

Variabilidade genética e melhoramento dos citros¹

INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira representa importante segmento econômico na pauta de produtos agrícolas, não só por seu expressivo valor de produção, como por sua importância na geração de empregos diretos e indiretos. Em nível mundial, o Brasil destaca-se como maior produtor de citros, detentor de pomares que somam uma população superior a 200 milhões de plantas, e maior produtor e exportador de suco concentrado congelado de laranja. O Nordeste, por sua vez, detém, após o Estado de São Paulo, a citricultura de maior expressão, graças à liderança nesse setor dos Estados da Bahia e Sergipe, que hoje praticamente se igualam na produção de citros (IBGE, 1995).

Apesar de sua importância, a vulnerabilidade da citricultura nordestina, a exemplo da brasileira, é muito grande, pela presença quase única da combinação laranja 'Pêra' [*Citrus sinensis* (L.) Osb.] / limão 'Cravo' (*C. limonia* Osb.) na sustentação de nossos pomares, tornando urgente a diversificação de variedades. A par deste fato, verifica-se uma adaptação inadequada das variedades hoje disponíveis às nossas condições tropicais de cultivo, conforme se constata pelo período de vida útil relativamente baixo que apresentam (em torno de 12 anos), em comparação com o que se observa em outras regiões produtoras como Flórida, Califórnia, Mediterrâneo e Japão, nas quais esse período pode se prolongar por mais de 60 anos.

O presente trabalho traz informações que procuram mostrar a contribuição que o melhoramento genético, tendo por base a grande variabilidade genética disponível em citros, pode oferecer no tocante à sustentação de nossa citricultura, particularmente quanto ao desenvolvimento de um programa de diversificação de variedades, destacando as atividades que a Embrapa Mandioca e Fruticultura vem conduzindo nesse sentido.

ORIGEM E DISPERSÃO DOS CITROS

As verdadeiras frutas cítricas pertencem aos gêneros *Citrus*, *Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus*, *Eremocitrus* e *Clymenia*, dos quais somente os três primeiros apresentam maior interesse comercial, sendo *Citrus* o de importância mais relevante. A esse gênero relacionam-se as laranjas doces *C. sinensis* (L.) Osb., tangerinas (diversas espécies), laranjas azedas *C. aurantium* L., pomelos *C. paradisi* Macf., toranjas *C. grandis* Osb., limas ácidas *C. aurantifolia* Swing., limas doces *C. limettioides* Tan., limões *C. limon* Burm., cidras *C. medica* L. e outros tipos, incluindo híbridos naturais (Chapot, 1975).

¹ Trabalho apresentado no Simpósio de Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste do Brasil, realizado na **Embrapa Semi-Árido**, Petrolina, PE, no período de 28 de setembro a 2 de outubro de 1998.

O gênero *Citrus* representa o ponto mais alto de um longo período evolutivo, cujo início remonta a mais de 20 milhões de anos, na Austrália, quando esta ainda estava conectada com a Ásia e Nova Guiné, antes da separação dos continentes (Swingle, 1967). Sua origem é atribuída ao Sudoeste da Ásia, particularmente ao Este da Índia, apresentando relações filogenéticas que se estendem pelas Índias Orientais, Austrália, Centro da China, Japão e África.

A mais antiga região de cultivo dos citros compreende o Sudeste da China, Sul da Península Malaia e Oeste de Myanmar, antiga Birmânia, onde tiveram origem as tangerinas, toranjas e limas, havendo evidências de que essas frutas já fossem exploradas no Sul da China há mais de 4.000 anos, daí dispersando-se em direção ao sudeste, pelas Filipinas e numerosos grupos de ilhas do Pacífico (Spurling, 1969). A cidra foi a primeira espécie a se destacar em termos de distribuição geográfica. Há indícios de que seu cultivo já era realizado na Pérsia em período anterior a 500 a.C., sendo alvo da atenção de gregos e hebreus (Webber et al., 1967; Soost & Cameron, 1975). Foi introduzida na Bacia do Mediterrâneo ao redor de 300 a.C., difundindo-se por toda a região durante o Império Romano (Gonzales-Sicilia, 1969). Com o fim do domínio romano, a dispersão das espécies cítricas passou a ser influenciada pelos árabes (Webber et al., 1967), que no século X introduziram a laranja azeda no Este do Mediterrâneo e posteriormente na África e Sul da Europa, havendo indicações de que os limões, as limas ácidas e as toranjas tenham se dispersado de modo semelhante, durante a primeira metade do século XII (Soost & Cameron, 1975). Após o domínio árabe, as Cruzadas, cujo início data do final do século XI, passaram a ter grande influência sobre a expansão dos citros na Europa (Webber et al., 1967). Quanto a laranja doce, presume-se que sua introdução no continente europeu tenha ocorrido somente em princípios do século XV, por parte de genovêses, apesar de seus cultivos serem bastante antigos na China. As tangerinas, também extensivamente exploradas na China e no Japão desde épocas remotas, passaram a ser conhecidas na Europa a partir do século passado, inicialmente na Inglaterra, de onde difundiram-se pelo Mediterrâneo (Webber et al., 1967; Soost & Cameron, 1975). O pomelo, por sua vez, é considerado como um mutante espontâneo da toranja, atribuindo-se sua origem à Ilha de Barbados, em princípios do século XVIII, tendo sido introduzido na Flórida em 1823 (Nishiura, 1965; Webber et al., 1967) e na Região Mediterrânea no início deste século (Gonzales-Sicilia, 1969).

Cristovão Colombo, por ocasião de sua segunda viagem ao Novo Mundo, em 1493, trouxe para o Haiti sementes de laranjas, limões e cidras procedentes da Ilha de Gomera, pertencente ao grupo das Canárias. Introduções adicionais foram feitas nas Américas por portugueses e espanhóis, em princípios do século XVI (Webber et al., 1967; Soost & Cameron, 1975). No Brasil, os relatos de cultivo dos citros mais antigos datam de 1540, na Ilha de Cananéia, Estado de São Paulo, e de 1549, com a chegada de padres jesuítas a Salvador, Estado da Bahia (Webber et al., 1967; Chapot, 1975; Campos, 1976).

Atualmente, a citricultura destaca-se entre as principais atividades agrícolas mundiais, ocupando uma ampla área geográfica, situada entre os paralelos de 35° de latitude Norte e 35° de latitude Sul, sendo que no

Mediterrâneo, devido a condições excepcionais de clima, a cultura é explorada em locais com até 42° de latitude Norte (Campos, 1976).

MUTAÇÕES ESPONTÂNEAS EM CITROS

As mutações espontâneas tiveram um papel muito importante no processo evolutivo das plantas de propagação vegetativa (Nybom & Koch, 1965). Práticas como a enxertia e a estaquia, comumente utilizadas em árvores frutíferas, facilitaram a conservação e acumulação de mutações, particularmente aquelas associadas à esterilidade, que seriam eliminadas em caso de reprodução sexual. Além disso, a embrionia nucelar, de ocorrência comum em *Citrus* e gêneros afins, como *Poncirus* e *Fortunella*, possibilitou, devido ao desenvolvimento de embriões apogâmicos, a preservação de muitas mutações espontâneas de surgimento anterior às técnicas de propagação vegetativa hoje empregadas pelo homem (Nishiura, 1965).

Mutações espontâneas, constatadas por mudanças repentinas em caracteres herdáveis, são freqüentes em citros, sendo observadas sob a forma de variações em ramos ou setores em frutos, podendo também ser ocasionalmente detectadas em *seedlings* nucleares, situação esta em que toda a planta é afetada. Apesar das variações somáticas identificadas em pomares comerciais serem geralmente desfavoráveis, apresentando baixa produtividade de frutos, caracteres foliares atípicos, ou frutos anormais, muitas mutações espontâneas de elevado valor têm sido verificadas (Soost & Cameron, 1975). A maioria das variedades cítricas comerciais surgiu como decorrência de algum tipo de mutação natural. Diversas laranjas doces originaram-se dessa forma em regiões da China e do Mediterrâneo. A laranja 'Shamouti', por exemplo, de grande importância em Israel, é provavelmente uma mutação de gema da laranja 'Beladi'. Laranjas sangüíneas, como a 'Maltese', que se caracterizam por possuir antocianina na casca, septos e vesículas de suco, surgiram na região Mediterrânea. A laranja 'Bahia' (de umbigo) foi encontrada no Brasil, no Bairro do Cabula, Salvador, Bahia, como variação de ramo da laranja 'Seleta', cabendo destacar que, no grupo das laranjas de umbigo e 'Valência', muitas variedades têm sido selecionadas a partir de mutações somáticas em gemas ou ramos (Nishiura, 1965). Outros mutantes de interesse comercial incluem a laranja 'Salustiana' da Espanha e a laranja 'Marrs' do Texas, que são variações somáticas de maturação precoce nas áreas em que foram descobertas (Soost & Cameron, 1975). Relativamente aos pomelos, pode-se dizer que todas as variedades conhecidas originaram-se, direta ou indiretamente, da cultivar Duncan, a exemplo do pomelo Marsh seedless, tipo com poucas sementes, que surgiu como um *seedling* dessa cultivar (Nishiura, 1965). O pomelo 'Thompson', mutação de ramo do 'Marsh seedless', caracteriza-se por sua polpa rosada, tendo, por sua vez, dado origem a diversas variantes de polpa vermelha, como o 'Redblush' (Soost & Cameron, 1975). No Japão, a maioria dos clones comerciais de tangerina 'Satsuma' (*C. unshiu* Marc.) proveio de mutações somáticas espontâneas (Nishiura, 1965; Soost & Cameron, 1975; Kukimura et al., 1976). No tocante aos limões, pode-se citar como exemplos de mutações naturais as variedades Eureka e Lisboa (Nishiura, 1965).

