

**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**

**CULTIVO *IN VITRO* EM AUXÍLIO À OBTENÇÃO DE  
TANGERINEIRAS TRIPLOIDES E PROPAGAÇÃO DE  
PORTA-ENXERTOS DE CITROS**

**Reisane Teles Santiago**

**CRUZ DAS ALMAS-BAHIA  
2017**

**CULTIVO *IN VITRO* EM AUXÍLIO À OBTENÇÃO DE  
TANGERINEIRAS TRIPLOIDES E PROPAGAÇÃO DE PORTA-  
ENXERTOS DE CITROS**

**Reisane Teles Santiago**

Bacharel em Biologia

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2015

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

**Orientador:** Prof. Dr. Walter dos Santos Soares Filho

**Coorientador:** Dr. Abelmon da Silva Gesteira

**Coorientador:** Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo

**CRUZ DAS ALMAS-BAHIA  
2017**

## FICHA CATALOGRÁFICA

S235c

Santiago, Reisane Teles.

Cultivo *in vitro* em auxílio à obtenção de tangerineiras triploides e propagação de porta-enxertos de citros / Reisane Teles Santiago. – Cruz das Almas, BA, 2017.

63f.; il.

Orientador: Walter dos Santos Soares Filho.

Coorientador: Abelmon da Silva Gesteira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Tangerina – Cultivo in vitro. 2.Tangerina – Melhoramento genético. 3.Porta-enxertos – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Ledo, Carlos Alberto da Silva. III.Título.

CDD: 634.3

**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**

**CULTIVO *IN VITRO* EM AUXÍLIO À OBTENÇÃO DE  
TANGERINEIRAS TRIPLOIDES E PROPAGAÇÃO DE PORTA-  
ENXERTOS DE CITROS**

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de  
Reisane Teles Santiago

Aprovada em 25 de abril de 2017

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

Profa. Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB  
(Examinador Interno)

Profa. Dra. Mariane de Jesus da Silva de Carvalho  
Faculdade Maria Milza - FAMAM  
(Examinador Externo)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, eterno protetor, pelo dom da vida.

Ao meu orientador Dr. Walter dos Santos Soares Filho, pela oportunidade, ensinamentos, confiança, presteza, orientação e apoio.

Ao pesquisador Dr. Antônio da Silva Souza por toda orientação, paciência e conhecimentos a mim transmitidos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos coorientadores Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo e Dr. Abelmon da Silva Gesteira pelas contribuições.

A toda equipe do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura pelas colaborações, aprendizado e amizade.

Ao Edson Souza e Senhor Getúlio Vieira, pela ajuda no campo, e com as polinizações controladas.

Ao Senhor Shizuo Hayashi e funcionários da Agropecuária Hayashi Ltda, pelas colaborações com as coletas dos frutos e polinizações realizadas em Mucugê.

Ao Senhor Paulo Cavalcanti e funcionários da Lavoura e Pecuária Igarashi Ltda, pelas contribuições para a execução deste trabalho.

Ao Lucas Almeida e os estagiários de iniciação científica pela ajuda com as análises de citometria de fluxo.

Ao Prof. Rogério Ferreira Ribas pela amizade, pelos conselhos, paciência com minhas idas frequentes ao Laboratório para usar o espaço e a internet, por ser gentil e estar sempre disposto a me ajudar todas as vezes que precisei.

A toda minha família pelo apoio incondicional e incentivo, especialmente, aos meus pais e irmãos, por todo amor e carinho que me dedicam.

A todos os colegas, por todos os bons momentos compartilhados ao longo dessa trajetória.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, pela oportunidade de realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela base financeira.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	VI
ABSTRACT .....	VII
INTRODUÇÃO .....	1
Importância econômica da citricultura no Brasil .....	1
Melhoramento genético de citros .....	2
Poliploides.....	4
Triploides em citros .....	6
Cultivo <i>in vitro</i> em citros .....	8
REFERÊNCIAS.....	9
CAPÍTULO 1 .....	14
RESUMO.....	15
ABSTRACT: .....	16
INTRODUÇÃO .....	17
MATERIAL E MÉTODOS.....	18
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
Ploidia das plantas de citros obtidas de polinizações abertas, por meio da citometria de fluxo .....	23
Ploidia das plantas de citros obtidas de cruzamentos controlados, por meio da citometria de fluxo .....	27
CONCLUSÕES .....	37
REFERÊNCIAS.....	38
CAPÍTULO 2 .....	42
RESUMO.....	43
ABSTRACT .....	44
INTRODUÇÃO .....	45
MATERIAL E MÉTODOS.....	46
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
CONCLUSÕES .....	51
REFERÊNCIAS.....	51
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	55

## CULTIVO *IN VITRO* EM AUXÍLIO À OBTENÇÃO DE TANGERINEIRAS TRIPLOIDES E PROPAGAÇÃO DE PORTA-ENXERTOS DE CITROS

**RESUMO:** Técnicas de cultivo *in vitro* constituem importantes ferramentas de apoio à obtenção e propagação de variedades de citros, copa e porta-enxertos. O objetivo deste trabalho foi obter variedades triploides de tangerineiras e propagar porta-enxertos de interesse agrônomo por meio do cultivo *in vitro*, empregando meio de cultura *Wood Plant Medium* - WPM. Relativamente à obtenção de triploides, foram realizados dois experimentos, nos municípios baianos de Cruz das Almas e de Mucugê, um baseado em frutos de polinizações abertas das variedades Ortanique, Clemenules, Montenegrina, Nova, Piemonte, Page, Dancy, Fremont, Ellendale, Fortune, Span Americana, Murcott, Kincy, Swatow e África do Sul, e outro considerando frutos de cruzamentos controlados tendo como parentais femininos 'Nova', 'Fortune' e 'Ortanique' e como parentais masculinos 'Page', 'Montenegrina', 'Swatow', 'Fremont' e 'Kincy'. Os frutos provenientes tanto das polinizações naturais como dos cruzamentos controlados foram levados ao Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, onde as sementes foram removidas, estas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo aproximadamente 10 mL de meio de cultivo WPM e levadas à sala de crescimento. Quando as plantas atingiram cerca de 60 dias, amostras de folhas foram retiradas para quantificação do DNA por meio da técnica de citometria de fluxo, de acordo com a metodologia descrita por Dolezel et al. (2007), com modificações. A maior frequência de triploides foi obtida em Mucugê, num total de 12 indivíduos: sete provenientes de polinizações controladas e cinco de polinizações abertas. Em Cruz das Almas obteve-se apenas um triploide, oriundo de polinização aberta da variedade Kincy. A 'Ortanique' destacou-se pelo seu maior potencial de produção de triploides. Sementes de menor tamanho e pouco desenvolvidas apresentaram maior capacidade de geração de triploides que as sementes normais. O ambiente de Mucugê, que tem maior altitude e temperaturas mais baixas, favoreceu a formação de triploides. Em relação à propagação de porta-enxertos mediante cultivo *in vitro*, foi realizado experimento com dez híbridos introduzidos ou obtidos pelo Programa de Melhoramento Genético de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura: citrandarins 'San Diego', 'Indio' e 'Riverside', tangerineira 'Sunki Tropical', LRF x (LCR x TR) - 005, HTR - 051, HTR - 069, TSKC x (LCR x TR) - 059, LCR x TR - 001 e TSK x TRBK - Colômbia. Segmentos nodais de plantas matrizes dos dez genótipos, com aproximadamente 1 cm de comprimento, foram inoculados em frascos de vidro contendo 50 mL do meio WPM. Aos 150 dias de cultivo, procedeu-se ao subcultivo dos explantes em novo meio de cultura. O número de plantas formadas por explante foi avaliado aos 180 dias após a inoculação. Os dados obtidos foram submetidos ao teste F da análise de variância e as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. O meio WPM mostrou-se adequado à micropropagação dos genótipos estudados, particularmente do citrandarin 'Indio' e dos híbridos TSKC x (LCR x TR) - 059 e TSK x TRBK - Colômbia. Ajustes no meio WPM são necessários para melhorar a eficiência da micropropagação da tangerineira 'Sunki Tropical' e dos híbridos LRF x (LCR x TR) - 005 e LCR x TR - 001.

**Palavras-chave:** *Citrus* spp.; híbridos de *Poncirus*; hibridação; melhoramento genético

## **IN VITRO CULTURE IN AID THE OBTAINMENT OF TRIPLOID MANDARIN AND PROPAGATION OF IN CITRUS ROOTSTOCK**

**ABSTRACT:** *In vitro* cultivation techniques are important tools to support the production and propagation of citrus varieties, crowns and rootstocks. The objective of this work was to obtain triploid varieties of mandarins and to propagate rootstocks of agronomic interest by means of *in vitro* cultivation, using Wood Plant Medium - WPM. In order to obtain triploids, two experiments were carried out in the municipalities of Cruz das Almas and Mucugê, one based on fruits of open pollinations of the variety Ortanique, Clemenules, Montenegrina, Nova, Piemonte, Page, Dancy, Fremont, Ellendale, Fortune, Span Americana, Murcott, Kincy, Swatow and África do Sul, and another considering fruits of controlled crosses having as female parents 'Nova', 'Fortune' and 'Ortanique' and as male parents 'Page', 'Montenegrina', 'Swatow', 'Fremont' and 'Kincy'. Fruits from both the natural pollination of controlled crossings were taken to the Laboratory for Tissue Culture of Embrapa Cassava and Fruticulture, and its seeds removed, these were inoculated into test tubes containing approximately 10 mL of WPM culture medium and brought into the growth room. When the plants reached about 60 days, leaf samples were taken for quantification of the DNA by means of the flow cytometry technique, according to the methodology described by Dolezel et al. (2007), with modifications. The highest frequency of triploids was obtained in Mucugê, in a total of 12 individuals: seven from controlled pollinations and five from open pollinations. In Cruz das Almas, only a triploid was obtained, from open pollination of the Kincy variety. The 'Ortanique' stands out for its greater potential for triploid production. Seeds of smaller size and undeveloped showed greater ability to generate triploids than normal seeds. Mucugê environment that has higher altitude and lower temperatures favored the formation of triploids. In relation to the propagation of rootstocks by *in vitro* culture, experiment was carried out with ten hybrids introduced or obtained by the Citrus Breeding Program of Embrapa Cassava and Fruticulture: 'San Diego', 'Indio' and 'Riverside' citrandarins, 'Sunki Tropical' mandarin, LRF x (LCR x TR) - 005, HTR - 051, HTR - 069, TSKC x (LCR x TR) - 059, LCR x TR - 001 and TSK x TRBK - Colômbia. Host nodal segments of the ten genotypes, approximately 1 cm long, were inoculated into glass vials containing 50 mL of the WPM medium. After 150 days of cultivation, the explants were subcultured in a new culture medium. The number of plants formed per explant was evaluated at 180 days after inoculation. The data were submitted to the F test of the analysis of variance and the means grouped by the Scott-Knott test at 5% probability. The WPM medium was suitable for the micropropagation of the genotypes studied, particularly 'Indio' citrandarin and TSKC x (LCR x TR) - 059 and TSK x TRBK - Colombia hybrids. Adjustments in the WPM medium are necessary to improve the micropropagation efficiency of 'Sunki Tropical' and LRF x (LCR x TR) - 005 and LCR x TR - 001 hybrids.

**Keywords:** *Citrus* spp.; genetical improvement; hybrids of *Poncirus*; hybridization

## **INTRODUÇÃO**

### **Importância econômica da citricultura no Brasil**

O Brasil tem papel de destaque na produção mundial de citros, ocupa a posição de maior produtor de laranjas doces e maior produtor e exportador de suco concentrado de laranja. Entretanto, participa pouco do mercado global de frutas de mesa, principalmente por não atender aos critérios de qualidade exigidos para a comercialização dos frutos. O mercado mundial de frutas para consumo in natura é extremamente exigente no que diz respeito à qualidade dos frutos, estando entre as características de maior importância a ausência ou reduzido número de sementes, em média uma por fruto, cascas de fácil remoção e com coloração escura, variando desde o vermelho ao alaranjado intenso, polpa com cores fortes, teor elevado de açúcares e acidez equilibrada (AGRIANUAL, 2008).

Porém, apesar do elevado rigor exigido pelo mercado de frutas frescas, a cadeia citrícola contribui significativamente para o agronegócio brasileiro, com a maior parte de sua produção voltada para o mercado externo, respondendo anualmente por US\$ 1,5-2,0 bilhões em divisas para o país (FERRARO et al., 2006; NEVES et al., 2010). A citricultura tem grande importância na economia brasileira, contribui com milhões em impostos para o país, além disso, gera entre empregos diretos e indiretos, um contingente de 230 mil posições, e uma massa salarial anual de R\$ 676 milhões (NEVES et al., 2010; POVEDANO et al., 2012).

A ampliação da citricultura brasileira ocorreu principalmente devido à instalação das indústrias de suco concentrado de laranja nos anos 60, especialmente no Estado de São Paulo, por ser a principal região produtora. Já no final dos anos 90, a produção de citros no Brasil destinava-se 70% à produção do suco concentrado e congelado voltado para o mercado internacional; 28% para comercialização da fruta ou suco no mercado doméstico; e o restante destinado à exportação da fruta in natura. Nota-se ainda, que há alguns anos o Brasil se mantém como o maior produtor mundial de laranja, seguido pelos Estados Unidos, China, Índia, México, Egito e Espanha (MOLIN; MASCARIN, 2007; LOHBAUER, 2011; MICHIELIN, 2016).

Além de deter liderança mundial no mercado, a citricultura brasileira vem se destacando ao longo dos anos, por promover o crescimento socioeconômico do país, contribuindo significativamente com a balança comercial nacional, especialmente por promover de forma direta ou indireta a ampliação de empregos em áreas rurais. Dentre os principais tipos de frutas cítricas produzidas no Brasil destacam-se as laranjas doces, tangerinas, as limas ácidas e limões verdadeiros, sendo as laranjas doces as de maior importância econômica (NEVES et al., 2001).

A maior produção de citros concentra-se principalmente no Estado de São Paulo, local onde ocorre em torno de 80% da produção brasileira de laranjas (14, 8 milhões toneladas, 700 mil hectares), destacando-se também a produção de lima ácida 'Tahiti' e de tangerinas, como a 'Ponkan' e o tangor 'Murcott' (1,5 milhão de toneladas aproximadamente). A Bahia, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e outros estados, também contribuem com o agronegócio do citros, principalmente por meio da produção de laranjas, tangerinas e a limeira ácida 'Tahiti', sendo que as laranjas são as representantes mais expressivas das espécies cítricas cultivadas no país, especialmente devido ao grande mercado mundial de exportação de suco (NEVES et al., 2001; BOTEON; PAGLIUCA, 2010; LOPES et al., 2011; AGRIANUAL, 2015).

Apesar da participação expressiva do país na produção mundial de suco de laranja, as exportações globais de laranja e tangerina *in natura* ainda são baixas. Entre os fatores que contribuem para essa pequena participação no mercado de frutas frescas, estão questões de ordem fitossanitária, porém o fator mais limitante é a inexistência de cultivares que atendam aos requisitos de qualidade exigidos pelo mercado externo de frutas de mesa. Sendo assim, uma alternativa para o aumento da participação do Brasil no mercado externo de frutas frescas seria a produção de frutos sem sementes, por meio da utilização de variedades triploides (INSTITUTO FNP, 2006; LATADO et al., 2007).

### **Melhoramento genético de citros**

O melhoramento de plantas é uma estratégia importante para aumentar a produtividade vegetal e tentar solucionar problemas inerentes à cultura. Nesse aspecto, é extremamente importante a atuação de programas de melhoramento genético na citricultura brasileira, pois existe uma enorme vulnerabilidade genética

da cultura, principalmente devido às poucas variedades que constituem a base dos pomares para os cultivos comerciais, causando uma fragilidade frente a fatores adversos como pragas e doenças (BASTOS et al., 2014).

O melhoramento genético de citros vem sendo utilizado como uma ferramenta importante para buscar soluções e reduzir ou resolver problemas agrônômicos e fitossanitários da cultura. Geralmente espera-se obter variedades com as características desejadas pelos consumidores e que também beneficiem os produtores, por exemplo: plantas que sejam mais tolerantes e/ ou resistentes às pragas e doenças; que apresentem uma maior produção e/ ou produtividade; plantas com pequeno porte para facilitar a colheita; características morfológicas favoráveis e que propiciem melhor qualidade nutricional dos frutos, entre outras características de interesse (MACHADO et al., 2005).

As plantas de citros possuem longo período vegetativo, são perenes e demoram muitos anos para começarem a produzir, essas características acabam tornando o melhoramento genético das espécies um processo demorado e trabalhoso (PIO, 2003). Além disso, as espécies possuem barreiras biológicas que dificultam os cruzamentos, uma delas é a ocorrência de apomixia, que é um processo de reprodução assexuada, em que os embriões são gerados do tecido do óvulo, sem que ocorra a fecundação, sendo que os embriões nucelares resultantes apresentam material genético idêntico ao da planta-mãe, e a outra é o longo período juvenil das plantas obtidas da germinação de sementes, que a depender da espécie, das condições ambientais e do método de cultivo empregado, pode variar de dois a 13 anos (SOUZA, 2010; OLIVEIRA et al., 2014).

