórida’ com o híbrido de limoeiro ‘Cravo’ comum com *P. trifoliata* TSKFL x (LCR x TR) relativo ao caráter vigor, altura e diâmetro de planta e coeficiente de variação CV%.

Anos	Vigor				Altura				Diâmetro			
	a	b	X_0	CV%	a	b	X_0	CV%	a	b	X_0	CV%
2010	13,22	0,48	3,2	7,5	34,19	0,50	6,2	13,8	37,99	0,50	6,6	14,7
2011	8,52	0,51	2,5	5,3	31,07	0,49	5,8	13,1	34,46	0,50	6,2	13,8
2015	30,60	0,49	5,7	12,8	17,56	0,50	3,9	8,9	32,24	0,50	5,9	13,2
2016	23,90	0,49	4,8	11,1	27,60	0,50	5,3	12,0	30,45	0,51	5,7	12,3

** Estimativas dos parâmetros da equação de Smith (1938), por meio do ajuste da equação geral $CV(x) = \frac{A}{x^b}$.

Para o cruzamento TSKFL x CTSW e TSKFL x TRBK o maior tamanho da amostra foi também para o caráter diâmetro do tronco com 15 plantas para o ano de 2010 (Tabela 4 e 5). Conhecer o maior tamanho de amostra pode ser interessante, pois a partir deste pode se ter inferências sobre a maior ou menor influências dos fatores sobre o caráter avaliado.

De modo geral características como essas tendem a sofrer maior influência do ambiente por se tratar de um caráter poligênico. Sahin-Cevik e Moore (2012), estudando características quantitativas no gênero *Citrus*, comprovaram se tratar de uma variável determinada por vários genes. De certa forma o tamanho da amostra tende a variar em função da base genética do caráter e dos fatores ambientais, principalmente precipitação e temperatura (Tabela 3).

Tabela 3 - Dados climáticos para os anos de 2009 a 2015, referentes à precipitação, umidade relativa do ar (UR) e temperatura média.

Anos/Média	Precipitação	Umidade relativa	Temperatura
2009	2,46	81,47	25,67
2010	3,1	82,13	23,26
2011	3,44	85,1	24,61
2012	1,92	80,17	24,85
2013	6,52	82,1	25,19
2014	2,99	84,17	24,82
2015	2,95	76,28	25,47

Fonte: Embrapa Mandioca e Fruticultura - Setor de climatologia.

O carácter altura de planta, que na literatura apresenta como diretamente relacionado com diâmetro do tronco, apresentou resultados diferentes destes com tamanho ótimo de seis plantas para o ano de 2011, seis plantas para o ano 2010 e cinco plantas para o ano 2010 nas progênies TSKFL x (LCR x TR), TSKFL x CTSW e TSKFL X TRBK, respectivamente (tabelas 2, 4 e 5).

Esses dados corrobora com Lima et al. (2007) que encontrou como número ótimo igual a seis plantas, para a mesma variável com a espécie de mamoeiro (*Carica papaya* L.). Freitas et al. (2001) realizando estudos com algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) chegaram a conclusão de que tamanhos de amostras iguais a seis ou mais plantas representam bem o carácter altura de planta o que condiz com os resultados obtidos neste trabalho. Toda via vale salientar que cada cultura pode apresentar tamanhos de amostras diferentes em função do delineamento experimental, tratos culturais, expassamentos etc.

Observa-se ainda que tanto para a variável altura de planta quanto para o diâmetro do tronco ao longo desses quatros anos de avaliações os tamanhos de amostras foram diminuindo, com o maior tamanho de amostra, justamente, no ano de 2010 (primeiro ano de avaliação) (Tabelas 2, 4, 5 e 6).

Tabela 4 - Estimativas dos parâmetros a e b** do tamanho ótimo de amostra, (X_0) de indivíduos da progênie tangerineira ‘Sunki da Flórida’ com citrumelo ‘Swingle’ (TSKFL x CTSW), relativamente aos caracteres vigor e altura de planta e diâmetro do tronco e coeficiente de variação.

Anos	Vigor				Altura				Diâmetro			
	a	b	X_0	CV%	a	b	X_0	CV%	a	b	X_0	CV%
2010	27,56	0,48	5,3	12,2	36,18	0,50	6,4	14,3	1,25	4,81	14,7	34,3
2011	37,14	0,49	6,5	14,8	35,02	0,50	6,3	14,0	38,50	0,51	6,7	14,6
2015	34,84	0,50	6,2	13,9	27,23	0,50	5,3	11,9	39,88	0,50	6,9	15,6
2016	33,62	0,49	5,8	13,7	22,31	0,50	4,6	10,4	34,32	0,49	6,2	13,9

** Estimativas dos parâmetros da equação de Smith (1938), por meio do ajuste da equação geral $CV(x) = \frac{A}{x^b}$.

Acredita-se que isso se deve a idade das progênies quatro e três anos, respectivamente. Justifica-se que nos primeiros anos de vida das plantas, elas

possuem um crescimento mais acelerado, se estabilizando à medida que vão chegando a fase adulta (frutificação). É sabido também que as plantas cítricas apresentam um longo período de juvenildade e isso pode interferir no tamanho da amostra.

Tabela 5 - Estimativas dos parâmetros a e b e tamanho ótimo de amostra (X_0) da progênie tangerineira 'Sunki', seleção 'da Flórida' com o parental masculino *P. trifoliata* seleção 'Benecke' TSKFL X TRBK, para os caracteres vigor, altura e diâmetro de plantas e coeficiente de variação CV%.

Anos	Vigor				Altura				Diâmetro			
	a	b	X_0	CV%	a	b	X_0	CV%	a	b	X_0	CV%
2010	8,1	0,48	2,5	5,7	28,34	0,50	5,5	11,9	1,33	5,08	15,2	33,3
2011	10,62	0,47	2,8	6,5	21,24	0,49	4,1	10,0	29,09	0,49	5,5	12,5
2015	27,16	0,49	5,3	11,9	19,61	0,48	4,2	9,8	36,63	0,49	6,4	14,7
2016	28,62	0,51	5,5	11,9	18,06	0,48	4,0	9,2	32,82	0,50	6,0	13,2

** Estimativas dos parâmetros da equação de Smith (1938), por meio do ajuste da equação geral $CV(x) = \frac{A}{x^b}$.

Embora boa parte das características avaliadas em uma planta apresente herança mendeliana simples (monogênica), é importante salientar que para a maioria dos fenótipos observados, a exemplo de caracteres de interesse agrônômico, nas populações naturais não segregam de forma monogênica, o que significa que a variabilidade fenotípica observada em vários traços hereditários é resultado da ação de vários genes, por exemplo, altura de planta e diâmetro do tronco, e não apenas da interação de um par de alelos (PIMENTEL et al., 2013).

É pertinente distinguir ainda heranças quantitativas contínuas, ou seja, se distribuem de maneira gradual entre dois extremos, altura de planta e diâmetro do tronco, por exemplo, de heranças quantitativas categóricas, em outras palavras podem ser separadas em classes, é o que ocorre com o caráter vigor visual avaliado neste trabalho.

O vigor visual é avaliado a partir do aspecto da planta e é dado nota três para o vigor considerado bom, dois para vigor médio e um para vigor ruim. Foi possível observar que esta variável apresentou comportamentos diferentes nas três progênies.

A progênie TSKFL x (LCR x TR) apresentou três plantas como tamanho ótimo de amostra para o ano de 2010 e duas plantas para o ano de 2011, já para o

ano de 2015 foram seis plantas, demonstrando o maior tamanho de amostra para este último ano.

Tamanho de amostra muito pequena significa que houve pouca ou nenhuma variação entre as plantas avaliadas. A progênie TSKFL X TRBK, por exemplo, para os anos de 2010 e 2011 apresentou baixo tamanho de amostra. Essas progênies para os dois anos em questão exibiu um vigor elevado (igual a três), que de acordo com a escala de notas de avaliação é considerada um vigor bom.

Esse baixo valor de tamanho de amostra pode ser um reflexo também da alta homoziguidade dos parentais, uma vez que a 'Sunki da Flórida', como parental feminino, possui alta homoziguidade e o *Poncirus trifoliata* seleção 'Beneke' possui relativa homoziguidade (Tabela 1). Isso parece ter influenciado nos valores do tamanho ótimo de amostra.

Entretanto, a progênie TSKFL x CTSW apresentou maiores tamanhos de amostras para todos os anos avaliados. Isso se deve, possivelmente, ao maior grau de heteroziguidade do parental masculino citrumelo 'Swingle' em comparação aos outros parentais (Tabela 1). Essa progênie apresenta grande desuniformidade em campo, o que leva a considerar esse o fator principal para tamanhos ótimos de amostra mais elevados nos quatro anos de avaliações.

De modo geral as três variáveis estudadas, nas três progênies, nos quatro anos de avaliações, não apresentaram tamanhos de amostras elevados, o que demonstra uma uniformidade nos dados coletados (Tabela 6). E isso permite inferir um único tamanho ótimo da amostra para as três progênies (Tabelas 2, 4 e 5). Considerando-se o maior tamanho ótimo de amostra como o ideal.

Quando analisadas as três progênies em conjunto, foi possível identificar que a característica diâmetro do tronco continuou sendo a que apresentou o maior tamanho ótimo de amostra (14 plantas) (Tabela 6). Talvez por ser influenciada pelos tamanhos de amostras das progênies analisadas individualmente (Tabelas 2, 4 e 5).

A progênie TSKFL x TRBK foi a que apresentou os menores tamanhos de amostras quando considerado as três variáveis, exceto para o caráter diâmetro do tronco no ano de 2010 (Tabela 5). Esses resultados já eram esperados, pois são os parentais com maiores graus de homoziguidade. A progênie TSKFL x (TR x LCR) também apresentou pouca variação onde se observa que apenas sete plantas é o suficiente para representar essa progênie para os três caracteres avaliados (Tabela

4). Por fim, acredita-se que a progênie TSKFL x CTSW foi a que demonstrou maiores tamanhos de amostra em cada variável analisada (Tabela 4).

Vale salientar que a quantidade de plantas avaliadas nas progênies de citros foram muito maiores do que os tamanhos ótimos de amostras encontrados neste trabalho. A progênie TSKFL x TRBK, por exemplo, foram avaliadas 50 plantas, mas apresentou apenas 15 plantas como tamanho ótimo de amostra, o que demonstra uma redução na quantidade de plantas necessárias. Essa redução na quantidade de plantas necessárias já era esperada, tendo em vista que a utilização do método é justamente essa. Com isso, constata-se que o Método da Máxima Curvatura Modificada possibilita uma redução de mão de obra, espaço, tempo e, por consequência, menor custo.

Tabela 6 - Estimativas dos parâmetros a e b** e tamanho ótimo de amostra (X_0) das três progênies TSKFL x (LCR X TR)*; TSKFL X CTSW*; TSKFL X TRBK* para os caracteres vigor, altura de planta e diâmetro do caule e coeficiente de variação CV%.

Anos	Vigor				Altura				Diâmetro			
	a	b	X_0	CV%	a	b	X_0	CV%	a	b	X_0	CV%
2010	24,73	0,50	5,0	11,0	41,08	0,49	7,0	15,6	1,21	5,09	14,3	31,3
2011	31,07	0,50	5,8	12,8	34,55	0,50	6,2	13,9	39,88	0,50	6,8	15,0
2015	32,93	0,50	6,0	13,4	25,42	0,50	5,1	11,2	39,88	0,50	6,8	15,3
2016	31,15	0,49	5,8	13,1	23,43	0,50	4,8	10,6	32,97	0,49	6,0	13,6

*Tangerineira 'Sunki', seleção 'da Flórida'. Como parentais masculinos foram utilizados o citrumelo 'Swingle' (CTSW), *P. trifoliata* seleção 'Benecke' (TRBK) e híbrido de limoeiro 'Cravo' comum com *P. trifoliata* (LCR x TR). ** Estimativas dos parâmetros da equação de Smith (1938), por meio do ajuste da equação geral $CV(x) = \frac{A}{x^b}$.

As avaliações envolvendo tamanho ótimo de amostra sofrem a influência de variações ambientais, em função da base genética do caráter avaliado, bem como do nível de homozigiosidade do material genético estudado, o que torna necessária a realização de diversas avaliações ao longo do tempo, até que o material vegetal tenha seu desenvolvimento estabilizado.

Fatores ambientais e genéticos podem influenciar o tamanho ótimo da amostra como foi observado nos caracteres altura de planta e diâmetro do tronco

para o ano de 2010, principalmente, que apresentou o maior tamanho da amostra (Tabela 6).

Fatores como homoziguidade, condições climáticas e idade das plantas também são fatores muito relevantes no momento de definir-se o tamanho ótimo da amostra. Por exemplo, para os caracteres avaliados: vigor visual, altura de planta e diâmetro do tronco o tamanho ótimo de amostra foi de seis, sete e 15 plantas, respectivamente. Entretanto, se considerar as três variáveis em conjunto recomenda-se um tamanho de amostra em torno de 18 plantas, nas condições ambientais e genéticas apresentadas.

Todavia, se considerar cada progênie individual para os três caracteres pode-se dizer que sete plantas são suficientes para representar a progênie TSKFL x (LCR x TR) (Tabela 2). Já para as progênies TSKFL x CTSW e TSKFL x TRBK necessitam de 15 plantas para que se representem as três variáveis estudadas (Tabelas 4 e 5).

CONCLUSÃO

O Método da Máxima Curvatura Modificada possibilitou tamanho de amostra muito menor do que o número de plantas avaliadas, o que comprova a eficiência em reduzir custo, espaço, mão de obra e tempo.

O tamanho ótimo de amostra para o caráter vigor visual foi igual a seis plantas, para o caráter altura de planta foi igual a sete plantas e para o caráter diâmetro do tronco foi igual a 15 plantas.

A grau de homoziguidade dos parentais além da base genética dos parentais também são fatores que podem influenciar nos tamanhos ótimos de amostras.

REFERÊNCIAS

- BARRETT, H. C.; RHODES, A. M. A Numerical Taxonomic Study of Affinity Relationships in Cultivated Citrus and Its Close Relatives. **Systematic Botany**, v.2, p.105-136, 1976.
- BASTIANEL, M.; OLIVEIRA, A, C.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M, A, Diversidade genética entre híbridos de laranja-doce e tangor 'Murcott' avaliada por AFLP e RAPD. **Pesq. Agropec. Bras**, Brasília, v.41, n.5, p.779-784, maio 2006.
- BENIN, G.; Carvalho, F. I. F.; Oliveira, A. C.; Lorencetti, Cláudio.; et al. Adaptabilidade e estabilidade em aveia em ambientes estratificados. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, p.295-302, 2005.
- CORNÉLIO, M.T.M.N.; FIGUEIRÔA, A.R.S.; SANTOS, K.G.B.;CARVALHO, R.; SOARES FILHO, W. S.; GUERRA, M. Chromosomal relationships among cultivars of *Citrus reticulata* Blanco, its hybrids and related species. **Plant Systematics and Evolution**, Viena, v. 240, p.149-161, 2003.
- FREITAS, J. A.; SILVA, E. B.; FALLIERI, J.; LANZA, M. A.;PETRÔNIO, R. S. F.; SILVA, J. Tamanho de amostra na parcela para caracterização da altura de plantas de algodoeiro herbáceo *Gossypium hirsutum*. **Cienc. Rural**, vol.31, n. 4 Santa Maria July/Aug. 2001.
- LESSMAN, K. J.; ATKINS R.E.. Optimum plot size and relative efficiency of lattice designs for grain sorghum yield tests. **Crop Science**, v.3, p.477-481, 1963.
- LIMA, J. F.; Peixoto, C. P.; Ledo, C. A. S.; Faria, G. A. Tamanho ótimo de parcela para experimentos com plantas de mamoeiro em casa de vegetação. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.5, p.1411-1415, 2007.
- Liu, K.; Muse, S. V. Power Marker: An integrated analysis environment for genetic marker data. **Bioinformatics**, v.21, p.2128-2129, 2005.
- LUIZ da SILVA, R.; XAVIER, A.; GARCIA, H. L.; PIRES, I. E. Determinação do tamanho ótimo da parcela experimental pelos métodos da máxima curvatura modificado, do coeficiente de correlação intra-classe e da análise visual em testes clonais de eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, vol.27, n.5, p.669-676, setembro-outubro 2003.
- MAHONEY, CONNER L. AND SPRINGER, DOUGLAS A. Genetic diversity. **Genetic variation-genetics**, New York, v.1, 2009.
- MEIER, V. D.; LESSMAN, K. J. Estimation of optimum field plot shape and size for testing yield in *Crambe abyssinica* Hochst. **Crop Science**, v.11, p.648-650, 1971.
- MURRAY, H.G.; THOMPSON W.F. Rapid isolation of high molecular weight DNA. **Nucleic Acids Res**, v.8, p.4321-4325, 1980.

PIMENTEL, M. M. G.; GALLO, M. C. V.; SANTOS-REBOUÇAS, C. B. Genética essencial. Rio de Janeiro: **Guanambara Koogan**, p. 291, 2013.

ŞAHIN-CEVIK, M. MOORE, G. A. Quantitative trait loci analysis of morphological traits in Citrus. **Plant Biotechnol**, v.6, p.47–57, 2012.

R CORE TEAM. R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2014. Disponível em: <http://www.R-project.org/>.

SANTOS, C. Q. J.; GIRARDI, E. A.; VIEIRA, E. L.; LEDO, C. A. S.; FILHO, W. S. S. Tamanho ótimo de amostras de frutos e de sementes para determinação da poliembrionia em citros. **Rev. Bras. Frutic**, Jaboticabal -SP, v.37, n.1, p.172-178, Março 2015.

SMITH, H. F. An empirical law describing heterogeneity in the yields of agricultural crops. **J. Agricul. Sci**, Cambridge, v.28, p.1-23, 1938

SOARES FILHO, W.; LEDO, C. A. S.; QUINTELA, M. P.; MATTOS, L. A.; PASSOS, O. S.; SOUZA, A. S. Cruzamentos em citros: frequência e vigor de híbridos. **Rev. Bras. Frutic**, Jaboticabal, vol.29, no.2, Aug, 2007.

SOARES FILHO, W. S.; CUNHA SOBRINHO, A. P.; PASSOS, O. S.; SOUZA, A. S. Melhoramento Genético. In: CUNHA SOBRINHO, A. P. (Ed.). **Cultura dos citros**. Brasília: Embrapa, v.1, p.61-102 2013.

STORCK, F. S. L.; LÚCIO, A. DAL ' COL.; LOPES, S. J. Heterogeneidade do solo e de tamanho de amostra antes e após cultivos com abobrinha italiana em estufa plástica. **Ciência Rural**, v.36, n.6, p. 1744 – 1748. Santa Maria, 2006.

ZANON, M. L. B; STORCK L. Tamanho ótimo de parcelas experimentais para *Eucalyptus saligna* Smith em dois estádios de desenvolvimento. **Cerne**, V.6, p.104-111, 2000.

Capítulo 2

TAMANHO ÓTIMO DE AMOSTRA EM FUNÇÃO DO CARÁTER POLIEMBRIONIA EM PROGÊNIES DE CITROS

TAMANHO ÓTIMO DE AMOSTRA EM FUNÇÃO DO CARACTER POLIEMBRIONIA EM PROGÊNIES DE CITROS

Autor: Leandro Ribeiro dos Santos

Orientador: Walter dos Santos Soares Filho

Co-orientador: Carlos Alberto da Silva Ledo e Abelmon da Silva Gesteira

RESUMO: A poliembrionia é um fenômeno pelo qual embriões adventícios originam-se a partir de tecidos nucelares da semente, com mesma constituição genética da planta-mãe. Característica de grande importância para cultura do citros, em que a alta porcentagem é indicada para propagação, via sementes, de genótipos promissores, ao passo que para obtenção de híbridos a poliembrionia é um fator dificultador. Portanto, buscou-se definir o tamanho ótimo da amostra para o caráter poliembrionia em duas progênies de citros. O trabalho foi realizado na Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizado no Município de Cruz das Almas-BA. Avaliaram-se duas progênies oriundas dos cruzamentos do parental feminino 'Sunki da Flórida' com os respectivos parentais masculinos: o citrumelo 'Swingle' (CTSW) e *P. trifoliata* seleção 'Benecke' (TRBK) no período de 2009 a 2016. Foi coletado dez frutos de cada planta, retiradas e abertas às sementes para contagem dos embriões, por contagem direta. O tamanho ótimo de amostra foi calculado pelo Método da Máxima Curvatura Modificado no programa estatístico R. O maior tamanho de amostra foi de sete plantas para a progênie TSKFL X CTSW e cinco para a progênie TSKFL x TRBK, ambas para o ano de 2016. Conclui-se que poliembrionia intermediária, entre 10% a 90%, sofre maiores variações ambientais e por consequência apresenta maiores tamanhos de amostra e que porcentagens de poliembrionia altas ou baixas apresentaram menores tamanhos de amostra.