Frost & Krug (1942) chamam a atenção para o fato de que a enorme diversidade observada em *Citrus*, a par de sua elevada heterozigose, sugere a

ocorrência de frequências relativamente altas de mutações gênicas, podendo ser essa uma das prováveis causas das variações de gemas verificadas nesse gênero. Raghuvanshi (1969), a seu turno, comenta que células somáticas apresentando divisão desigual, restabelecimento do núcleo resultando em células poliplóides, pontes somáticas e atraso dos cromossomos na anáfase, parecem não ser incomuns em citros, enfatizando que tais aberrações na cariocinese poderiam facilmente induzir o aparecimento de células somáticas com genótipo modificado em regiões de crescimento, determinando, com as divisões celulares posteriores, o aparecimento de ramos modificados ou de variações em gemas.

VARIABILIDADE GENÉTICA E HIBRIDAÇÃO EM CITROS

O gênero *Citrus* pertence à família Rutaceae, subfamília Aurantioideae, tribo Citreae, subtribo Citrinae. Esta compreende outros gêneros: *Severinia*, *Pleiospermium*, *Burkillanthus*, *Limnocitrus* e *Hesperetusa*, que são mais primitivos, *Citropsis* e *Atalantia*, gêneros mais evoluídos que os anteriores, e *Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus*, *Eremocitrus* e *Clymenia*. Estes últimos, em conjunto com *Citrus*, compõem o grupo das verdadeiras frutas cítricas, por possuírem frutos semelhantes à laranja ou ao limão (Swingle, 1967).

A variabilidade genética presente nesses gêneros é bastante expressiva, podendo ser de grande utilidade particularmente em programas de melhoramento genético dirigidos à obtenção de novos porta-enxertos. Nesse sentido, tem-se que *Microcitrus* e *Eremocitrus* são encontrados sob a forma selvagem quase que exclusivamente na Austrália, sendo este último pronunciadamente xerofítico, capaz de se desenvolver em regiões semi-áridas, em solos com pouco ou nenhum nitrogênio, além de resistir a concentrações relativamente elevadas de sais presentes na solução do solo, enquanto que o *Microcitrus* é semi-xerofítico, podendo suportar períodos de seca prolongados. Esses gêneros, assim como *Poncirus* e *Fortunella*, também se destacam por sua notável resistência ao frio, apresentando adaptação a habitats onde nenhuma espécie de *Citrus* consegue sobreviver. Gêneros mais primitivos, como *Severinia*, igualmente mostram certos graus de afinidade com *Citrus*, verificando-se que o primeiro suporta teores de boro no solo suficientemente elevados para eliminar este último, sendo surpreendente o fato de que sob tais condições as raízes de *Severinia* absorvem e translocam quantidades muito baixas desse elemento, a ponto de permitir o estabelecimento de enxertos sadios de variedades comerciais de *Citrus*, mesmo em se tratando de copas bastante sensíveis ao boro, como as de limão. *Citropsis gilletiana*, parente selvagem nativo da República do Congo, é imune ao ataque de um coleóptero cujas larvas escavam o colo de plantas de *Citrus*, além de ser resistente à doença fúngica gomose de *Phytophthora*, sendo essa espécie utilizada como porta-enxerto na referida região (Swingle, 1967). Adicionalmente, tem-se que, a exemplo de *Citropsis*, os gêneros *Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus*, *Eremocitrus* e *Severinia* são altamente resistentes à gomose de *Phytophthora*. Espécies como *Severinia buxifolia*, à semelhança de *Eremocitrus glauca*, têm mostrado tolerância à salinidade. *Citropsis gilletiana* demonstra possuir resistência ao nematóide cavernícola *Radopholus similis*. *Poncirus trifoliata* e *Severinia*

buxifolia são consideradas resistentes aos complexos comuns do vírus da tristeza dos citros. *Eremocitrus glauca* pode ser utilizada em programas de melhoramento dirigidos à obtenção de porta-enxertos adaptados a solos arenosos e as espécies *Microcitrus australis* e *M. australasica* são adaptadas a áreas sujeitas a chuvas pesadas e a solos com baixa fertilidade (Hearn et al., 1974). *Severinia buxifolia*, bem como várias seleções de *Poncirus trifoliata*, mostram-se resistentes ao nematóide dos citros *Tylenchulus semipenetrans* (Hutchison & O'Bannon, 1972). *Poncirus trifoliata* distingue-se como fonte de tolerância relativamente alta a solos encharcados (Yelenosky et al., 1974). *Citropsis*, *Eremocitrus*, *Microcitrus* e *Clymenia* têm demonstrado a possibilidade de utilização em programas de melhoramento visando a seleção de porta-enxertos que reduzem o porte das plantas, de forma a permitir um maior adensamento de plantio (Castle, 1979).

Diante do exposto, depreende-se que a variabilidade genética existente em *Citrus* e gêneros afins é bastante ampla, capaz de permitir a criação de porta-enxertos adaptados às mais diversas condições ambientais. Apesar das hibridações entre espécies de *Citrus* e entre este e gêneros afins serem em muitas circunstâncias passíveis de realização, deve-se atentar para a ocorrência de barreiras reprodutivas que dificultam ou mesmo impedem determinados cruzamentos. A esse respeito, tem-se que o conjunto ou *pool* de genes associado a uma determinada cultura, incluindo todas as cultivares, parentes silvestres e espécies selvagens afins, pode ser dividido em três níveis (Hoyt, 1988 e 1992; FAO/PNUMA, 1991; Giacometti, 1991):

–*Pool* de genes primário (PG-1): contém as formas domesticadas e formas selvagens da cultura, sendo seus indivíduos interférteis; a transferência de genes é simples.

–*Pool* de genes secundário (PG-2): seus indivíduos podem ser cruzados com os de PG-1, porém muitos dos híbridos resultantes são estéreis; a transferência de genes para formas cultivadas é possível, contudo pode haver dificuldades.

–*Pool* de genes terciário (PG-3): constitui o limite extremo de alcance do potencial genético, sendo a transferência de genes para PG-1 possível somente mediante o emprego de técnicas não convencionais de melhoramento genético, como as de cultivo *in vitro* de embriões, fusão de protoplastos, duplicação do número cromossômico e utilização de espécies-“ponte”; os híbridos obtidos com PG-1 são estéreis.

Relativamente a algumas espécies e gêneros afins ao *Citrus*, Giacometti (1991), com base em estudos realizados por diversos autores, sugeriu os seguintes *pools* gênicos:

–PG-1: *C. aurantifolia*, *C. aurantium*, *C. grandis*, *C. jambhiri*, *C. limettioides*, *C. limon*, *C. limonia*, *C. madurensis*, *C. medica*, *C. reticulata*, *C. reshni*, *C. sinensis*, *Fortunella* spp., *P. trifoliata*.

–PG-2: *C. combara*, *C. hystrix*, *C. ichangensis*, *C. latipes*, *C. macroptera*, *Microcitrus* spp.

–PG-3: *Atalantia* spp., *Citropsis* spp., *Clymenia* spp., *Eremocitrus* spp.

Certamente, a relação de espécies e gêneros identificados por Giacometti (1991) dentro de cada *pool* gênico está incompleta, porém indica situações nas quais os cruzamentos deverão ser realizados com um maior ou menor grau de dificuldade. A partir dessas informações pode-se concluir, por exemplo, que hibridações entre *Citrus* (PG-1) e *Microcitrus* (PG-2) poderão apresentar algumas restrições e que aquelas entre *Citrus* e *Eremocitrus* (PG-3) deverão ser viáveis somente mediante o emprego de técnicas não convencionais, como a de fusão de protoplastos.