O melhoramento genético tradicional possui algumas limitações para a obtenção de novas variedades porta-enxertos e copas, principalmente devido às características biológicas da espécie, tais como, poliembrião nucelar, elevada heterozigiosidade, incompatibilidade sexual, poliploidia, esterilidade gametofítica, entre outras (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990; CALIXTO, 2003).

Devido à utilização de diferentes ferramentas de biotecnologia têm-se conseguido avanços nas técnicas de melhoramento, contribuindo, dessa forma, com os programas convencionais de melhoramento genético dos citros e auxiliando no desenvolvimento de variedades com características superiores.

Entretanto, ainda existe a necessidade de progressos no aprimoramento de variedades copa e porta-enxerto, especialmente em relação à resistência a doenças, produtividade e qualidade dos frutos, o que contribuirá para a ampliação da base dos pomares brasileiros (BALDASSARI et al., 2003).

A utilização de técnicas de biotecnologia em programas de melhoramento de citros, por exemplo, a cultura de tecidos, genética molecular, fusão de protoplastos e transformação genética, tem facilitado e permitido um avanço na utilização da variabilidade disponível, possibilitando a criação de novas combinações que podem ser utilizadas nos programas de melhoramento convencional ou até mesmo dar origem a novas variedades (GMITTER JUNIOR et al., 1992; GROSSER et al., 1996; BENEDITO et al., 2000).

Geralmente os programas de melhoramento de citros que buscam a produção de variedades que possuam um número reduzido ou ausência de sementes, contam principalmente com duas importantes estratégias: obtenção de plantas com baixa viabilidade de pólen ou triploides. Embora tenham ocorrido grandes avanços em biotecnologia que contribuíram para a transformação genética e a hibridação somática, os métodos convencionais de melhoramento, como as hibridações naturais, ainda desempenham papel importante na recombinação e introgressão de genes (SILVA et al., 2005a; BRUGNARA et al., 2008).

A utilização de algumas ferramentas, como as técnicas de cultura de tecidos, são alternativas importantes para o auxílio ao melhoramento genético convencional dos citros, principalmente por buscarem contornar os problemas que são inerentes à cultura (MOURA et al., 2001).

### **Poliploides**

A poliploidia, isto é, a ocorrência de indivíduos ou espécies com números cromossômicos múltiplos do comum na espécie ou no gênero é um fenômeno muito importante em duas áreas da genética de plantas: na evolução e no melhoramento genético (SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2001).

Poliploides podem surgir pela duplicação de cromossomos em células somáticas ou por via sexual, pela união de gametas não reduzidos. Células poliploides ocorrem com frequência entre células diploides nos tecidos vegetativos da maioria das plantas. A indução artificial de poliploidia pode ser feita

com colchicina ou outros agentes poliploidizantes, como o ácido nitroso, podendo originar partes poliploides ou uma planta inteira poliploide, a depender do estágio de desenvolvimento em que o produto for aplicado. Sendo assim, a poliploidia induzida pode ser uma importante ferramenta para o melhoramento genético (DE WET, 1971).

No melhoramento de plantas, a indução de poliploidia pode ser manipulada de três modos principais: para elevar o número de cromossomos das espécies (induzir autopoliploides), como um meio de tentar conseguir plantas maiores e melhores, já que poliploides em geral são maiores e mais robustos que os seus parentais diploides, apresentando o chamado efeito "gigas"; para aumentar o número de cromossomos de espécies híbridas (induzir alopoliploides), como tentativa de recuperar a fertilidade do híbrido estéril, sintetizar uma nova espécie ou resintetizar uma já existente; ou como uma ponte para transferir genes de interesse entre níveis de ploidia diferentes, intraespecíficos ou interespecíficos (DEWEY, 1980).

A teoria amplamente aceita entre os pesquisadores para a origem dos poliploides na natureza, é que eles ocorrem por meio da união de gametas não reduzidos. Gametas não reduzidos são o mesmo que: gametas  $2n$ , gametas com número cromossômico somático, ou ainda gametas com número cromossômico esporofítico, e são chamados dessa forma, porque não são haploides, eles apresentam o mesmo número de cromossomos que as células somáticas do indivíduo (SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2001). Esses tipos de gametas são provenientes de um processo meiótico anormal, onde a redução do número de cromossomos não acontece. Esse erro na redução pode ocorrer basicamente de dois modos: Na meiose I, pela restituição na primeira divisão (RPD), em que os cromossomos não se dirigem para os polos na anáfase e, em vez de duas células com número haploide de cromossomos na telófase I, há formação de uma célula com número diploide, a meiose II, neste caso, ocorre normalmente, mas resulta em uma díade ao contrário da tétrade esperada; A outra forma de origem dos gametas  $2n$  ocorre na meiose II, pela restituição na segunda divisão (RSD) em que há falha da citocinese e restituição de núcleos diploides, com formação de díades ou tríades (SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2001).

Sabe-se que ocasionalmente, indivíduos poliploides surgem de progênies diploides. Os poliploides são classificados, basicamente, em dois tipos: autopoliploides, originam-se da duplicação de um mesmo genoma, e espera-se a ocorrência de herança polissômica; e alopoliploides ou poliploides genômicos, são formados pela duplicação de genomas diferentes em híbridos, o pareamento cromossômico ocorre apenas entre os cromossomos do mesmo genoma, e se espera herança dissômica (SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2001; SCHIFINO-WITTMANN, 2004).

Estima-se que mais de um terço das espécies de plantas com flores sejam poliploides. Em populações de plantas naturais, a poliploidia geralmente resulta de uma mutação durante a divisão celular, essas mutações podem ser espontâneas ou devido a danos causados por bactérias ou outros fatores externos. Uma mutação ocorre como uma interrupção da meiose, quando as células vegetais estão se dividindo e dando origem aos gametas ou ao zigoto. Outra mutação pode ocorrer devido à meiose incompleta, e gametas não reduzidos são produzidos com o mesmo número de cromossomos de uma célula somática (SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2001; SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2003; SCHIFINO-WITTMANN, 2004).

A manipulação do nível de ploidia é uma importante ferramenta que pode ser explorada no melhoramento genético de plantas.

### **Triploides em citros**

No gênero *Citrus* o número básico de cromossomos é ( $n = x = 9$ ), sendo que a condição mais frequente de se encontrar são os diploides ( $2n = 2x = 18$ ), mas também podem ocorrer cromossomos triploides ( $2n = 3x = 27$ ) e tetraploides ( $2n = 4x = 36$ ) em menor proporção na natureza (WEILER et al., 2011).

Uma alternativa importante para o desenvolvimento de variedades com potencial para produzir frutos sem sementes é a obtenção de híbridos triploides. As plantas triploides são normalmente inférteis, devido a um desbalanceamento no número de cromossomos durante a meiose, onde os gametas recebem números distintos de cromossomos, o que causa esterilidade, e conseqüentemente não produzem sementes ou estas abortam em sua maioria, embora eles possam ocasionalmente produzir frutos com muito poucas sementes (NAVARRO et al., 2005; ALEZA et al., 2010).

A frequência de ocorrência natural de triploides geralmente é muito baixa, e eles são naturalmente de origem zigótica. As plantas podem produzir um número variável de frutos, e esses frutos habitualmente não apresentam sementes. Normalmente as variedades triploides apresentam frutos com um maior tamanho do que os diploides normais (BRUGNARA et al., 2008).

Os triploides espontâneos podem ser obtidos por meio da fusão de gametas femininos não reduzidos com gametas masculinos reduzidos. Portanto, acredita-se que o parental feminino é o principal responsável pela taxa de indução de triploides naturais. Ao que tudo indica o mecanismo provável para a produção de megásporos não reduzidos, é devido à ausência da segunda divisão meiótica, onde o gameta feminino retém o mesmo genótipo, ou ainda, pode ocorrer uma duplicação cromossômica apenas após a meiose, neste caso o gameta feminino será homozigoto (HANDAJI et al., 2008).

Uma das formas utilizadas para a obtenção de triploides são as hibridizações sexuais por meio de diferentes combinações de parentais femininos e masculinos. Os híbridos triploides podem ser obtidos a partir de cruzamentos entre parentais masculinos e femininos diploides ( $2n \times 2n$ ), parentais masculinos tetraploides e femininos diploides ( $2n \times 4n$ ), parentais masculinos diploides e femininos tetraploides ( $4n \times 2n$ ) (NAVARRO et al., 2005; ZHU et al., 2009), e espontaneamente de hibridações convencionais entre diploides monoembriônicos. Além dessas, outra forma de produção de triploides é o cultivo *in vitro* do endosperma, o tecido nutritivo da semente, que apresenta estrutura triploide (GROSSER; GMITTER, 1990; MACHADO et al., 2005).

Os triploides são encontrados em sementes que possuem em torno de 1/3 a 1/6 do tamanho das sementes que contém embriões diploides e em sementes pouco desenvolvidas. Acredita-se que o tamanho reduzido das sementes que contém cromossomos triploides está relacionado com o endosperma pentaploide, que cresce mais lentamente e tem o desenvolvimento encerrado prematuramente (ROCHA, 2014).

Dentre as características importantes que precisam ser levadas em consideração nos programas de melhoramento genético para a obtenção de novas variedades, uma é a produção de frutos sem sementes para consumo *in natura*, especialmente em países desenvolvidos, onde o consumidor não aceita a

presença de sementes. No caso específico dos citros, o melhoramento genético de variedades copa tem enfatizado a produção de triploides, que produzem frutos sem sementes, com foco no mercado de frutas frescas (SOUZA et al., 2013).

### **Cultivo *in vitro* em citros**

A propagação *in vitro* de vegetais é uma ferramenta de biotecnologia que conjuntamente com outras áreas pode ser utilizada para auxiliar o melhoramento genético de plantas (SOUZA; PEREIRA, 2007; CARRER et al., 2010). O cultivo *in vitro*, é uma técnica utilizada para multiplicar plantas no interior de tubos de ensaio ou em recipientes similares de vidro, em condições assépticas (CID, 2001). A técnica apresenta vantagens importantes como: propagar material livre de doenças; tornar os métodos de propagação vegetativa tradicionais mais rápidos; produzir material vegetal em pouco espaço e em larga escala, com qualidade e quantidade superiores aos métodos convencionais, e, conseqüentemente, com custos de produção reduzidos; além de promover a manutenção de bancos de germoplasma (FIGUEIREDO; TAKITA, 2004; COLOMBO, et al., 2010).

O melhoramento genético convencional de citros apresenta algumas limitações impostas pela cultura tais como longo período juvenil; elevada heterozigiosidade, que favorece a formação de híbridos com características variadas; e sementes poliembriônicas, que dificulta a identificação de híbridos, entre outros problemas enfrentados pelos melhoristas (SILVA et al., 2005b).

Do ponto de vista do melhoramento de citros, a ocorrência da poliembrionia, que é a presença de dois ou mais embriões na mesma semente, pode dificultar ou impossibilitar avanços no trabalho de melhoramento, especialmente quanto à hibridação, onde o embrião nucelar obtido por via assexuada compete com o embrião zigótico obtido por via sexuada, prejudicando ou inviabilizando o desenvolvimento do mesmo, e conseqüentemente a obtenção de híbridos (PASQUAL et al., 2003).

As técnicas biotecnológicas são utilizadas para tentar superar as barreiras da biologia reprodutiva dos citros, contribuindo no estabelecimento e aprimoramento de programas de melhoramento genético. Assim, a biotecnologia é uma importante aliada na busca de superar as dificuldades enfrentadas pelo melhoramento genético tradicional, disponibilizando ferramentas como a cultura

de tecidos vegetais, que vem sendo utilizada pelos programas de melhoramento de citros, com o intuito de aprimorar e desenvolver novas variedades copa e porta-enxerto (OLIVEIRA et al., 2012; SORIANO, 2015).

Com a busca de métodos para tentar contornar os problemas enfrentados pelo melhoramento genético convencional, a utilização das técnicas de cultivo *in vitro*, constitui-se numa estratégia importante, por possibilitar a solução de algumas barreiras impostas pela biologia reprodutiva dos citros (SILVA et al., 2005a; MORAIS et al., 2012). Nesse contexto, a cultura de tecidos vegetais se torna uma ferramenta imprescindível, pois, por meio do cultivo *in vitro* ela possibilita o estudo das necessidades físicas e nutricionais dos embriões (CHAGAS et al., 2003; DUARTE et al., 2013).

## REFERÊNCIAS

- AGRIANUAL: **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: Instituto FNP, 2008. 552p.
- AGRIANUAL: **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: Instituto FNP, 2015, p. 241-244.
- ALEZA, P.; JUÁREZ, J.; CUENCA, J.; OLLITRAULT, P.; NAVARRO, L. Recovery of citrus triploid hybrids by embryo rescue and flow cytometry from 2X x 2X sexual hybridisation and its application to extensive breeding programs. **Plant Cell Report**, v.29, p. 1023-1034, 2010.
- BALDASSARI, R.B.; de GOES, A.; TANNURI, F. Declínio dos citros: algo a ver com o sistema de produção de mudas cítricas?. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Comunicação científica, Jaboticabal, v.25, n.2, 2003.
- BASTOS, D. C.; FERREIRA, E. A.; PASSOS, O. S.; de SÁ, J. F.; ATAÍDE, E. M.; CALGARO, M. Cultivares copa e porta-enxertos para a citricultura brasileira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.35, n.281, p.36-45, 2014.
- BENEDITO, V. A.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MENDES, B.M.J. Calogênese, embriogênese somática e isolamento de protoplastos em variedades de laranja doce. **Scientia Agricola**, v.57, n.1, 2000.

- BOTEON, M.; PAGLIUCA, L.G. Análise da sustentabilidade econômica da citricultura paulista. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.31, n.2, p.101-106, 2010.
- BRUGNARA, E.C.; WITTMANN, M.T.S.; WEILER, R.L.; SCHWARZ, S.F. Ploidia e fertilidade de pólen em progênies de citros. **Bragantia**, Campinas, v.67, n.3, p.599-602, 2008.
- CALIXTO, M.C. Hibridação somática entre *Citrus sinensis* e *C. grandis*. Piracicaba, 2003. 99p. Tese (Doutorado em agronomia), **Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- CARRER, H.; BARBOSA, A. L.; RAMIRO, D. A. Biotecnologia na agricultura. **Estudos avançados**, v. 24, n. 70, São Paulo, 2010.
- CHAGAS, E. A.; PASQUAL, M.; DUTRA, L. F.; SILVA, A. B. da.; CAZETTA, J. O.; SANTOS, F. C.; CARDOSO, P. Desempenho de diferentes estádios embrionários no cultivo in vitro de embriões de ‘Pêra Rio’ x ‘Poncã’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 523-525, 2003.
- CID, L. P. B. A propagação in vitro de plantas. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 3, n. 10, p. 16-17, 2001.
- COLOMBO, L. A ; ASSIS, A. M. DE; FARIA, R. T. DE; ROBERTO, S. R. Estabelecimento de protocolo para multiplicação *in vitro* de Bastão-do-imperador (*Etlingera elatior*) jack RM Sm. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 4, Maringá, 2010.
- DE WET, J.M.J. Polyploidy and evolution in plants. **Taxon**, v.20, n.1, p.29-35, 1971.
- DEWEY, D.R. Some applications and misapplications of induced polyploidy to plant breeding. In: LEWIS, W.H. **Polyploidy: biological relevance**. New York: Plenum. 1980. p. 445 -469.
- DUARTE, F. E. V. de. O.; BARROS, D. dos. R.; GIRARDI, E. A.; SOARES FILHO, W. S.; PASSOS, O. S. Poliembrião e atributos morfológicos de sementes de porta-enxertos de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, n.1, p. 246-254, 2013.
- FERRARO, A. E.; PIO, R. M.; AZEVEDO, F. A. Influência da polinização com variedades de laranja-doce sobre o número de sementes de tangelo Nova. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n.2, Jaboticabal, 2006.

- FIGUEIREDO, L. H. M.; TAKITA, M. A. Melhoramento e biotecnologia: Cultura de tecidos e transformação genética de citros. **Revista Laranja**, Cordeirópolis, v.25, n.2, p.439-459, 2004.
- GMITTER JUNIOR, F.G.; J.W.; MOORE, G.A. Citrus. In: HAMMERSCHLAG, F.A.; LITZ, R.E. (Ed.). **Biotechnology of perennial fruit crops**. Cambridge: University Press, 1992. Cap.14, p.335-369.
- GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G. Protoplast fusion and citrus improvement. **Plant Breeding Reviews**, v.8, p. 339-374, 1990.
- GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G.; TUSA, N.; REFORGIATO RECUPERO, G.; CUCINOTTA, P. Further evidence of a cybridization requirement for plant regeneration from Citrus leaf protoplasts following somatic fusion. **Plant Cell Reports**, v. 15, p. 672-676, 1996.
- HANDAJI, N.; ARSALANE, N.; BENYAHIA, H.; et IBRIZ, M. Identification de l'origine de gamètes parentaux diploïdes et mode de restitution nucléaire des hybrides spontanément triploïdes de mandariniers. **Alawamia**, p.123-124, 2008.
- INSTITUTO FNP. **Agriannual 2006**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP, 2006. 504p.
- LATADO, R.R.; YALY, M.C.; CARVALHO, C.R.; MACHADO, M.A. Plantas autotetraploides de citros sob tratamento *in vitro* com colchicina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.10, p.1429-1435, 2007.
- LOHBAUER, C. O Contencioso do Suco de Laranja entre Brasil e Estados Unidos na OMC. **Revista Política Externa**, v. 20, n.2, 2011.
- LOPES, J.M.S.; DÉO, T. F. G.; ANDRADE, B. J. M.; GIROTO, M.; FELIPE, A. L. S.; JUNIOR, C. E. I.; BUENO, C. E. M. S.; SILVA, T. F.; LIMA, F. C. C. Importância econômica do citrus no Brasil. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, n. 20, 2011.
- MACHADO, M.A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A.M.; OLIVEIRA, A.C. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). Citros. Campinas: **Instituto Agrônômico**; FUNDAG, p. 223-277, 2005.
- MICHIELIN, T. H. V.; YALY, M. C.; CAMPOS, K. A. F.; SCHINOR, E. H.; AZEVEDO, F. A. de.; BASTIANEL, M. Reação de híbridos de citros à inoculação

com *Alternaria alternata*. **Summa Phytopathol**, Botucatu, v. 42, n. 4, p. 313-320, 2016.