Palavras-chave: número de plantas, embriões nucelares e citricultura.

GREAT SIZE OF SAMPLE BASED CHARACTER POLYEMBRYONY IN CITRUS PROGENIES

Author: Leandro Ribeiro dos Santos

Adviser: Walter dos Santos Soares Filho

Co-adviser: Carlos Alberto da Silva Ledo and Abelmon da Silva Gesteira

ABSTRACT: Polyembryony is a phenomenon by which adventitious embryos originate from nucellar tissues of the seed, with the same genetic constitution of the mother plant. Characteristic of great importance for citrus cultivation, in which the high porcentage is indicated for propagation, via seeds, of promising genotypes, whereas for hybrids the polyembryony is a difficult factor. Therefore, we attempted to define the optimal sample size for the polyembryonic character in two citrus progenies. The work was carried out at Embrapa Mandioca and Fruticultura, located in the Municipality of Cruz das Almas-BA. Two progenies from the crosses of the female parental 'Sunki of Florida' with the respective male parents were evaluated: the citrumelo 'Swingle' (CTSW) and *P. trifoliata* selection 'Benecke' (TRBK) from 2009 to 2016. It was collected Ten fruits of each plant, removed and opened to the seeds to count the embryos, by direct counting. The optimal sample size was calculated by the Modified Maximum Curvature Method in the statistical program R. The largest sample size was seven plants for the TSKFL X CTSW progeny and five for the TSKFL x TRBK progeny, both for the year 2016. Concludes Intermediate polyembryony, between 10% and 90%, suffers from greater environmental variations and therefore has larger sample sizes and higher or lower polyembryony percentages presented smaller sample sizes.

Key words: number of plants, nucellar embryo and citriculture.

INTRODUÇÃO

A elevada produção de sementes é uma característica de grande valor para programas de melhoramento genético de citros, principalmente quando se tem o interesse de propagar um determinado genótipo promissor. Essa elevada produção, geralmente, está atrelada a capacidade de frutificação do genótipo que, por sua vez, é intimamente ligado à polinização, hormônios envolvidos no processo e o teor de carboidratos da planta (GOLD SCHMIDT, 1999).

O número de sementes em uma planta é determinado tanto por fatores ambientais quanto por biológicos. Siviero et al. (2002) estudou o mapeamento de QTLs associados à produção de frutos e sementes em híbridos de Citrus 'sunki' [*C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka] x *Poncirus trifoliata* (Raf.) e constataram que se tratava de uma característica de natureza oligogênica.

A poliembrionia é um tipo de apomixia muito comum nas espécies cítricas, sendo seu caráter, determinado por dois genes dominantes, em que a poliembrionia é dominante sobre a monoembrionia. Todavia, acredita-se que existem outros genes com pequenos efeitos sobre essa dominância, exercendo variações na poliembrionia de acordo com a natureza do material genético e influências ambientais (SOARES FILHO et al., 2014).

Em culturas perenes, como é o caso dos citros, a alta produção de sementes, além do carácter poliembrionia constituem-se como importantes características em variedades candidatas à porta-enxerto (Guerra et al., 2012; SOARES FILHO et al., 2003). A poliembrionia é um fenômeno no qual as sementes são originadas a partir do tecido nucelar do ovário, situado em volta ao saco embrionário, em que se iniciando por crescimentos irregulares, as sementes poliembriônicas penetram no interior do saco embrionário, adquirindo, finalmente, a forma esférica (SILVIO MOREIRA et al., 1947; SOARES FILHO et al., 2014).

Relatos indicam que Strasburger foi o primeiro a investigar fenômenos citológicos no gênero *Citrus*, estudando, dentre outras características, processos de formação de embriões adventícios (BACCHI, 1943). Três formas de poliembrionia podem ser identificadas: poliembrionia nucelar (dá origem a um número variável de plantas idênticas), clivagem poliembriônica (originária a partir do embrião gerador) e a poliembrionia causada por mais de um gametófito normal (BACCHI, 1943).

A taxa de poliembrionia é um carácter de extrema importância na escolha de um porta-enxerto comercial, a qual, quanto mais elevada, aumentam as chances de um porta-enxerto, quando propagado por semente, originar sementes de origem nucelar, semelhantes, portanto, à planta - mãe (PASSOS et al., 2006). Na condução de um pomar comercial, onde se procura obter maior uniformidade, a poliembrionia torna-se de grande importância. Entretanto, a principal vantagem mesmo está relacionada à manutenção de características de interesse em um determinado porta-enxerto conhecido (CARLOS et al., 1997).

Observações feitas em algumas progênes do BAG de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF) mostraram que geralmente genótipos com poliembrionia intermediária tendem a apresentar maiores variações em seus valores, tendendo a ser mais estável quando apresentam poliembrionia alta (acima de 90%) ou baixa (abaixo de 10%).

O estudo da poliembrionia em citros torna-se muito importante por se tratar de uma característica que determinará a maior ou menor facilidade para multiplicar um determinado genótipo de interesse a partir de sementes, a depender do grau de poliembrionia do mesmo (PASSOS et al., 2006). Sendo assim, espera-se que um determinado porta-enxerto apresente alta poliembrionia, elevado número de embriões por sementes e alta produção de sementes por fruto (JESUS SANTOS et al., 2015). Todavia, quando se objetiva a obtenção de híbridos, materiais com baixa poliembrionia é o mais recomendável.

Os programas de melhoramento genético geralmente costumam realizar as avaliações para vários descritores e com número suficientemente grande de genótipos, o que demanda muito tempo, mão de obra e custo. No caso de carácter como a poliembrionia, os trabalhos são ainda mais minuciosos e demandam mais tempo para serem realizados. Sendo assim, o uso do método da definição do tamanho ótimo de amostra, a partir de programas estatísticos, pode ajudar a definir um tamanho de amostra que seja suficiente para representar toda a progênie para o carácter em questão e assim reduzir o dispêndio de trabalho e tempo além de aumentar à precisão experimental.

Existem vários métodos citados na literatura, entretanto, o da máxima curvatura modificada proposto por Lessman e Atkins (1963) é o mais indicado para este trabalho por gerar resultados mais confiáveis (LUIZ da SILVA et al., 2003). Este

método é fundamentado na modificação do método de Smith (1938), por meio do ajuste da equação geral $CV(x) = \frac{A}{x^b}$.

A partir desse método, a relação entre o coeficiente de variação (CV) e o tamanho de amostra com X unidades básicas é explicado pelo modelo $CV = aX - b$, em que a e b são os parâmetros a serem estimados. A partir da função de curvatura dado por esse modelo determina-se o valor da abscissa onde ocorre o ponto de máxima curvatura. Em que X_0 é o valor da abscissa no ponto de Máxima Curvatura, o qual corresponde à estimativa do tamanho ótimo da parcela experimental (LIMA et al., 2007).

Vale salientar que nesse trabalho de pesquisa procura-se estimar o tamanho da amostra e não o número nem formas de parcelas. Todavia, o Método da Máxima Curvatura Modificada serve para ser utilizado em ambos os objetivos. Portanto, busca-se no presente estudo definir o tamanho ótimo de amostra para o caráter poliembrionia em duas progênies de citros TSKFL x CTSW e TSKFL x TRBK.

MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado na Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizado no Município de Cruz das Almas, Recôncavo Baiano, nas coordenadas geográficas 12°40'19" de latitude sul, 39°06'23" de longitude oeste com altitude de 226 m, em ambiente representativo da grande unidade de paisagem de Tabuleiros Costeiros, Sendo que o plantio foi iniciado no mês de outubro de 2007 através de polinizações controladas, mantendo a individualidade dos parentais femininos e masculinos, utilizando os acessos do Banco Ativo de Germoplasma de citros (BAG citros).

O solo da área experimental é considerado bastante profundo, bem intemperizado, oriundo de sedimentos da formação Capim Grosso de baixa fertilidade química, classificado como Latossolo Amarelo distrófico típico, textura argilosa a moderada, ácido, com declividade entre 10% e 15% (SOARES FILHO et al., 2007). O clima da região é com evapotranspiração potencial média anual maior do que a precipitação média anual, estação seca de verão e temperatura média superior a 22°C no mês mais quente do ano, estando a umidade relativa média anual em torno de 80% (D'ANGIOLELLA et al., 1998 apud SOARES FILHO et al., 2007).

Foram utilizadas duas progênies de citros oriundas dos cruzamentos do parental feminino 'Sunki da Flórida' com os respectivos parentais masculinos: 1 - Citrumelo 'Swingle' (CTSW) e 2 - *P. trifoliata* seleção 'Benecke' (TRBK).

O caractere poliembrionia foi avaliado no período de 2009 a 2016. Foram coletados 10 frutos de cada planta, levados ao laboratório onde foi realizado um corte longitudinal no fruto com auxílio de uma faca, porém tomando o cuidado para não danificar as sementes, após abertos, foram retiradas as sementes e feito a contagem de todas as que estavam viáveis em cada fruto.

As sementes foram lavadas em água para a retirada da mucilagem e armazenadas em congelador para posterior avaliação em laboratório. Posteriormente foram caracterizadas quanto ao número de embriões por semente (NES), determinado por contagem direta, com auxílio de bisturi e lente de aumento 10x.

A taxa de poliembrionia (TP) foi calculada pela percentagem de sementes com mais de um embrião. Para determinar a TP foram selecionadas vinte e cinco

sementes, aleatoriamente, quantidade a mais do que recomendaram Santos et al. (2015).

O espaçamento do experimento foi 2 x 3 m totalizando uma área de 2880 m². O delineamento foi inteiramente casualizado. Foram avaliadas 195 plantas para o cruzamento TRKFL x CTSW e 50 plantas para o cruzamento TSKFL x TRBK.

Para a confirmação do grau de homozigosidade dos parentais foi realizado a análise molecular, onde se utilizou 12 *primers microsatélite*. A extração de DNA seguiu o protocolo Murray e Thompson (1980). Foram coletadas em campo folhas jovens dos quatros parentais, as mesmas foram levadas ao laboratório onde foram lavadas com água corrente, enxaguada com água destilada e seca em papel toalha. Foram utilizados 10 amostras de DNA com três repetições totalizando 30 amostras. O programa de Power Marker foi utilizado para estimação número de alelos, frequência alélica e heterozigosidade (LIU e MUSE, 2005).

O tamanho ótimo de amostra foi calculado pelo Método da Máxima Curvatura Modificado, proposto por Lessman & Atkins (1963), realizadas com o auxílio do programa estatístico R (R CORE TEAM, 2014). Por esse método, a relação entre = o coeficiente de variação (CV) e o tamanho da parcela com X unidades básicas é explicado pelo modelo $CV = aX^b$, em que a e b são os parâmetros a serem estimados. A partir da função de curvatura dada por esse modelo, determinou-se o valor da abscissa onde ocorre o ponto de máxima curvatura, dada por: $X = \exp \left\{ \left[\frac{1}{(2b+2)} \right] \log \left[\frac{(ab)^2(2b+1)}{(b+2)} \right] \right\}$, em que X é o valor da abscissa no ponto de máxima curvatura, o qual corresponde à estimativa do tamanho ótimo da parcela experimental (MEIER e LESSMAN, 1971).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O valor de F (coeficiente de endogâmia) diz o quanto um genótipo é homocigoto a partir de uma escala que varia de zero a um, onde um é o maior grau de homocigose. Os estudos moleculares mostraram que o parental ‘Sunki da Flórida’ foi quem apresentou o maior grau de homocigose, com maior endogamia, condição esperada já que se trata de uma espécie verdadeira. Esse elevado grau de homocigose já foi confirmado por alguns autores (CORNÉLIO et al., 2003; HANDA et al. 1986; MAHONEY e SPRINGER, 2009). Seguido do *P. trifoliata* seleção ‘Benecke’, o híbrido LCR x TR e por último o citrumelo ‘Swingle’ que apresentou menor endogamia e por consequência possui maior heterocigose entre todos os parentais (Tabela 1).

Tabela 1 – Resultado da análise molecular dos parentais estudados apresentando número de alelos encontrado, frequência alélica e coeficiente de endogamia.

Genótipos*	Número de Alelos	Maior frequência alélica	Valor de F**
TSKFL	3	0,375	1,000
CTSW	3	0,556	0,297
TRBK	2	0,750	0,615
LCR x TR	4	0,500	0,379
Média	3	4,000	0,580

*Tangerineira ‘Sunki’, seleção ‘da Flórida’ (TSKFL), citrumelo ‘Swingle’ (CTSW), seleção ‘Benecke’ de *P. trifoliata* (TRBK) e híbrido de limoeiro ‘Cravo’ comum com *P. trifoliata* (LCR x TR). **Coeficiente de endogamia.

Acredita-se que a progênie TSKFL x TRBK possua maior grau de homocigose quando comparada a progênie TSKFL x CTSW. E por isso, o que se espera é que apresente maior regularidade nos dados apresentados, por ser mais uniformes (Tabela 1). Isso em resposta à níveis mais altos de homocigose apresentada pelo parental feminino ‘Sunki da Flórida’, quando comparado às outras espécies do gênero *Citrus*. Cornélio et al. (2003) estudaram essa espécie com técnicas de bandeamento cromossômico e confirmam que a *C. ‘sunki’* possui, de fato, maior homocigose em comparação com outras espécies de *Citrus*.

As duas progênies estudadas apresentaram taxas de poliembrião diferentes quando observados os dados nos três anos de avaliações realizadas. A Tangerineira ‘Sunki da Flórida’ (TSKFL) utilizada como parental feminino é monoembriônica, quando cruzada com outro parental, poliembriônico, tende a apresentar baixa poliembrião, enquanto que os parentais citrumelo ‘Swingle’ (CTSW) (*C. paradisi* Macfad. x *P. trifoliata*) e o *P. trifoliata* seleção ‘Beneke’(TRBK) são poliembriônicos, sendo que o primeiro possui poliembrião intermediária e este último alta taxa de poliembrião (GUERRA et al 2012; SOARES FILHO et al., 2014).

A progênie ‘Sunki da Flórida’ com citrumelo ‘Swingle’ (TSKFL x CTSW) apresentou o maior tamanho ótimo de amostra, igual a sete plantas para o ano 2016 (Tabela 3). Essa progênie apresenta taxa de poliembrião intermediária, o que de acordo com as observações feitas em campo, acredita-se sofrer maiores variações nas taxas de poliembrião, o que gera maiores valores de CV (coeficiente de variação) e por consequência maior tamanho de amostra.

Variedades que apresentam porcentagens de poliembrião altas ou baixas parecem ser menos susceptível às mudanças ambientais, e provavelmente requerem menores tamanhos ótimos de amostras. Contudo, quando se avaliam genótipos com taxa de poliembrião intermediária, mais sujeita às variações ambientais, tais como temperatura, pluviosidade além da genética, o tamanho ótimo de amostra apresentam-se maiores (JESUS SANTOS et al., 2015) (Tabela 2). Nesse caso, é necessário maior quantidade de plantas para que represente o caráter analisado.

Tabela 2 - Dados climáticos para os anos de 2009 a 2015, referentes à precipitação, umidade relativa do ar (UR) e temperatura média.

Anos/Média	Precipitação	Umidade relativa	Temperatura
2009	2,46	81,47	25,67
2010	3,1	82,13	23,26
2011	3,44	85,1	24,61
2012	1,92	80,17	24,85
2013	6,52	82,1	25,19
2014	2,99	84,17	24,82
2015	2,95	76,28	25,47

Fonte: Embrapa Mandioca e Fruticultura - Setor de climatologia.

A diferença encontrada em espécies de citros, a respeito do carácter poliembrionia, deve-se a vários fatores. Garcia et al. (1999) concordam com essa afirmação quando diz que as diferentes proporção de embriões nucelares parece variar entre as espécies cítricas. Eles afirmam ainda que os fatores ambientais, nutrição da planta, cultivar, forma de polinização e variedade polinizadora atuam diretamente tanto no tamanho quanto no número de embriões presentes na semente, como também pode ocorrer em função das variações em frutos da mesma planta no mesmo ano e entre as plantas em anos distintos (AMANTO MOREIRA et al., 2010).

Percebe-se que a mesma progênie pode apresentar diferentes tamanhos de amostras em função das variações nas porcentagens de poliembrionia. É o que se observa, por exemplo, na progênie TSKFL x TRBK que apresentou significativa variação nos diferentes anos. Para o ano de 2013 apresentou tamanho de amostra igual a três plantas, no ano de 2014 apresentou duas plantas e no ano de 2016 seis plantas (Tabela 3). Possivelmente devido às influências de fatores ambientais. Quando observado os valores climáticos da tabela 3, percebe-se que houve variação entre os anos de 2013 e 2014 que pode ter contribuição na variação encontrada nos tamanhos de amostras.

Tabela 3 - Estimativas dos parâmetros a e b**, tamanho ótimo de amostra (X_0) das duas progênies TSKFL X CTSW*; TSKFL X TRBK* para o carácter poliembrionia e coeficiente de variação CV%.

(Anos)	TSKFL X CTSW				TSKFL X TRBK				GERAL			
	a	b	X_0	CV%	a	b	X_0	CV%	a	b	X_0	CV%
2013	37,84	0,51	6,6	14,3	13,63	0,51	3,4	7,3	28,72	0,49	5,5	12,4
2014	32,84	0,50	6,0	13,3	5,1	0,46	1,7	4,0	20,35	0,49	4,4	9,7
2016	41,04	0,50	7,0	15,4	31,37	0,50	5,8	12,8	38,73	0,51	6,7	14,7

*Tangerineira 'Sunki', seleção 'da Flórida'. Como parentais masculinos foram utilizados o citrumelo 'Swingle' (CTSW) e o *P. trifoliata* seleção 'Benecke' (TRBK). ** Estimativas dos parâmetros da equação de Smith (1938), por meio do ajuste da equação geral $CV(x) = \frac{A}{x^b}$.

Nota-se que o maior tamanho ótimo de amostra para a progênie TSKFL x TRBK foi de seis plantas para o ano de 2016. Um tamanho de amostra considerado alto já que essa progênie possui alta poliembrião e conseqüentemente espera-se que apresentem menores variações dos dados. Além de ser uma progênie com relativa homozigidade, que confere maior uniformidade nos caracteres.

Quando se observam os gráficos com os tamanhos de amostras para os três anos de avaliações e compara-os com os respectivos CVs apresentados, nota-se que o ano de 2016 foi o que gerou maior o CV (12,8) (Anexo 2). O que se espera de tamanhos de amostras maiores é que apresentem CVs menores, conforme encontrados por Bispo dos Santos et al. (2015).

Esses autores estudando tamanho ótimo de parcela em três híbridos de girassol (*Helianthus annuus* L.) notaram, para todas as variáveis estudadas, que o maior valor de coeficiente de variação (%) foi observado no menor tamanho de parcela, ou seja, com o menor número de unidades básicas, verificando-se redução contínua desse coeficiente com o tamanho da unidade experimental.

O ano de 2014 apresentou o menor tamanho ótimo de amostra igual a duas plantas (Tabela 2). O que significa que para esse ano em questão apenas duas plantas seria o suficiente para representar essa progênie para o caráter poliembrião. Observando os dados brutos notou-se que quase todas as plantas apresentaram grau de poliembrião acima de 80% o que pode justificar um tamanho menor de amostra.

É válido salientar ainda que a diferença encontrada nos tamanhos ótimos de amostras, para as duas progênies, se deve, além de outros fatores, à natureza do caráter. Soost e Roose (1996) acreditam que a poliembrião seja dominante em relação à monoembrião, para a maioria das espécies de *Citrus* e que o traço genético, possivelmente, seja controlado por dois genes dominantes. Além dos genes dominantes, estudos realizados em 88 progênies de citros para a herança da frequência de poliembrião demonstraram que esse caráter pode ser dominado por mais de um par de alelos gerando efeitos aditivos e por conseqüência variações nas porcentagens de poliembrião (KEPIRO e ROOSE, 2010).