POLIPLOIDIA EM CITROS

A poliploidia diz respeito a um aumento no número de conjuntos cromossômicos ou genomas, sendo coletivamente denominadas como poliplóides aquelas plantas com três ou mais conjuntos cromossômicos completos. Pode ser distinguida em autopoliploidia e alopoliploidia. Os autopoliplóides originam-se pela multiplicação do número de genomas de uma mesma espécie, geralmente são parecidos com as respectivas espécies diplóides, podendo ser maiores. Alopoliplóides, por sua vez, são indivíduos que possuem dois ou mais genomas distintos, provenientes de diferentes espécies (Mettler & Gregg, 1973; Wright, 1976). Por essa razão, os alopoliplóides geralmente exibem combinações das características dos parentais, podendo os graus de semelhança estarem voltados para um ou outro dos pais, caso ocorra dominância, sendo difícil determinar em que nível de extensão as diferenças quantitativas e qualitativas observadas são um reflexo de mecanismos genéticos ou da poliploidia em si, cujos efeitos são melhor avaliados em autotetraplóides (Swanson, 1957).

A poliploidia normalmente resulta em um aumento no tamanho das células (Anderson, 1972), observando-se que células tetraplóides, geralmente, têm um volume duas vezes superior e um comprimento, ou largura, 20% a 25% maior do que o de células diplóides, sendo tais aumentos em tamanho mais facilmente detectados nas células guarda dos estômatos (Wright, 1976). Há evidências, porém, indicativas de que o tamanho de células, tecidos e órgãos nem sempre acompanha o nível de ploidia, nem é igual para todas as estruturas (Medri et al., 1980). A poliploidia, além disso, pode induzir um desenvolvimento fisiológico lento (Swanson, 1957; Allard, 1971; Wright, 1976).

Diversos fatores podem conduzir à poliploidia. Se um meristema é exposto a excessivo calor, seca ou frio, por exemplo, os distúrbios provocados podem ser suficientes para impedir a formação da parede celular, sem, contudo, obstar a duplicação cromossômica durante a divisão, havendo uma predisposição à formação de células com um número dobrado de cromossomos (Allard, 1971; Wright, 1976). Na natureza esse fenômeno ocorre com frequência em células somáticas, verificando-se, comumente, a formação de tecidos poliploidizados em indivíduos que, no seu todo, permanecem como diplóides. Mais raramente, pode não ocorrer a redução do número de cromossomos durante a meiose, havendo,

como conseqüência da união de gametas não reduzidos, a formação de indivíduos poliplóides, principalmente triplóides (Mettler & Gregg, 1973; Wright, 1976). Intencionalmente, a poliploidia passou a ser induzida artificialmente a partir de 1937, com base no emprego da colchicina, alcalóide extraído dos bulbos da planta “crocus do outono” (*Colchicum autumnale*) (Allard, 1971).

Em *Citrus*, a poliembrião é um fenômeno comum em muitas espécies. Nestas, as sementes geralmente possuem um único embrião de origem sexual, sendo os demais apogâmicos, formados a partir de células do nucelo. Eventualmente, pode ocorrer o desenvolvimento de mais de um embrião zigótico, pela formação de dois sacos embrionários, ou pela clivagem do embrião zigótico, originando, neste caso, gêmeos idênticos. Pode-se considerar que as espécies cítricas, de um modo geral, são pré-adaptadas à ocorrência de poliploidia, uma vez que, segundo Mehra & Bawa (1969), a manifestação conjunta da reprodução sexuada e da apomixia permite um escape a possíveis casos de esterilidade, aumentando as chances imediatas de sobrevivência e difusão de novas formas.

O número haplóide de cromossomos de todas as espécies de *Citrus*, bem como dos gêneros *Poncirus* e *Fortunella*, é nove, sendo a condição diplóide predominante, embora formas poliplóides sejam identificadas ou produzidas, mostrando-se úteis em programas de genética e de melhoramento. Formas tetraplóides têm sido reportadas para esses gêneros, havendo, também, indicações de indivíduos triplóides, pentaplóides, hexaplóides, bem como aneuplóides (Cameron & Frost, 1968; Chapot, 1975).

Fenotipicamente, os tetraplóides, em comparação com os diplóides, apresentam folhas maiores em largura do que em comprimento, mais espessas, com tendência a uma coloração mais escura. As asas dos pecíolos são normalmente mais largas e em algumas variedades fundem-se freqüentemente com o limbo foliar. Seu desenvolvimento é mais lento, a ocorrência de brotações vigorosas é menos comum e a copa é menos ereta e mais compacta. Além disso, apresentam florescimento mais retardado e menor frutificação (Cameron & Frost, 1968; Moreira, 1980), embora existam evidências da manifestação de alta produtividade em seleções tetraplóides de limão ‘Lisboa’ e de alguns pomelos (Cameron & Frost, 1968). Quanto a influência da poliploidia sobre o número de sementes, este é bem variável, havendo tetraplóides que apresentam redução no número de sementes, outros que não mostram alterações, como nas laranjas doces ‘Ruby’ e ‘Paperrind’, e outros, como o limão ‘Lisboa’, que são mais sementeados, em comparação com diplóides da mesma espécie. O número de embriões por semente tende a ser menor nos tetraplóides, predispondo a um aumento em seu tamanho médio, conforme Cameron & Frost (1968). Estes autores citam, também, que autotetraplóides de natureza espontânea parecem ocorrer quase que exclusivamente como *seedlings* nucelares e que os efeitos da tetraploidia em *Citrus* podem ser melhor avaliados em seleções nucelares, dado que a meiose e a segregação genética não são envolvidas. Comentam, outrossim, que tetraplóides na condição de pés-francos freqüentemente apresentam menor desenvolvimento em comparação com o que se verifica quando enxertados.

A obtenção intencional de poliplóides em programas de melhoramento

genético tem na hibridação somática via fusão de protoplastos uma importante ferramenta de trabalho, aplicando-se, em citros, tanto ao melhoramento de copas como de porta-enxertos. Espera-se que os híbridos (alotetraplóides) obtidos por esse processo apresentem características complementares provenientes das variedades doadoras de protoplastos, variedades estas muitas vezes relacionadas a espécies pertencentes a diferentes *pools* gênicos, entre as quais a troca de genes mediante hibridação convencional pode ser impedida por barreiras reprodutivas.

Nesse contexto, cabe destacar que a fusão de protoplastos de variedades comerciais de *Citrus* com aqueles de espécies pertencentes a gêneros afins a este, como *Microcitrus* e *Eremocitrus*, de reconhecido valor adaptativo a ambientes sujeitos a estresses, apresenta grandes perspectivas sob o ponto de vista do melhoramento genético dos citros, particularmente no tocante à obtenção de novos porta-enxertos.

Por serem alotetraplóides, tais híbridos mantêm as ligações gênicas presentes nos pais, devido à ausência de segregação meiótica (Oliveira, 1993). Desse modo, os genes deletérios recessivos presentes nas variedades parentais permanecem sem expressão, escondidos sob uma condição heterozigótica, dando-se o contrário com as características controladas por genes dominantes ou codominantes, cuja possibilidade de manifestação nos híbridos é preservada.

Vários autores têm conseguido híbridos somáticos interespecíficos (Kobayashi et al., 1988; Ohgawara et al., 1989; Grosser et al., 1989 e 1991; Tusa et al., 1990), híbridos somáticos intergenéricos de espécies sexualmente compatíveis (Grosser et al., 1988; Deng et al., 1991) e de espécies incompatíveis (Grosser et al., 1990 e 1991).

O limão 'Rugoso' (*C. jambhiri* Lush.) e o limão 'Volkameriano' (*C. volkameriana* Ten. et Pasq.) têm despertado grande interesse por serem altamente produtivos, tolerantes à "tristeza" e à seca, porém têm a desvantagem de serem suscetíveis ao declínio dos citros. A tangerina 'Cleópatra' (*C. reshni* Hort. ex Tan.), por sua vez, embora tolerante ao declínio, apresenta o inconveniente de que as copas nela enxertadas possuem um longo período vegetativo (Castle, 1987). As laranjeiras doces também são tolerantes ao declínio, mas sua utilização como porta-enxertos tem sido reduzida drasticamente devido à alta susceptibilidade à gomose de *Phytophthora*. Com base no exposto, tem-se que a hibridação somática da tangerina 'Cleópatra' com os limões 'Rugoso' e 'Volkameriano' ou com laranjas doces, poderá originar porta-enxertos vigorosos, produtivos e resistentes ao declínio (Louzada et al., 1992). Outro exemplo poderia incluir a hibridação somática entre a laranja 'Azeda' com a tangerina 'Cleópatra', reunindo as características de alta produtividade e qualidade de frutos, longevidade, resistência à geada, à seca, ao declínio e à gomose, além de boa adaptação a uma grande diversidade de solos da primeira, com a tolerância à "tristeza" nela ausente, porém presente na citada tangerina (Louzada et al., 1992).