MOLIN, J.P.; MASCARIN, L.S. Colheita de citros e obtenção de dados para mapeamento da produtividade. **Revista Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v.27, n.1, p.259-266, 2007.

MORAIS, T.P.; LUZ, J.M.Q.; SILVA, S.M.; RESENDE, R.F.; SILVA, A.S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n. 1, Botucatu, 2012.

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

NAVARRO, L.; JUÁREZ, J.; ALEZA, P.; PINA, J.A.; OLIVARES-FUSTER, O.; CUENCA, J.; NJULVE.J.M. Programa de obtención de híbridos triploides de mandarina en España. **Phytoma**, Valencia, n. 170, p. 36-41, 2005.

NEVES, E.M.; YOUB, M.D.; DRAGONE, D.S.; NEVES, M.F. Citricultura Brasileira: Efeitos Econômicos Financeiros, 1996-2000. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 432-436, 2001.

NEVES, MF.; TROMBIN, VG.; MILAN, P.; LOPES, FF.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. (2010). **O Retrato da Citricultura Brasileira**, Markestrat, São Paulo, 137 p.

OLIVEIRA, A. M. de.; SANTOS. R. da. S.; BARBOSA, M. S. A biotecnologia aplicada ao melhoramento genético vegetal: controvérsias e discussões. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 10, n. 1, p. 339-361, 2012.

OLIVEIRA, R. P. de.; SOARES FILHO, W. dos. S.; MACHADO, M. A.; FERREIRA, A. E.; SCIVITTARO, W. B.; GESTEIRA, A. da. S. Melhoramento genético de plantas cítricas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 35, n. 281, p. 22-29, 2014.

PASQUAL, M.; ALVES, G. P.; DUTRA, L. F.; CHAGAS, E. A.; RIBEIRO, L. de. O. Desenvolvimento *in vitro* de embriões imaturos oriundos de tangerineira 'Poncã' x laranjeira 'Pera' em diferentes fotoperíodos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras , v. 27, n. 3, p. 535-540, 2003.

- PIO, L. A. S. **Viabilidade do pólen de citros em diferentes condições de armazenamento**. 2003, 45.p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2003.
- POVEDANO, L.; HUMBERTO, F. H.; NETO, A.T.; LATADO, R.R. Obtenção de plantas tetraploides de citros visando a produção de frutos triploides sem sementes. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.33, n.2, p.65-74, 2012.
- ROCHA, S. **Caracterização de híbridos triploides espontâneos de citros**. 2014, 46.p. Dissertação (Mestrado em Melhoramento e Biotecnologia Vegetal) – Instituto Agrônômico de Campinas, Campinas, 2014.
- SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Poliploidia e seu impacto na origem e evolução das plantas silvestres e cultivadas. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.10, n. 2, p. 151-157, 2004.
- SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DALL'AGNOL, M. Gametas não reduzidos no melhoramento de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.1, p.169-175, 2001.
- SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DALL'AGNOL, M. Indução de poliploidia no melhoramento de plantas. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 9, n. 1-2, p. 155-164, 2003.
- SILVA, R. P. da.; COSTA, M. A. P. de. C.; SOUZA, A. da. S.; ALMEIDA, W. A. B. de. Regeneração de plantas de laranja 'Pêra' via organogênese *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.12, Brasília, 2005a.
- SILVA, R. P. da.; SOUZA, E. dos. S.; REBOUÇAS, F. S.; ALMEIDA, W. A. B. de. Otimização de protocolos para regeneração de plantas *in vitro* de tangerina 'Cleópatra' (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.27, n.3, p. 484-487, 2005b.
- SORIANO, L. A organogênese *in vitro* e transformação genética de variedades de tangerina (*Citrus reticulata* Blanco e *Citrus clementina* hort. ex Tan.). (Doutorado em Ciências), **Centro de Energia Nuclear na Agricultura**, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.
- SOUZA, A. da. S.; SANTOS FILHO, H.P.; KOBAYASHI, A.K.; SOARES FILHO, W. dos. S.; MENDES, B.M.J.; LINO, L.S.M. **Cultura de tecidos**. Cultura dos citros, v.1, 1ª ed, p.133-135, 2013.

SOUZA, A.V.; PEREIRA, A.M.S. Revisão: Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.9, n.4, p.103-117, 2007.

SOUZA, L.B. **Mapeamento genético de híbridos intraespecíficos de laranja doce [ Citrus sinensis (L.) Osbeck], obtidos por cruzamentos controlados**. 2010. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

WEILER, R. L.; BRUGNARA, E. C.; GUERRA, D.; WITTMAN, M. T. S.; SCHWARZ, S. F. Caracterização morfológica, determinação do nível de ploidia e viabilidade do pólen de uma progênie de tangerineira 'Clementina Fina' e 'Montenegrina'. **Bragantia**, v.70, n.3, Campinas, 2011.

ZHU, S. P.; SONG, J. K.; HU, Z. Y.; TAN, B.; XIE, Z. Z.; YI, H. L.; DENG, X. X. Ploidy variation and genetic composition of open-pollinated triploid citrus progenies. **Botanical Studies**, v.50, 2009.

## **CAPÍTULO 1**

### **OBTENÇÃO DE HÍBRIDOS TRIPLOIDES PRODUTORES DE FRUTOS TIPO TANGERINA**

---

Artigo será submetido ao comitê editorial do periódico científico Revista Brasileira de Ciências Agrárias.

## OBTENÇÃO DE HÍBRIDOS TRIPLOIDES PRODUTORES DE FRUTOS TIPO TANGERINA

**RESUMO:** A criação de híbridos triploides é uma importante estratégia de melhoramento genético para o desenvolvimento de novas variedades copa comerciais de citros. O objetivo do trabalho foi quantificar a frequência de triploides obtidos a partir de cruzamentos naturais e controlados, em diferentes variedades de tangerineiras e condições ambientais do Estado da Bahia. Os experimentos foram conduzidos em Cruz das Almas (Recôncavo Baiano) e Mucugê (Chapada Diamantina), um experimento foi baseado em frutos de polinizações abertas das variedades Page, Ortanique, Ellendale, Clemenules, Swatow, Piemonte, Fortune, África do Sul, Montenegrina, Kincy, Span Americana, Fremont, Nova, Dancy e Murcott, e outro considerando frutos de cruzamentos controlados tendo como parentais femininos 'Nova', 'Fortune' e 'Ortanique' e como parentais masculinos 'Page', 'Montenegrina', 'Swatow', 'Fremont' e 'Kincy'. Utilizaram-se todas as sementes pequenas e pouco desenvolvidas, e 20 sementes normais. Estas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo aproximadamente 10 mL de meio de cultivo *Wood Plant Medium* - WPM e levadas à sala de crescimento, à temperatura de  $27 \pm 1$  °C, com densidade de fluxo de fótons de  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas. Quando as plantas atingiram cerca de 60 dias, amostras de folhas foram retiradas para quantificação do DNA por meio da técnica de citometria de fluxo, de acordo com a metodologia descrita por Dolezel et al. (2007), com as seguintes modificações: foram realizados testes com a espécie *Crotalaria breviflora* DC., comparando-a com um padrão de citros (Tangerineira 'Sunki Tropical') para definição do conteúdo de DNA. A análise foi realizada utilizando pequenos fragmentos de folhas de citros ( $2C = 0,70$  pg de DNA) comparando-as com o conteúdo da *Crotalaria breviflora* ( $2C = 2,02$  pg de DNA). As amostras foram maceradas em placa de petri sobre gelo na presença de 1 ml de tampão de isolamento de núcleos (LB01, Galbraith's buffer, Tris.MgCl<sub>2</sub> buffer) e depois acrescentado 0,20µL de iodeto de propídeo usado para corar o DNA. Relativamente às polinizações abertas, as condições ambientais de Mucugê foram favoráveis, obtendo-se em relação a essa localidade um total de cinco triploides: 'Clemenules' (um), 'África do Sul' (um) e 'Ortanique' (três). Já em Cruz das Almas, obteve-se apenas um triploide da variedade kincy. Nos cruzamentos controlados, em Mucugê, foram obtidos sete triploides: 'Ortanique' x 'Montenegrina' (sete), 'Ortanique' x 'Kincy' (um) e 'Ortanique' x 'Swatow' (dois). Em Cruz das Almas não foram obtidos triploides dos cruzamentos. A frequência de obtenção de triploides variou em função do genótipo, do tamanho das sementes e do ambiente. A 'Ortanique' destacou-se pelo seu maior potencial de produção de triploides. Sementes de menor tamanho e pouco desenvolvidas apresentaram maior capacidade de geração de triploides que as sementes normais. O ambiente de Mucugê, que apresenta maior altitude e temperaturas mais baixas, favoreceu a formação de triploides.

**Palavras-chave:** *Citrus* spp.; cultivo *in vitro*; hibridação; melhoramento genético

## OBTAINING TRIPLOIDES HYBRIDS FRUIT PRODUCING MANDARIN TYPE

**ABSTRACT:** The creation of triploid hybrids is an important genetic improvement strategy for the development of new commercial citrus varieties. The objective of this work was to quantify the frequency of triploids obtained from natural crosses (open pollinations) and controlled, in different varieties of mandarin and environmental conditions of the State of Bahia. The experiments were conducted in Cruz das Almas (Recôncavo Baiano) and Mucugê (Chapada Diamantina), an experiment was based on fruits of open pollinations of the varieties Page, Ortanique, Ellendale, Clemenules, Swatow, Piemonte, Fortune, África do Sul, Montenegrina, Kincy, Span Americana, Fremont, Nova, Dancy and Murcott, and another considering fruits of controlled crosses having as female parent 'Nova', 'Fortune' and 'Ortanique' and as male parents 'Page', 'Montenegrina', 'Swatow', 'Fremont' and 'Kincy'. Were used all the small seeds and undeveloped, and of 20 normal seeds. These were inoculated into test tubes containing approximately 10 mL of Wood Plant Medium - WPM culture medium and brought to the growth room at  $27 \pm 1$  ° C with a photon flux density of  $30 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$  and photoperiod of 16 hours. When the plants reached about 60 days, leaf samples were taken for quantification of the DNA by means of the flow cytometry technique, according to the methodology described by Dolezel et al. (2007), with the following modifications: were tested with the species *Crotalaria breviflora* DC., comparing it with a citrus ('Sunki Tropical' mandarin) to define the DNA content. The analysis was performed using small fragments of citrus leaves ( $2C = 0.70$  pg DNA) comparing them with the content of *Crotalaria breviflora* ( $2C = 2.02$  pg DNA). Samples were macerated on petri dish on ice in the presence of 1 ml of core isolation buffer (LB01, Galbraith's buffer, Tris.MgCl<sub>2</sub> buffer) and then added 0.20 µl of propidium iodide used to stain the DNA. Relatively to the open pollinations, the environmental conditions of Mucugê were favorable, obtaining in relation to this locality a total of five triploids: 'Clemenules' (one), 'Africa do Sul' (one) and 'Ortanique' (three). Already in Cruz das Almas, only a triploid of the kincy variety was obtained. In the controlled crossings, in Mucugê, seven triploids were obtained: 'Ortanique' x 'Montenegrina' (four), 'Ortanique' x 'Kincy' (one) and 'Ortanique' x 'Swatow' (two). In Cruz das Almas, triploids of the crosses were not obtained. The frequency of triploids varied according to genotype, seed size and environment. 'Ortanique' stands out for its greater potential for triploid production. Seeds of smaller size and undeveloped presented greater capacity of generate triploids than normal seeds. Mucugê environment, that lodge higher altitude and lower temperatures, favored the formation of triploids.

**Keywords:** *Citrus* spp.; genetical improvement; hybridization; *in vitro* cultivation

## INTRODUÇÃO

Os citros estão entre o grupo de fruteiras mais importantes para o Brasil, devido ao valor nutritivo dos frutos e ao papel socioeconômico que desempenham na exportação (COELHO et al., 2006). E a ampliação da base genética dos pomares brasileiros, especialmente relacionada às variedades utilizadas para copas e porta-enxertos, incluindo aquelas com capacidade de adaptação a estresses abióticos, contribuirá significativamente para que se alcancem rendimentos economicamente superiores no país (BRITO et al., 2008).

Apesar dos citros apresentarem grande importância na economia do país, o Brasil apresenta participação pouco expressiva nas exportações mundiais de laranja e tangerina *in natura*. Além de questões de ordem fitossanitária, uma das razões para a baixa participação brasileira neste mercado é a inexistência de cultivares que atendam aos requisitos de qualidade exigidos pelo mercado externo de fruta fresca, sendo um dos principais, a exigência de frutos sem sementes (LATADO et al., 2007).

Uma das estratégias utilizadas para a obtenção de frutos sem sementes é a utilização de cultivares triploides, como a limeira ácida 'Tahiti' (*Citrus latifolia* Tanaka), que apresenta alto valor comercial e é altamente produtiva, provavelmente originada de hibridação natural (LUCHETTI et al., 2003).

Os híbridos triploides em citros podem ser obtidos a partir de cruzamentos de parentais diploides (2x) com tetraploides (4x) e diploides (2x) com diploides (2x) neste último caso, os embriões triploides originam-se da fertilização de gametas femininos não reduzidos (diploides), com gametas masculinos reduzidos (haploides), sendo a frequência natural de obtenção de triploides muito baixa (próxima de 5 %), neste último caso, variando em função do genótipo materno (ESEN; SOOST, 1971; ESEN; SOOST, 1973a).

Programas de melhoramento genético de citros baseados em hibridizações dirigidas a obtenção de variedades produtoras de frutos triploides, necessitam de metodologias que permitam o resgate e cultivo de embriões e a análise do nível de ploidia dos indivíduos obtidos. Nesse aspecto, as técnicas de biotecnologia são aliadas essenciais para contornar as dificuldades encontradas no melhoramento de variedades copas, disponibilizando ferramentas como a

cultura de tecidos vegetais, que por meio do cultivo *in vitro* possibilita o estudo das necessidades físicas e nutricionais dos embriões (CHAGAS et al., 2003).

Frutos sem sementes é uma das características mais importantes para a produção de tangerinas voltadas para o mercado de frutas frescas, pois os consumidores, principalmente os europeus, não aceitam a presença de sementes nos frutos (ALEZA et al., 2010b). A partenocarpia é uma peculiaridade fundamental para a produção de frutos sem sementes, e é uma característica que está presente no germoplasma de citros (ALEZA et al., 2010a). Com isso, a criação de híbridos triploides é uma importante estratégia de melhoramento genético para o desenvolvimento de novas variedades copas comerciais de citros (OLLITRAULT et al., 2008).

Neste sentido, o objetivo do trabalho foi quantificar a frequência de triploides obtidos a partir de cruzamentos naturais (polinizações abertas) e controlados, em diferentes variedades de tangerineiras e condições ambientais do Estado da Bahia.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram conduzidos em dois municípios do Estado da Bahia. Cruz das Almas, Recôncavo Baiano, coordenadas geográficas 12°40'19" de latitude sul, 39°06'23" de longitude oeste com altitude de 226 m. O clima é tropical quente e úmido, com pluviosidade média anual de 1170 mm, com variações entre 900 e 1300 mm, sendo os meses de março a agosto os mais chuvosos e de setembro a fevereiro os mais secos. A temperatura média anual é de 24,5°C e umidade relativa de 80% (REZENDE, 2004). Mucugê, Chapada Diamantina, coordenadas geográficas 13° 00'19" de latitude sul, 41° 22' 15" de longitude oeste com altitude de 983 m. O clima é caracterizado como semiúmido, com estação chuvosa (outubro a março) e seca (abril a setembro). A pluviosidade média anual é de cerca de 1100 mm, com média de 600 mm na estação seca e 1500 mm na estação chuvosa; a temperatura média anual é de 20°C (STRADMANN, 1998).

Foram realizados dois experimentos: um envolvendo frutos obtidos a partir de polinizações abertas e outro utilizando frutos provenientes de polinizações

controladas. Os frutos de polinizações abertas foram coletados em meses diferentes do ano de 2015, sendo que as coletas foram realizadas em locais distintos: no Banco Ativo de Germoplasma de citros (BAG Citros) da Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizado em Cruz das Almas; na Fazenda Alpercata e na Lavoura e Pecuária Igarashi Ltda, ambas situadas no município de Mucugê.