A avaliação do número de embriões em uma semente e a taxa de poliembrião em cada semente por contagem direta é uma atividade que exige trabalho minucioso, isso demanda tempo e esforço prolongado. Além disso, quando se pensa em programas de melhoramento genético que geram uma quantidade

elevada de novos genótipos anualmente, como é o caso do programa de melhoramento genético de citros, cuja avaliação para fins de seleção de indivíduos promissores se dá tanto para variedades porta-enxerto quanto para variedades copa, nota-se a real importância de se avaliar esse caráter nas diferentes plantas.

Portanto, a determinação de um tamanho ótimo de amostra de plantas para o caráter poliembrionia é importante para minimizar trabalho com avaliações, reduzindo assim recurso com mão de obra, tempo e espaço. Além do mais, quando se pensa em produção de sementes para fins de obtenção de porta-enxerto em campos comerciais, determinar a taxa de poliembrionia pode ser necessário, para fins de previsão de colheita e planejamento de semeadura de porta-enxertos, onde determinar o tamanho ótimo da amostra se torna muito pertinente.

Dessa forma observa-se que o Método da Máxima Curvatura Modificada possibilitou uma redução significativa do número de plantas, o que permite maior redução de custos com mão de obra, espaço e tempo gasto com avaliações. Acredita-se que tamanhos de amostra em torno de dez plantas sejam suficientes para representar o caráter nas duas progênies. Vale salientar que a poliembrionia é um caráter que apresentou variações ao longo dos anos, portanto, é importante realizar avaliações ao longo do tempo para maior acurácia do tamanho ótimo de amostra.

CONCLUSÃO

Os maiores tamanhos ótimo de amostras para o caráter poliembrionia foram de sete plantas e seis plantas para o ano de 2016 para a progênie TSKFL x CTSW e TSKFL x TRBK, respectivamente.

Maiores valores de tamanho de amostra podem estar relacionados com a porcentagem de poliembrionia intermediárias, entre 10% a 90%, pois tendem a sofrer maiores variações genéticas e ambientais.

Progênies que possui poliembrionia alta ou baixa apresentaram tamanhos ótimos de amostras menores.

O tamanho ótimo de amostra variou em diferentes anos, o que torna necessárias avaliações ao longo do tempo, a fim de obter resultados mais confiáveis.

Por fim, o Método da Máxima Curvatura Modificada possibilitou menor quantidade de planta do que é atualmente utilizada, sendo passível de redução de espaço para avaliações futuras com poliembrião, assim como mão de obra e custo.

REFERÊNCIA

- AMANTO MOREIRA, R.; RAMOS, J. D.; CRUZ, M. C. M. Caracterização de Frutose Poliembriônica em Sementes de 'Flying Dragon' e de Híbridos de Porta-Enxerto de Citros. *Rev. Bras. Frutic*, Jaboticabal, v.32, n.2, June 2010.
- BACCHI, O. Cytological Observations in citrus: III megasporogenesis fertilization and polyembryony. **Botanical Gazette**, v.105, n.2, p.221-225, Dec 1943.
- CARLOS, E. F.; STUCHI, E. S.; DONADIO, L. C. Porta-enxertos para a citricultura paulista. **Funep**, Jaboticabal, 1997. Disponível em: http://www.estacaoexperimental.com.br/documentos/BC_01.pdf. Acesso em: 08 de fevereiro de 2017.
- BISPO DOS SANTOS, A. M. P.; PEIXOTO, C. P.; ALMEIDA, A. T.; SANTOS, J. M. S.; MACHADO, G. S. Tamanho ótimo de parcela para a cultura de girassol em três arranjos espaciais de plantas. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.28, n.4, p.265 – 273, out-dez, 2015.
- CORNÉLIO, M. T. M. N.; FIGUEIRÔA, A. R. S.; SANTOS, K. G. B.; CARVALHO, R.; SOARES FILHO, W. S.; GUERRA, M. Chromosomal relationships among cultivars of *Citrus reticulata* Blanco, its hybrids and related species. **Plant Systematics and Evolution**, v.240, p.149-161, Viena, 2003.
- GARCIA, M. R.; ASINS, M. J.; FORNER, J.; CARBONELL, E. A. Genetic analysis of apomixis in *Citrus* and *Poncirus* by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.99, p.511-518, 1999.
- GOLD SCHMIDT, E. E. Carbohydrates supply as a critical factor for Citrus fruit development and productivity. **Hort Science**, Alexandria, v.34, n.6, p.1020-1024, 1999.
- GUERRA, D.; SCHIFINO-WITTMAN, M. T.; SCHWARZ, S. F.; SOUZA, P. V. D.; WEILER, R. L. Caracterização morfológica, determinação do número de embriões e taxa de poliembrião em três porta-enxertos híbridos de citros. **Bragantia**, Campinas, v.71, n.2, 2012.
- HANDA, T., ISHIZAWA, Y., OOGAKI, C. Phylogenetic study of fraction I protein in the genus *Citrus* and its close related genera. **Japan Journal of Genetics**, Tokyo, n.61, p.15-24, 1986.

KEPIRO, J.L. & ROOSE, M.L. AFLP markers closely linked to a major gene essential for nucellar embryony (apomixis) in *Citrus maxima* × *Poncirus trifoliata*. **Tree Genetics & Genomes**. V. 6:1–11, 2010.

LESSMAN K. J; ATKINS R. E. Optimum plot size and relative efficiency of lattice designs for grain sorghum yield tests. **Crop Science**. v.3, p. 477-481, 1963.

JESUS SANTOS, C. Q.; GIRARDI, E. A.; VIEIRA, E. L.; LEDO, C. A. S.; FILHO, W. S. S. Tamanho ótimo de amostras de frutos e de sementes para determinação da poliembrionia em citros. **Rev. Bras. Frutic**. Jaboticabal - SP, v. 37, n. 1, p. 172-178, Março 2015.

LIMA, J. F.; PEIXOTO, C. P.; LEDO, C. A. S.; FARIA, G. A. Tamanho ótimo de parcela para experimentos com plantas de mamoeiro em casa de vegetação. **Revista Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 31, n. 5, p. 1411-1415, 2007.

LIU, K.; MUSE, S. V. Power Marker: Integrated analysis environment for genetic marker data. **Bioinformatics**. 21, 2128-2129, 2005.

LUIZ da SILVA, R.; XAVIER, A.; GARCIA, H. L.; PIRES, I. E. Determinação do tamanho ótimo da parcela experimental pelos métodos da máxima curvatura modificado, do coeficiente de correlação intra-classe e da análise visual em testes clonais de eucalipto. **Revista Árvore**. Viçosa, Brasil. vol. 27, n. 5, p. 669-676, setembro-outubro 2003.

MAHONEY, CONNER L. AND SPRINGER, DOUGLAS A. GENETIC DIVERSITY. **Genetic Variation-genetics**. New York., v.1, 2009.

MEIER, V. D.; LESSMAN, K. J. Estimation of optimum field plot shape and size for testing yield in *Crambe abyssinica* Hochst. *Crop Science*, v.11, p.648-650, 1971.

MURRAY, H. G.; THOMPSON W. F. Rapid isolation of high molecular weight DNA. **Nucleic Acids Res**, v.8, p.4321-4325, 1980.

PASSOS, O. S.; PEIXOUTO, L. S.; SANTOS, L. C.; CALDAS, R. C.; SOARES FILHO, W. S. Caracterização de híbridos de *Poncirus Trifoliata* e de outros porta-enxertos de citros no estado da bahia. **Rev. Bras. Frutic**, Jaboticabal-SP, v. 28, n.3, p.410-413, Dezembro 2006.

R CORE TEAM. R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2014. Disponível em: <http://www.R-project.org/>.

SILVIO MOREIRA.; GURGEL, J. T. A.; ARRUDA, L. F. de. Poliembrionia em citros. **Bragantia**, v.7, p.69-106, 1947.

SIVIERO, A.; CRISTOFANI, M.; BOAVA, L. P.; MACHADO, M. A. Mapeamento de QTLs Associados à Produção de Frutos e Sementes em Híbridos de *Citrus Sunki* Vs, *PoncirusTrifoliata*. **Rev. Bras. Frutic**, Jaboticabal-SP, v.24, n.3, p.741-743, Dezembro 2002.

SMITH, H.F. An empirical law describing heterogeneity in the yields of agricultural crops. **Journal of Agricultural Science**, v.28, p.1-23, 1938.

SOARES FILHO, W. S.; SOUZA, U.; LEDO, C. A. S.; SANTANA, L. G. L.; PASSOS, O. S. Poliembrionia e potencial de obtenção de híbridos em citros. **Rev. Bras. Frutic**, Jaboticabal-SP, v.36, n.4, p.950-956, Dezembro 2014.

SOARES FILHO, W. S.; VILARINHOS, A. D.; ALVES, A. A. C.; CUNHA SOBRINHO, A. P.; OLIVEIRA, A. A. R.; SOUZA, A. S. et al. **Programa de melhoramento genético de citros da Embrapa mandioca e fruticultura: obtenção de híbridos**. 1 ed., Cruz das Almas, p.37, n.106, 2003.

SOARES FILHO, W.; LEDO, C. A. S.; QUINTELA, M. P.; MATTOS, L. A.; PASSOS, O. S.; SOUZA, A. S. Cruzamentos em citros: frequência e vigor de híbridos, **Rev. Bras. Frutic**, Jaboticabal, v.29, n.2, Aug 2007.

SOOST, R. K.; ROOSE M.L. **Citrus**. In: Janick J, Moore J. N (eds) Fruit breeding vol I: tree and tropical fruits. Wiley, New York, v.6, p.257–323, 1996.

Capítulo 3

**TAMANHO ÓTIMO DE AMOSTRA EM FUNÇÃO DOS CARACTERES:
BROTAÇÃO E TOLERÂNCIA À SECA EM PROGÊNIES DE CITROS**

TAMANHO ÓTIMO DE AMOSTRA EM FUNÇÃO DOS CARACTERES: BROTAÇÃO E TOLERÂNCIA À SECA EM PROGÊNIES DE CITROS

Autor: Leandro Ribeiro dos Santos

Orientador: Walter dos Santos Soares Filho

Co-orientador: Carlos Alberto da Silva Ledo e Abelmon da Silva Gesteira

RESUMO: Devido a importância econômica que o estresse hídrico causa nos pomares de plantas cítricas, objetivou-se determinar o tamanho ótimo da amostra para os caracteres estresse hídrico e brotação em três progênies de citros, utilizando o Método da Máxima Curvatura Modificada. O trabalho foi realizado na Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizado no Município de Cruz das Almas – Ba. Avaliou-se três progênies oriundas dos cruzamentos do parental feminino ‘Sunki da Flórida’ com os respectivos parentais masculinos o híbrido limoeiro ‘Cravo’ comum x *Poncirus trifoliata* TRKFL x (LCR x TR), citrumelo ‘Swingle’ (CTSW) e *P. trifoliata* seleção ‘Benecke’ (TRBK) no período de 2009 a 2016. Os caracteres avaliados foram: enrolamento foliar e brotações a partir de escalas de notas. O tamanho ótimo de amostra foi calculado pelo Método da Máxima Curvatura Modificado, proposto por Lessman & Atkins (1963) com auxílio do programa estatístico R. O maior tamanho de amostra para enrolamento foliar foi de sete plantas para a progênie TSKFL x (LCR x TR) no ano de 2009 e de nove plantas para a progênie TSKFL x CTSW no ano de 2013. Acredita-se que dez plantas possa ser suficiente para representar os dois caracteres.

Palavra-chave: citricultura, enrolamento foliar e estresse hídrico.

GREAT SIZE OF SAMPLE BASED CHARACTER: SPROUTING AND TOLERANCE TO DROUGHT IN CITRUS PROGENIES

Author: Leandro Ribeiro dos Santos

Adviser: Walter dos Santos Soares Filho

Co-adviser: Carlos Alberto da Silva Ledo and Abelmon da Silva Gesteira

ABSTRACT: Due to the economic importance that water stress causes in citrus orchards, the objective was to determine the optimal sample size for water stress and sprouting characteristics in three citrus progenies, using the Modified Maximum Curvature Method. The work was carried out at Embrapa Mandioca and Fruticultura, located in the Municipality of Cruz das Almas - Ba. Three progenies from the crosses of the female parental 'Sunki of Florida' with the respective male parentheses were the Common Clavier 'Cluster' hybrid x *Poncirus trifoliata* TRKFL x (LCR x TR), 'Swingle' citrumelo (CTSW) and *P. trifoliata* Selection 'Benecke' (TRBK) in the period from 2009 to 2016. The characters evaluated were foliar winding and sprouting from scales of notes. The optimal sample size was calculated by the Modified Maximum Curvature Method, proposed by Lessman & Atkins (1963) with the aid of the statistical program R. The largest sample size for foliar winding was seven plants for the progeny TSKFL x (LCR x TR) In the year 2009 and nine plants for the progeny TSKFL x CTSW in the year 2013. It is believed that ten plants may be sufficient to represent the two characters.

Key words: citriculture, foliar winding and water stress.

INTRODUÇÃO

O organismo vegetal está em constante interação com o ambiente em sua volta, de tal forma que fatores climáticos como os gases atmosféricos, luz, temperatura, umidade, precipitação, são significativamente importantes para seu perfeito crescimento e desenvolvimento (SUASSUNA et al., 2012; SHIMAZAKI et al., 2007; TAIZ e ZEIGER, 2009). A homeostase do vegetal pode ser afetada pela simples alteração na oferta desses fatores. Dentre esses citados acima, o que provoca expressiva ação na planta é a umidade (água). A falta desta gera inúmeras reações fisiológicas e morfológicas na planta.

“O crescimento e o desenvolvimento das plantas podem ser significativamente afetados pelo estresse hídrico” (SANTOS e CARLESSO, 1998). Este é um dos principais fatores dentre os distúrbios abióticos que afeta todos os organismos vivos (AKINCI e LOSEL, 2012). Esse fenômeno ocorre quando a oferta de água no solo é insuficiente para a planta, umidade relativa do ar se torna baixa e a temperatura elevada (AKINCI e LOSEL, 2012). Sendo que um dos primeiros efeitos da deficiência hídrica nas plantas vasculares manifesta-se sobre os estômatos (CASAROLI e LIER, 2015).

Fisiologicamente, o déficit hídrico causa nas folhas uma redução no turgor (ψ_p) e nos volumes celulares, o que está associado à desidratação celular e ao potencial hídrico (ψ_w) do apoplasto, que vai se tornando cada vez mais negativo que o do simplasto. Isso faz com que a célula concentre mais íons em células específicas ocasionando a cessação da expansão celular (TAIZ e ZEIGER, 2013).

Já o estresse térmico pode causar danos em membranas e enzimas celulares, além de reduzir ou inibir a fotossíntese (TAIZ e ZEIGER, 2013). Além desses fatores citados existe ainda a redução da área celular, modificação na forma da folha e abscisão foliar, quando, neste último caso, a planta é submetida a longos períodos de estresse.

Em espécies de citros essa redução da área foliar e o enrolamento das folhas são características marcantes quando submetidas a longos períodos de tempo sem chuva e calor intenso, o que pode ocasionar redução da taxa fotossintética e conseqüentemente diminuição na produção de frutos (LECHINOSKI et al., 2007).

A citricultura nordestina encontra-se assentada principalmente no ecossistema de Tabuleiros Costeiros, onde as plantas cítricas desenvolvem um sistema radicular pouco profundo, tornando-as mais vulneráveis a déficits hídricos, comuns nos meses de novembro a março (PEIXOTO et al., 2006).

Outras características como sistema de plantio, estágio de desenvolvimento, idade da planta e condições climáticas, que afetam à absorção e o transporte de água na planta, movimentos estomáticos e transpiração, todas essas interferem na reação da planta ao estresse hídrico e variam com a espécie (MATTOS JÚNIOR et al., 2005).

Estudos referentes às relações hídricas e interações causadas pelo déficit hídrico temporário nos processos fisiológicos, são de fundamental importância visto que o déficit hídrico tem efeitos em diversos processos fisiológicos das plantas, muitos dos quais refletem mecanismos de adaptação e de produção da cultura (JIFON e SYVERTSEN, 2003; JAIMEZ et al., 2005; GARCÍA-TEJERO et al., 2010).

Dessa forma, definir o tamanho da amostra para esses caracteres pode ser importante, pois permite inferir a quantidade ótima de plantas necessárias para determinar esses caracteres em progênies de citros, com reduzido custo e espaço experimental. Existem vários métodos citados na literatura, entretanto, o da máxima curvatura modificada proposto por Lessman e Atkins (1963) é o mais indicado para este trabalho por gerar resultados mais confiáveis (LUIZ da SILVA et al., 2003). Este método é fundamentado na modificação do método de Smith (1938), por meio do ajuste da equação geral $CV(x) = \frac{A}{x^b}$.

A partir desse método, a relação entre o coeficiente de variação (CV) e o tamanho de amostra com X unidades básicas é explicado pelo modelo $CV = aX - b$, em que a e b são os parâmetros a serem estimados. A partir da função de curvatura dado por esse modelo determina-se o valor da abscissa onde ocorre o ponto de máxima curvatura. Em que X_0 é o valor da abscissa no ponto de Máxima Curvatura, o qual corresponde à estimativa do tamanho ótimo da parcela experimental (LIMA et al., 2007).

Portanto, objetiva-se determinar o tamanho ótimo da amostra para os caracteres estresse hídrico e brotação em três progênies de citros, utilizando o Método da Máxima Curvatura Modificada.

MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado na Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizado no Município de Cruz das Almas, Recôncavo Baiano, nas coordenadas geográficas 12°40'19" de latitude sul, 39°06'23" de longitude oeste com altitude de 226 m, em ambiente representativo da grande unidade de paisagem de Tabuleiros Costeiros. Sendo que o plantio foi iniciado no mês de outubro de 2007 através de polinizações controladas, mantendo a individualidade dos parentais femininos e masculinos, utilizando os acessos do Banco Ativo de Germoplasma de citros (BAG citros).

O solo da área experimental é considerado bastante profundo, bem intemperizado, oriundo de sedimentos da formação Capim Grosso de baixa fertilidade química, classificado como Latossolo Amarelo distrófico típico, textura argilosa a moderada, ácido, com declividade entre 10% e 15% (SOARES FILHO et al., 2007). O clima da região é com evapotranspiração potencial média anual maior do que a precipitação média anual, estação seca de verão e temperatura média superior a 22°C no mês mais quente do ano, estando a umidade relativa média anual em torno de 80% (D'ANGIOLELLA et al., 1998 apud SOARES FILHO et al., 2007).

Foram utilizadas três progênies de citros oriundas dos cruzamentos do parental feminino 'Sunki da Flórida' com os respectivos parentais masculinos o híbrido (limoeiro 'Cravo' comum x *Poncirus trifoliata*) ou TRKFL x (TR x LCR), Citrumelo 'Swingle' (CTSW) e P, trifoliata seleção 'Benecke' (TRBK). Foram avaliados no período de 2009 a 2016 os caracteres: estresse hídrico (enrolamento foliar) e brotações a partir de escalas de notas (Figuras 1 e 2).

Depois de um prolongado déficit hídrico, geralmente no período de dezembro a fevereiro, realizaram-se avaliações visuais de sensibilidade à seca, por meio de notas 5 (N), 4 (S-), 3 (S), 2 (S+), 1 (S++), onde N = normal, sem enrolamento foliar, S- = poucas folhas levemente enroladas, S = folhas enroladas, S+ = folhas bastante enroladas, S++ = todas as folhas fechadas, com aspecto de secas e antecipação da abscisão de folhas, respectivamente. As avaliações visuais levaram-se em conta: cor das folhas, enrolamento foliar e queda das folhas.

Foram coletados também dados relacionados às normais climáticas do ano de 2009 a 2016 com o intuito de observar o comportamento dos caracteres em função de cada ano de avaliação.

O espaçamento do experimento foi 2 x 3 m totalizando uma área de 2880 m², O delineamento foi inteiramente casualizado. Foram avaliados 76 plantas oriundas do cruzamento TRKFL x (LCR x TR), 195 plantas da progênie TRKFL x CTSW e 50 plantas TSKFL x TRBK.

Para a confirmação do grau de homozigosidade dos parentais foi realizado a análise molecular, onde se utilizou doze primers microssatélite. A extração de DNA seguiu o protocolo de Murray e Thompson (1980). Foram coletadas em campo folhas jovens dos quatros parentais, as mesmas foram levadas ao laboratório onde foram lavadas com água corrente, enxaguada com água destilada e seca em papel toalha. Foram utilizadas 10 amostras de DNA com três repetições totalizando 30 amostras. O programa Power Marker foi utilizado para estimação número de alelos, frequência alélica e heterozigosidade (LIU e MUSE, 2005).