Situado em região tropical, o Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Citros pertencente à Embrapa Mandioca e Fruticultura procura dar ênfase a espécies e variedades adaptáveis a ambientes nela prevalentes, principalmente relacionados ao Norte e Nordeste brasileiros.

Contando atualmente com 643 acessos, conservados sob condições de campo, na razão de três a 12 plantas por acesso, o BAG Citros reúne diversas espécies, compreendendo: *Citrus* spp., *Poncirus trifoliata*, *Fortunella* spp., *Microcitrus* spp., *Eremocitrus glauca*, *Severinia buxifolia*, *Atalantia monophylla*, *Merrillia caloxylon*, *Feroniella oblata*, *Feronia limonia*, *Micromelum tephrocarpa*, *Triphasia trifolia*.

Em termos de formas de conservação, as plantas são propagadas por enxertia de borbulha, empregando-se diferentes porta-enxertos [limão 'Cravo', limão 'Volkameriano', limão 'Rugoso Mazoe', tangerina 'Cleópatra', tangerina 'Sunki' (*C. sunki* Hort. ex Tan.), *C. macrophylla*, citrumelo 'Swingle' (*C. paradisi* x *P. trifoliata*), dentre outros passíveis de serem utilizados em propagações futuras], observando-se espaçamentos de 6 m x 4 m, 7 m x 4 m e 7 m x 4 m x 4 m, em função do vigor dos diferentes acessos.

Apesar da grande variabilidade genética presente no BAG Citros, um dos mais diversificados do país, deve-se atentar para a necessidade de enriquecimento do mesmo, tanto a partir de coleções presentes em instituições nacionais como internacionais, bem como mediante coletas em centros de origem e/ou dispersão dos citros. Tendo-se em vista a grande dimensão do território brasileiro, compreendendo ambientes ecológicos bastante distintos, é recomendável a constituição de bancos ativos regionais, cada um responsabilizando-se pela conservação de acessos adaptados, o melhor possível, aos seus ambientes específicos.

A caracterização do germoplasma vem sendo efetuada mediante o emprego de descritores mínimos definidos pela Embrapa Mandioca e Fruticultura e pelo International Plant Genetic Resources Institute-IPGRI, além do uso de marcadores moleculares e de técnicas citogenéticas, estas baseadas em bandeamento cromossômico.

Os trabalhos de avaliação têm permitido a identificação de cultivares promissoras sob o ponto de vista comercial, a exemplo das laranjas doces 'Jaffa', 'Parson Brown', 'Pineapple', 'Salustiana', 'Kona', 'Midsweet', 'Biondo', 'Gardner' e 'Torregrosa', que se caracterizam pela produção de safras precoces a início de meia-estação (Passos et al., 1997; Cunha Sobrinho et al., 1999). Quanto a tangerinas e híbridos, cabe mencionar clones de 'Clementina' (*C. clementina* Hort. ex Tan.), as tangerinas-tangelos 'Lee', 'Nova' e 'Page' [tangerina 'Clementina' x tangelo 'Orlando' (pomelo 'Duncan' x tangerina 'Dancy' *C. tangerina* Hort. ex Tan.)], 'Clementina' x tangor 'Murcott' (híbrido natural entre laranja doce e tangerina, de origem desconhecida), dentre outros. No tocante a variedades porta-enxerto, cabe acrescentar a identificação de um clone de tangerina 'Sunki' (CNPMF 02), que segundo observações de campo tem se mostrado mais tolerante à gomose de *Phytophthora* em relação a outros clones dessa tangerina

(Cunha Sobrinho et al., 1999), e de um clone de limão 'Cravo', denominado por Santa Cruz, que se caracteriza por apresentar um número médio de sementes por fruto relativamente mais elevado do que o normal da variedade (Cunha Sobrinho et al., 1999; Soares Filho et al., 1999).

O Banco Ativo de Germoplasma de Citros tem sido utilizado como elemento de suporte ao Programa de Melhoramento Genético (PMG) de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, tanto no que concerne à identificação de variedades promissoras nele introduzidas, copas e porta-enxertos, como no apoio a trabalhos de hibridação visando a criação de novas cultivares. Nesse sentido, os trabalhos de caracterização têm se concentrado em caracteres de interesse agrônomo, compreendendo: tolerância à seca, tolerância ao alumínio, tolerância/resistência à gomose de *Phytophthora*, tolerância/resistência à "tristeza", grau de poliembrionia, entre outros.

O BAG Citros tem se prestado, também, como fonte de introdução de variedades promissoras, copas e porta-enxertos, em diversas regiões do país, contribuindo, assim, para a diversificação do pomar citrícola nacional, hoje altamente concentrado na combinação laranja 'Pêra' / limão 'Cravo'. Nessa atividade, várias instituições têm sido envolvidas, públicas e privadas, além de associações e produtores.

PROGRAMA DE MELHORAMENTO GENÉTICO DE CITROS DA Embrapa Mandioca e Fruticultura - OBTENÇÃO DE HÍBRIDOS

Visando a obtenção de novas variedades cítricas, melhor adaptadas aos trópicos, a Embrapa Mandioca e Fruticultura iniciou em setembro de 1988 um programa de hibridações tendo como base seu Banco Ativo de Germoplasma, dotado de ampla variabilidade genética. Esta iniciativa teve como estímulo a relativamente baixa longevidade dos pomares brasileiros, cuja vida útil está em torno de 15 a 18 anos nas principais regiões produtoras do Estado de São Paulo, onde se encontram cerca de 80% da produção citrícola nacional (Neves, 1994 e 1995), e de 12 a 15 anos no Norte e Nordeste do país.

Como objetivos imediatos, o referido programa busca a seleção de genótipos, particularmente porta-enxertos, tolerantes à seca e ao alumínio, além de adaptados a altas densidades populacionais.

Contando com o apoio de uma equipe multidisciplinar, diversas ações de pesquisa encontram-se em curso, conforme exposição realizada a seguir:

• Hibridações

As variedades empregadas nos trabalhos de hibridação compreendem espécies e híbridos interespecíficos de *Citrus*, bem como gêneros afins e híbridos

intergenéricos. Como critério de escolha dos parentais a serem hibridados procura-se, em princípio, aqueles possuidores de comprovado valor agrônomo e/ou adaptativo a condições ambientais adversas, como tolerância à seca e ao alumínio, resistência/tolerância a doenças. Dentre os gêneros afins ao *Citrus*, são de especial interesse *Poncirus*, *Microcitrus* e *Eremocitrus*, por seu potencial relativo à obtenção de novos porta-enxertos ananizantes (Castle, 1979) e resistentes à gomose de *Phytophthora* (Hearn et al., 1974), doença fúngica que tem causado sérios prejuízos aos pomares brasileiros. Os gêneros *Microcitrus* e *Eremocitrus*, além disso, podem permitir a criação de porta-enxertos adaptados a ambientes sujeitos a períodos prolongados de estresse hídrico (Swingle, 1967).

Resultados preliminares baseados no caráter vingamento de frutos indicam que a tangerina 'Clementina', tangerina-tangelo 'Robinson' (tangerina 'Clementina' x tangelo 'Orlando'), tangerina 'Sunki', tangor 'Dweet' (laranja 'Mediterrânea' *C. sinensis* x tangerina 'Dancy'), limões 'Cravo' e 'Volkameriano' e laranja 'Azeda Double Calice' podem ser recomendados como bons parentais femininos, particularmente os cinco primeiros, por possuírem graus de poliembrião entre nulo a moderado (Soares Filho et al., 1995a e b; Moreira, 1996; Medrado, 1998), devido à existência de uma relação inversa entre o grau de poliembrião e o tamanho do embrião zigótico, sendo que quanto mais expressivo for este caráter tanto maior será a probabilidade de germinação do embrião híbrido e conseqüente desenvolvimento do *seedling* resultante (Vásquez Araujo, 1991; Soares Filho et al., 1994b; Moreira, 1996).

Como resultado dos cruzamentos realizados pelo PMG Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, até o momento, foram plantados em campo cerca de 2.000 *seedlings* híbridos obtidos de cruzamentos envolvendo principalmente limões, laranjas, tangerinas, *P. trifoliata* e híbridos desta espécie. Esses híbridos, em sua maioria, serão avaliados como porta-enxertos.