A primeira coleta foi realizada nos meses de abril, maio e junho de 2015, coletaram-se 30 frutos oriundos de polinizações naturais de 15 variedades: Ortanique tangor natural [*Citrus reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osbeck]; Clemenules (*C. clementina* hort. ex Tanaka); Montenegrina (*C. deliciosa* Ten.); tangerineira-tangelo Nova [tangerineira 'Clementina' x tangelo 'Orlando' (*C. paradisi* Macfad. x *C. reticulata*)]; Piemonte [tangerineira 'Clemenules' x (*C. reticulata* x *C. sinensis*)]; tangerineira-tangelo Page (tangerineira 'Clementina' x tangelo 'Minneola' *C. paradisi* Macfad. x *C. tangerina* Hort. ex Tanaka); tangerineira Dancy (*C. tangerina*); Fremont (tangerineira 'Clementina' x tangerineira 'Ponkan' *C. reticulata*); Ellendale (*C. reticulata* x *C. sinensis*); Fortune (tangerineira 'Clementina' x *C. tangerina*); tangerineira Span Americana (*C. reticulata*); tangor Murcott (*C. reticulata* x *C. sinensis*); Kincy (tangerineira 'King' *C. nobilis* Lour. x tangerineira 'Dancy' *C. tangerina*); tangerineira Swatow (*C. reticulata*) e África do Sul (*C. reticulata*).

Por sua vez, a segunda coleta foi realizada em setembro de 2015, nos respectivos locais citados anteriormente. Foram coletados 30 frutos das variedades Ortanique, Kincy, Ellendale e Dancy, pois, na ocasião em que a segunda coleta foi realizada apenas estas quatro variedades possuíam frutos.

As polinizações controladas foram iniciadas no mês de setembro de 2015, envolvendo os seguintes parentais femininos: 'Nova', 'Fortune' e 'Ortanique', e como parentais masculinos foram utilizadas as variedades Page, Montenegrina, Swatow, Fremont e Kincy, sendo que as polinizações controladas foram realizadas nos mesmos locais em que ocorreram as coletas dos frutos das polinizações abertas (Mucugê e Cruz das Almas).

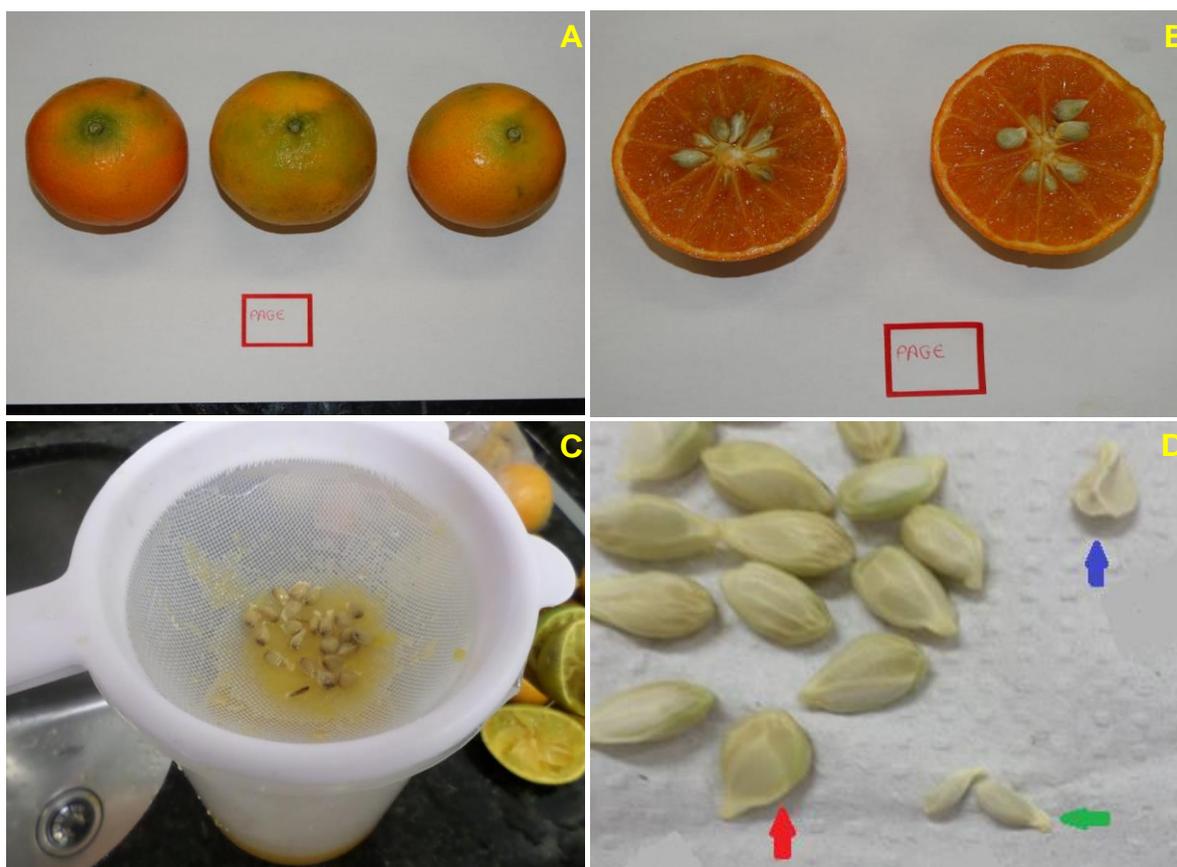
O número de polinizações controladas variou em função da disponibilidade de flores no momento de suas realizações. Deram-se no período de maior

intensidade solar e temperatura, em dias não chuvosos, entre as 10h e 16h, para facilitar a liberação e uso do pólen.

O pólen colhido de flores recém-abertas dos parentais masculinos foi utilizado na polinização de flores dos parentais femininos: estas últimas foram emasculadas antes da antese. A emasculação foi realizada no estágio de balão (próxima da abertura floral), eliminando-se cuidadosamente as pétalas e anteras com auxílio de pinça e bisturi, evitando-se o contato com o estigma. A polinização foi realizada imediatamente após a emasculação, estando o estigma receptivo (úmido).

Em torno de quatro a cinco meses após as polinizações serem realizadas, os frutos que vingaram foram coletados. Sendo que os frutos provenientes tanto das polinizações naturais como dos cruzamentos controlados, foram levados ao Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, onde suas sementes foram removidas mediante a um corte transversal incompleto feito no fruto, garantindo assim a integridade das mesmas (Figura 1A e 1B), as sementes foram lavadas com detergente neutro e água corrente (Figura 1C), contadas individualmente por fruto, e classificadas de acordo com o estágio de desenvolvimento e o tamanho, em normal (sementes com o tegumento bem formado), pouco desenvolvida (sementes com o tegumento enrugado) e pequena (sementes com 1/3 a 1/6 do tamanho normal), Figura1D.

Selecionaram-se, prioritariamente, sementes que são de 3 a 6 vezes menores que as sementes contendo embriões diploides por elas apresentarem expressivo potencial de produção de indivíduos triploides (ALEZA et al., 2010b).



**Figura 1.** Frutos da variedade Page (A); frutos cortados para retirada das sementes (B); sementes lavadas com detergente neutro depois de extraídas dos frutos (C); sementes com tamanho normal, indicadas pela seta vermelha, semente pouco desenvolvida, indicada pela seta azul e sementes pequenas, indicadas pela seta verde (D).

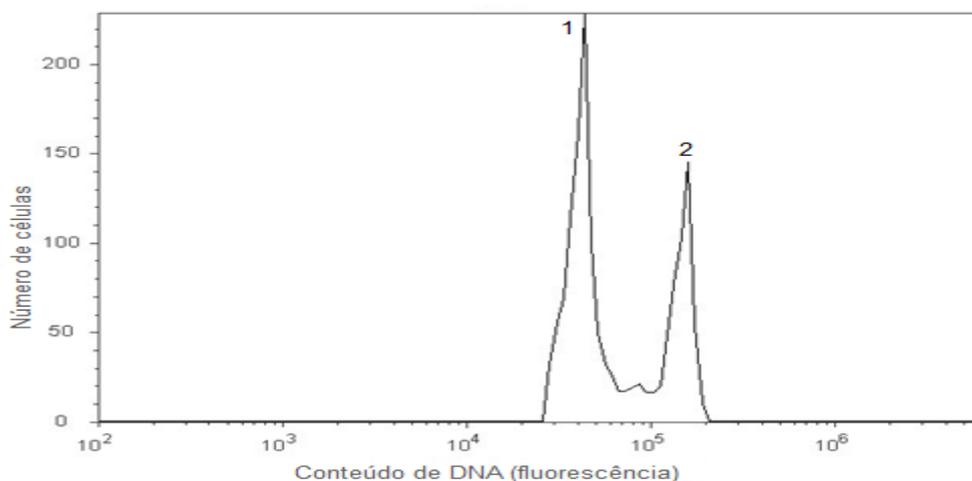
Retirou-se o tegumento de todas as sementes pequenas, das sementes pouco desenvolvidas, e de 20 sementes normais, sendo que o número de sementes inoculadas variou em função da quantidade de sementes disponíveis.

Em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas com solução de etanol 70% por 5 minutos, e posteriormente, em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% contendo duas gotas de Tween 20<sup>®</sup>, por 20 minutos, seguidas de três lavagens em água destilada autoclavada. Estas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo aproximadamente 10 mL de meio de cultivo *Wood Plant Medium* - WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) e levadas à sala de crescimento, à temperatura de  $27 \pm 1$  °C, com densidade de fluxo de fótons de  $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas.

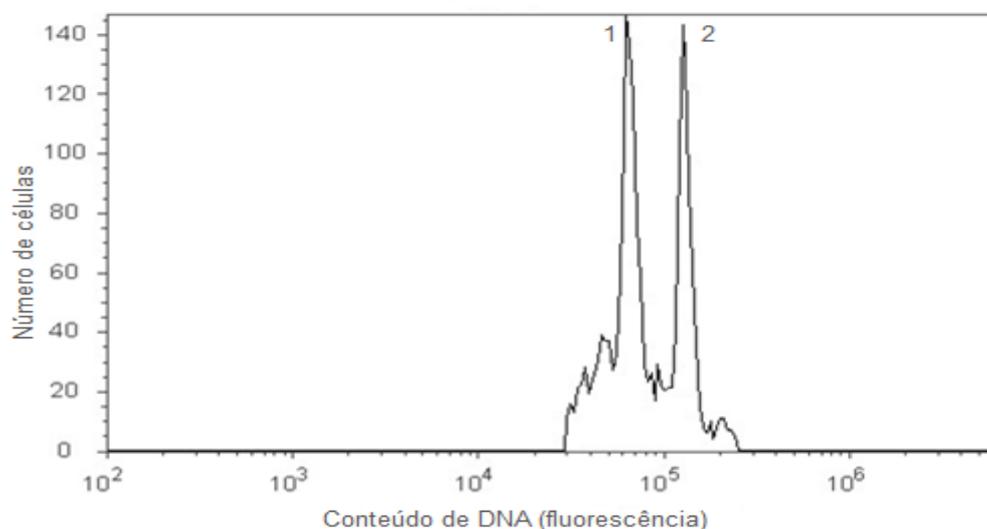
Quando as plantas atingiram cerca de 60 dias, amostras de folhas foram retiradas para quantificação do DNA por meio da técnica de citometria de fluxo, de acordo com a metodologia descrita por Dolezel et al. (2007), com as seguintes modificações: foram realizados testes com a espécie *Crotalaria breviflora* DC., comparando-a com um padrão de citros [tangerineira ‘Sunki Tropical’ (*Citrus sunki* hort. ex Tanaka)] para definição do conteúdo de DNA. A análise foi realizada utilizando pequenos fragmentos de folhas de citros (2C = 0,70 pg de DNA) comparando-as com o conteúdo da *Crotalaria breviflora* (2C = 2,02 pg de DNA). As amostras foram maceradas em placa de petri sobre gelo na presença de 1 ml de tampão de isolamento de núcleos (LB01, Galbraith’s buffer, Tris.MgCl<sub>2</sub> buffer) e depois acrescentado 0,20µL de iodeto de propídeo usado para corar o DNA. O cálculo para determinar o conteúdo de DNA (pg) das amostras desconhecidas foi realizado segundo Dolezel et al. (2007), utilizando a fórmula: Valor da amostra 2C (pg de DNA) = posição média do pico da amostra x valor da referência 2C

referência 2C da posição média do pico

As Figuras 2 e 3 mostram os histogramas gerados pelas análises de citometria de fluxo, utilizando amostras de folhas de citros, indivíduo diploide e triploide e o controle diploide *Crotalaria breviflora*.



**Figura 2.** Histograma obtido por análise de citometria de fluxo de amostra de folha de tangerineira ‘Cravo’(*Citrus reticulata* Blanco) diploide (pico 1) com amostra de folha do controle diploide *Crotalaria breviflora* DC., (pico 2).



**Figura 3.** Histograma obtido por análise de citometria de fluxo de amostra de folha de tangerineira 'Fortune' (*Citrus clementina* hort. ex Tanaka) triploide (pico 1) com amostra de folha do controle diploide *Crotalaria breviflora* DC., (pico 2).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Ploidia das plantas de citros obtidas de polinizações abertas, por meio da citometria de fluxo

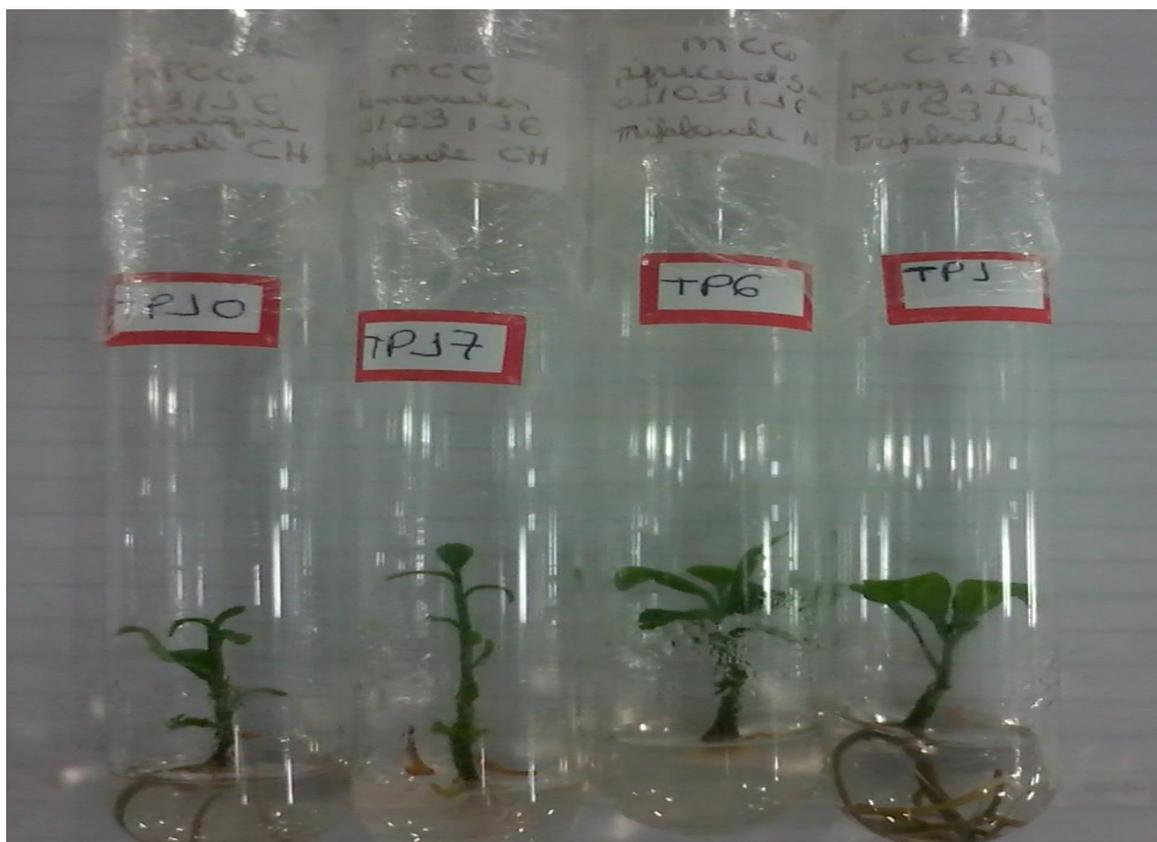
Os dados relativos às 15 variedades de tangerineiras coletadas em Mucugê e em Cruz das Almas, nos meses de abril, maio e junho de 2015, são mostrados na Tabela 1; Figura 4. Em Mucugê, a frequência de obtenção de triploides entre as variedades variou de 50% ('África do Sul') a 100% ('Ortanique' e 'Clemenules'). As variações na frequência de triploides ocorreram em função da porcentagem de sementes germinadas, do tipo de semente, do ambiente e do genótipo.

De acordo com Esen e Soost (1971) híbridos triploides de citros podem ser obtidos por meio de hibridizações  $2x \times 2x$  mediante a produção de gametas não reduzidos pelo parental feminino. A frequência de gametas não reduzidos depende do genótipo (ESEN; SOOST, 1971; LURO et al., 2004). Embriões triploides são preferencialmente encontrados em sementes entre 1/3 e 1/6 menores que as sementes do tamanho normal, e geralmente essas sementes não germinam em condições normais em casa de vegetação. Normalmente é necessário o resgate e cultivo *in vitro* de embriões destas sementes pequenas para atingir altas taxas de germinação (NAVARRO et al., 2002; ALEZA et al., 2010b).