O tamanho ótimo de amostra foi calculado pelo Método da Máxima Curvatura Modificado, proposto por Lessman e Atkins (1963), realizadas com auxílio do programa estatístico R (R CORE TEAM, 2014). Por esse método, a relação entre o coeficiente de variação (CV) e o tamanho da parcela com X unidades básicas é explicado pelo modelo $CV = aX^b$, em que a e b são os parâmetros a serem estimados. A partir da função de curvatura dada por esse modelo, determinou-se o valor da abscissa onde ocorre o ponto de máxima curvatura, dada por: $X = \exp \left\{ \left[\frac{1}{(2b+2)} \right] \log \left[\frac{(ab)^2(2b+1)}{(b+2)} \right] \right\}$, em que X é o valor da abscissa no ponto de máxima curvatura, o qual corresponde à estimativa do tamanho ótimo da parcela experimental (MEIER e LESSMAN, 1971).



Figura 1 - Escala de notas para avaliação de estresse hídrico (enrolamento foliar), 5 (N) = sem enrolamento foliar; 4 (S-) = folhas levemente enroladas em poucos ramos da planta; 3 (S) = folhas levemente enroladas em todos os ramos das planta; 2 (S+) = Todas as folhas da planta muito enroladas, mas com pouca queda de folhas; 1 (S++) = todas as folhas da planta muito enroladas, com aspecto de secas e com muita queda de folhas.



Figura 2 - Escala de notas para avaliação de emissão de brotações: 1 (SB) - sem brotações, 2 (B-) – com brotações em apenas um quadrante da planta, 3 (B) – com brotações em dois a três quadrantes da planta e 4 (B+) - com brotações em todos os quadrantes da planta.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O valor de F (coeficiente de endogâmia) diz o quanto um genótipo é homocigoto a partir de uma escala que varia de zero a um, onde um é o maior grau de homocigose. Os estudos moleculares mostraram que o parental Sunki da flórida' foi quem apresentou o maior grau de homocigose, com maior endogamia, condição esperada já que se trata de uma espécie verdadeira. Seguido do *P. trifoliata* seleção 'Benecke', o híbrido LCR x TR e por último o citrumelo 'Swingle' (Tabela 1). Pode-se dizer, portanto, que a progênie de 'Sunki da Flórida' com 'Swingle' apresente maiores variações genéticas.

O maior tamanho de amostra para o caráter enrolamento foliar (epinastia) foi de sete plantas no ano de 2009 para a progênie TSKFL x (LCR x TR) (Tabela 2). Esse resultado permite entender que houve maior variação em relação à resposta das plantas ao estresse hídrico nesse ano quando comparado com os outros anos. Isso pode estar relacionado com as diferenças nas respostas das plantas ao déficit hídrico como também da base genética do caráter. Segundo Mattos Júnior et al. (2005) a intensidade do estresse hídrico nas plantas pode variar com a espécie, sistema de plantio, estágio de desenvolvimento da planta, idade e condições climáticas, que afetam as características de absorção e o transporte de água na planta, movimento dos estômatos e transpiração.

Tabela 1. – Resultado da análise molecular dos parentais estudados apresentando: número de alelos encontrado, frequência alélica e coeficiente de endogamia.

Genótipos*	Número de Alelos	Maior frequência alélica	Valor de F**
TSKFL	3	0,375	1,000
CTSW	3	0,556	0,297
TRBK	2	0,750	0,615
LCR x TR	4	0,500	0,379
Média	3	4,000	0,580

*Tangerineira 'Sunki', seleção 'da Flórida' (TSKFL), citrumelo 'Swingle' (CTSW), seleção 'Benecke' de *P. trifoliata* (TRBK) e híbrido de limoeiro 'Cravo' comum com *P. trifoliata* (LCR x TR). **Coeficiente de endogamia.

O déficit hídrico nas plantas leva à redução nas taxas fotossintéticas por meio de limitações estomáticas e não estomáticas. A principal resposta adaptativa das plantas à seca com efeito na produtividade é o ajuste osmótico, proporcionado pelo acúmulo de solutos, como a prolina (CARVALHO et al., 2016). Isso permite que as plantas mantenham o turgor foliar necessário à abertura estomática mesmo com baixo potencial hídrico, além de favorecer a absorção de água pelas raízes (BLUM, 2009).

Os graus de tolerância à seca dos parentais que originaram essa progênie pode possibilitar melhor inferência do comportamento referente ao carácter analisado. A tangerineira 'Sunki da Flórida' apresenta boa tolerância à seca, da mesma forma que o limoeiro 'cravo', porta-enxerto conhecido, dentre outros fatores, devido ao vigor, profundidade efetiva de seu sistema radicular e condutividade hidráulica das raízes (POMPEU JUNIOR e BLUMER, 2005).

Entretanto, o *Poncirus trifoliata* é considerado um porta-enxerto susceptível à seca (BASTOS et al., 2014). Portanto, acredita-se que a progênie na qual esse parental faça parte, deva apresentar moderada tolerância à seca, o que pode levar a uma variação no comportamento das plantas em função deste carácter e por consequência nos valores de tamanho ótimo de amostra.

Donato et al. (2008) afirmam que o tamanho ideal da amostra pode variar com o solo, características avaliadas, local do ensaio, época da avaliação, recursos e práticas de manejo no local de experimentação e método de estimativa.

Foi possível observar também que houve certa variação no tamanho de amostra ao longo dos anos (Tabela 2). Acredita-se que devido o estresse hídrico nas plantas ser dominado por vários genes, isso pode ter levado a uma grande variação nas respostas fisiológicas das plantas em relação a esse fator, o que possivelmente pode ter gerado resultados diferentes (sete plantas 2009, quatro plantas 2011 e cinco plantas 2015) nos três anos de avaliações (Tabela 2).

Esses resultados corroboram com Martin et al. (2005) e Storck et al. (2006), ambos trabalhando com espécies de milho, que encontraram diferentes tamanhos de parcela utilizando o Método da Máxima Curvatura Modificada e constataram que tais diferenças foram devidas às características genéticas.

Quando se observa os dados climáticos dos três anos, nota-se que o ano de 2009 apresentou maior temperatura, menor umidade relativa (UR) e menor

precipitação, o que pode justificar o maior tamanho ótimo de amostra para esse ano (Tabela 4).

Tabela 2 - Estimativas dos parâmetros a e b**, tamanho ótimo da amostra das duas progênes; TSKFL x (LCR x TR); TSKFL x CTSW e TSKFL x TRBK para o caráter enrolamento foliar (epinastia) e coeficiente de variação CV%.

ANOS	TSKFL X (LCRxTR)*				TSKFL X CTSW*				TSKFL X TRBK*				GERAL			
	a	b	X ₀	CV%	a	b	X ₀	CV%	a	b	X ₀	CV%	a	b	X ₀	CV%
2009	43,39	0,50	7,2	16,1	36,26	0,49	6,4	14,4	27,78	0,49	5,3	12,2	37,01	0,49	6,5	14,6
2011					20,86	0,50	4,4	9,9	14,47	0,50	3,5	7,7	18,52	0,49	4,1	9,4
2012	18,22	0,51	4,1	8,9	20,55	0,50	4,4	9,7	15,13	0,49	3,6	8,0	19,66	0,50	4,3	9,2
2015	26,21	0,49	5,2	11,5	32,13	0,49	5,9	13,3	26,19	0,49	5,1	11,7	18,52	0,49	4,1	9,2

*Tangerineira 'Sunki', seleção 'da Flórida'. Como parentais masculinos foram utilizados o citrumelo 'Swingle' (CTSW), a seleção 'Benecke' de *P. trifoliata* (TRBK) e híbrido de limoeiro 'Cravo' comum com *P. trifoliata* (LCR x TR). ** Estimativas dos parâmetros da equação de Smith (1938), por meio do ajuste da equação geral $CV(x) = \frac{A}{x^b}$.

A estimativa do tamanho ótimo de amostra resultou em valores bastante próximos entre as progênes TSKFL x CTSW e TSKFL x (TR x LCR). A partir destes valores, pode-se verificar que os genótipos possuem desempenhos semelhantes quanto aos tamanhos de amostra obtidos e por isso pode ser definido um único tamanho de amostra para as duas progênes. Contudo, seria mais indicada a utilização do maior tamanho de amostra de cada uma das progênes, para desta forma, ter maior confiabilidade. Sendo assim, os tamanhos ótimos de amostra iguais a seis e sete plantas seria o recomendado para as progênes TSKFL x (LCR x TR) e TSKFL x CTSW, respectivamente (Tabela 2).

Quando se observa a progênie TSKFL x TRBK nota-se que apresentou o menor tamanho ótimo de amostra em relação às outras progênes. Analisando as avaliações realizadas ao longo dos anos percebe-se que apresentou pouco enrolamento foliar.

De acordo com a escala de notas (Figura 1), em que quase todas as plantas receberam notas quatro e cinco (pouco e nenhum enrolamento foliar), exceto para o ano de 2009 que apresentou maiores variações nas notas. O que explica o maior

tamanho ótimo de amostra justamente para esse ano. Possivelmente, a maior disponibilidade de chuvas, umidade relativa do ar e temperaturas mais amenas podem ter influenciado nesses resultados.

Entende-se que o maior tamanho de amostra vai ser encontrado justamente nos dados que apresentarem maiores variações. Pois, o Método da Máxima Curvatura leva em conta os CVs calculados para cada tamanho de amostra, que quanto maior variação nos dados apresentados, maior tamanho de amostra será necessário para representar o caráter na progênie. Dessa forma, progênies que apresentam a maioria das plantas com baixo ou nenhum enrolamento foliar tende a ter menores tamanhos ótimos de amostras.

Todas as progênies apresentaram os menores tamanhos de amostra para os anos de 2011 e 2012 (Tabela 3). Esses valores coincidem com as melhores condições ambientes, em relação aos outros anos de avaliações. Em que a umidade relativa do ar apresentou valores satisfatórios, assim como os valores para precipitação de chuvas e temperatura máxima (Tabela 4).

Tabela 3 - Parâmetros a e b** são estimadores do tamanho ótimo de amostra (X_0), tamanho ótimo da amostra das três progênies e coeficiente de variação: TSKFL X (LCR x TR); TSKFL x CTSW e TSKFL x TRBK para o caráter brotação e coeficiente de variação CV%.

Anos	TSKFL X (TR X LCR)*				TSKFL X CTSW*				TSKFL X TRBK*				Geral			
	a	b	X_0	CV%	a	b	X_0	CV%	a	b	X_0	CV%	a	b	X_0	CV%
2012					32,48	0,50	6,0	13,2	33,46	0,49	6,1	13,7	32,32	0,49	5,9	13,4
2013	33,63	0,46	6,0	14,6	58,83	0,49	8,8	20,0	34,88	0,50	6,3	13,8	53,19	0,49	8,3	18,6
2015	39,87	0,50	6,8	15,4	34,24	0,49	6,2	13,9	37,30	0,48	6,5	15,0	35,55	0,48	6,3	14,4
2016	52,38	0,50	8,2	18,0	46,97	0,49	7,6	17,1	51,80	0,50	8,1	18,0	49,38	0,49	7,9	17,5

*Tangerineira 'Sunki', seleção 'da Flórida'. Como parentais masculinos foram utilizados o citrumelo 'Swingle' (CTSW), a seleção 'Benecke' de *P. trifoliata* (TRBK) e híbrido de limoeiro 'Cravo' comum com *P. trifoliata* (LCR x TR). ** Estimativas dos parâmetros da equação de Smith (1938), por meio do ajuste da equação geral $CV(x) = \frac{A}{x^b}$.

Para a variável brotação todas as progênies apresentaram valores ajustáveis aos coeficientes de variação (%) apresentáveis a cada amostra (Anexo B). Esse caráter mede a eficiência e a rapidez das plantas em emitir quantidades de

brotações, logo após as primeiras chuvas, quando estavam submetidas a um longo período de estresse hídrico.

Tabela 4 - Dados climáticos para os anos de 2009 a 2015, referentes à precipitação, umidade relativa do ar (UR) e temperatura média.

Anos/Média	Precipitação	Umidade relativa	Temperatura
2009	2,46	81,47	25,67
2010	3,1	82,13	23,26
2011	3,44	85,1	24,61
2012	1,92	80,17	24,85
2013	6,52	82,1	25,19
2014	2,99	84,17	24,82
2015	2,95	76,28	25,47

Fonte: Embrapa Mandioca e Fruticultura - Setor de climatologia.

Foi possível notar uma correlação entre os anos de avaliações dos indivíduos das progênes, em que a maioria apresentou notas iguais a um, com os menores tamanhos de amostra, independente da progênie. Os anos que apresentaram os maiores tamanhos de amostras tiveram maior influência ambiental, demonstrando ser um fator, possivelmente, com característica poligênica. Stork et al. (2006) estudando tamanho ótimo de parcelas em batata encontraram variações entre os ensaios realizados com diferentes tamanhos em função das variações ambientais. Acredita-se que atenção maior deve ser dada para esses fatores, tendo em vista que todas as progênes apresentaram variações diferenciadas ao longo dos anos.

Entretanto, é pertinente apontar a uniformidade dos resultados apresentado pela progênie TSKFL x TRBK com tamanho ótimo de planta igual a seis em todos os anos, exceto para o ano de 2016 com oito plantas. Portanto, a utilização do maior tamanho de amostra encontrado, nesse caso, para cada genótipo é o mais indicado, a fim de garantir maior confiabilidade das dados (MARTIN et al., 2005).

Quando comparadas as duas variáveis estudadas, observa-se que os tamanhos ótimos de amostras não foram iguais. Leite et al. (2009) também verificaram que as estimativas do tamanho de amostra variaram de acordo com a variável em estudo.

Apesar de não se notar uma relação direta nos valores apresentados para o tamanho ótimo de amostra entre enrolamento foliar e brotação, sabe-se que são

características intimamente interligadas e, portanto, no momento de definir o tamanho da amostra deve-se optar pelo o maior valor apresentado entre as duas.

O déficit hídrico é uma característica muito estudada em culturas perenes e por apresentar impactos diretos e significativos no crescimento e desenvolvimento das plantas além de provocar diversas alterações fisiológicas, cuja tolerância depende da constituição genética do material vegetal avaliado, duração, severidade e estágio de desenvolvimento, torna-se pertinente entender melhor seu comportamento. Aliar esse caráter à brotação pode ser interessante por possibilitar uma visão mais pormenorizada da resposta da planta em função dos efeitos apresentados por cada um, conseqüentemente, melhor determinação do tamanho ótimo da amostra. Entretanto, se tratando de um caráter muito influenciado pelo ambiente recomendam-se avaliações ao longo dos anos, para obter melhor acurácia no tamanho ótimo da amostra.

CONCLUSÃO

O Método da Máxima Curvatura Modificada apresentou tamanhos de amostras diferenciadas para cada variável estudada ao longo dos anos analisados.

Ao se utilizar o Método da Máxima Curvatura Modificada para determinar o tamanho ótimo de amostra é preciso estar atento aos fatores que levam a uma maior variação nos valores apresentados, tais variações podem estar relacionados ao caráter analisado, ao genótipo da planta e efeitos ambientais.

O maior tamanho de amostra foi igual a sete plantas para a progênie TSKFL x (LCR x TR) no ano de 2009 para o caráter enrolamento foliar

O maior tamanho de amostra foi igual a nove plantas para o caráter brotação na progênie TSKFL x CTSW no ano de 2013.

Dez plantas pode ser suficiente para representar os dois caracteres em todos os anos avaliados, levando em consideração os fatores que interferiram nesse tamanho de amostra.

Por fim, vale salientar ainda que a determinação do tamanho de amostra deve ser feita para cada cultura, cada local em que ocorram condições climáticas e

de solo diferentes das que já tenham sido determinadas e para cada caráter analisado com intuito de obter maior precisão experimental.

REFERÊNCIA

AKINCI, S.; LÖSEL, D. M. "Plant Water-Stress Response Mechanisms, Water Stress," I. Md. and M. Rahman, Eds. **Water Stress**, Intech Europe, p.15-42, 2012.

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

BLUM, A.. Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress. **Field Crops Research**, v.12, n.2-3, p.119-123, jun. 2009.

CARVALHO, L. M.; CARVALHO, H. W. L.; SOARES FILHO, W. S.; MARTINS, C. R.; PASSOS, ORLANDO SAMPAIO . Porta-enxertos promissores, alternativos ao limoeiro 'Cravo', nos Tabuleiros Costeiros de Sergipe. **Pesq. Agropec. Bras**, v.51, n.2, p.132-141, fev. 2016.

CASAROLI, D.; LIER, Q. J. V. Resposta fotossintética do feijoeiro em função da intensidade de radiação e do teor de água no solo . **Revista de Ciências Agroambientais**, Alta Floresta-MT, v.13, n.1, p.69-75, 2015.

DONATO, S. L. R .; SIQUEIRA, D. L.; SILVA, S. O. CECON, P. R.; SILVA, J. A.; E SALOMÃO, L. C. C. Estimativas de tamanho de parcelas para avaliação de descritores fenotípicos em bananeira. **Pesq. agropec. Bras**, Brasília, v.43, n.8, p.957-969, ago. 2008.

GARCÍA-TEJERO, I.; ROMERO-VICENTE, R.; JIMÉNEZ-BOCANEGRA, J. A.; MARTÍNEZ-GARCÍA, G.; DURÁN-ZUAZO, V. H.; MURIEL-FERNÁNDEZ, J. L. Response of citrus trees to deficit irrigation during different phenological periods in relation to yield, fruit quality, and water productivity. **Agricultural Water Management**, v.97, n.5, p.689–699, 2010.

JAIMEZ, R. E.; RADA, F.; GARCIA-NÚÑEZ, C.; AZÓCAR, A. Seasonal variations in leaf gas exchange of plaitain cv. Hartón (Musa AAB) under different soil water conditions in a humid tropical region. **Scientia Horticulturae**. v.104, n.1, p.79-89, 2005.

JIFON, J. L., SYVERTSEN, J. P. Moderate shade can increase net gas exchange and reduce photoinhibition in citrus leaves. **Tree Physiol**, v.23, p.119–127, 2003.

LECHINOSKI, A.; FREITAS, J. M. N., CASTRO, D. S.; LOBATO, A. K. S.; OLIVEIRA NETO, C. F.; CUNHA, R. L. M. Influência do Estresse Hídrico nos Teores de Proteínas e Aminoácidos Solúveis Totais. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, p.927-929, jul. 2007.

LEITE, M. S. O.; PETERNELLI, L. A.; BARBOSA, M. H. P.; CECON, P. R.; CRUZ, C. D. Sample size for full-sib family evaluation in sugarcane. **Pesq. Agropec. Bras**, v.44, n.12, p.1562-1574, dez. 2009.

LESSMAN, K. J.; ATKINS R.E.. Optimum plot size and relative efficiency of lattice designs for grain sorghum yield tests. **Crop Science**, v.3, p.477-481. 1963.

LIMA, J. F.; PEIXOTO, C. P.; LEDO, C. A. S.; FARIA, G. A. Tamanho ótimo de parcela para experimentos com plantas de mamoeiro em casa de vegetação. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.5, p.1411-1415, 2007.

Liu, K.; Muse, S. V. Power Marker: Integrated analysis environment for genetic marker data. **Bioinformatics**, v.21, p.2128-2129, 2005.

LUIZ da SILVA, R.; XAVIER, A.; GARCIA, H. L.; PIRES, I. E. Determinação do tamanho ótimo da parcela experimental pelos métodos da máxima curvatura modificado, do coeficiente de correlação intra-classe e da análise visual em testes clonais de eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, vol.27, n.5, p.669-676, setembro-outubro 2003.

MARTIN, T. N.; STORCK, L.; LÚCIO, A. D.; CARVALHO, M. P.; SANTOS, P. M. Bases genéticas de milho e alterações no plano experimental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.35-40, 2005.

MATTOS JÚNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, J. **Citros C498**. Campinas: Instituto Agrônômico e FUNDAG, p. 929, 2005.

MEIER, V. D.; LESSMAN, K. J. Estimation of optimum field plot shape and size for testing yield in *Crambe abyssinica* Hochst. **Crop Science**, v.11, p.648-650, 1971.