• Cultivo de embriões / Embriogênese *in vitro*

Em se tratando de parentais femininos cujas sementes apresentam elevado grau de poliembrião, o cultivo de embriões oriundos de frutos obtidos a partir de polinizações controladas deve ser feito sob condições assépticas, *in vitro*, de modo a possibilitar a germinação da maioria dos embriões, garantindo a sobrevivência dos eventuais *seedlings* híbridos. Nessas variedades, todavia, é comum a ocorrência de embriões imaturos (< 3,0 mm) que não germinam no meio MT (Murashige & Tucker, 1969), recomendado para citros, implicando na necessidade de ajustes do mesmo. Neste sentido, estudos realizados com tangerina 'Cleópatra', que possui cerca de 10 embriões por semente (Vásquez Araujo, 1991; Soares Filho et al., 1994b), indicam diversas modificações no meio MT, a saber: manter as concentrações originais de micronutrientes e vitaminas, reduzir pela metade a concentração de macronutrientes, reduzir a concentração de sacarose para 40 g/L e suplementar o meio MT com 0,08 mg/L de benzilaminopurina (BAP), 0,01 mg/L de ácido naftalenoacético (ANA) e 20 mg/L de adenina (Morais, 1997). Cabe mencionar que estas modificações no meio MT são recomendadas somente no caso de emprego de frutos com quatro a cinco

meses após a polinização. Esses resultados servirão de base para a definição de metodologia capaz de completar a embriogênese *in vitro* do(s) primeiro(s) embrião(ões) a se formar(em) após a fertilização, no intuito de evitar ou restringir a manifestação da poliembrião, particularmente em variedades altamente poliembriônicas.

Quanto aos parentais femininos monoembriônicos, ou com graus de poliembrião entre baixo a moderado, o cultivo de embriões *in vitro*, devido a seus custos relativamente elevados, pode ser evitado, sem prejuízos evidentes no tocante à sobrevivência dos *seedlings* híbridos, segundo constatações obtidas por Soares Filho et al. (1995c) e Medrado (1998). Este comportamento, conforme já exposto, deve-se ao fato de que em tais variedades, nas situações em que as sementes são poliembriônicas, os embriões zigóticos tendem a estar entre aqueles de maior tamanho, o que facilita sua germinação e conseqüente desenvolvimento em *seedling*, sendo esta tendência tanto mais evidente quanto menor for o grau de poliembrião (Vásquez Araujo, 1991; Soares Filho et al., 1994b; Moreira, 1996).

• Identificação de embriões / *seedlings* híbridos

Análises de caracteres morfológicos

Os caracteres cor de cotilédones e tamanho de embrião vêm sendo empregados como ferramentas auxiliares na identificação de embriões zigóticos em sementes poliembriônicas de citros. O primeiro em razão da existência de influências do polinizador sobre sua formação (efeito de metaxenia), conforme De Lange & Vincent (1977), Ueno & Hirai (1983), Vásquez Araujo (1991) e Vásquez Araujo et al. (1994). O segundo devido a evidências, mencionadas anteriormente, de que o embrião zigótico tende a estar entre aqueles de maior tamanho (Vásquez Araujo, 1991; Soares Filho et al., 1994b; Moreira, 1996). Observações relativas à posição do embrião na semente mostraram que tanto os embriões zigóticos como os nucelares apresentam forte tendência de localizarem-se na região micropilar, indicando que esse caráter não favorece o reconhecimento dos embriões de origem híbrida (Vásquez Araujo, 1991; Soares Filho et al., 1994b; Moreira, 1996).

Quanto a identificação de *seedlings* híbridos a partir de estádios jovens de desenvolvimento, tem sido utilizada a característica morfológica trifoliada, dominante, presente em *P. trifoliata* e híbridos desta espécie.

Análises de escurecimento enzimático (*browning*)

Espécies e híbridos interespecíficos e intergenéricos de *Citrus* e gêneros afins a este, compreendendo um total de 53 acessos do BAG Citros, bem como *seedlings* (nucelares e híbridos) provenientes de cruzamentos controlados, com idade máxima não superior a dois anos, foram caracterizados mediante o emprego do escurecimento enzimático (Esen & Soost, 1974a e b; Esen & Scora, 1975), utilizando-se o código de cores de Séguy (1936) na definição dos

resultados. As análises basearam-se em observações do comportamento fenotípico (cor) de manchas de macerados de brotações foliares formadas sobre papel filtro. Este procedimento teve por objetivo identificar grupos de indivíduos contrastantes entre si com respeito ao escurecimento enzimático, visando seu uso na distinção entre *seedlings* híbridos e nucelares obtidos a partir de polinizações controladas. Relativamente aos *seedlings* analisados neste estudo, os resultados obtidos mostraram-se inconclusivos, não permitindo a separação dos zigóticos em relação àqueles de origem nucelar, indicando sua não aplicabilidade, no que tange a esta finalidade, nas situações envolvendo *seedlings* jovens (Soares Filho et al., 1994a).

Análises de isoenzimas

Análises de isoenzimas vêm sendo empregadas na identificação de *seedlings* híbridos. Devido aos seus custos relativamente baixos, o sistema glutamato-oxaloacetato-transaminase (GOT) foi bastante utilizado no PMG Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura (Souza Jr. et al., 1993). Em razão das limitações desse sistema, relativamente à impossibilidade de identificar *seedlings* zigóticos em muitos cruzamentos de interesse, outros sistemas isoenzimáticos deverão ser avaliados, a exemplo da leucina-amino-peptidase (LEP), fosfoglicose-isomerase (PGI) e peroxidase (PRX).

Análises de segmentos polimórficos de DNA

Com mais ênfase do que as anteriores, análises de segmentos polimórficos de DNA vêm sendo realizadas, destacando-se a de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) por ajustar-se melhor a atividades de rotina e por ser menos exigente em equipamentos. Entre as virtudes desta técnica estão a rapidez, o número teoricamente ilimitado de marcadores existentes, a possibilidade de automação, a não interferência de fatores ambientais, entre outras, o que a torna excelente para trabalhos que envolvem um grande número de análises. As análises de segmentos polimórficos de DNA, além disso, têm a vantagem, em relação àquelas baseadas em marcadores isoenzimáticos, de permitir a identificação de *seedlings* zigóticos mesmo em hibridações intraespecíficas. A utilização de isoenzimas, porém, será considerada sempre que possível, por ser mais uma opção disponível e apresentar custos relativamente baixos.

Análises de bandeamento cromossômico

Análises de bandeamento cromossômico realizadas com três espécies de tangerina (*C. reshni*, *C. reticulata* Blanco e *C. nobilis* Loureiro), mediante o emprego dos fluorocromos CMA/DAPI, mostraram a existência de heteromorfismo para um ou mais pares cromossômicos (Santos et al., 1993). Esses resultados indicam a possibilidade de se utilizar cromossomos marcadores como auxiliares na identificação de *seedlings* zigóticos, em cruzamentos envolvendo parentais com padrões de bandas cromossômicas diferentes entre si. Além disso, análises cromossômicas de 51 acessos do BAG Citros, compreendendo 20 espécies de *Citrus*, *Poncirus trifoliata* e sete híbridos interespecíficos, mostraram que a característica cariotípica mais claramente variável foi o número e posição das constrições secundárias (SECs), indicando que as mesmas também têm potencial

de uso na identificação de híbridos oriundos de cruzamentos controlados (Guerra *et al.*, 1997).

• Hibridação somática por meio de fusão de protoplastos

Conforme comentários já realizados, em citros a hibridação somática via fusão de protoplastos aplica-se ao melhoramento genético de variedades copa e porta-enxerto. Os híbridos alotetraplóides obtidos por esse processo mantêm as ligações gênicas presentes nos pais, em razão da não ocorrência de segregação meiótica (Oliveira, 1993). Desse modo, espera-se que tais híbridos apresentem características complementares sob o ponto de vista agrônomo, provenientes das variedades doadoras de protoplastos, podendo estas relacionarem-se a espécies pertencentes a diferentes *pools* gênicos, entre as quais a troca de genes mediante hibridação convencional pode ser impedida por barreiras reprodutivas (Grosser *et al.*, 1988; Grosser & Gmitter Jr., 1990a e b).