**Tabela 1.** Frequência de obtenção de híbridos triploides em 15 variedades de tangerineira, em função do genótipo, tipo de semente (semente normal - N e semente pouco desenvolvida - PD) e do ambiente (Cruz das Almas - CZA e Mucugê - MCG). Frutos coletados nos meses de abril, maio e junho de 2015.

Semente	Variedade <sup>1</sup>	Plantas obtidas		Germinadas (%)		Triploides (%)	
		CZA	MCG	CZA	MCG	CZA	MCG
N	África do Sul	1	2	20	40	0	1 (50%)
	Clemenules	2	1	40	20	0	0
	Dancy	2	2	40	40	0	0
	Ellendale	0	0	0	0	0	0
	Fortune	0	4	0	80	0	0
	Fremont	1	2	20	40	0	0
	Kincy	5	1	100	20	1 (20%)	0
	Montenegrina	0	0	0	0	0	0
	Murcott	0	0	0	0	0	0
	Nova	5	2	100	40	0	0
	Ortanique	0	5	0	100	0	0
	Page	0	0	0	0	0	0
	Piemonte	0	0	0	0	0	0
	Span Americana	2	1	40	20	0	0
	Swatow	0	0	0	0	0	0
PD	África do Sul	0	1	0	20	0	0
	Clemenules	0	1	0	20	0	1 (100%)
	Dancy	1	2	20	40	0	0
	Ellendale	1	0	20	0	0	0
	Fortune	0	0	0	0	0	0
	Fremont	0	0	0	0	0	0
	Kincy	0	0	0	0	0	0
	Montenegrina	0	1	0	20	0	0
	Murcott	0	3	0	60	0	0
	Nova	2	4	40	80	0	0
	Ortanique	0	2	0	40	0	2 (100%)
	Page	0	1	0	20	0	0
	Piemonte	1	0	20	0	0	0
	Span Americana	0	2	0	40	0	0
	Swatow	0	0	0	0	0	0

<sup>1</sup>Ortanique' tangor natural [*Citrus reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osbeck]; 'Clemenules' (*C. clementina* hort. ex Tanaka); 'Montenegrina' (*C. deliciosa* Ten.); tangerineira-tangelo 'Nova'[tangerineira 'Clementina' x tangelo 'Orlando' (*C. paradisi* Macfad. x *C. reticulata*)]; 'Piemonte' [tangerineira 'Clemenules'*C. clementina* x (*C. reticulata* x *C. sinensis*)]; tangerineira-tangelo 'Page' (tangerineira 'Clementina' *C. clementina* hort. ex Tanaka x tangelo 'Minneola' *C. paradisi* Macfad. x *C. tangerina*); tangerineira 'Dancy' (*C. tangerina* hort. ex Tanaka); 'Fremont' (tangerineira 'Clementina' *C. clementina* x tangerineira 'Ponkan' *C. reticulata*); 'Ellendale' (*C. reticulata* x *C. sinensis*); 'Fortune' (tangerineira 'Clementina' *C. clementina* x tangerineira 'Dancy' *C. tangerina*); 'Span Americana' (*C. reticulata*); 'Murcott' (*C. reticulata* x *C. sinensis*); 'Kincy' (tangerineira 'King' *C. nobilis* Lour. x tangerineira 'Dancy' *C. tangerina*); tangerineira 'Swatow' (*C. reticulata*); 'África do Sul' (*C. reticulata*).



**Figura 4.** Plantas triploides oriundas do cultivo *in vitro* de sementes de polinizações abertas das variedades: 'Clemenules' (*Citrus clementina* hort. ex Tanaka); 'Ortanique' tangor natural [*C. reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osbeck]; 'África do Sul' (*C. reticulata* Blanco) e 'Kincy' [tangerineira King (*C. nobilis* Lour.) x tangerineira Dancy (*C. tangerina* hort. ex Tanaka)], identificadas pela técnica de citometria de fluxo.

Em se tratando do efeito do ambiente na formação de sementes com potencial de geração de plantas triploides, as condições ambientais de Mucugê foram favoráveis, obtendo-se em relação a essa localidade um total de quatro triploides, um da variedade Clemenules, um da África do Sul e dois da Ortanique (Tabela 1). Já em Cruz das Almas, obteve-se apenas um triploide da variedade Kincy (Tabela 1). Relativamente ao tipo de semente (Tabela 2), em Mucugê a frequência de triploides foi de 5% para plantas oriundas de sementes normais e de 17,6% para plantas provenientes de sementes pouco desenvolvidas, evidenciando, que o tipo de semente tem influência na taxa de obtenção de triploides. Por sua vez, em Cruz das Almas, a frequência de triploides em plantas oriundas de sementes normais foi de 5,6% e em plantas de sementes pouco desenvolvidas foi de 0,0%.

**Tabela 2.** Frequência de obtenção de triploides em Cruz das Almas e em Mucugê, em função do tipo de semente (semente normal - N e semente pouco desenvolvida - PD). Frutos coletados nos meses de abril, maio e junho de 2015.

Local	Tipo de semente	Plantas obtidas	Triploides (%)
Cruz das Almas	N	18	1 (5,6%)
	PD	5	0 (0,0%)
Mucugê	N	20	1 (5,0%)
	PD	17	3 (17,6 %)

Cameron e Frost (1968) chegaram à conclusão que a frequência de obtenção natural de plantas triploides em progênies interespecíficas ou intraespecíficas de *Citrus*, provenientes de polinizações entre parentais diploides, é geralmente baixa (próxima de 5%), variando em função do genótipo materno (Esen e Soost, 1971). Entretanto, Aleza et al. (2010b) em hibridações controladas 2x × 2x envolvendo parentais femininos monoembriônicos e não apomíticos, utilizando as técnicas de resgate de embriões e cultivo *in vitro*, conseguiram uma taxa de 91,6% de plantas triploides.

Quanto à coleta realizada em setembro de 2015, foram colhidas apenas quatro variedades: Dancy, Ellendale, Kincy e Ortanique. Obteve-se em Mucugê, apenas uma planta triploide da 'Ortanique', proveniente de semente pouco desenvolvida, com uma frequência de obtenção de triploides de 50% para esta variedade (Tabela 3). Já em Cruz das Almas não foram obtidos triploides (Tabela 3). Nota-se que em ambas as coletas, em geral, o ambiente de Mucugê favoreceu uma maior formação de plantas triploides em relação ao ambiente de Cruz das Almas. Entretanto, deve-se levar em consideração a baixa taxa de germinação das sementes em ambos os ambientes, e conseqüentemente o reduzido número de plantas obtidas, sendo que todas as plantas provenientes do cultivo *in vitro*, independente do tipo de semente, foram avaliadas por citometria de fluxo.

**Tabela 3.** Frequência de obtenção de híbridos triploides em quatro variedades de tangerineira, em função do genótipo, tipo de semente (semente normal - N e semente pouco desenvolvida - PD) e do ambiente (Cruz das Almas - CZA e Mucugê - MCG). Frutos coletados no mês de setembro de 2015.

Semente	Variedade <sup>1</sup>	Plantas obtidas		Germinação (%)		Triploides (%)	
		CZA	MCG	CZA	MCG	CZA	MCG
N	Dancy	0	0	0	0	0	0
	Ellendale	2	2	100	100	0	0
	Kincy	2	2	100	100	0	0
	Ortanique	2	1	100	50	0	0
PD	Dancy	1	0	5	0	0	0
	Ellendale	2	12	10	60	0	0
	Kincy	3	1	15	5	0	0
	Ortanique	2	2	10	10	0	1 (50%)

<sup>1</sup>'Ortanique' tangor natural [*Citrus reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osbeck]; 'Kincy' (tangerineira 'King' *C. nobilis* Lour. x tangerineira 'Dancy' *C. tangerina* hort. ex Tanaka); tangerineira 'Dancy' (*C. tangerina*); 'Ellendale' (*C. reticulata* x *C. sinensis*).

Segundo Handaji et al. (2008), pesquisas realizadas com híbridos triploides espontâneos resultantes de cruzamentos entre parentais diploides têm sua formação relacionada a duas hipóteses: ou os descendentes triploides são originados da união do gameta feminino não reduzido com o gameta masculino reduzido ( $18n + 9n$ ) ou da fusão do gameta feminino reduzido com o gameta masculino não reduzido ( $9n + 18n$ ). Entretanto, Esen e Soost (1971) rejeitaram essa hipótese. No caso das hibridizações  $2x \times 2x$  híbridos triploides são obtidos a partir da união do megagametófito  $2n$  com o pólen haploide (ESEN & SOOST, 1971; ESEN & SOOST, 1973a; GERACI et al., 1975). Luro et al. (2008) propuseram que a restituição da segunda divisão meiótica é o mecanismo controle para o desenvolvimento do megagametófito diploide em 'Clementina', enquanto que Chen et al. (2008) propuseram a restituição da primeira divisão meiótica em laranjas doces.

#### **Ploidia das plantas de citros obtidas de cruzamentos controlados, por meio da citometria de fluxo**

Foram realizadas 197 polinizações em Cruz das Almas: 'Ortanique' x 'Kincy' (5); 'Ortanique' x 'Fremont' (19); 'Nova' x 'Kincy' (43); 'Nova' x 'Page' (71); 'Fortune' x 'Kincy' (10); 'Fortune' x 'Page' (49). As taxas de vingamento dos frutos variaram entre 4,2% 'Nova' x 'Page' e 40% 'Ortanique' x 'Kincy' (Tabela 4).

**Tabela 4.** Cruzamentos controlados realizados em Cruz das Almas, Ba. Número de flores polinizadas (NP), número de frutos obtidos após as polinizações (NF) e taxa de vingamento dos frutos (TV).

<b>Cruzamentos<sup>1</sup></b>	<b>NP</b>	<b>NF</b>	<b>TV (%)</b>
'Ortanique' x 'Kincy'	5	2	40,0
'Ortanique' x 'Fremont'	19	-	-
'Nova' x 'Kincy'	43	15	34,9
'Nova' x 'Page'	71	3	4,2
'Fortune' x 'Kincy'	10	-	-
'Fortune' x 'Page'	49	-	-
<b>Total</b>	<b>197</b>	<b>20</b>	

<sup>1</sup>'Ortanique' tangor natural [*Citrus reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osbeck]; 'Kincy' (tangerineira 'King' *C. nobilis* Lour. x tangerineira 'Dancy' *C. tangerina* hort. ex Tanaka); tangerineira-tangelo 'Nova' [tangerineira 'Clementina' x tangelo 'Orlando' (*C. paradisi* x *C. reticulata*)]; tangerineira-tangelo 'Page' (tangerineira 'Clementina' *C. clementina* hort. ex Tanaka x tangelo 'Minneola' *C. paradisi* Macfad. x *C. tangerina*); 'Fremont' (tangerineira 'Clementina' *C. clementina* x tangerineira 'Ponkan' *C. reticulata*); 'Fortune' (tangerineira 'Clementina' *C. clementina* x tangerineira 'Dancy' *C. tangerina*).

Por sua vez, em Mucugê foram realizadas 734 polinizações: 'Ortanique' x 'Kincy' (66); 'Ortanique' x 'Montenegrina' (86); 'Ortanique' x 'Page' (67); 'Ortanique' x 'Fremont' (17); 'Ortanique' x 'Swatow' (61); 'Nova' x 'Kincy' (28); 'Nova' x 'Montenegrina' (75); 'Nova' x 'Page' (81); 'Nova' x 'Fremont' (52); 'Nova' x 'Swatow' (122); 'Fortune' x 'Kincy' (16); 'Fortune' x 'Montenegrina' (11); 'Fortune' x 'Page' (22); 'Fortune' x 'Fremont' (12); 'Fortune' x 'Swatow' (18). As taxas de vingamento de frutos variaram entre 7,4% 'Nova' x 'Page' e 39,3% 'Ortanique' x 'Swatow' (Tabela 5).

**Tabela 5.** Cruzamentos controlados realizados em Mucugê, Ba. Número de flores polinizadas (NP), número de frutos obtidos após as polinizações (NF) e taxa de vingamento dos frutos (TV).

<b>Cruzamentos<sup>1</sup></b>	<b>NP</b>	<b>NF</b>	<b>TV (%)</b>
'Ortanique' x 'Kincy'	66	15	22,7
'Ortanique' x 'Montenegrina'	86	33	38,4
'Ortanique' x 'Page'	67	22	32,8
'Ortanique' x 'Fremont'	17	4	23,5
'Ortanique' x 'Swatow'	61	24	39,3
'Nova' x 'Kincy'	28	6	21,4
'Nova' x 'Montenegrina'	75	18	24,0
'Nova' x 'Page'	81	6	7,4
'Nova' x 'Fremont'	52	14	26,9
'Nova' x 'Swatow'	122	39	31,9
'Fortune' x 'Kincy'	16	-	-
'Fortune' x 'Montenegrina'	11	-	-
'Fortune' x 'Page'	22	-	-
'Fortune' x 'Fremont'	12	-	-
'Fortune' x 'Swatow'	18	-	-
<b>Total</b>	<b>734</b>	<b>181</b>	

<sup>1</sup>'Ortanique' tangor natural [*Citrus reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osbeck]; 'Kincy' (tangerineira 'King' *C. nobilis* Lour. x tangerineira 'Dancy' *C. tangerina* hort. ex Tanaka); 'Montenegrina' (*C. deliciosa* Ten.); tangerineira-tangelo 'Page' (tangerineira 'Clementina' *C. clementina* hort. ex Tanaka x tangelo 'Minneola' *C. paradisi* Macfad. x *C. tangerina*); 'Fremont' (tangerineira 'Clementina' *C. clementina* x tangerineira 'Ponkan' *C. reticulata*); tangerineira-tangelo 'Nova' [tangerineira 'Clementina' x tangelo 'Orlando' (*C. paradisi* x *C. reticulata*)]; tangerineira 'Swatow' (*C. reticulata*); 'Fortune' (tangerineira 'Clementina' *C. clementina* x tangerineira 'Dancy' *C. tangerina*).

Nos cruzamentos controlados realizados em Mucugê e em Cruz das Almas, utilizaram-se como parentais femininos as variedades Nova, Ortanique e Fortune, e como parentais masculinos Page, Swatow, Montenegrina, Fremont e Kincy. Entretanto, os frutos resultantes dos cruzamentos utilizando a variedade Fortune como parental feminino não vingaram, em ambos os ambientes, não sendo possível avaliar a influência dessa variedade na formação de triploides.

Relativamente ao ambiente, em Mucugê, foram obtidos sete triploides, quatro do cruzamento 'Ortanique' x 'Montenegrina', um 'Ortanique' x 'Kincy' e dois 'Ortanique' x 'Swatow' (Figura 5; Tabela 6). Nota-se que a variedade Ortanique se destacou entre os demais parentais femininos, e a 'Montenegrina' entre os

parentais masculinos. A frequência de obtenção de triploides entre os cruzamentos variou entre 100% ('Ortanique' x 'Montenegrina') e ('Ortanique' x 'Swatow'), e 50% ('Ortanique' x 'Kincy').



**Figura 5.** Plantas triploides oriundas do cultivo *in vitro* de sementes de cruzamentos controlados entre os parentais: 'Ortanique' tangor natural [*Citrus reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osbeck] x 'Montenegrina' (*C. deliciosa* Ten.) e 'Ortanique' x 'Swatow' (*C. reticulata*).

**Tabela 6.** Cruzamentos controlados realizados em Mucugê, BA. Número de plantas obtidas a partir de sementes normais (SN), número de plantas obtidas a partir de sementes pouco desenvolvidas (SPD), número de plantas obtidas a partir de sementes pequenas (SP), porcentagem de plantas obtidas (PO%) e porcentagem de plantas triploides.

Parental feminino	Parental masculino	SN	PO%	Triploides%	SPD	PO%	Triploides%	SP	PO%	Triploides%
'Ortanique'	'Kincy'	3	7,9	0,0	0	0,0	0,0	2	40,0	1 (50,0%)
	'Montenegrina'	9	9,3	0,0	0	0,0	0,0	4	50,0	4 (100%)
	'Page'	10	17,2	0,0	0	0,0	0,0	0	0,0	0 (0,0%)
	'Swatow'	5	13,5	0,0	0	0,0	0,0	2	50,0	2 (100%)
	'Fremont'	2	10,0	0,0	1	20,0	0,0	0	0,0	0 (0,0%)
'Nova'	'Swatow'	6	5,0	0,0	0	0,0	0,0	5	33,3	0 (0,0%)
	'Kincy'	1	5,0	0,0	0	0,0	0,0	0	0,0	0 (0,0%)
	'Fremont'	5	25,0	0,0	0	0,0	0,0	0	0,0	0 (0,0%)
	'Montenegrina'	2	10,0	0,0	0	0,0	0,0	0	0,0	0 (0,0%)

<sup>1</sup>'Ortanique' tangor natural [*Citrus reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osbeck]; 'Kincy' (tangerineira 'King' *C. nobilis* Lour. x tangerineira 'Dancy' *C. tangerina* hort. ex Tanaka); 'Montenegrina' (*C. deliciosa* Ten.); tangerineira-tangelo 'Page' (tangerineira 'Clementina' *C. clementina* hort. ex Tanaka x tangelo 'Minneola' *C. paradisi* Macfad. x *C. tangerina*); 'Fremont' (tangerineira 'Clementina' *C. clementina* x tangerineira 'Ponkan' *C. reticulata*); tangerineira 'Swatow' (*C. reticulata*); tangerineira-tangelo 'Nova' [tangerineira 'Clementina' x tangelo 'Orlando' (*C. paradisi* x *C. reticulata*)].