MURRAY, H.G.; THOMPSON W.F. Rapid isolation of high molecular weight DNA. **Nucleic Acids Res**, v.8, p.4321-4325, 1980.

OLIVEIRA PH; ESTEFANEL V. Tamanho e forma da parcela para avaliação do rendimento em experimentos com batata. **Ciência Rural**, v.25, p.205-220, 1995.

PEIXOTO, C. P.; CERQUEIRA, E. C.; SOARES FILHO, W. S.; CASTRO NETO, M. T.; LEDO, C. A. S.; MATOS, F.S. A.; OLIVEIRA, J. G. Análise de crescimento de diferentes genótipos de citros cultivados sob déficit hídrico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n.3, p.439-443, 2006.

POMPEU JUNIOR, J.; BLUMER, S. Performance de citrumelos F80 no Estado de São Paulo. **Laranja**. v.26, n.1, p.77-85, 2005.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2014. Disponível em: <http://www.R-project.org/>.

SANTOS, R. F.; CARLESSO, R. Water deficit and morphologic and physiologic behavior of the plants. **Rev. Bras. Eng. Agric. Ambient**, v.2, p.287-294, 1998.

SHIMAZAKI, K. I.; DOI, M.; ASSMANN, S. M.; KINOSHITA, T. Light regulation of stomatal movement. **Annual Review of Plant Biology**, v.58, p.219-247, Jul 2007.

SOARES FILHO, W.; LEDO, C. A. S.; QUINTELA, M. P.; MATTOS, L. A.; PASSOS, O. S.; SOUZA, A. S. Cruzamentos em citros: frequência e vigor de híbridos. **Rev. Bras. Frutic**, Jaboticabal, v.29, n.2, Aug, 2007.

Storck, L.; Martin, T. N.; Lúcio, A. D.; Lopes, S. J.; Santos, P. M. dos S.; Carvalho, M. P. de. Tamanho ótimo de parcela em experimentos com milho relacionado a metodologias. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**. v.5, p.48-57, 2006.

SUASSUNA, J. F.; FERNANDES, P. D.; NASCIMENTO, R.; OLIVEIRA, A. C. M.; BRITO, K. S. A.; MELO, A. S. Produção de fitomassa em genótipos de citros submetidos a estresse hídrico na formação do porta-enxerto. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.16, n.12, p.1305-1313, 2012.

Taiz, L.; Zeiger, E. Fisiologia Vegetal. 4. ed, Porto Alegre: **Art Med**. 2009. 819p.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Método da Máxima Curvatura Modificada foi eficiente para a cultura de citros. Observou-se que os tamanhos de amostras foram diferenciados para cada variável estudada ao longo dos anos analisados nas três progênes.

Fatores ambientais e genéticos podem influenciar no tamanho ótimo de amostra em menor ou maior grau, a depender do caráter. Fatores como homoziguidade, condições climáticas e idade das plantas também são relevantes no momento de definir-se o tamanho ótimo de amostra.

Salienta-se que avaliações realizadas em anos diferentes são necessárias para maior acurácia do método. Dessa forma, recomenda-se, considerando o caráter altura de planta, diâmetro do tronco e vigor visual para as três progênes TSKFL x (LCR x TR). TSKFL x CTSW e TSKFL x TRBK, tamanho de amostra em torno de 18 plantas, nas condições ambientais e genéticas apresentadas.

Para o caráter poliembrionia as maiores variações foram encontradas para progênes com poliembrionia intermediárias (10% a 90%), em que as progênes com poliembrionia alta ou baixa apresentaram tamanhos ótimos de amostras menores. Deve-se levar em consideração fatores ambientais, nutrição da planta, cultivar, forma de polinização e variedade polinizadora, pois podem influenciar no tamanho

ótimo de amostra. Por fim, para os caracteres enrolamento foliar e brotação, acredita-se que uma superestimação de dez plantas seja suficiente para representar os dois caracteres em todos os anos avaliados.

ANEXO A


```

                                ylab=list("Tamanho da amostra", rot=-25,
cex=1),
                                xlab=list("Reamostragem", rot=45, cex=1),
                                zlab=list('CV', rot=95, cex=1),
                                par.box = list(col=c(1,1,NA,NA,1,NA,1,1,1)))
    }
    if(pl==2){
      nonlinear <- nls(CV ~ a*Tamanho^(-b), data=result.saida,
start=list(a=7, b=1))
      coefc <- coef(nonlinear)
      Xc <-
round((((coefc[1]^2)*(coefc[2]^2)*(2*coefc[2]+1))/(coefc[2]+2))^(1/(2+2
*coefc[2])),1)
      yt <- round(coefc[1]*Xc^(-coefc[2]),1)
      print(yt)
      print(Xc)
      t.max <- max(result.saida$Tamanho)
      y.max <- max(result.saida$CV)
      print(xyplot(predict(nonlinear) ~ Tamanho,
data=result.saida, type="a", col="black", ylab="CV", xlab="Tamanho da
amostra",

scales=list(x=list(at=c(Xc,round(seq(0,t.max, by=t.max/3),1))),
            y=list(at=c(yt,
round(seq(0,y.max, by=y.max/7),1)))))+
      as.layer(xyplot(CV ~ Tamanho, data=result.saida, type="p",
col="black",

                    panel=function(...){
                      panel.xyplot(...)
                      panel.segments(x0=c(Xc,Xc),y0=c(0,yt),x1=c(Xc,-
10),y1=c(yt,yt),...)
                    })))
      print(summary(nonlinear))
    }
    # if(pl==3){
    #   xyplot(Desv ~ Tamanho, data=result.saida, type="a",
col="black", ylab="Desvio-padrão", xlab="Tamanho da amostra")
    # }
  }

a = rnorm(80, 100, 40)

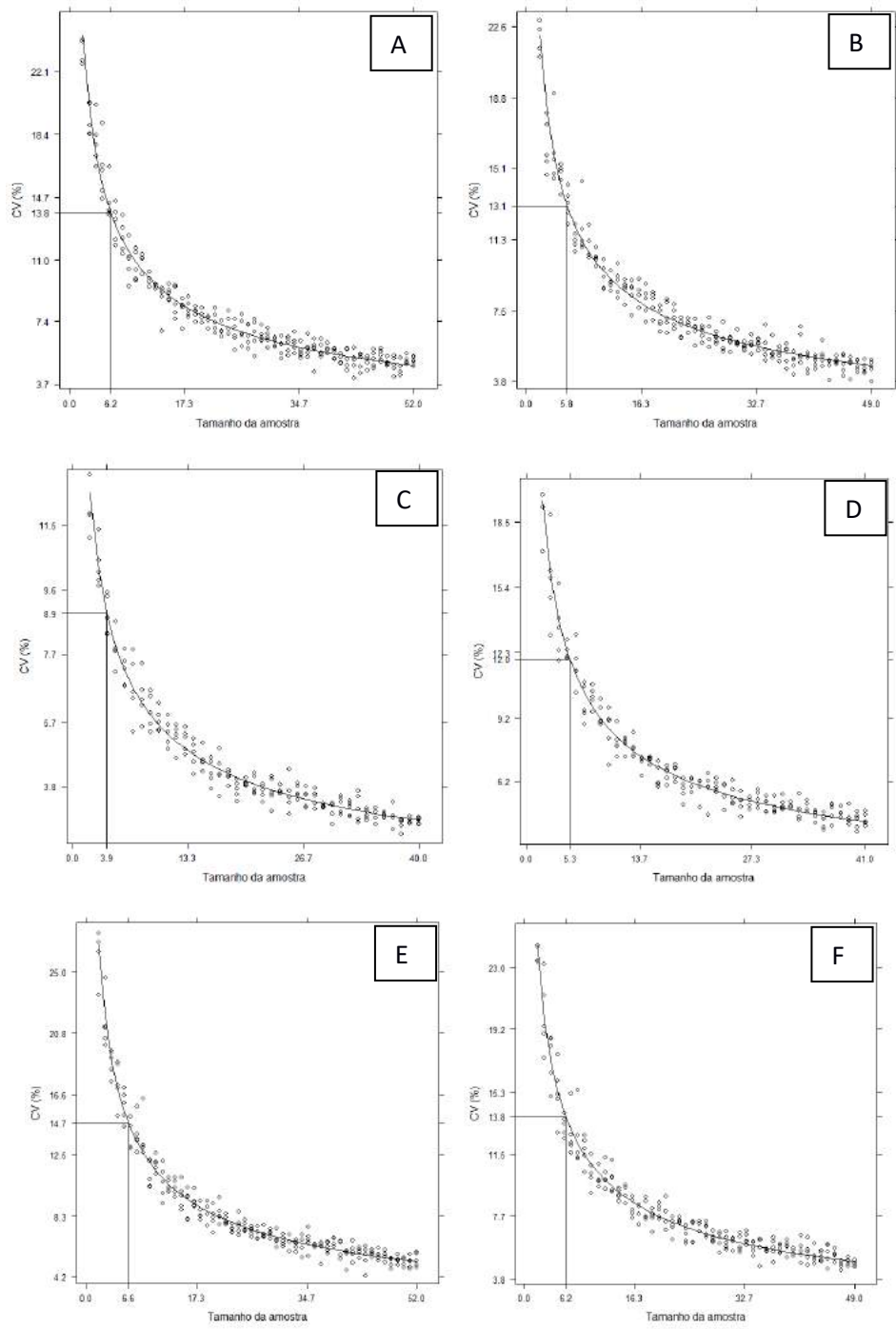
teste <- calc.amostra(a)

plot.amostra(teste)

plot.amostra(teste, pl=1)

```

ANEXO B



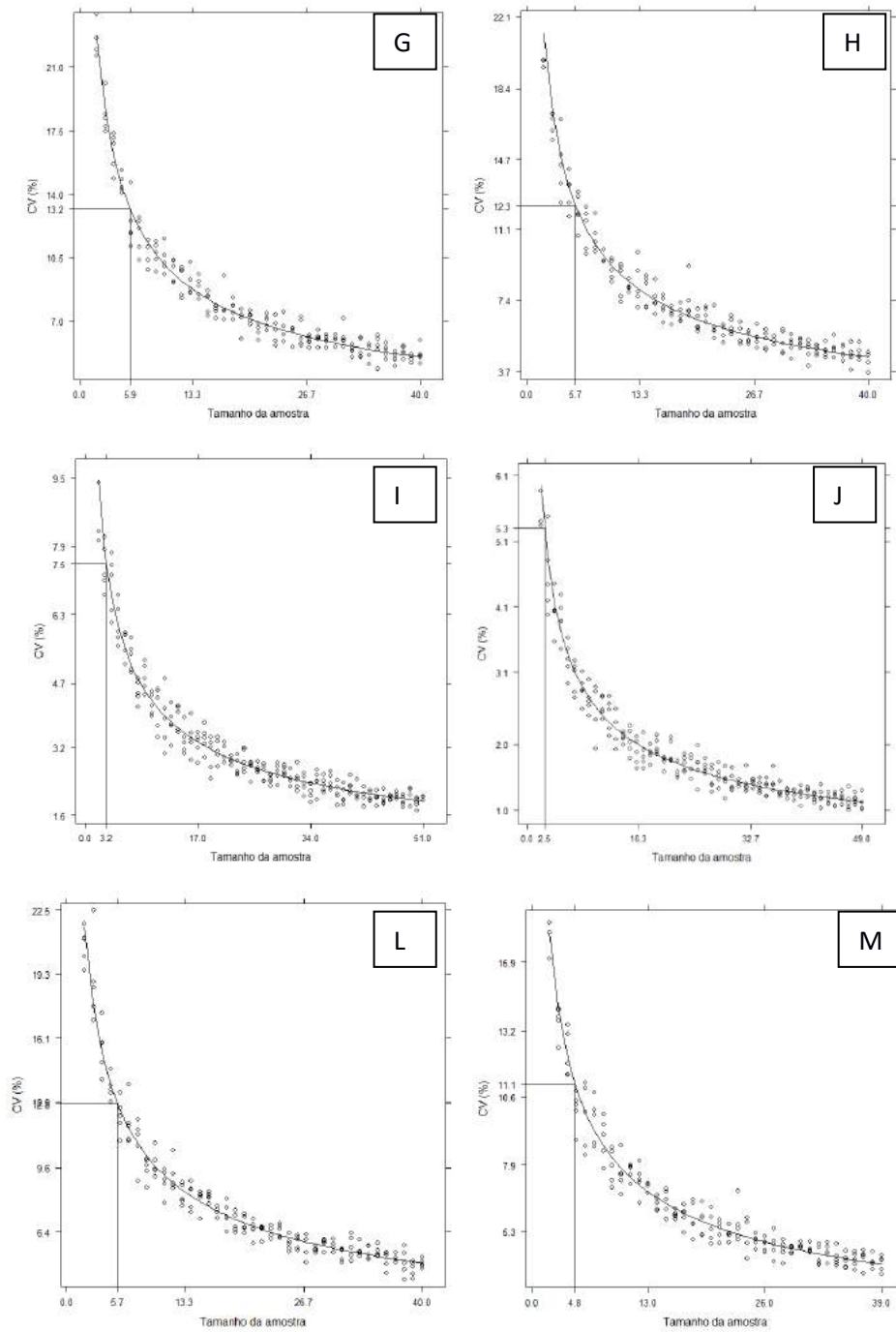
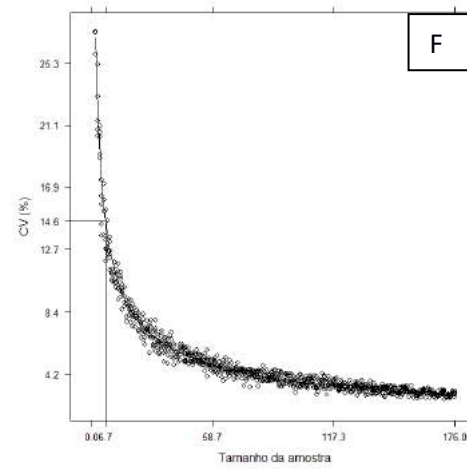
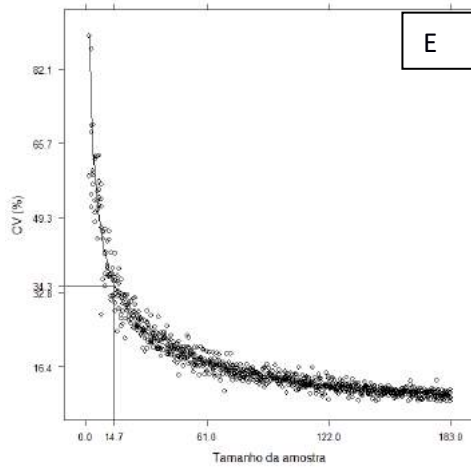
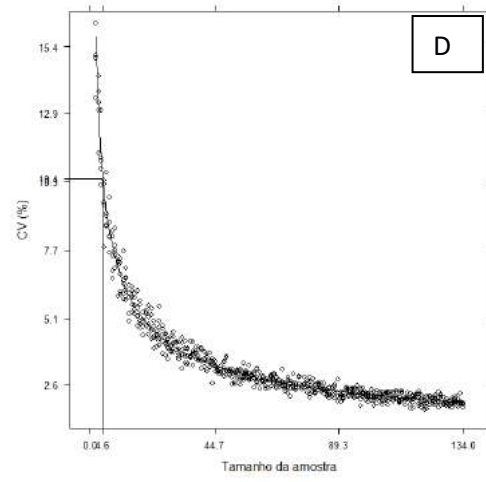
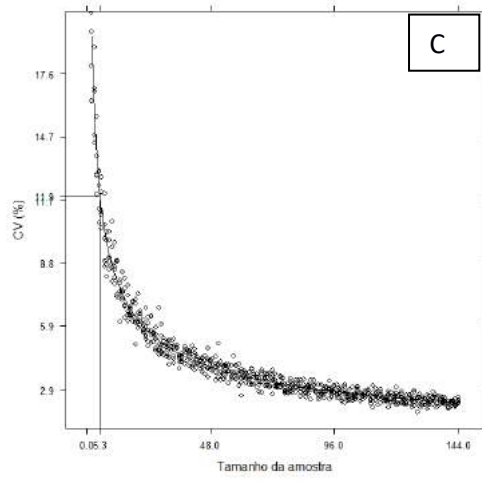
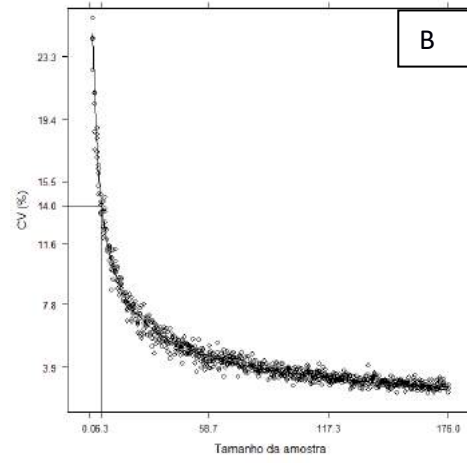
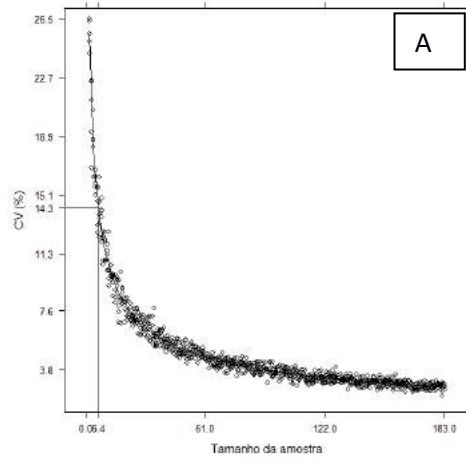


Figura 1. Apresentando os tamanhos ótimos de amostras para a progênie TSKFL x (TR x LCR) nos diferentes anos. As letras A, B, C e D são para o caráter altura de planta para os anos 2010, 2011 e 2015 e 2016; E, F, G e H para o caráter diâmetro do tronco para os anos de 2010, 2011, 2015 e 2016; I, J, L e M para o caráter vigor visual para os anos de 2010, 2011, 2015 e 2016.