Pretende-se com essa ação de pesquisa obter híbridos somáticos entre espécies de *Citrus*, bem como entre este e outros gêneros afins, particularmente *Microcitrus* e *Eremocitrus*, ambos de reconhecido valor adaptativo a ambientes sujeitos a estresses (Swingle, 1967; Hearn *et al.*, 1974). Os experimentos estão sendo conduzidos no Laboratório de Biotecnologia - Cultura de Tecidos, tendo, até o momento, sido realizadas as seguintes etapas: obtenção e cultivo de calos nucleares embriogênicos e germinação e cultivo *in vitro* de plântulas. Os calos nucleares embriogênicos foram obtidos a partir de frutos com nove a 12 semanas de idade, provenientes de variedades porta-enxerto portadoras de características de interesse agrônomo, dentre as quais se incluem: limões 'Cravo Comum' e 'Cravo Santa Bárbara', 'Volkameriano Catânia 2' e 'Rugoso Mazoe', tangerinas 'Cleópatra', 'Sunki Comum' e 'Sunki CNPMF 02', laranjas 'Azeda', 'Hamlin (*C. sinensis*) CNPMF 04' e 'Hamlin CNPMF 20', *C. macrophylla* Wester, *C. ichangensis* Swingle, *P. trifoliata* seleção 'Flying Dragon', citranges (*C. sinensis* x *P. trifoliata*) 'Troyer', 'Carrizo' e C-35 e citrumelo (*C. paradisi* x *P. trifoliata*) 'Swingle'. A partir de células em suspensão, oriundas desses calos, serão isolados protoplastos. Quanto aos gêneros *Microcitrus*, *Eremocitrus* e *Severinia*, os protoplastos serão extraídos de folhas de *seedlings* obtidos a partir de germinação *in vitro*, sob condições assépticas.

• Seleção de híbridos tolerantes à seca e ao alumínio

A citricultura brasileira é praticada em sua quase totalidade sem irrigação, não obstante a freqüente ocorrência de estresses hídricos na maioria das regiões produtoras. Esta situação é particularmente preocupante no Nordeste do país, onde, além das dificuldades climáticas, o nível tecnológico do citricultor é bastante limitado, segundo se depreende pelas baixas produtividade e longevidade de seus pomares. Soma-se a isto a ocorrência de expressiva extensão de áreas geográficas com solos ácidos e teores elevados de alumínio trocável (Oliveira,

1991), aumentando os prejuízos causados ao crescimento das plantas, devido aos efeitos sinérgicos negativos que o estresse hídrico e a toxicidade de alumínio apresentam (Foy, 1967; Klimov e Klimov & Ribana, citados por Foy, 1988; Krizek & Foy, 1988; Goldman et al., 1989).

Diante do exposto, decidiu-se que os híbridos gerados pelo PMG Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura seriam selecionados inicialmente para tolerância à seca e ao alumínio. No momento, encontram-se em andamento estudos dirigidos à definição de metodologias que permitam a seleção de *seedlings* híbridos a partir de estádios jovens de desenvolvimento. Para tanto, diferentes variedades e espécies do BAG Citros, cuidadosamente escolhidas pela variabilidade genética que apresentam, vêm sendo utilizadas na condução dessas pesquisas.

Verificou-se, sob o ponto de vista metodológico, que o cultivo de *seedlings* em recipientes contendo volumes fixos de solo (sacos plásticos e tubos de PVC) mostrou-se inadequado, pois nesse tipo de ambiente genótipos que possuem sistemas radiculares mais desenvolvidos, a exemplo do limão 'Rugoso da Flórida', nos períodos de estresse hídrico, estabelecidos mediante supressão da irrigação, esgotam mais rapidamente a reserva de água disponível em comparação com aqueles cujos sistemas radiculares são mais pobres, como o *P. trifoliata*, implicando em respostas contraditórias em relação ao que se observaria sob condições de campo, onde o volume de solo ocupado pelo sistema radicular das plantas não sofre tal limitação. Visando contornar essa situação, encontram-se em andamento estudos nos quais o cultivo de *seedlings* dos genótipos sob avaliação baseia-se em soluções hidropônicas, tanto no tocante à aplicação de estresses hídricos, determinados mediante o emprego de polietilenoglicol (PEG), como de estresses de alumínio, aplicados com base no uso de cloreto de alumínio ($AlCl_3$). Essa metodologia, além de possibilitar um melhor controle das condições experimentais, permitirá a obtenção de resultados com maior rapidez. Serão enfatizadas as observações dirigidas ao sistema radicular das plantas (crescimento em extensão), buscando-se a identificação de parâmetros que melhor expliquem a tolerância à seca e ao alumínio, de modo a compor um índice de seleção capaz de permitir o reconhecimento, em estádios iniciais de desenvolvimento de *seedling*, de genótipos promissores.

Relativamente aos estudos dirigidos à tolerância ao alumínio, os experimentos vêm sendo conduzidos no Laboratório de Fisiologia Vegetal. Inicialmente, compreenderam cinco variedades porta-enxerto: limões 'Cravo Santa Bárbara', 'Volkameriano Catânia 2' e 'Rugoso da Flórida', laranja 'Azeda Comum' e tangerina 'Cleópatra'. *Seedlings* dessas variedades foram cultivados com base em solução nutritiva proposta por Furlani & Hanna (1984), aplicando-se à mesma cinco níveis de alumínio: 0 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm e 20 ppm, na forma de $AlCl_3$. Sintomas visíveis de toxicidade de alumínio foram observados no sistema radicular de todas as variedades estudadas, representados por um bloqueio no crescimento das raízes, tornando-as curtas, grossas e quebradiças, sintomas estes também verificados por Calbo, em sorgo, e por Mosquim, em *Stylosanthes humilis*, citados por Oliveira (1979). Os limões 'Cravo', 'Volkameriano' e 'Rugoso da Flórida' mostraram-se mais sensíveis do que a laranja 'Azeda' e a tangerina 'Cleópatra' ao estresse provocado. Os sintomas

tornaram-se mais evidentes no nível de 10 ppm de $AlCl_3$ e intensificaram-se nos níveis de 15 ppm e 20 ppm, a partir dos quais ocorreu a paralização do desenvolvimento do sistema radicular (Pinto, 1999).

- **Seleção precoce de genótipos resistentes/tolerantes à gomose de *Phytophthora***

As estratégias de controle da gomose de *Phytophthora* baseiam-se na aplicação de fungicidas, adoção de práticas culturais que minimizam a incidência da doença e na resistência do porta-enxerto ao ataque do patógeno. A exemplo do que ocorre na Flórida, EUA, onde já existe um programa de avaliação de híbridos que permite a identificação de genótipos tolerantes ou resistentes à doença, busca-se nesta ação de pesquisa a caracterização de híbridos e acessos do BAG Citros (*seedlings* em fase juvenil) quanto ao grau de resistência aos fungos *P. parasitica* e *P. citrophthora*.

Os *seedlings* serão cultivados em casa-de-vegetação e inoculados com isolados de *Phytophthora* (suspensão de zoosporos e solo infestado com clamidosporos) obtidos nos campos experimentais da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

- **Seleção de híbridos de citros resistentes/tolerantes ao vírus da “tristeza”**

Seedlings híbridos com idade igual ou superior a três anos, plantados em campo, vêm avaliados quanto a presença de caneluras (*stem pitting*) em ramos com cerca de 20 cm de comprimento, coletados em todos os quadrantes das plantas (nove ramos por *seedling*). As leituras têm considerado uma escala de notas variando de um (sem sintomas) a cinco (ramos severamente afetados). Os híbridos que não apresentarem sintomas serão submetidos a testes de ELISA, realizados a partir de amostras de folhas novas, obtidas nos períodos mais frios do ano.

- **Indução de florescimento de *seedlings* em fase juvenil**

Visando encurtar o longo período pré-reprodutivo comumente observado em citros, estão sendo iniciadas ações de pesquisa com a finalidade de definir metodologias que permitam antecipar o florescimento de híbridos selecionados como promissores, relativamente à tolerância à seca e ao alumínio, de modo a antecipar o início de suas avaliações posteriores. Estes estudos compreendem tanto o emprego de indutores de florescimento, a exemplo do paclobutrazol - PP(333), como a enxertia de *seedlings* jovens em plantas adultas (*top working*) e em plantas que se caracterizam por seu comportamento ananizado, a exemplo do *Poncirus trifoliata* seleção ‘Flying Dragon’.