Quanto ao tipo de semente, verificou-se que todos os triploides foram obtidos de sementes pequenas, sendo que das 13 plantas originadas de sementes pequenas, sete foram triploides, com uma frequência de 53,8% de triploides produzidos a partir de sementes pequenas. Já em relação ao ambiente de Cruz das Almas, não foram obtidas plantas triploides (Tabela 7). Esen e Soost (1971, 1973a, 1973b) concluíram que plantas triploides são formadas a partir de sementes pequenas e podem ser obtidas de cruzamentos  $2x \times 2x$ , e que essas sementes se formam a partir da união de gametas femininos não reduzidos com gametas masculinos reduzidos, contudo, a frequência de tais eventos é geralmente baixa, e propuseram a hipótese que a taxa de 3:5 de embriões formados a partir de endosperma poliploide foi o fator responsável pelo tamanho reduzido das sementes. Pois, em citros o endosperma das sementes que contém embriões diploides é naturalmente triploide, entretanto, estudos histológicos feitos por Esen e Soost (1971, 1973a) demonstrou que sementes pequenas contêm embriões com endosperma pentaploide, que por sua vez, cresce mais lentamente e para o desenvolvimento prematuramente, sendo provavelmente, este o fator responsável pelo tamanho reduzido das sementes que contém embriões triploides.

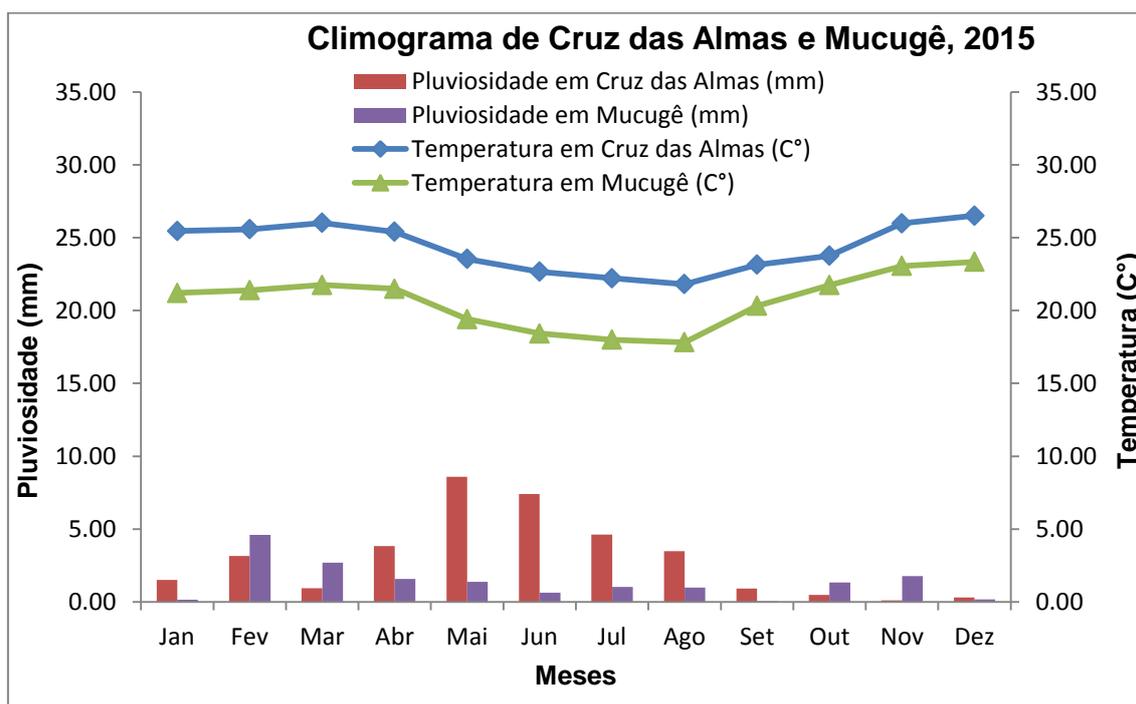
**Tabela 7.** Cruzamentos controlados realizados em Cruz das Almas, BA. Número de plantas obtidas a partir de sementes normais (SN), número de plantas obtidas a partir de sementes pouco desenvolvidas (SPD), número de plantas obtidas a partir de sementes pequenas (SP), porcentagem de plantas obtidas (PO%) e porcentagem de triploides.

Parental feminino	Parental masculino	SN	PO%	Triploides%	SPD	PO%	Triploides%	SP	PO%	Triploides%
'Nova'	'Kincy'	26	30,6	0,0	5	31,3	0,0	0	0,0%	0,0
	'Page'	4	40,0	0,0	0	0,0	0,0	0	0,0	0,0
'Ortanique'	'Kincy'	28	75,7	0,0	0	0,0	0,0	0	0,0	0,0

<sup>1</sup>Tangerineira-tangelo 'Nova' [tangerineira 'Clementina' *C. clementina* hort. ex Tanaka x tangelo 'Orlando' (*C. paradisi* Macfad x *C. reticulata* Blanco)]; 'Kincy' (tangerineira 'King' *C. nobilis* Lour. x tangerineira 'Dancy' *C. tangerina* hort. ex Tanaka); 'Ortanique' tangor natural [*Citrus reticulata* x *C. sinensis* (L.) Osbeck]; tangerineira-tangelo 'Page' (tangerineira 'Clementina' *C. clementina* hort. ex Tanaka x tangelo 'Minneola' *C. paradisi* Macfad. x *C. tangerina*).

De modo geral, apesar do ambiente de Mucugê ter propiciado uma maior frequência de triploides em relação a Cruz das Almas, onde não foram obtidas plantas triploides dos cruzamentos controlados, deve-se levar em consideração o reduzido número de plantas obtidas em ambos os ambientes, sendo que esse número foi diretamente proporcional à taxa de germinação das sementes, que foi baixa na maioria das variedades, principalmente em Cruz das Almas.

A Figura 6 ilustra a pluviosidade e a temperatura dos municípios de Cruz das Almas e Mucugê no período de condução deste trabalho (ano 2015). Observa-se que Mucugê apresentou menor temperatura e menor pluviosidade (médias mensais) ao longo do ano em comparação a Cruz das Almas. Nota-se, que a temperatura mais baixa em Mucugê pode ter influenciado a maior formação de triploides nesse ambiente, uma vez que, alguns autores relatam o efeito de baixas temperaturas na formação de poliploides.



**Figura 6.** Pluviosidade e temperatura (médias mensais) de Cruz das Almas e Mucugê no ano de 2015.

Alguns estudos realizados mostram que o parental masculino e as condições ambientais influenciam a produção de plantas triploides em citros (LURO et al., 2004; VILORIA; GROSSER, 2005; ALEZA et al., 2010b). A influência das condições ambientais no sucesso reprodutivo das plantas está bem

documentada. As condições ambientais podem afetar a produção de pólen, o tamanho do pólen e a taxa de crescimento do tubo polínico (YOUNG; STANTON 1990). A temperatura durante a fase progâmica representa um dos fatores ambientais mais importantes que afetam o desempenho do pólen. Assim, a resposta à temperatura durante a fase reprodutiva é dependente do genótipo (HEDHLY et al., 2005).

Otto e Whitton (2000), Saleh et al. (2008), Aleza et al. (2011), e Hussain et al. (2011), propuseram a hipótese de que diferentes condições ambientais, como a temperatura, podem ter um efeito nos eventos de duplicação cromossômica. Barret e Hutchison (1978) identificaram 0,75% e 0,90% de plantas poliploides em frutos colhidos na Flórida e Califórnia, respectivamente, e associaram essa diferença à temperatura.

O efeito de baixas temperaturas em eventos de poliploidização parece ser uma regra geral, tanto em plantas quanto em animais (RAMSEY; SCHEMSKE, 1998; OTTO; WHITTON, 2000). Além da vantagem adaptativa dos poliploides, a maior taxa de eventos de poliploidização em um ambiente mais frio poderia ser um dos fatores relacionados ao aumento da frequência de espécies poliploides com latitude no Hemisfério Norte (ASKER; JERLING, 1992).

Aleza et al. (2011) verificaram que a frequência global de mudas tetraploides entre 30 genótipos analisados de *Citrus* cultivados em Valência e na Córsega foi de 1 a 8% (variando de 0 a 9,7% de acordo com a cultivar e as condições ambientais). Além disso, confirmaram a importância das condições ambientais nas taxas de tetraploides, estudando sementes do mesmo genótipo (citrange 'Carrizo') colhidas em diferentes países. Foram observadas taxas mais elevadas para o Mediterrâneo do que para as áreas tropicais e observaram-se correlações negativas significativas entre as taxas de tetraploides e as temperaturas médias durante a indução floral e o período de floração. E eles sugeriram que condições mais frias favorecem eventos de tetraploidização em células nucleares cítricas.

Aleza et al. (2012a) Estudaram o efeito dos parentais e das condições ambientais sobre a produção de híbridos triploides em todas as hibridações sexuais de  $4x \times 2x$  feitas ao longo de 5 anos. Os resultados das hibridações

sugeriram uma interação entre parentais masculinos e as condições ambientais na produção de triploides.

Luro et al. (2004) mostraram que as condições ambientais afetam a produção de híbridos triploides em hibridizações  $2x \times 2x$ . Viloría e Grosser (2005) observaram um efeito da temperatura na eficiência de produção de híbridos de citros com base em hibridizações  $2x \times 4x$ . A produção de híbridos triploides será influenciada pela capacidade do pólen para realizar fecundação bem-sucedida. Esta capacidade é dependente da qualidade do pólen, que é determinada pelo genótipo masculino, mas também por condições ambientais, o nível de compatibilidade entre o parental feminino e masculino, e efeitos ambientais na germinação e crescimento do tubo polínico (YOUNG; STANTON 1990; VILORIA; GROSSER, 2005).

Esen e Soost (1971) chegaram à conclusão que quando diferentes parentais femininos eram polinizados pelo mesmo parental masculino, a progênie resultante apresentava diferentes frequências de triploides inesperados. Entretanto, quando ocorria a polinização de um mesmo genótipo feminino com diferentes parentais masculinos ocorria à mesma frequência de triploides inesperados, além disso, todas as sementes que possuíam embriões triploides apresentavam endosperma pentaploide, indicando que a formação do gameta não reduzido ocorria no genótipo feminino.

Estudos citogenéticos realizados por Aleza et al. (2015) mostraram que embriões triploides são associados com endospermas pentaploides, e há uma forte indicação que eles resultam da fertilização de óvulos não reduzidos pelo pólen haploide normal. Dependendo do genótipo, a frequência de duplicação entre os gametas femininos variaram de menos de 1% a mais de 20%.

Bosco et al. (1992) demonstraram que o aborto na megasporogênese durante o período entre as primeiras divisões celulares e a formação da célula ovo é comum. Por esta razão, plantas triploides de citros são geralmente estéreis, embora elas possam ocasionalmente produzir frutos com poucas sementes, e são capazes de induzir a formação de sementes em frutos de outras cultivares, indicando que os embriões são formados a partir de megagametófitos não reduzidos.

Aleza et al. (2012b) em hibridações  $2x \times 4x$  obteve 1061 plantas de sementes normais, das quais, 279 plantas foram triploides (26%), constatando que em hibridizações utilizando parentais femininos  $2n$  com parentais masculinos  $4n$ , é possível recuperar plantas triploides de ambos os tipos de sementes, normais e pouco desenvolvidas.

Aleza et al. (2010b) em hibridizações utilizando parentais  $2x \times 2x$ , realizadas durante um período de dez anos (1996 a 2006) pelo programa de melhoramento de híbridos triploides de citros do *Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias* (IVIA), constatou que híbridos triploides são encontrados em sementes desenvolvidas que possuem entre 52 e 62% do tamanho das sementes normais; o resgate de embriões e a citometria de fluxo são duas técnicas indispensáveis para extensivos programas de melhoramento de triploides em citros baseados em hibridações  $2x \times 2x$ ; a frequência de produção de gametas não reduzidos depende do genótipo materno, e essa frequência pode ser quantificada por meio de uma triagem no genótipo, antes de iniciar os cruzamentos controlados visando a obtenção de triploides; a tangerineira 'Fortune' apresenta uma maior frequência deste fenômeno do que as clementinas; e observou-se um efeito claro do progenitor masculino na produção de híbridos triploides, bem como efeito das condições ambientais.

## CONCLUSÕES

A frequência de obtenção de triploides variou em função do genótipo, do tamanho das sementes e do ambiente.

A 'Ortanique' destacou-se pelo seu maior potencial de produção de triploides.

Sementes de menor tamanho e pouco desenvolvidas apresentaram maior capacidade de geração de triploides que as sementes normais.

O ambiente de Mucugê, que apresenta maior altitude e temperaturas mais baixas, favoreceu a formação de triploides.

## REFERÊNCIAS

- ALEZA, P.; CUENCA, J.; HERNÁNDEZ, M.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, L.; OLLITRAULT, P. Genetic mapping of centromeres in the nine *Citrus clementina* chromosomes using half-tetrad analysis and recombination patterns in unreduced and haploid gametes. **BMC Plant Biology**, v.15, n. 80, 2015.
- ALEZA, P.; CUENCA, J.; JUÁREZ, J.; PINA, J. A.; NAVARRO, L. ‘Garbí’ Mandarin: A New Late-maturing Triploid Hybrid. **Horticultural Science**, January, v. 45, n. 1, p.39-141, 2010a.
- ALEZA, P.; FROELICHER, Y.; SCHWARZ, S.; AGUSTI, M.; HERNÁNDEZ, M.; JUÁREZ, J.; LURO, F.; MORILLON, R.; NAVARRO, L.; OLLITRAULT, P. Tetraploidization events by chromosome doubling of nucellar cells are frequent in apomictic citrus and are dependent on genotype and environment. **Annals of Botany**, v.108, p.37-50, 2011.
- ALEZA, P.; JUÁREZ, J.; CUENCA, J.; OLLITRAULT, P. Extensive citrus triploid hybrid production by  $2x \times 4x$  sexual hybridizations and parent-effect on the length of the juvenile phase. **Plant Cell Reports**, v.3, p. 1723–1735, 2012b.
- ALEZA, P.; JUÁREZ, J.; CUENCA, J.; OLLITRAULT, P.; NAVARRO, L. Recovery of citrus triploid hybrids by embryo rescue and flow cytometry from  $2X \times 2X$  sexual hybridisation and its application to extensive breeding programs. **Plant Cell Report**, v.29, p. 1023-1034, 2010b.
- Aleza, P.; Juárez, J.; Hernández, M.; Ollitrault, P.; Navarro, L. Implementation of extensive citrus triploid breeding programs based on  $4x \times 2x$  sexual hybridization. **Tree Genetics & Genomes**, v.8, p.1293-1306, 2012a.
- ASKER, S.; JERLING, L. Apomixis in plants. Boca Raton, FL: CRC Press; 1992.
- BARRETT, H.C.; HUTCHISON, D.J. Spontaneous tetraploidy in apomictic seedlings of *Citrus*. **Economic Botany**, v.32, p.27-45, 1978.
- BOSCO S, F. del.; MATRANGA, G.; GERACI, G. Micro and macrosporogenesis of two triploid hybrids of citrus. **International Society of Citriculture**, Acireale, v.1, p.122–124, 1992.
- BRITO, M. E. B.; FERNANDES, P. D.; GHEYI, H. R.; MELO, A. S. DE; CARDOSO, J. A. F.; SOARES FILHO, W. DOS. S. Sensibilidade de variedades e

híbridos de citrange à salinidade na formação de porta-enxertos. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 3, p. 343-353, 2008.

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

CHAGAS, E. A.; PASQUAL, M.; DUTRA, L. F.; SILVA, A. B. da.; CAZETTA, J. O.; SANTOS, F. C.; CARDOSO, P. Desempenho de diferentes estádios embrionários no cultivo *in vitro* de embriões de 'Pêra Rio' x 'Poncã'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 523-525, 2003.

CHEN, C.; LYON, M.T.; O'MALLEY, D.; FEDERICI, C.T.; GMITTER, J.; GROSSER, J.W.; CHAPARRO, J.X.; ROOSE, M.L.; GMITTER, F.G. Origin and frequency of 2n gametes in *Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata* and their reciprocal crosses. **Plant Science**, v.174, p.1–8, 2008.

COELHO, E. F.; COELHO FILHO, M. A.; SIMÕES, W.L.; COELHO, Y. S. Irrigação em citros nas condições do nordeste do Brasil. **Revista Laranja**, Cordeirópolis, v.27, n.2, p297-320, 2006.

DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. **Nature Protocols**, v.2, n.9, p. 2233-2244, 2007.

ESEN, A.; SOOST, R. K. Precocious development and germination of spontaneous triploid seeds in citrus. **Journal of Heredity**, v. 64, p.147–154, 1973a.

ESEN, A.; SOOST, R. K. Seed development in Citrus with special reference to 2x x 4x crosses. **American Journal of Bioethics**, v. 60, p.448-462, 1973b.