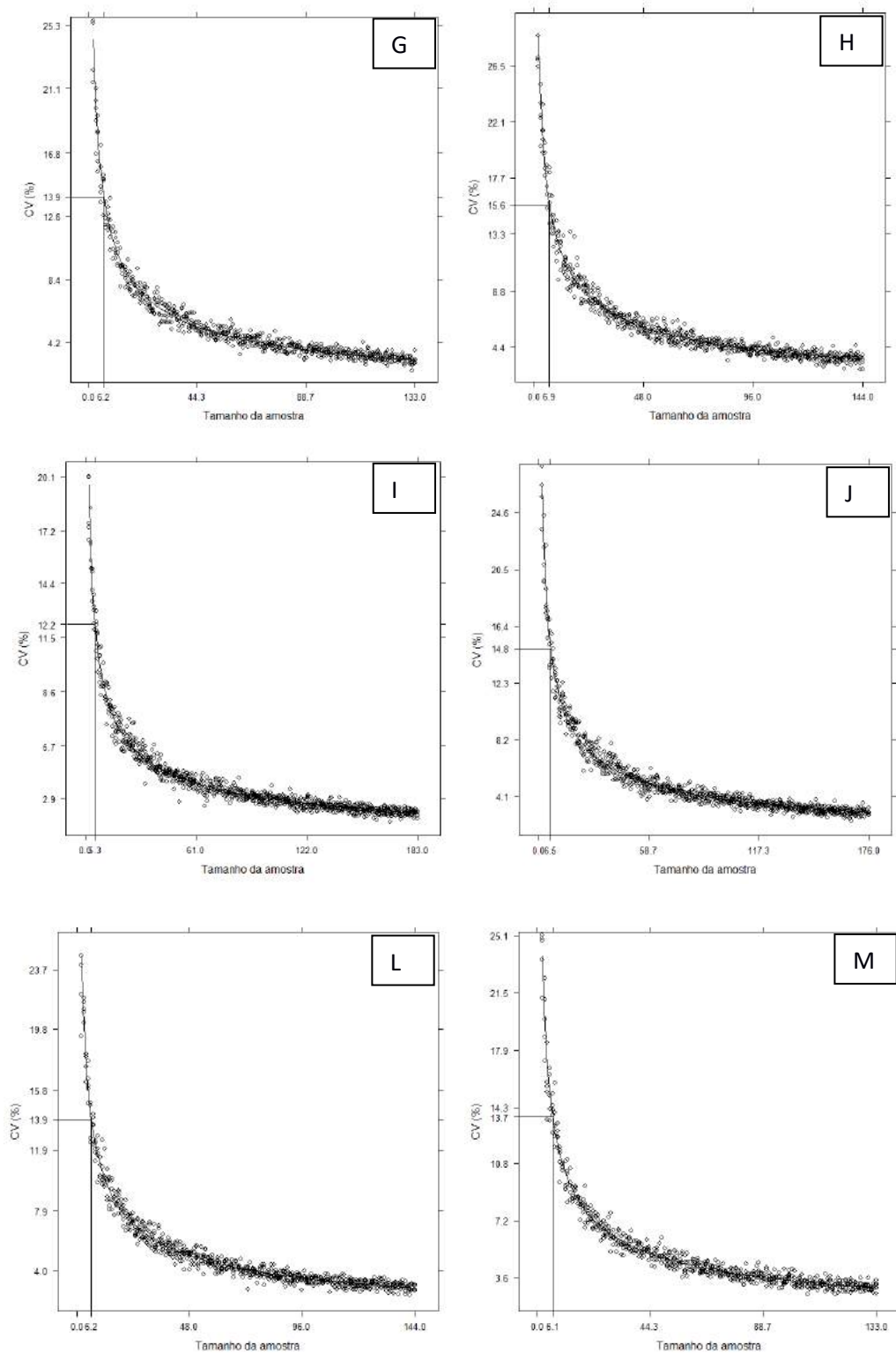
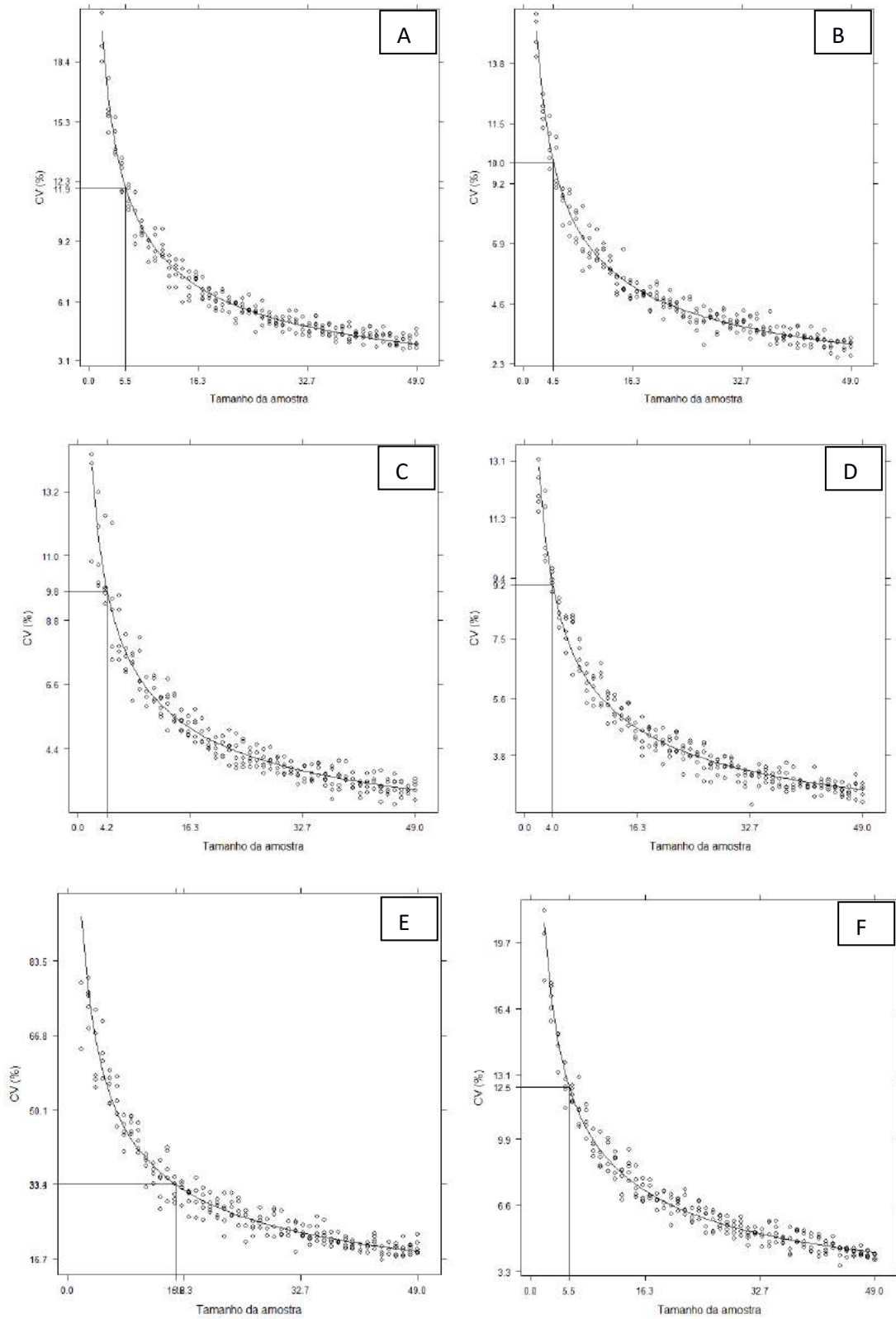


Figura 2. Apresentando os tamanhos ótimos de amostras para a progênie TSKFL x CTSW nos diferentes anos. As letras A, B, C e D são para o caráter altura de planta para os anos 2010, 2011 e 2015 e 2016; E, F, G e H para o caráter diâmetro do tronco para os anos de 2010, 2011, 2015 e 2016; I, J, L e M para o caráter vigor visual para os anos de 2010, 2011, 2015 e 2016.



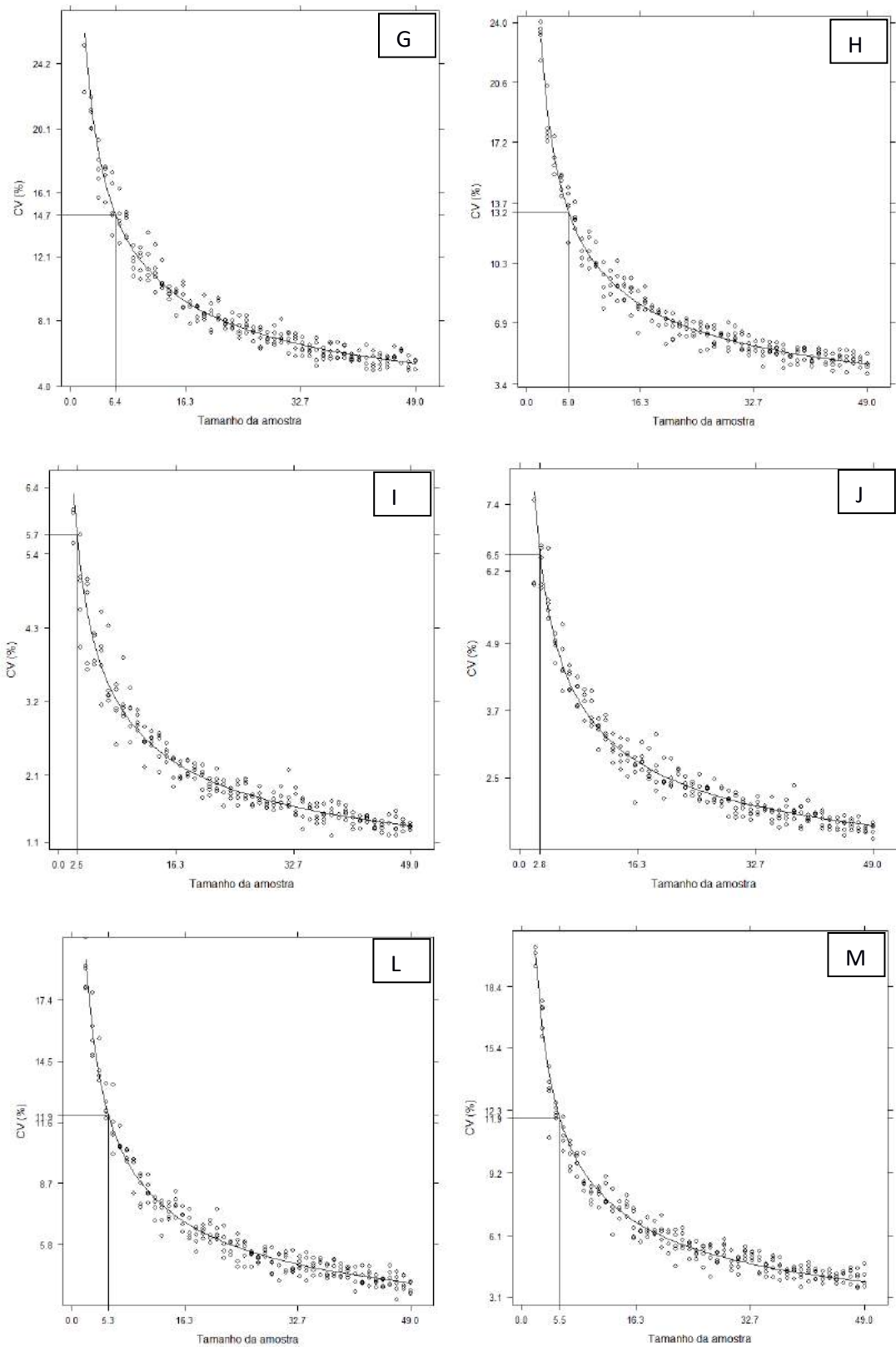
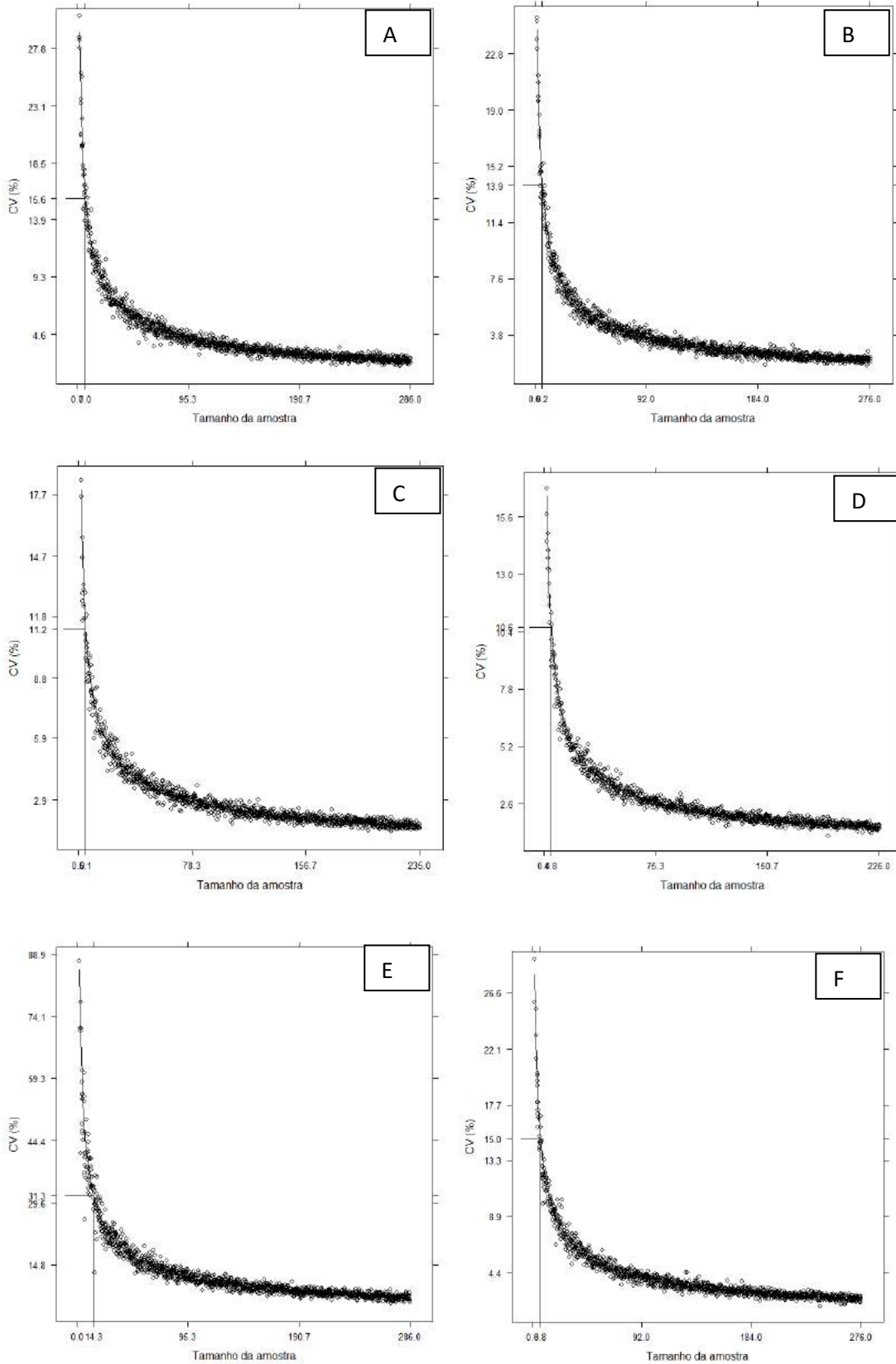


Figura 3. Apresentando os tamanhos ótimos de amostras para a progênie TSKFL x TRBK nos diferentes anos. As letras A, B, C e D são para o caráter altura de planta para os anos 2010, 2011 e 2015 e 2016; E, F, G e H para o

caráter diâmetro do tronco para os anos de 2010, 2011, 2015 e 2016; I, J, L e M para o caráter vigor visual para os anos de 2010, 2011, 2015 e 2016.



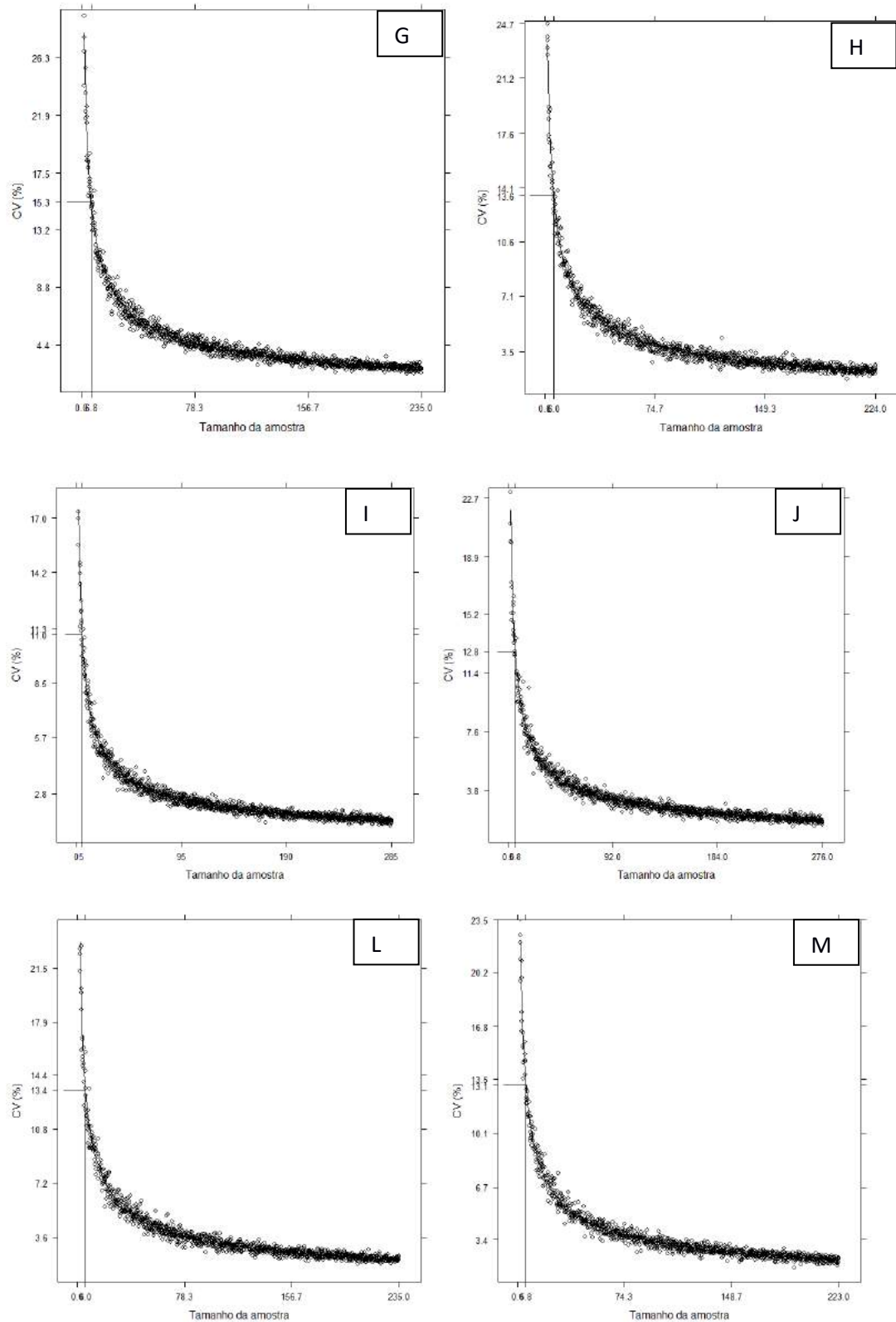


Figura 4. Apresentando os tamanhos ótimos de amostras para as três progênies TSKFL X (TR X LCR), TSKFL X CTSW e TSKFL x TRBK nos diferentes anos. As letras A, B, C e D são para o caráter altura de planta para os anos 2010, 2011 e 2015 e 2016; E, F, G e H para

o caráter diâmetro do tronco para os anos de 2010, 2011, 2015 e 2016; I, J, L e M para o caráter vigor visual para os anos de 2010, 2011, 2015 e 2016.

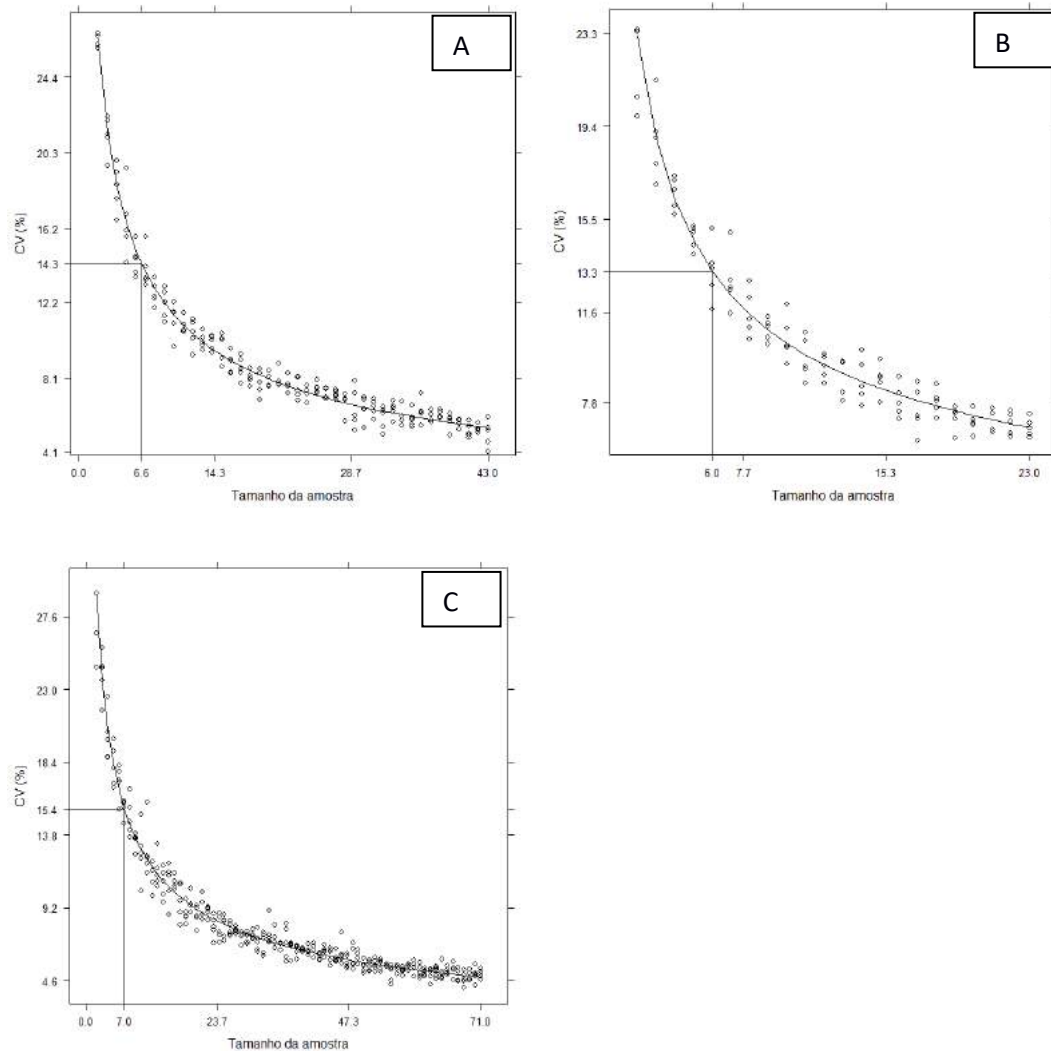


Figura 5. Apresentando os tamanhos ótimos de amostras para a progênie TSKFL X CTSW referente ao caráter poliembrionia nos anos 2013, 2014 e 2016, letras A, B, C, respectivamente.