REFERÊNCIAS

- ALLARD, R.W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. Tradução de A. BLUMENSCHNEIN, E. PATERNIANI, J. T. A. GURGEL e R. VENCOSKY. São Paulo, SP, Editora Edgard Blücher Ltda., 1971. 381p.
- ANDERSON, L.C. *Flaveria campestris (asteraceae)*: a case of polyhaploidy or relic ancestral diploidy? **Evolution**, California, v.26, n.24, p.671-673, 1972.
- CAMERON, J.W.; FROST, H.B. Genetics, breeding, and nucellar embryony. In: REUTHER, W.L.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J. (eds.). **The Citrus Industry**. Berkeley, University of California Press, v.2, p.325-370. 1968.
- CAMPOS, J.S. de. **Cultura dos citros**. Campinas, SP, Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, 1976. 100p.
- CASTLE, W.S. Controlling citrus tree size with rootstocks and viruses for higher density plantings. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Orlando, Florida, v.91, p.46-50, 1979.
- CASTLE, W.S. Citrus rootstocks. In: ROM, R.C.; CARLSON, R.F.(eds.). **Rootstocks for fruit crops**, New York: Wiley, 1987. p. 361-399.
- CHAPOT, H. The citrus plant. In: HÄFLIGER, E. (ed.). **Citrus**: Basle, Switzerland, CIBA-GEIGY Ltd., p.14-20. 1975.
- CUNHA SOBRINHO, A.P. da; SOARES FILHO, W. dos S.; PASSOS, O.S. Banco ativo de germoplasma de citros. In: WORKSHOP PARA CURADORES DE BANCOS DE GERMOPLASMA DE ESPÉCIES FRUTÍFERAS, 1997. **Recursos genéticos de espécies frutíferas do Brasil**. Brasília, DF: 1999, p.94-96.
- DE LANGE, J.H.; VINCENT, A.P. Citrus breeding: new techniques in simulation of hybrid production and identification of zygotic embryo and seedlings. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE, 1977, Orlando, Florida. **Proceedings...** Orlando, Florida, 1977. v.2, p.589-595.
- DENG, X.X.; GROSSER, J.W.; GMITTER Jr., F.G. Intergeneric somatic hybrid plants from protoplast fusion of *Fortunella crassiflora* 'Meiwa' with *Citrus sinensis* 'Valencia'. **Scientia Horticulturae**, v.49, p.55-62, 1991.
- ESEN, A.; SCORA, R.W. Distribution of enzymatic browning of young shoot homogenates in the Aurantioideae. **American Journal of Botany**, Columbus, v.62, p.1078-1083, 1975.
- ESEN, A.; SOOST, R.K. Inheritance of browning of young-shoot extracts of citrus. **The Journal of Heredity**, Washington, D.C., v.65, p.97-100, 1974a.

- ESEN, A.; SOOST, R.K. Polyphenol oxidase-catalysed browning of young shoot extracts of citrus taxa. **Journal of the American Society of Horticultural Society**, Mount Vernon, v.99, p.484-489, 1974b.
- FAO/PNUMA (Santiago, Chile). **Conservación in situ de recursos genéticos**. Santiago, Chile: Oficina Regional de la FAO para America Latina y el Caribe, 1991.
- FOY, C.D. Differential tolerance of dry beans, snapbeans, and lima beans varieties to an acid soil high in exchangeable aluminum. **Agronomy Journal**, Madison, v.59, p.561-564, 1967.
- FOY, C.D. Plant adaptation to acid, aluminum toxic soil. In: **Communication in soil science and plant analysis**, v.19, n. 7/12, p.959-987, 1988.
- FROST, H.B.; KRUG, C.A. Diploid - tetraploid periclinal chimeras as bud variants in citrus. **Genetics**, New York, v.27, p.619-634, 1942.
- FURLANI, P.R.; HANNA, L.G. Avaliação da tolerância de plantas de arroz e milho ao alumínio em solução nutritiva. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.8, p.205-208, 1984.
- GIACOMETTI, D.C. Taxonomia das espécies cultivadas de citros baseada em filogenética. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A.A. (eds.). **Citricultura Brasileira**. 2. ed. Campinas, SP: Fundação Cargill, v.1, p.99-115. 1991.
- GOLDMAN, I.L.; CARTER, T.E.; PATERSON, R.P. Differential genotypic response to drought stress and subsoil aluminum in soybean. **Crop. Science**, v.29, p.330-334, 1989.
- GONZALES-SICILIA, E. Citrus in the Mediterranean basin. In: INTERNACIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1, 1968. Riverside. **Proceedings...** Riverside, CA: University of California, 1969. v.1, p.121-134.
- GROSSER, J.W.; GMITTER Jr., F.G.; CHANDLER, J.L. Intergeneric somatic hybrid plants of *Citrus sinensis* cv. Hamlin and *Poncirus trifoliata* cv. Flying Dragon. **Plant Cell Report**, v.7, p.5-7, 1988.
- GROSSER, J.W.; GMITTER Jr., F.G. Protoplast fusion and citrus improvement. In: JANICK, J.(ed). **Plant Breeding Reviews**, v.8, p.339-374, 1990a.
- GROSSER, J.W.; GMITTER Jr., F.G. Wide-hybridization of citrus via protoplast fusion: progress, strategies and limitations. **Horticultural Biotechnology**, p.21-31, 1990b.
- GROSSER, J.W.; GMITTER Jr., F.G.; SESTO, F.; DENG, X.X.; CHANDLER, J.L. Six new somatic citrus hybrid and their potential for cultivar improvement. **Journal of America Society for Horticultural Science**, v.117. p.169-173, 1991.

- GROSSER, J.W.; GMITTER Jr., F.G.; TUSA, N.; CHANDLER, J.L. Somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species: *Citrus reticulata* and *Citropsis gilletiana*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.8, p.656-659, 1990.
- GROSSER, J.W.; MOORE, G.A.; GMITTER Jr., F.G. Interespecific somatic hybrid plants from the fusion of 'Key lime' (*C. aurantifolia*) with 'Valencia' sweet orange (*C. sinensis*) protoplasts. **Scientia Horticulturae**, n.39, p.23-29, 1989.
- GUERRA, M.; PEDROSA, A.; SILVA, A.E.B.; CORNÉLIO, M.T.M.; SANTOS, K.; SOARES FILHO, W. dos S. Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a citrus germplasm bank. **Revista Brasileira de Genética**, v.20, n.3, p.489-496, 1997.
- HEARN, C.J.; HUTCHISON, D.J.; BARRET, H.C. Breeding citrus rootstocks. **HortScience**, Mount Vernon, v.9, n.4, p.357-358, 1974.
- HOYT, E. **Conserving the wild relatives crops**. Roma, Itália: IBPGR/IUCN/WWF, 1988, 45p.
- HOYT, E. **Conservação dos parentes silvestres das plantas cultivadas**. Roma. Itália: IBPGR, 1992, 52p. Traduzido por Lidio Coradin.
- HUTCHISON, D.J.; O'BANNON, J.O. Evaluating the reaction of citrus selections to *Tylenchulus semipenetrans*. **Plant Disease Reporter**, Washington, DC, v.56, n.9, p.747-751, 1972.
- IBGE (Rio de Janeiro). **Levantamento sistemático da produção agrícola: Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil**. Rio de Janeiro, RJ: 1995. 66p.
- KOBAYASHI, S.; OHGAWARA, T.; OIYAMA, I.; ISHII, S.A Somatic hybrid obtained by protoplast fusion between navel orange (*C. sinensis*) and satsuma mandarin (*C. unshiu*). **Plant Cell, Tissue & Organ Culture**, n.14, p.63-69, 1988.
- KRIZEK, D.T.; FOY, C.D. Stress in differential aluminium of two barley cultivar grown in an acid soil. **J. Plant. Nut.**, v.11, n.4, p.351-364, 1988.
- KUKIMURA, H.; IKEDA, F.; FUJITA, H.; MAETA, T.; NAKAJIMA, K.; KATAGIRI, K.; NAKAHIRA, K.; SOMEKAWA, M. Genetical, cytological and physiological studies on the induced mutants with special regard to effective methods for obtaining useful mutants in perennial wood plants. In: FAO/IAEA Division of Atomic Energy in Food and Agriculture. **Improvement of vegetatively propagated plants and treecrops through induced mutations**. Viena, IAEA, p.93-137, 1976.
- LOUZADA, E.S.; GROSSER, J.W.; GMITTER Jr., F.G.; NIELSEN, B.; CHANDLER, J.L. Eight new somatic hybrid citrus rootstocks with potential for improved disease resistance. **HortScience**, v.29, n.9, p.1033-1036, 1992.