ESEN, A.; SOOST, R. K. Unexpected triploids in *Citrus*: their origin, identification and possible use. **Journal of Heredity**, v.62, p. 329–333, 1971.

GERACI, G.; ESEN, A.; SOOST, R. K. Triploid progenies from 2x–2x crosses of citrus cultivars. **Journal of Heredity**, v. 66, p.177–178, 1975.

HANDAJI, N.; ARSALANE, N.; BENYAHIA, H.; et IBRIZ, M. Identification de l'origine de gamètes parentaux diploïdes et mode de restitution nucléaire des hybrides spontanément triploïdes de mandariniers. **Alawamia**, p.123-124, 2008.

HEDHLY, A.; HORMAZA, J. L.; HERRERO, M. Influence of genotype temperature interaction on pollen performe. **Journal of Evolutionary Biology**, v.18, p.1494–1502, 2005.

HUSSAIN, S.; CURK, F.; OLLITRAULT, P.; MORILLON, R.; LURO, F. Facultative apomixis and chromosome doubling are sources of heterogeneity in citrus rootstock trials: Impact on clementine production and breeding selection. **Scientia Horticulturae**, v.130, p.815-819, 2011.

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

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **Horticultural Science**, Alexandria, v. 15, n. 3, p. 416-417, 1980.

LUCHETTI, M. A.; MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; FIGUEIREDO, J. O. Aspectos gerais e distribuição de cultivo. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; FIGUEIREDO, J. O. (Ed.). Lima ácida 'Tahiti'. **Instituto Agrônômico**, Campinas, p. 1-12, 2003.

LURO, F.; COSTANTINO, G.; TEROL, J. F.; ARGOUT, X.; ALLARIO, T.; WINCKER, P.; TALON M.; OLLITRAULT, P.; MORILLON, R. Transferability of the EST-SSRs developed on Nules clementine (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) to other citrus species and their effectiveness for genetic mapping. **BMC Genomics**, v. 9, n.287, p.1-13, 2008.

LURO, F.; MADDY, F.; JACQUEMOND, C.; FROELICHER, Y.; MORILLON, R.; RIST, D.; OLLITRAULT, P. Identification and evaluation of diplogyny in clementine (*Citrus clementina*) for use in breeding. **Acta Horticulturae**, v.663, p.841–847, 2004.

NAVARRO, L.; JUÁREZ, J.; ALEZA, P.; PINA, J. A. Recovery of triploid seedless mandarin hybrids from  $2n \times 2n$  and  $2n \times 4n$  crosses by embryo rescue and flow cytometry. **Plant Biotechnology**, Orlando, p. 541–544, 2002.

OLLITRAULT, P.; DAMBIER, D.; LURO, F.; FROELICHER, Y. Ploidy manipulation for breeding seedless triploid citrus. **Plant Breeding Reviews**, v.20, p.323–354, 2008.

- OTTO, S.P.; WHITTON, J. Polyploid incidence and evolution. **Annual Review of Genetics**, v.34, p.401-437, 2000.
- RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D.W. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**. v.29, p.467–501, 1998.
- REZENDE, J. O. Recôncavo Baiano, berço da Universidade Federal Segunda da Bahia: passado, presente e futuro. **Pesquisa e Análise**, Salvador, 194.p, 2004.
- SALEH, B.; ALLARIO, T.; DAMBIER, D.; OLLITRAULT, P.; MORILLON, R. Tetraploid citrus rootstocks are more tolerant to salt stress than diploid. **Compets Rendus Biologies**, v.331, p.703-710, 2008.
- STRADMAN, M.T.S. 1998. **Plano de Manejo do Parque Municipal de Mucugê**. Projeto Sempre Viva. Prefeitura Municipal de Mucugê, Mucugê.
- VILORIA, Z.; GROSSER, J. W. Acid citrus fruit improvement via interploid hybridization using allotetraploid somatic hybrid and autotetraploid breeding parents. **Horticultural Science**, v.130, p.392–402, 2005.
- YOUNG, H. J.; STANTON, M. L. Influence of environmental quality on pollen competitive ability in wild radish. **Science**, v. 248, p.1631–1633, 1990.

## **CAPÍTULO 2**

### **MICROPROPAGAÇÃO DE PORTA-ENXERTOS DE CITROS**

---

Artigo será submetido ao comitê editorial do periódico científico Revista Brasileira de Ciências Agrárias.

## MICROPROPAGAÇÃO DE PORTA-ENXERTOS DE CITROS

**RESUMO:** As técnicas de biotecnologia, como o cultivo *in vitro*, constituem-se em alternativas importantes para aprimorar os métodos de propagação existentes. O objetivo do trabalho foi propagar porta-enxertos de interesse agrônomo por meio do cultivo *in vitro*, empregando meio de cultura *Wood Plant Medium* - WPM. O experimento foi desenvolvido na biofábrica da Campo Biotecnologia Vegetal Ltda., localizada na Embrapa Mandioca e Fruticultura. Selecionaram-se dez híbridos introduzidos ou obtidos pelo Programa de Melhoramento Genético de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura: citrandarins 'San Diego', 'Indio' e 'Riverside'; tangerineira 'Sunki Tropical'; híbridos LRF x (LCR x TR) - 005, HTR - 051, HTR - 069, TSKC x (LCR x TR) - 059, LCR x TR - 001 e TSK x TRBK - Colômbia. Segmentos nodais obtidos de plantas matrizes, com aproximadamente 1cm de comprimento, foram inoculados em frascos de vidro (250 mL) contendo 50 mL do meio WPM na sua constituição basal, sendo em seguida os frascos levados a sala de crescimento, à temperatura de  $27 \pm 1$  °C, com densidade de fluxo de fótons de 30  $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas. Aos 150 dias de cultivo, procedeu-se ao subcultivo dos explantes em novo meio de cultura. O número de plantas formadas por explante foi avaliado aos 180 dias após a inoculação. Os dados obtidos foram submetidos ao teste F da análise de variância e as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Para determinação da taxa de poliembrionia nos genótipos estudados, utilizou-se 23 sementes a partir do total coletado, considerando poliembriônicos aqueles com mais de um embrião por semente. O cultivo *in vitro* de explantes dos dez genótipos estudados, apresentou respostas positivas à micropropagação em WPM. O número médio de explantes produzidos por planta apresentaram diferenças significativas pelo teste de Scott-Knott. O citrandarin 'Indio' destacou-se com a maior média de explantes por planta (4,20), seguido pelos híbridos TSKC x (LCR x TR) - 059 e TSK x TRBK - Colômbia, ambos com média (3,55), citrandarins 'San Diego' com média (3,00) e 'Riverside' com média (2,82). Por sua vez, os genótipos que apresentaram as menores médias de explantes por planta foram: tangerineira 'Sunki Tropical', os híbridos LRF x (LCR x TR) - 005 e LCR x TR - 001, todos com média (1,00), HTR - 069 (média 1,40) e HTR - 051 (média 2,00). O meio WPM mostrou-se adequado à micropropagação dos genótipos estudados, particularmente do citrandarin 'Indio' e dos híbridos TSKC x (LCR x TR) - 059 e TSK x TRBK - Colômbia. Ajustes no meio WPM são necessários para melhorar a eficiência da micropropagação da tangerineira 'Sunki Tropical' e dos híbridos LRF x (LCR x TR) - 005 e LCR x TR - 001.

**Palavras-chave:** *Citrus* spp.; explantes; híbridos de *Poncirus*; *Wood Plant Medium*

## MICROPROPAGATION OF VARIETIES IN CITRUS ROOTSTOCK

**ABSTRACT:** Biotechnology techniques, such as *in vitro* culture, are important alternatives for improving existing propagation methods. The objective of the work was to propagate rootstocks of agronomic interest by *in vitro* culture, using Wood Plant Medium - WPM. The experiment was developed out at biofactory the Field Plant Biotechnology localized at Embrapa Cassava and Fruticulture. Selected ten hybrids introduced or obtained by the Citrus Breeding Program of Embrapa Cassava and Fruticulture: 'San Diego', 'Indio' and 'Riverside' citrandarins; 'Sunki Tropical' mandarin; LRF x (LCR x TR) - 005, HTR - 051, HTR - 069, TSKC x (LCR x TR) - 059, LCR x TR - 001 and TSK x TRBK – Colombia hybrids. Nodal segments obtained from matrix plants, approximately 1 cm long, were inoculated in glass vials (250 mL) containing 50 mL of the WPM medium in its basal constitution, the flasks were then brought to the growth room, at a temperature of  $27 \pm 1$  ° C, with a photon flux density of  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  and photoperiod of 16 hours. At 150 days of culture, the explants were subcultured in a new culture medium. The number of plants formed per explant was evaluated at 180 days after inoculation. The data were submitted to the F test of the analysis of variance and the means grouped by the Scott-Knott test at 5% of probability. To determine the polyembryony rate in the studied genotypes, 23 seeds were used from the total collected, considering polyembryonic ones with more than one embryo per seed. *In vitro* culture of explants of the ten genotypes studied, presented positive responses to micropropagation in WPM. The average number of explants produced per plant showed significant differences by the Scott-Knott test. The 'Indio' citrandarin showed the highest average of explants per plant (4.20), followed by TSKC x (LCR x TR) - 059 and TSK x TRBK - Colombia hybrids, both with a mean (3.55), 'San Diego' with mean (3.00) and 'Riverside' with mean (2.82) citrandarins. The genotypes with the lowest explants averages were: 'Sunki Tropical' mandarin, LRF x (LCR x TR) - 005 and LCR x TR - 001 hybrids, all with mean (1.00), HTR-069 (mean: 1.40) and HTR-051 (mean 2.00). The WPM medium was suitable for the micropropagation of the genotypes studied, particularly 'Indio' citrandarin and TSKC x (LCR x TR) - 059 and TSK x TRBK - Colombia hybrids. Adjustments in the WPM medium are necessary to improve the micropropagation efficiency of 'Sunki Tropical' mandarin and LRF x (LCR x TR) - 005 and LCR x TR - 001 hybrids.

**Keywords:** *Citrus* spp.; explants; hybrids of *Poncirus*; *Wood Plant Medium*

## INTRODUÇÃO

O porta-enxerto é de extrema importância na formação das mudas cítricas, pois, pode influenciar muitas características da copa, tais como a qualidade, quantidade e precocidade da produção, desenvolvimento, vigor, período de maturação dos frutos, resistência a pragas e doenças, capacidade de adaptação das plantas às condições ambientais desfavoráveis, mantendo as características essenciais das copas desejadas (ANDRADE; MARTINS, 2003).

A produção *in vitro* de porta-enxertos de frutas de caroço vem sendo realizada de forma comercial em vários países da Europa, principalmente na Itália (LORETI; MASSAI, 1995), não sendo utilizada no Brasil em função da inexistência de um método economicamente viável (SILVA et al., 2003; TEIXEIRA, et al., 2004). A ferramenta do cultivo *in vitro* é uma técnica que tem permitido propagar espécies que possuem difícil multiplicação, e apresenta as vantagens de possibilitar a produção em larga escala de mudas livres de patógenos e com uniformidade genética, em pequeno espaço físico e curto período de tempo, de forma a atender às exigências das entidades fiscalizadoras e às necessidades dos produtores de mudas de qualidade (OLIVEIRA et al., 2001; CARRER et al., 2010).

Apesar de a citricultura ser extremamente importante para a economia do país, no Brasil ocorre a concentração do porta-enxerto limoeiro 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck) sustentando a base dos pomares, principalmente nas regiões Norte e Nordeste. O que acaba contribuindo para deixar a citricultura brasileira em estado de vulnerabilidade, em virtude do surgimento de doenças, às quais o limoeiro 'Cravo' pode apresentar suscetibilidade (SOUZA et al., 2002; POMPEU JUNIOR; BLUMER, 2009; CARVALHO et al., 2016).

Normalmente a produção de porta-enxertos de citros ocorre por meio de semeadura em viveiros, e a depender da taxa de poliembrião das sementes essa via de propagação pode comprometer a fidelidade genética e uniformidade dos pomares, pois os embriões zigóticos não preservam as características do porta-enxerto de interesse (SHARMA et al., 2009). Na germinação das sementes ocorre a produção de 1% a 40% de plântulas zigóticas. Além disso, têm porta-enxertos que não produzem ou apresentam uma quantidade muito pouca de sementes; são monoembriônicos; possuem baixa taxa de germinação; dificultando a produção de mudas por esse método (SHARMA et al., 2009).

Porta-enxertos obtidos pelo Programa de Melhoramento Genético de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura exemplifica o exposto acima: o HTR - 051 produz poucas sementes, o LCR x TR - 001 possui sementes inviáveis, que abrem ao serem manipuladas, e o TSKC x (LCR x TR) - 059 apresenta baixa taxa de poliembrionia, o que prejudica a formação de nucelares, e nesses casos, a propagação por meio da utilização apenas de sementes acaba dificultando a multiplicação de novas plantas (BORDÓN et al., 2000; MOREIRA et al., 2010; NAKANO et al., 2013).

Nesse contexto, surge a necessidade de buscar métodos econômicos e eficazes para produzir mudas de porta-enxertos com qualidade sanitária e genética, que são características fundamentais na implantação de um pomar comercial. Desse modo, as técnicas de biotecnologia, tais como o cultivo *in vitro*, constituem-se em possibilidades importantes, por promover auxílio às vias de propagação existentes (FELZENER et al., 2007; ROCHA et al., 2009).

A micropropagação é uma ferramenta alternativa de grande importância para a multiplicação de porta-enxertos, pois nesse caso, o número de plantas produzidas não é limitado pela disponibilidade de sementes, as plantas são mais uniformes, livres de doenças, e conseqüentemente apresentam maior qualidade para comercialização (SILVA et al., 2005; SHARMA et al., 2009; SCHMILTD et al., 2015).

No presente trabalho, objetivou-se propagar porta-enxertos de interesse agrônomo por meio do cultivo *in vitro*, empregando o meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980).

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido na biofábrica da Campo Biotecnologia Vegetal Ltda., localizada na Embrapa Mandioca e Fruticultura. Selecionaram-se dez híbridos introduzidos ou obtidos pelo Programa de Melhoramento Genético de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura: citrandarins [*Citrus sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] 'Indio', 'San Diego' e 'Riverside'; LRF x (LCR x TR) - 005, híbrido de limoeiro 'Rugoso da Flórida' (*C. jambhiri* Lush.) x limoeiro 'Cravo' *C. limonia* Osbeck x *P. trifoliata*; HTR - 051, HTR -069, híbridos de trifoliata; TSKC x (LCR x TR) - 059, híbrido de tangerineira 'Sunki' (*C. sunki* Hort. ex Tanaka) seleção comum x (*C. limonia* x *P. trifoliata*); TSK x TRBK - Colômbia, híbrido de tangerineira 'Sunki' *C. sunki* x *P. trifoliata* seleções 'Beneke'; tangerineira 'Sunki

Tropical' (*C. sunki*); e LCR x TR - 001, híbrido de limoeiro 'Cravo' (*C. limonia*) x híbridos de (*P. trifoliata*).

Para a obtenção dos explantes, foram coletados cinco frutos maduros dos dez genótipos, previamente selecionados, localizados no Campo Experimental da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Foram removidas todas as sementes, as mesmas foram lavadas para a retirada da mucilagem e secas em temperatura ambiente. Posteriormente, foi retirado o tegumento externo (testa) das sementes e realizou-se a desinfestação em câmara de fluxo laminar, imergindo-as em etanol 70% por cinco minutos e em solução de hipoclorito de sódio 0,5 %, contendo duas gotas de Tween® por 20 minutos, seguindo-se três lavagens em água destilada autoclavada. As sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo aproximadamente 10 mL do meio de cultura WPM na sua constituição basal (LLOYD; MCCOWN, 1980). Os tubos foram mantidos em sala de crescimento, incubados à temperatura de  $27 \pm 1$  °C, com densidade de fluxo de fótons de  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas.

Após 120 dias de cultivo, quando as plantas alcançaram altura de aproximadamente 10 cm a 12 cm, foram utilizadas como fontes de explantes para o estabelecimento do experimento.

Segmentos nodais das plantas cultivadas *in vitro*, com aproximadamente 1cm de comprimento, foram inoculados em frascos de vidro (250 mL) contendo 50 mL do meio de cultura WPM, em seguida os frascos foram levados a sala de crescimento, à temperatura de  $27 \pm 1$  °C, com densidade de fluxo de fótons de  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas.

Aos 150 dias de cultivo procedeu-se ao subcultivo dos explantes em novo meio de cultura. O número de plantas formadas por explante foi avaliado aos 180 dias após a inoculação dos segmentos nodais.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste F da análise de variância e as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, as análises estatísticas foram realizadas com o programa estatístico *Statistical Analysis System - SAS* (SAS, 2004).

Para determinação da taxa de poliembriõnia nos genótipos estudados, utilizou-se 23 sementes a partir do total coletado, considerando poliembriônicos aqueles com mais de um embrião por semente, conforme metodologia descrita por Santos et al. (2015).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cultivo *in vitro* de explantes dos citrandarins ‘Indio’, ‘San Diego’ e ‘Riverside’, da tangerineira ‘Sunki Tropical’, dos híbridos TSKC x (LCR x TR) - 059, LRF x (LCR x TR) - 005, TSK x TRBK - Colômbia, HTR - 051, HTR - 069 e LCR x TR - 001, apresentou respostas positivas à micropropagação em WPM.