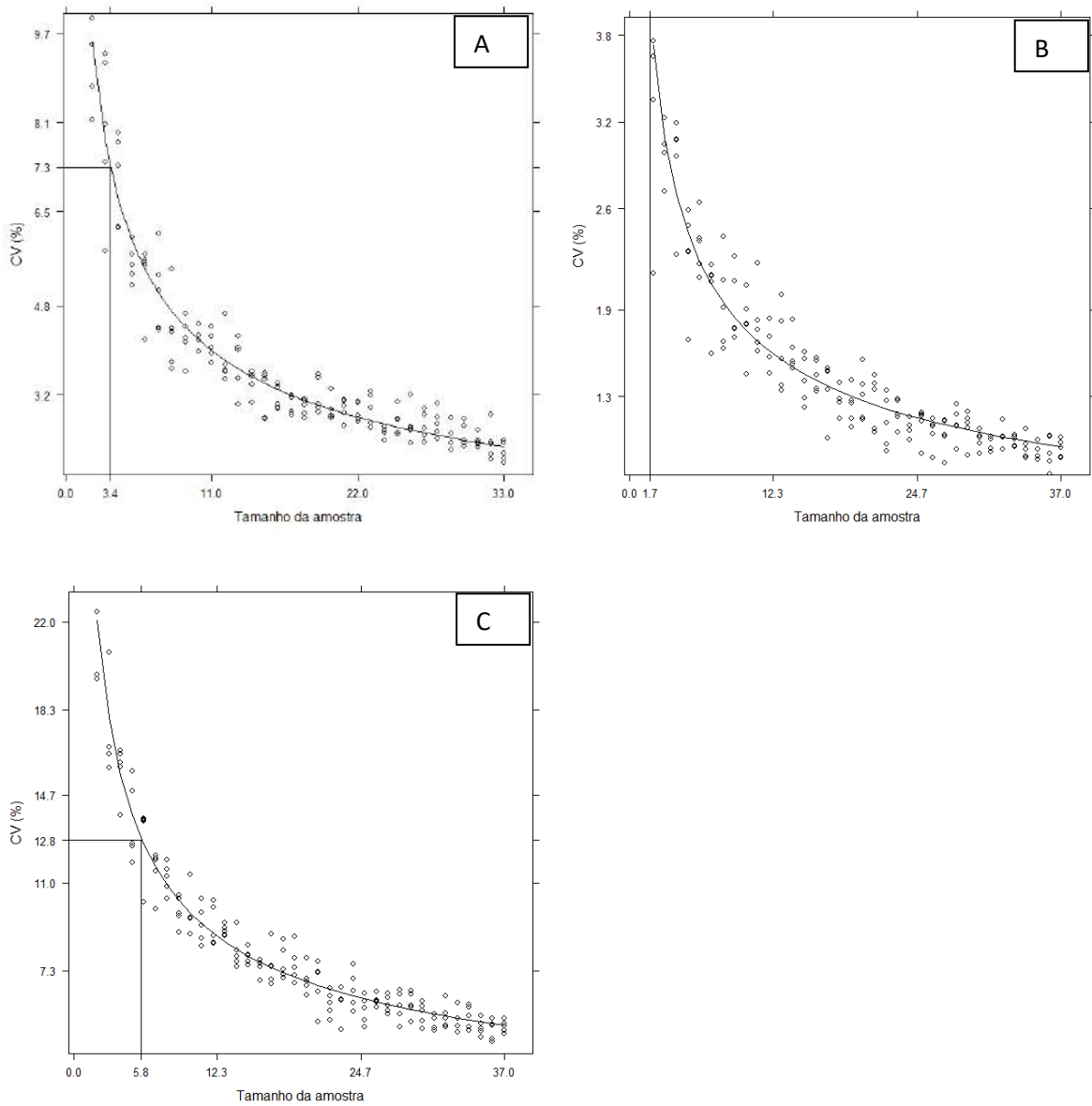


Figura 6. Apresentando os tamanhos ótimos de amostras para a progênie TSKFL X TRBK referente ao caráter poliembrião, nos anos 2013, 2014 e 2016, letras A, B, C, respectivamente.

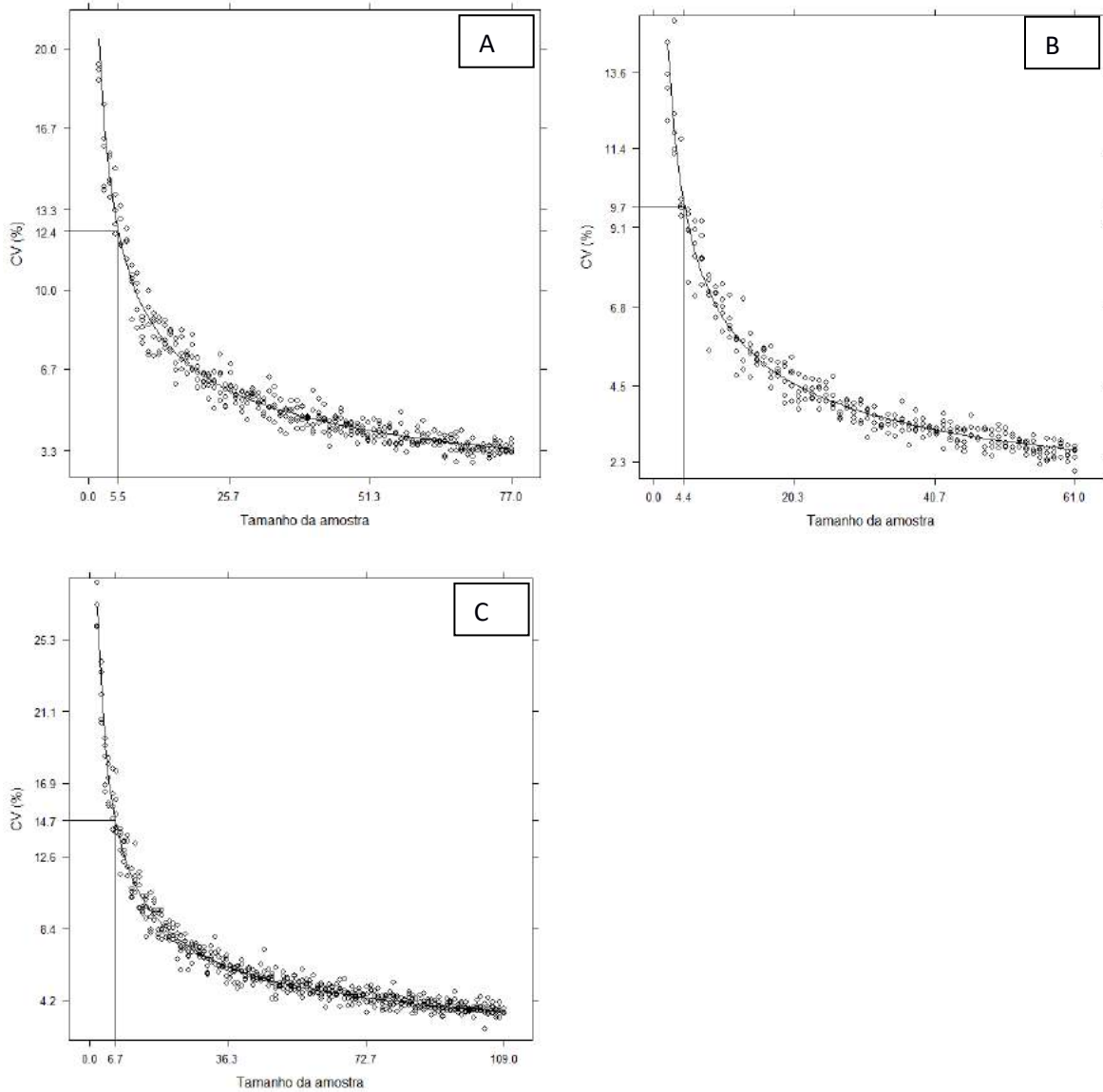


Figura 7. Apresentando os tamanhos ótimos de amostras para as progênies TSKFL x CTSW e TSKFL X TRBK referente ao caráter poliembrião, nos anos 2013, 2014 e 2016, letras A, B, C, respectivamente.

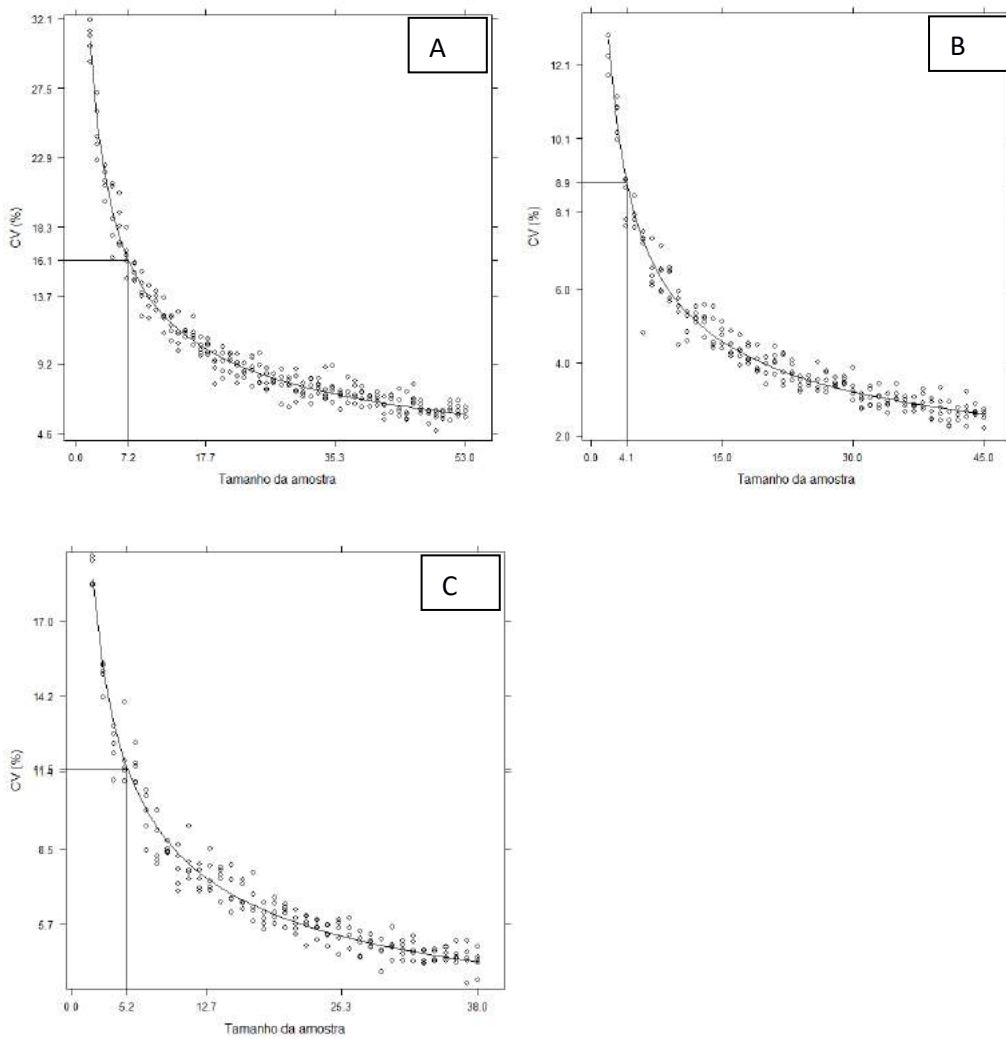


Figura 8. Apresentando os tamanhos ótimos de amostras para a progênie TSKFL x (TR x LCR) referente ao caráter enrolamento foliar, nos anos 2009, 2012 e 2015, letras A, B, C, respectivamente.

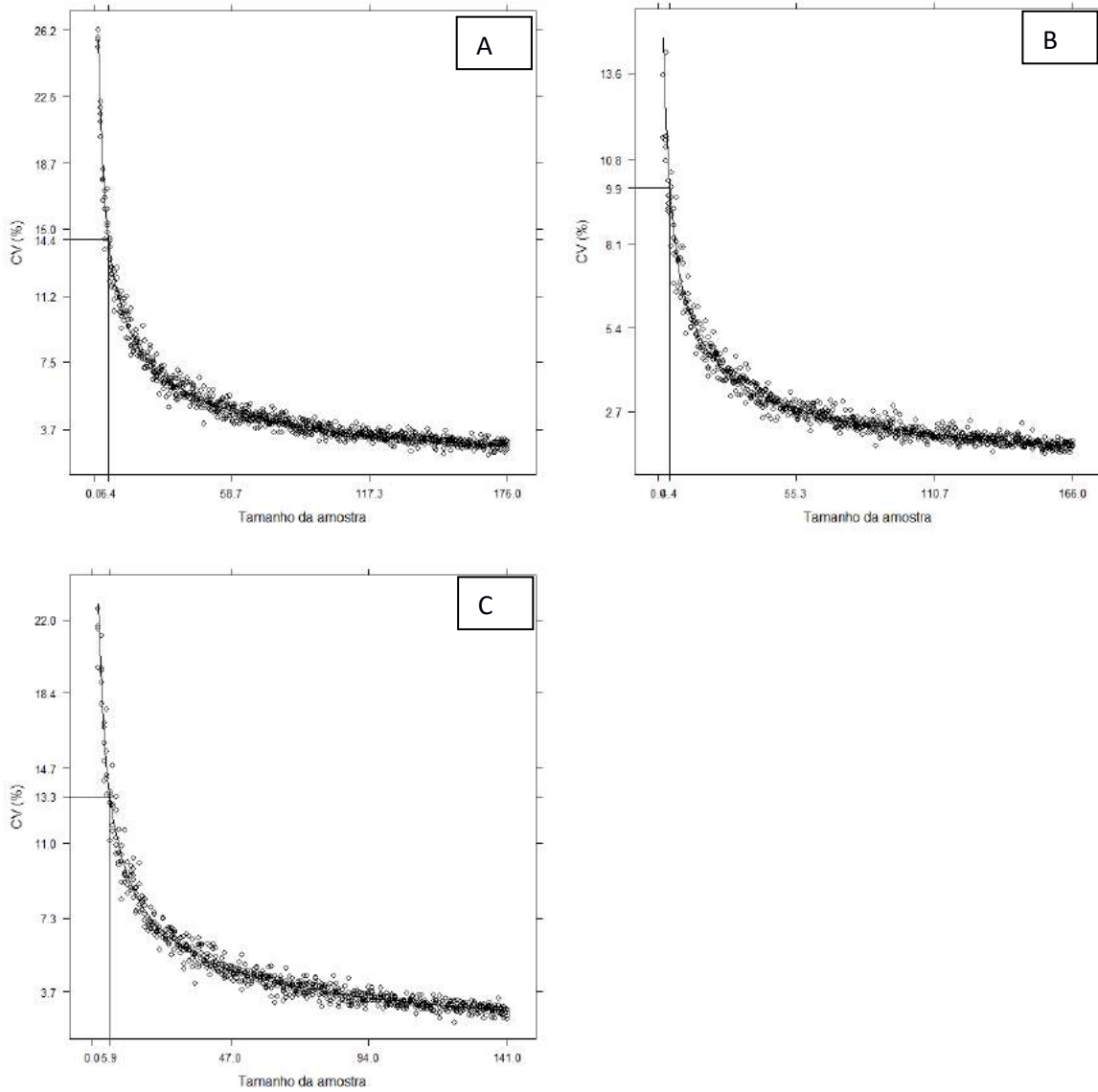


Figura 9. Apresentando os tamanhos ótimos de amostras para a progênie TSKFL x CTSW referente o caráter enrolamento foliar, nos anos 2009, 2012 e 2015, letras A, B, C, respectivamente.

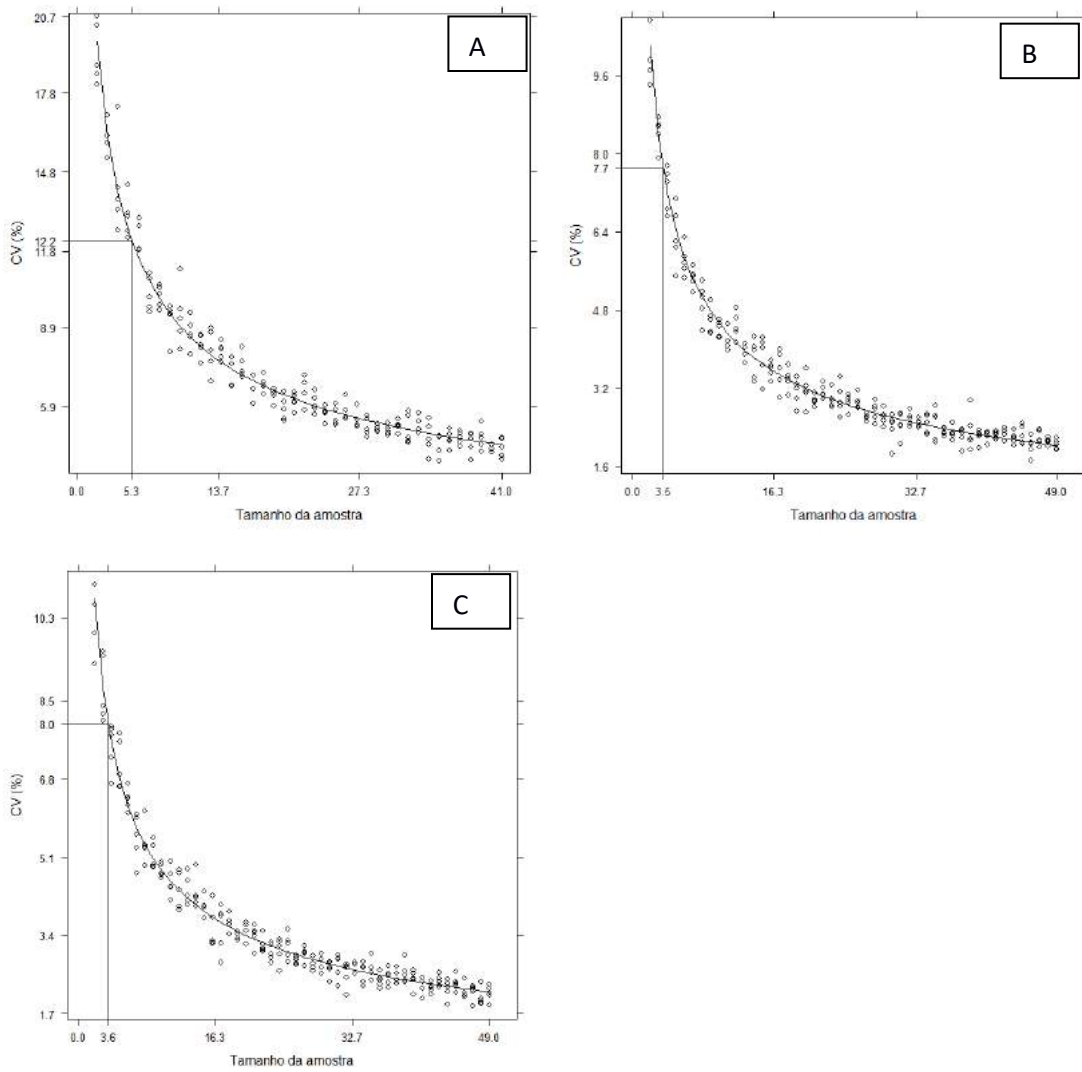


Figura 10. Apresentando os tamanhos ótimos de amostras para a progênie TSKFL x TRBK referente ao caráter enrolamento foliar, nos anos 2009, 2012 e 2015, letras A, B, C, respectivamente.