- MEDRI, M.E.; LLERAS, E.; VALOIS, A.C.C. Comparação anatômica entre folhas diplóides e poliplóides do guaraná [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke]. **Acta Amazônica**, Manaus, v.10, n.2, p.283-288, 1980.
- MEDRADO, A.C. de M. **Cultivo de sementes versus cultivo *in vitro* de embriões de citros (*Citrus spp.*)**: implicações na sobrevivência de híbridos. Cruz das Almas: EAUFBA, 1998. 46p. (Dissertação de Mestrado).
- MEHRA, P.N.; BAWA, K.S. Chromosomal evolution in tropical hardwoods. **Evolution**, Chicago, v.23, n.3, p.466-481, 1969.
- METTLER, L.E.; GREGG, T.G. **Genética de populações e evolução**. Tradução de VENCOSKY, R.; AZEVEDO, J.L. de; BANDEL, G. São Paulo, SP, Editora Polígono e EDUSP, 1973. 262p.
- MORAIS, L.S. **Ajustes no meio de Murashige & Tucker (MT) para o cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerina 'Cleópatra'**. Cruz das Almas: EAUFBA, 1997, 95p. (Dissertação de Mestrado).
- MOREIRA, C. dos S. **Frequência de híbridos em citros (*Citrus spp.*) em função do grau de poliembrionia**. Cruz das Almas, BA: EAUFBA, 1996, 78p. (Dissertação de Mestrado).
- MOREIRA, C.S. Melhoramento de citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F. (coord.). **Citricultura Brasileira**. Campinas, SP: Fundação Cargill, v.1, p.197-223. 1980.
- MURASHIGE, T., TUCKER, D.P.H. Growth factor requirement of citrus tissue culture. In: INTERNACIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1, 1968. Riverside. **Proceedings...** Riverside, CA,: University of California, 1969. v.3, p.1155-1161.
- NEVES, E.M. Citricultura no mundo, no Brasil e em São Paulo. In: NEVES, E.M. **Nutrição mineral dos citros: citricultura no Brasil e em São Paulo**. São Paulo, SP: ESALQ/SEBRAE, 1994. 31p. (Cursos Agrozootécnicos).
- NEVES, E.M. Mercado nacional e internacional de citros e sucos cítricos e os relacionamentos produtor x agroindústrias. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 35, e CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE HORTICULTURA, 7, 1995, Foz do Iguaçu, PR. **Anais...** Foz do Iguaçu, PR: 1995.
- NISHIURA, M. Natural mutation and its utilization in the selection of citrus fruits. **Gamma Field Symposia**, Tokyo, n.4, p.27-38, 1965.
- NYBOM, N.; KOCH, A. Induced mutations and breeding methods in vegetatively propagated plants. In: FAO e IAEA (org.). **The used of induced mutations in plant breeding**. Dorking, Great Britain: Adlard & Son Ltd., 1965, p.671-678.

- OHGAWARA, T.; KOBAYASHI, S.; ISHII, S.; YOSHINOOGA, K.; OIYAMA, I. Somatic hybridization in citrus: Navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) and grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.78, p.609-612, 1989.
- OLIVEIRA, J.B. Solos para citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A.A. **Citricultura Brasileira**. 2. ed. Campinas, SP: Fundação Cargill, 1991. v.1, p.196-227.
- OLIVEIRA, L.E.M. Crescimento e comportamento nutricional de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) submetidas a níveis de alumínio. Viçosa, MG: UFV, 1979, 50p. (Dissertação de Mestrado).
- OLIVEIRA, R.P. de. **Cultura de calos, células em suspensão e protoplastos de porta-enxertos de citros**. Piracicaba, SP: ESALQ/USP, 1993, 117p. (Dissertação de Mestrado).
- PASSOS, O.S.; ROCHA, A.F.M.; SOARES FILHO, W. dos S.; CUNHA SOBRINHO, A.P. da. Variedades cítricas no Nordeste brasileiro: novas alternativas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, BA, v.19, n.1, p.103-112, 1997.
- PINTO, I. de S. **Tolerância ao alumínio de cinco porta-enxertos de citros (*Citrus* spp.) cultivados em solução nutritiva**. Cruz das Almas, BA: EAUFGA, 1999, 65p. (Dissertação de Mestrado).
- RAGHUVANSHI, S.S. Cytological evidence bearing on evolution in *Citrus*. In: INTERNACIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1, 1968. Riverside. **Proceedings...** Riverside, CA: University of California, 1969. v.1, p.207-214.
- SANTOS, K.G.B.; GUERRA, M.; SOARES FILHO, W. dos S. Padrão de bandas cromossômicas obtido com o fluorocromo CMA em três espécies de tangerinas. In: ENCONTRO DE GENÉTICA DO NORDESTE, 9, 1993, Teresina, PI. **Anais...** Teresina, PI: UFPI/UEPI/EMBRAPA/SBG - Regionais do Nordeste, 1993. p.167.
- SÉGUY, E. **Code universel des couleurs**. Paris: P. Lechevalier, 1936. (Encyclopedie Pratique du Naturaliste).
- SOARES FILHO, W. dos S.; CUNHA, M.A.P. da; CUNHA SOBRINHO, A.P. da; PASSOS, O.S.; SOUZA JUNIOR, M.T. Identification of zygotic seedlings derived from polyembryonic seeds of citrus: the use of "browning". In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 7, 1992, Acireale, Italy, **Proceedings...** Catania, Italy: International Society of Citriculture, 1994a. v.1, p.139-141.
- SOARES FILHO, W. dos S.; CUNHA SOBRINHO, A.P. da; LEE, L.M. Influence of pollinators on fruit set in citrus. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.403, p.39-46, 1995a.

- SOARES FILHO, W. dos S.; LEE, L.M.; CUNHA SOBRINHO, A.P. da. Influence of pollinators on polyembryony in citrus. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.403, p.256-265, 1995b.
- SOARES FILHO, W. dos S.; MORAIS, L.S.; CUNHA SOBRINHO, A.P. da; DIAMANTINO, M.S.A.S.; PASSOS, O.S. 'Santa Cruz': uma nova seleção de limão 'Cravo'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v.21, n.2, p.222-225, 1999.
- SOARES FILHO, W. dos S.; PELACANI, C.R.; SOUZA, A. da S.; CUNHA SOBRINHO, A.P. da; ARAUJO, E.F. de. Influência dos tegumentos externo e interno na germinação de sementes de citros: implicações na sobrevivência de "seedlings" híbridos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, BA, v.17, n.1, p.91-101, 1995c.
- SOARES FILHO, W. dos S.; VASQUEZ ARAUJO, J.E.; CUNHA, M.A.P. da; CUNHA SOBRINHO, A.P. da; PASSOS, O.S. Degree of polyembryony, size and survival of the zygotic embryo in citrus. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 7, 1992, Acireale, Italy. **Proceedings...** Catania, Italy: International Society of Citriculture, 1994b. v.1, p.135-138.
- SOOST, R.K.; CAMERON, J.W. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (eds.). **Advances in fruit breeding**. West Lafayette, Indiana: Purdue University Press, 1975, p.507-540.
- SOUZA JÚNIOR, M.T.; SOARES FILHO, W. dos S.; SILVA, R.P. Identificação de "seedlings" zigóticos de citros mediante o emprego do sistema enzimático glutamato-oxaloacetato transaminase (E.C.2.3.1.1.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, BA, v.15, n.3, p.57-65, 1993.
- SPURLING, M.B. Citrus in the Pacific area. In: INTERNACIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1, 1968. Riverside. **Proceedings...** Riverside, CA: University of California, 1969. v.1, p.93-101.
- SWANSON, C.P. **Cytology and cytogenetics**. New Jersey, Prentice-Hall Inc., 1957. 596p.
- SWINGLE, W.T The botany of *Citrus* and its relatives. Revisão de Philip C. Reece. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (eds.). **The citrus industry**. Berkeley, California: University of California, 1967. v.1, cap.3, p.190-430.
- TUSA, N.; GROSSER, J.G.; GMITTER Jr., F.G. Plant regeneration of 'Valencia' sweet orange, 'Femminello' lemon, and the interspecific somatic hybrid following protoplast fusion. **Journal of the American Society Science**, Alexandria, v.115, n.6, p.1043-1046, 1990.
- UENO, I.; HIRAI, M. Identification of zygotic embryos in polyembryonic citrus seeds by cotyledon colour. **Bull. Fruit Tree Res. Sta.**, Japan, v.10, p.35-49, 1983.

VÁSQUEZ ARAUJO, J.E. **Identificação de embriões zigóticos em sementes poliembriônicas de citros (*Citrus* spp.) mediante características morfológicas**. Cruz das Almas: EAUFBA, 1991, 74p. (Dissertação de Mestrado).

VÁSQUEZ ARAUJO, J.E.; SOARES FILHO, W. dos S.; CUNHA, M.A.P. da; CUNHA SOBRINHO, A.P. da; PASSOS, O.S.; SOUZA, A. da S. Identification of zygotic embryos in polyembryonic citrus seeds: the use of cotyledon colours. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 7, 1992, Acireale, Italy. **Proceedings...** Catania, Italy: International Society of Citriculture, 1994. v.1, p.142-144.

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

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

YELENOSKY, G.; BROWN, R.T.; HEARN, C.J. Tolerance of trifoliata orange selection and hybrids to freezes and flooding. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Orlando, Florida, v.86, p.99-104, 1974.