Conforme pode ser observado na Tabela 1, os citrandarins ‘Indio’ e ‘Riverside’, os híbridos HTR - 051, LRF x (LCR x TR) - 005, LCR x TR - 001 e a tangerineira ‘Sunki Tropical’ apresentaram elevada taxa de poliembrionia em suas sementes, já o TSKC x (LCR x TR) - 059, HTR - 069 e TSK x TRBK - Colômbia apresentaram baixa taxa de poliembrionia, evidenciando que o meio de cultivo WPM na sua constituição basal, é eficiente na propagação tanto de indivíduos de origem nucelar quanto de híbridos. O que permitirá, após serem feitas análises moleculares de todas as plantas obtidas, a identificação e seleção apenas dos genótipos nucleares, que serão multiplicados *in vitro*, e o descarte dos híbridos.

**Tabela 1.** Diferentes genótipos de citros cultivados no meio de cultivo *Wood Plant Medium* - WPM, com suas respectivas taxas de poliembrionia.

Genótipos <sup>1</sup>	Poliembrionia (%)
Citrandarin ‘Indio’	91,30
Citrandarin ‘Riverside’	95,65
TSKC x (LCR x TR) - 059	57,97
Citrandarin ‘San Diego’	78,26
TSK x TRBK - Colômbia	55,07
HTR - 051	86,96
HTR - 069	65,22
LRF x (LCR x TR) - 005	84,05
LCR x TR - 001	95,65
Tangerineira ‘Sunki Tropical’	86,96

<sup>1</sup>Citrandarins [*Citrus sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] ‘Indio’, ‘San Diego’ e ‘Riverside’; LRF: limoeiro ‘Rugoso da Flórida’ (*C. jambhiri* Lush.); LCR: limoeiro ‘Cravo’ (*C. limonia* Osbeck); TR: *P. trifoliata*; HTR: híbrido trifoliado; TSKC: tangerineira ‘Sunki’ (*C. sunki*) seleção comum.

Na Tabela 2, nota-se que os genótipos que produziram maior número de plantas a partir dos explantes cultivados *in vitro* no meio de cultivo WPM na sua constituição basal foram os citrandarins ‘Indio’ (279), ‘Riverside’ (203) e ‘San Diego’ (118), os híbridos TSKC x (LCR x TR) - 059 (128), e TSK x TRBK - Colômbia (110), evidenciando que o meio WPM foi adequado ao desenvolvimento dos mesmos *in vitro*, fator importante para que eles possam ser multiplicados em larga escala.

**Tabela 2.** Número de plantas matrizes, número de explantes, média de explantes produzidos por planta e número total de plantas obtidas após 180 dias de cultivo *in vitro* no meio de cultura *Wood Plant Medium* - WPM, de diferentes genótipos.

Genótipos <sup>1</sup>	Plantas matrizes	Nº de explantes	Média de explantes por planta <sup>2</sup>	Plantas totais obtidas
Citrandarin 'Indio'	10	42	4,20 a	279
TSKC x (LCR x TR) - 059	11	39	3,55 a	203
TSK x TRBK - Colômbia	11	39	3,55 a	128
Citrandarin 'San Diego'	10	30	3,00 a	118
Citrandarin 'Riverside'	11	31	2,82 a	110
HTR - 051	8	16	2,00 b	71
HTR - 069	10	14	1,40 b	67
LRF x (LCR x TR) - 005	11	11	1,00 b	66
LCR x TR - 001	8	8	1,00 b	62
Tangerineira 'Sunki Tropical'	6	6	1,00 b	25

<sup>1</sup>Citrandarins [*Citrus sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] 'Indio', 'San Diego' e 'Riverside'; LRF: limoeiro 'Rugoso da Flórida' (*C. jambhiri* Lush.); LCR: limoeiro 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck); TR: *P. trifoliata*; HTR: híbrido trifoliado; TSKC: tangerineira 'Sunki' (*C. sunki*) seleção comum. <sup>2</sup>Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Já os genótipos que produziram menor número de plantas foram o HTR - 051 (71), HTR 069 (67), LRF x (LCR x TR) - 005 (66), LCR x TR - 001 (62) e a tangerineira 'Sunki Tropical'(25), indicando a necessidade de ajustes no meio para que eles possam se desenvolver melhor. Rodrigues et al. (2015) avaliaram porta-enxertos híbridos de citros introduzidos ou obtidos pelo Programa de Melhoramento Genético de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, e perceberam que os híbridos HTR - 051 e LCR x TR - 001 apresentaram, em média, 2,1 e 3,3 sementes totais por fruto. Nesse aspecto, para esses genótipos, a disponibilidade de mais plantas matrizes visando à maior obtenção de frutos é necessária para um adequado fornecimento de sementes.

O número médio de explantes produzidos por planta, obtidos a partir dos 10 genótipos estudados apresentaram diferenças significativas pelo teste de Scott-Knott (Tabela 2). O citrandarin 'Indio' destacou-se com a maior média de explantes por planta (4,20), seguido pelos híbridos TSKC x (LCR x TR) - 059 e TSK x TRBK - Colômbia, ambos com média (3,55), citrandarins 'San Diego' (média 3,00) e 'Riverside' (média 2,82). Por sua vez, os genótipos que apresentaram as menores

médias de explantes por planta foram: tangerineira 'Sunki Tropical', os híbridos LRF x (LCR x TR) - 005 e LCR x TR - 001, todos com média (1,00), HTR - 069 (média 1,40) e HTR - 051 (média 2,00).

Sabe-se que o WPM é um meio de cultivo básico, que vem sendo utilizado para o estabelecimento *in vitro* do Banco Ativo de Germoplasma de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, por proporcionar resultados muito promissores na multiplicação de vários genótipos de citros (SOUZA et al., 2011).

O número de segmentos nodais ou de brotos é uma característica de grande importância quando se objetiva a micropropagação. Neste estudo, foi possível a obtenção de um número satisfatório de segmentos nodais da maioria dos genótipos cultivados no meio WPM em sua concentração basal, mesmo quando comparado ao número de brotos, obtidos em outros estudos. Esmaeilnia e Dehestani (2015) obtiveram uma média de 1,2 brotos cultivando *in vitro* seguimentos apicais de *Citrus sinensis* L. Osbeck., também em meio WPM. Oliveira et al. (2010), obtiveram a mesma média de brotos no cultivo *in vitro* de laranjeiras 'Pêra', 'Valência' e 'Bahia' em meio WPM.

Em estudo realizado por Rodrigues et al. (2015) eles constataram que os genótipos LCR x TR - 001, citrandarins 'Índio' e 'Riverside', e tangerineira 'Sunki Tropical' apresentaram 100% de poliembrionia em suas sementes, já os híbridos HTR - 051 e TSKC x (LCR x TR) - 059 apresentaram taxa de poliembrionia variando de 87,5% a 58,53%. De acordo com Passos et al. (2006) quanto mais elevada a taxa de poliembrionia nas sementes, maiores serão as chances de o porta-enxerto quando propagado produzir plantas de origem nucelar, pois, em sementes poliembrionicas a maioria dos embriões é de origem nucelar, ou seja, são geneticamente idênticos a planta mãe, garantindo desse modo, a integridade genética e a homogeneidade dos pomares.

Em se tratando de porta-enxertos de citros, uma elevada produção de sementes é uma característica muito importante, pois é diretamente proporcional a quantidade de novas plantas que serão multiplicadas nos viveiros. Sabe-se que são os fatores genéticos e ambientais que irão determinar o número de sementes por fruto, sendo esse número variável a depender do genótipo (SANTOS et al., 2015).

Segundo Oliveira et al. (2014) em ensaios conduzidos no norte do estado de São Paulo, os híbridos LCR x TR - 001, HTR - 051, HTR 069 e TSKC x (LCR x TR) -

059 em combinações com copa de laranjeira 'Valência' (*C. sinensis*), têm se destacado por apresentar características importantes, como redução no porte da copa, associada à alta eficiência de produção de frutos e à alta qualidade destes (teores elevados de sólidos solúveis).

De acordo com Passos et al. (2006) dentre as variedades de porta-enxertos existentes, destacam-se aquelas provenientes de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., porta-enxerto que confere características importantes como: baixo porte, resistência a doenças e produção de frutas com alta qualidade nas combinações copa/porta-enxerto de que participa.

A micropropagação em conjunto com outras técnicas da cultura de tecidos vegetais, permite a obtenção em curto espaço de tempo e em qualquer época do ano, de grande número de plantas com boa qualidade fitossanitária (NAGAO et al., 1994), além de preservar a autenticidade genética da planta, especialmente se não ocorrer à adição de reguladores de crescimento no meio de cultivo empregado.

Assim, neste estudo constatou-se que a utilização do cultivo *in vitro* empregando meio de cultivo WPM na sua constituição basal, mostrou ser uma estratégia importante para propagar porta-enxertos cítricos de interesse comercial. No caso dos citros, essa técnica é uma alternativa para a propagação de porta-enxertos, principalmente daqueles com características importantes, como o *P. trifoliata*, que apresenta entre outras características de interesse, tolerância a baixas temperaturas (HEARN et al., 1974).

## CONCLUSÕES

O meio WPM mostrou-se adequado à micropropagação dos genótipos estudados, particularmente do citrandarin 'Índio' e dos híbridos TSKC x (LCR x TR) - 059 e TSK x TRBK - Colômbia.

Ajustes no meio WPM são necessários para melhorar a eficiência da micropropagação da tangerineira 'Sunki Tropical' e dos híbridos LRF x (LCR x TR) - 005 e LCR x TR - 001.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, R. A. de.; MARTINS, A. B. G. Propagação vegetativa de porta-enxertos para citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n.1, p. 134-136, 2003.

- BORDÓN, Y.; GUARDIOLA, J. L.; GARCIA-LUIS, A. Genotype Affects the Morphogenic Response *in vitro* of Epicotyl Segments of *Citrus* Rootstocks. **Annals of Botany**, v. 86, p. 159-166, 2000.
- CARRER, H.; BARBOSA, A. L.; RAMIRO, D. A. Biotecnologia na agricultura. **Estudos avançados**, v. 24, n. 70, São Paulo, 2010.
- CARVALHO, L. M. de.; CARVALHO, H. W. L. de.; SOARES FILHO, W.S. dos.; MARTINS, C. R.; PASSOS, O. S. Porta-enxertos promissores, alternativos ao limoeiro 'Cravo', nos Tabuleiros Costeiros de Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.51, n.2, p.132-141, 2016.
- ESMAEILNIA, E.; DEHESTANI, A. *In vitro* plant regeneration from mature tissues of Thomson navel sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck.). **Biharean Biologist**, Oradea, v. 9, n. 1, p. 9-14, 2015.
- FELZENER, L. M. T.; BARREIRO, A. P.; ONO, E. O.; CARDOSO, S. A. de B.; RODRIGUES, J. D. Efeitos de reguladores vegetais no enraizamento de estacas caulinares de *Poncirus trifoliata* var. *monstrosa* (T. Ito). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.29, n. 2, p.399-402, 2007.
- HEARN, C.J.; HUTCHINSON, D.J. & BARRET, H.C. Breeding citrus rootstock. **Hortscience**, Alexandria, v. 9, p. 357-358, 1974.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **Horticultural Science**, Alexandria, v. 15, n. 3, p. 416-417, 1980.
- LORETI, F.; MASSAI, R. Portinnesti fruttiferi: Pesco. **L'informatore Agrario**, n.32, p.37-42, 1995.
- MOREIRA, R. A.; RAMOS, J. D.; CRUZ, M. do C. M. da. Caracterização de frutos e poliembrião em sementes de 'Flying dragon' e de híbridos de porta-enxerto de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 2, p. 486-492, 2010.
- NAGAO, E. O.; PASQUAL, M.; RAMOS, J. D. Efeitos da sacarose e do nitrogênio inorgânico sobre a multiplicação "*in vitro*" de brotações de porta-enxerto de citros. **Bragantia**, Campinas, v. 54, n. 1, p. 25-31, 1994.
- NAKANO, M.; KIGOSHI, K.; SHIMIZU, T.; ENDO, T.; SHIMADA, T.; FUJII, H.; OMURA, M. Characterization of genes associated with polyembryony and *in vitro* somatic embryogenesis in *Citrus*. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v.9, n.3, p.795-803, 2013.

OLIVEIRA, M. L. P.; COSTA, M. G. C.; SILVA, C. V. da; OTONI, W. C. Growth regulators, culture media and antibiotics in the *in vitro* shoot regeneration mature tissue of citrus cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 45, n. 7, p. 654-660, 2010.

OLIVEIRA, R. P.; SOARES FILHO, W. S.; MACHADO, M. A.; FERREIRA, E. A.; SCIVITTARO, W. B.; GESTEIRA, A. S. Melhoramento genético de plantas cítricas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 35, n. 281, p. 22-29, 2014.

OLIVEIRA, R.P.; SILVEIRA, D.G.; SILVA, S.O. Concentração de BAP e a eficiência da micropropagação de bananeira tetraplóide (grupo AAAB). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.58, n.1, p.73-78, 2001.

PASSOS, O. S.; PEIXOUTO, L. S.; SANTOS, L. C. dos.; CALDAS, R. C.; SOARES FILHO, W. dos S. Caracterização de híbridos de *Poncirus trifoliata* e de outros porta-enxertos de citros no Estado da Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n.3, Jaboticabal, 2006.

POMPEU JUNIOR, J.; BLUMER, S. Híbridos de trifoliata como porta-enxertos para a laranja 'Valência'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, n.7, p.701-705, 2009.

ROCHA, P. S. G. da.; SCHUCH, M. W.; BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C. Multiplicação e alongamento *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 25, n. 1, p. 69-74, 2009.

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

SANTOS, C. Q. de J.; GIRARDI, E. A.; VIEIRA, E. L.; LEDO, C. A. da S.; SOARES FILHO, W. dos S. Tamanho ótimo de amostras de frutos e de sementes para determinação da poliembrião em citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 37, n. 1, p. 172-178, 2015.

SCHMILTD, O.; SCHMILTD, E.R.; OLIVEIRA, M. J. V. de. Sais e sacarose na germinação *in vitro* de limoeiro 'cravo'. **Nucleus**, v.12, n.1, 2015.

SHARMA, S.; PRAKASH, A.; TELE, A. *In vitro* propagation of citrus rootstocks. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanic Cluj-Napoca**, Haryana, v. 37, n. 1, p. 84-88, 2009.

SILVA, A. L. da.; ROGALSKI, M.; MORAES, L. K. A. de.; FESLIBINO, C.; CRESTANI, L.; GUERRA, M. P. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n.2, p. 297-300, 2003.

SILVA, R. P. da.; SOUZA, E. S.; REBOUÇAS, F. S.; ALMEIDA, W. A. B. de. Otimização de protocolos para regeneração de plantas *in vitro* de tangerina 'Cléopatra' (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 484-487, 2005.

SOUSA, H. U. de.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; FERREIRA, E. A. Efeito do ácido giberélico sobre a germinação de sementes de porta-enxertos cítricos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 496-499, 2002.

SOUZA, A. da S.; PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. dos S.; CARDOSO, M. G. S.; CARMO, R. S. do; CARVALHO, M. de J. da S. de; SANTOS, E. B. **Estabelecimento *in vitro* do banco ativo de germoplasma de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011. 7 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Circular técnica, 103).

Statistical Analysis System (SAS). (2004). **Statistica (data analysis software system)**, version 7. Retrieved from <http://www.statsoft.com>.

TEIXEIRA, P. T.; SILVA, A. L. da.; DUCROQUET, J. P. H. J.; GUERRA, M. P. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* spp. 'Carelli'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 26, n. 2, p. 377-379, 2004.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O cultivo *in vitro* é uma técnica de biotecnologia que tem sido utilizada na tentativa de superar as barreiras da biologia reprodutiva das plantas cítricas. É uma importante aliada na busca de tentar superar os obstáculos enfrentados pelo melhoramento genético convencional, e tem contribuído com avanços no aprimoramento e desenvolvimento de variedades copa e porta-enxertos.

A obtenção de plantas triploides em citros visa à produção de frutos sem sementes. Característica que vem sendo explorada em programas de melhoramento genético, objetivando desenvolver novas variedades copa, cujos frutos atendem as exigências do mercado global de frutas de mesa.

Normalmente, a criação de híbridos triploides por meio de hibridações utilizando parentais diploides, baseia-se na utilização de sementes pequenas e pouco desenvolvidas, e apontam para a influência das condições ambientais e do parental feminino na formação desses indivíduos. No entanto, neste trabalho utilizaram-se sementes pequenas, pouco desenvolvidas e normais, notando-se que a frequência de obtenção de triploides em sementes normais foi muito baixa, não sendo viável a utilização das mesmas. Estes resultados corroboram com o encontrado por outros autores.

Porta-enxertos com bom potencial de uso horticultural podem apresentar restrições à sua propagação, destacando-se o reduzido número de sementes e a baixa poliembrionia. Em auxílio ao contorno dessa situação, o cultivo *in vitro* é uma ferramenta de grande utilidade, além de promover a obtenção de propágulos livres de doenças, em larga escala e em pequena área. Nesse sentido, o meio de cultura WPM mostrou-se eficiente na micropropagação de diferentes genótipos de citros.