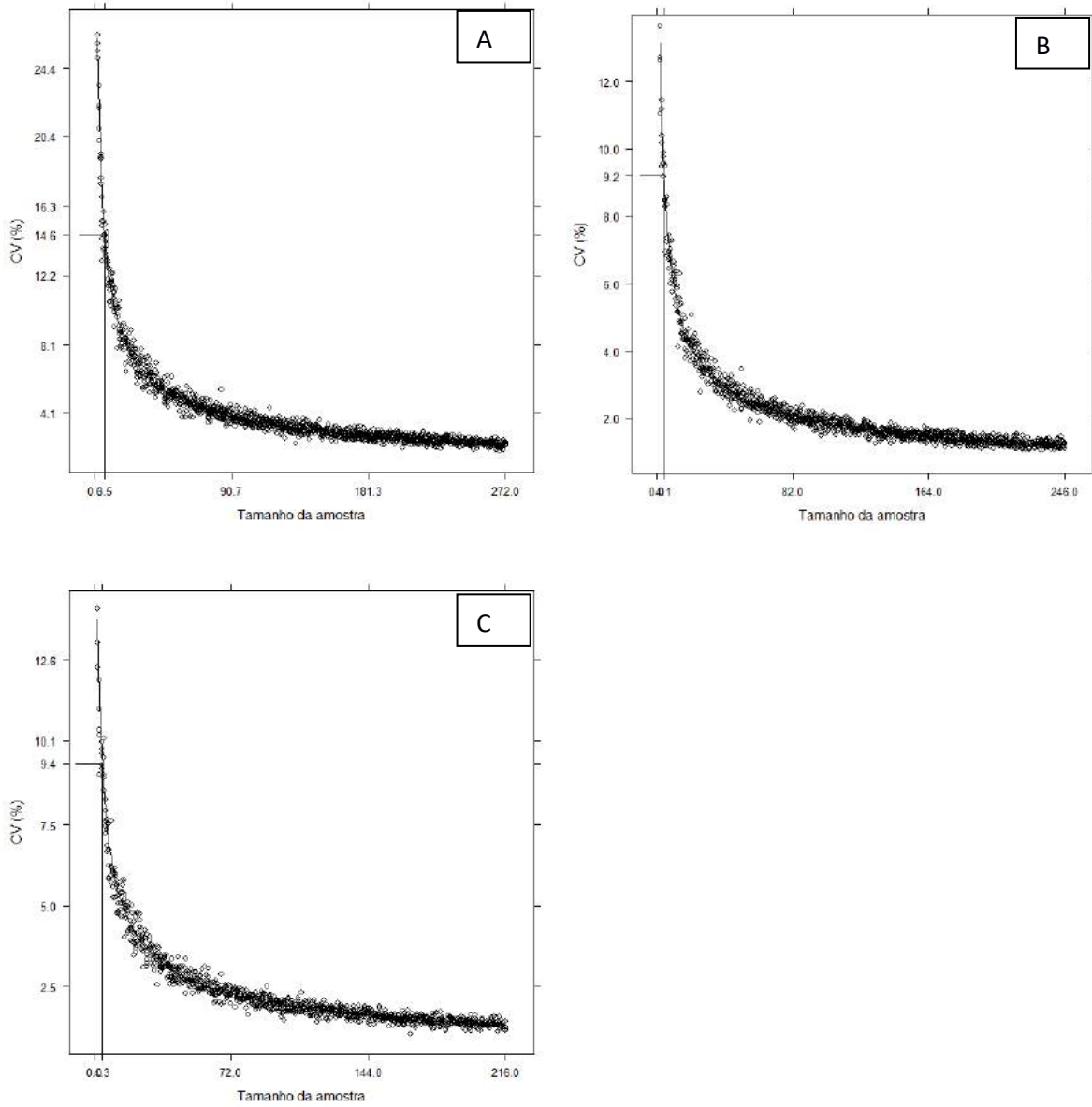


Figura 11. Apresentando os tamanhos ótimos de amostras para as três progênies TSKFL x (TR x LCR), TSKFL x CTSW e TSKFL x TRBK referente ao caráter enrolamento foliar, nos anos 2009, 2012 e 2015, letras A, B e C, respectivamente.

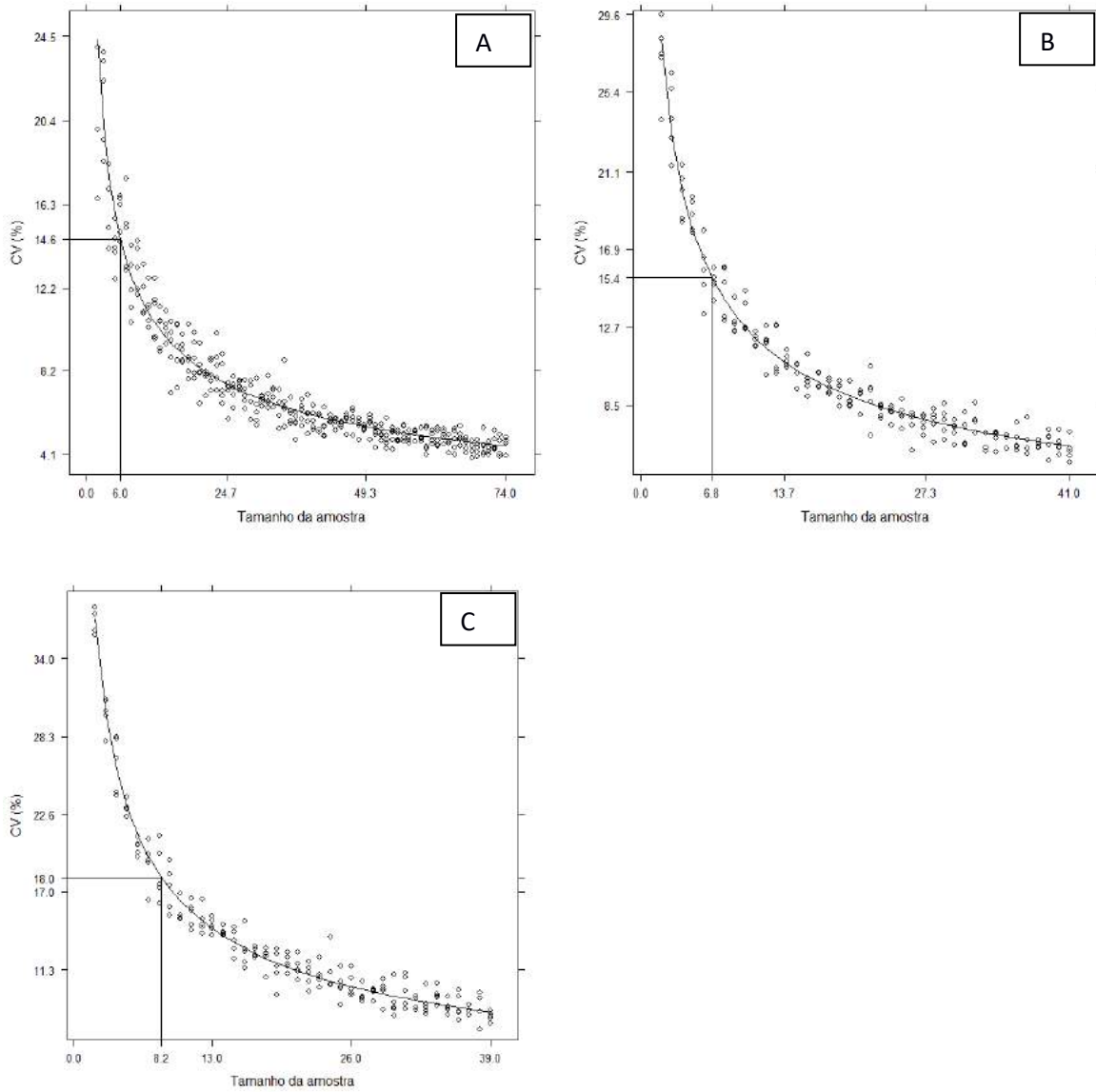


Figura 12. Apresentando os tamanhos ótimos de amostras para a progênie [TSKFL x (TR x LCR)] referente ao caráter brotação nos anos 2013, 2015 e 2016, letras A, B e C, respectivamente.

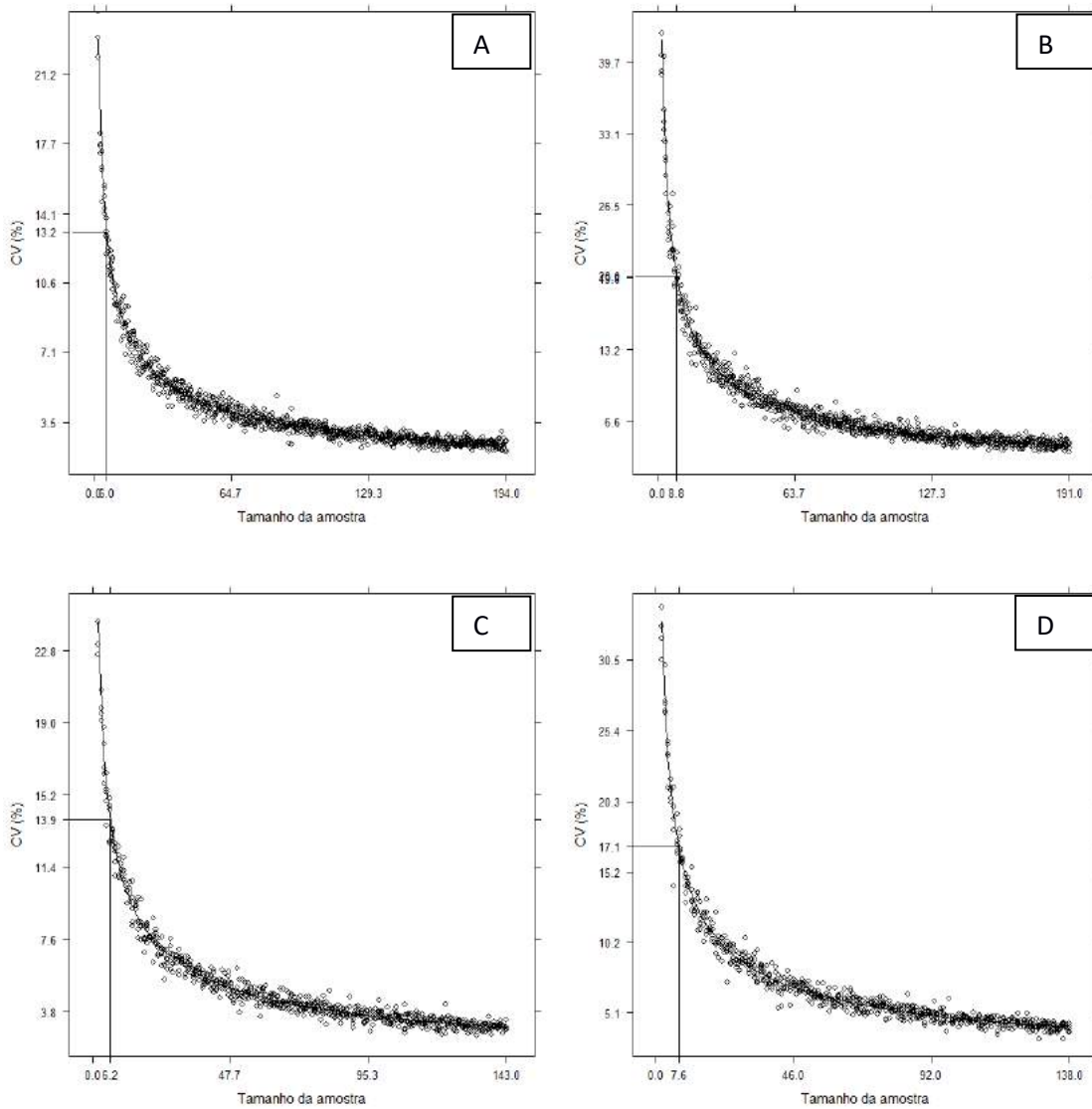


Figura 13. Apresentando os tamanhos ótimos de amostra para a progênie TSKFL x CTSW referente ao caráter brotação nos anos 2012, 2013 e 2015, 2016 letras A, B, C e D, respectivamente.

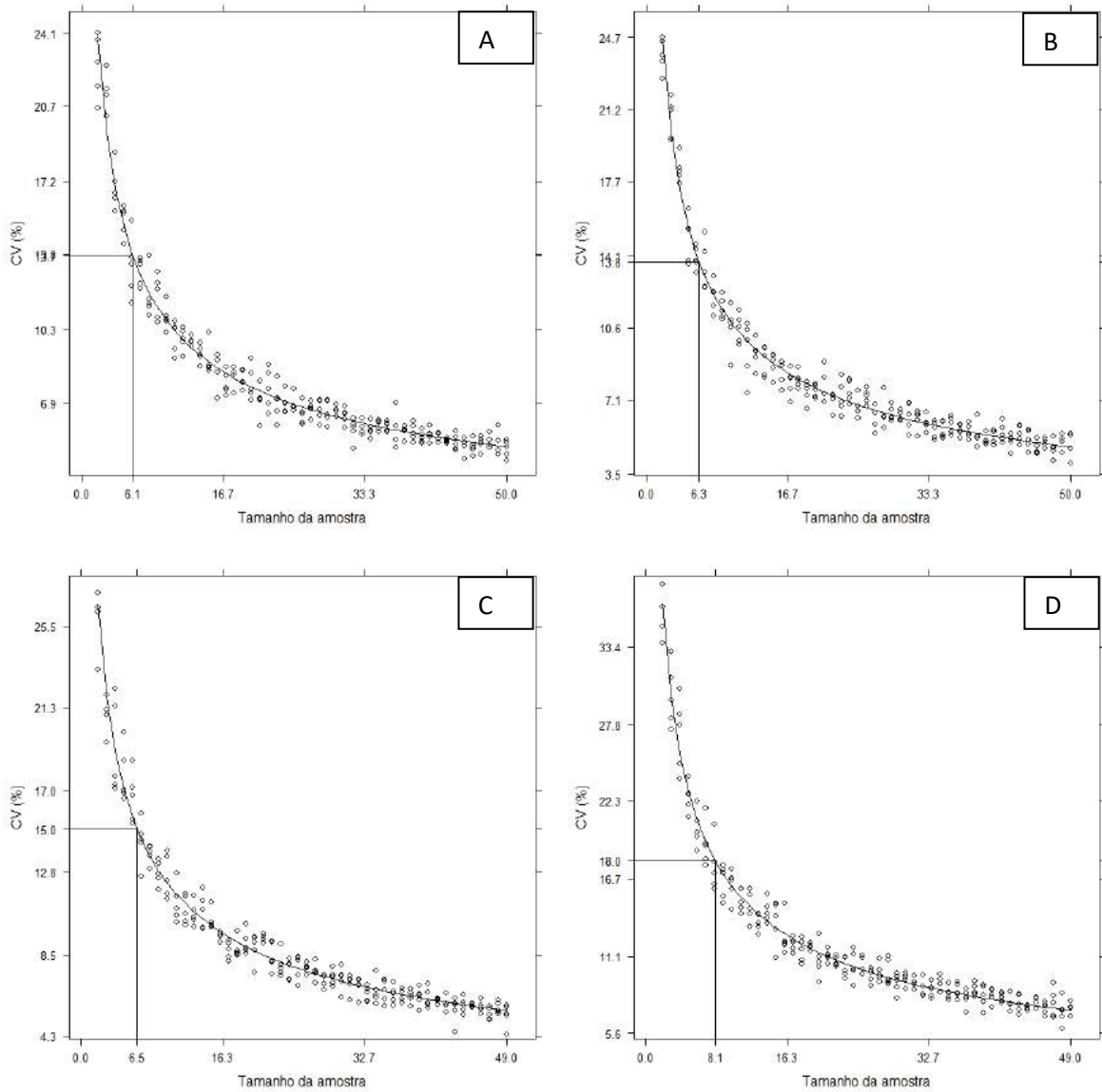


Figura 14. Apresentando os tamanhos ótimos de amostra para o cruzamento TSKFL x TRBK referente ao caráter brotação, nos anos 2012, 2013 e 2015, 2016 letras A, B, C e D, respectivamente.

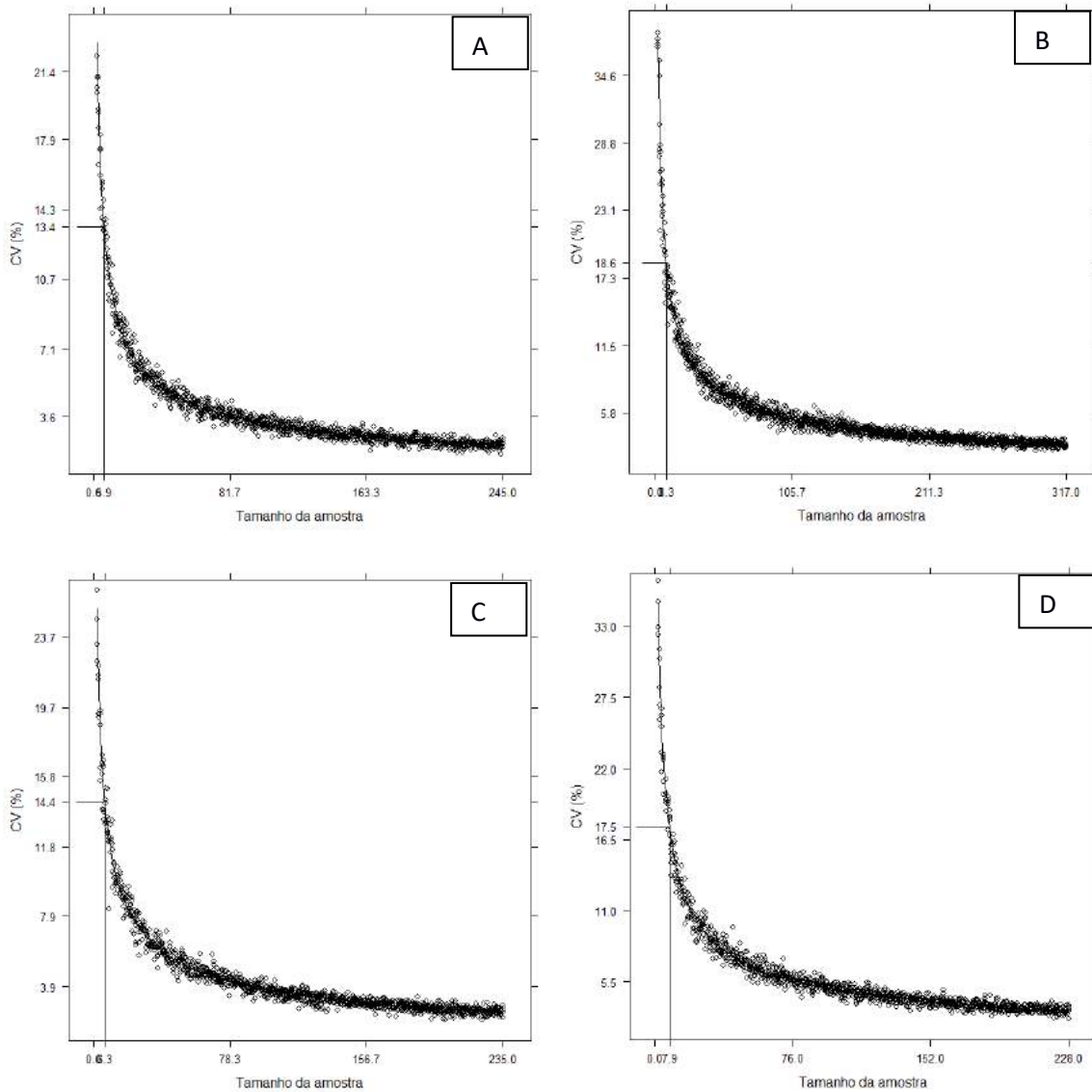


Figura 15. Apresentando os tamanhos ótimos de amostra para as três progênes TSKFL x (TR x LCR), TSKFL x CTSW e TSKFL x TRBK BK referente ao caráter brotação, nos anos 2012, 2013 e 2015, 2016 letras A, B, C e D, respectivamente.