

**CITOGENÉTICA DO 'CITRAVO' [*Citrus
limonia* Osbeck cv. Cravo x *Poncirus trifoliata*
(L.) Raf.] E SEUS GENITORES E ANÁLISE
ISOENZIMÁTICA DE POLIEMBRIÕES**

MÍVIA ROSA DE MEDEIROS

1998

MÍVIA ROSA DE MEDEIROS

**CITOGENÉTICA DO 'CITRAVO' [*Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo x
Poncirus trifoliata (L.) Raf.] E SEUS GENITORES E ANÁLISE
ISOENZIMÁTICA DE POLIEMBRIÕES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de "Mestre".

Orientadora
Profª. Lisete Chamma Davide

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1998



Ficha catalográfica preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA

Medeiros, Mívia Rosa de

Citogenética do "Citravo" [*Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo x
Poncirus trifoliata (L.) Raf.] e seus genitores e análise isoenzimática
de poliembriões. / Mívia Rosa de Medeiros. – Lavras: UFLA, 1998.
73p.: il.

Orientadora: Lisete Chamma Davide.

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Citravo 2. Porta-enxerto. 3. Cromossoma. 4. Isoenzima. 5. Análise
isoenzimática. 6. Citogenética. 7. Poliembrionia. 8. Citros. 9.
Melhoramento genético. 10. Apomixia. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD-634.33

MIVIA ROSA DE MEDEIROS

**CITOGENÉTICA DO 'CITRAVO' [*Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo x
Poncirus trifoliata (L.) Raf.] E SEUS GENITORES E ANÁLISE
ISOENZIMÁTICA DE POLIEMBRIÕES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 31 de agosto de 1998

Prof. Iara Alvarenga Mesquita Pereira

UFLA

Prof.^a Maria das Graças G. C. Vieira

UFLA



Prof.^a Lisete Chamma Davide
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais,
Walfrido Henriques de Medeiros e Darci Angélica Henriques;

Avós,
Miguel Henriques da Silva, Rosa Angélica do Prado e Vitalina Gonçalves de Jesus;

Irmãos,
Binho, Inhá, Myrinha, Marilda, Bell, Frido, Vaninha e Tê;

Sobrinhos,
Matheus, Arthur, Gabriela e Laryssa,
ancoradouro seguro durante todos estes anos.

A Marcelo Vichiato,
companheiro de todas as horas.

Ao professor Samuel Pereira de Carvalho,
não tenho palavras para agradecer tudo que tem feito por mim.

A todos que entraram na minha vida e partiram: “As pessoas não morrem, ficam encantadas”.

(João Guimarães Rosa)
OFEREÇO

Aos portadores de deficiência:

“Você verá que, mesmo assim, a estória não tem fim,
continua sempre que você responde sim
à sua imaginação.

A arte de sorrir, cada vez que o mundo diz: não.
Vamos brincar de viver!”

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, presente em todos os momentos da minha vida.

À Universidade Federal de Lavras - UFLA, pela oportunidade concedida para a realização deste curso de Pós-Graduação.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela bolsa de estudos concedida.

À Prefeitura Municipal de Belo Horizonte, que viabilizou a realização deste curso.

Aos colaboradores deste trabalho: Moacir Pasqual, Samuel Pereira de Carvalho, Renata Silva Mann e Lisete Chamma Davide, pela amizade, ensinamentos, orientação na execução deste trabalho e incentivo na realização do curso. "O homem demonstra sua grandeza pela maneira como trata os pequenos".

Aos professores da UFLA: Maria das Graças Cardoso (DQI), Maria das Graças G. C. Vieira (DAG), Iara Alvarenga M. Pereira (DBI), Amauri Alves Alvarenga (DFI).

À Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais - PUC-MG, em especial aos professores e amigos Tereza Raquel Saraiva, Pedro Alves Campos e Virgínia Simão.

À Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, em especial ao professor Geovanni Dantas Cassali, pela utilização do Laboratório de Fotomicroscopia.

Aos amigos, funcionários, alunos e comunidade da Escola Municipal Milton Campos, pelo apoio e carinho, em especial ao Sr. Herbert Gomes, Fernando César Alvarenga Catão, Waldir Barcelos, Afonso Estêvão, Regina Oliveira, Solange e Admir Jr.

Ao pessoal dos laboratórios de Citogenética, Cultura de Tecidos e Análise de Sementes: Ana Hortência, Ivan Bedin, Tanhã; Vantuil, Evaldo, Claret e Dinara.

Aos funcionários da Biblioteca Central da UFLA, pela amizade e auxílio, em especial a Vânia, Marcinho e Sr. Valdemiro.

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Biologia, pelo apoio, carinho e amizade.

Aos amigos Adelson Nascimento Oliveira, Bárbara P. Fontes Dantas, Maria das Graças Ribeiro (D. Fia), D. Lia, Carlos Aragão, Claudomiro André, Élberes Botrel, José Eduardo Colombo Andrade, Leonardo Cunha Melo, Jane Angélica Silveira de Souza, José Waldo Alves Campos (Cabeludo) Jurandir Matias (Jura), Maria Regina, Rubens Rondon, Juan, Bia e Lanna: "amigo é coisa pra se guardar do lado esquerdo do peito".

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho; e, se fosse citar todos, não caberiam nesta folha.

MUITO OBRIGADA.

SUMÁRIO

Página

RESUMO..... i

ABSTRACT..... ii

CAPÍTULO 1 - Citogenética do 'Citravo' [*Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] e seus genitores e análise isoenzimática de poliembriões

1	Introdução Geral.....	01
2	Referencial Teórico.....	03
2.1	Melhoramento genético dos citros.....	06
2.1.1	Dificuldades do melhoramento genético dos citros.....	08
2.2	Poliembriõnia: Ocorrência e importância em citros.....	09
2.3	Embriõnia adventícia.....	10
2.3.1	Expressão da embriõnia adventícia.....	12
2.4	Métodos de identificação dos embriões.....	13
2.4.1	Utilização da espécie <i>Poncirus trifoliata</i>	14
2.4.2	Análise de isoenzimas.....	16
2.4.3	Citogenética dos citros.....	21
3	Referências Bibliográficas.....	26

CAPÍTULO 2 – Citogenética do ‘Citravo’ [*Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] e seus genitores

1	Resumo.....	37
2	Abstract.....	38
3	Introdução.....	39
4	Material e Métodos.....	41
5	Resultados e Discussão.....	43
6	Conclusões.....	47
7	Referências Bibliográficas	48

CAPÍTULO 3 – Uso de marcadores isoenzimáticos para identificação de poliembriões do ‘Citravo’ [*Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.]

1	Resumo.....	50
2	Abstract.....	51
3	Introdução.....	52
4	Material e Métodos.....	55
5	Resultados e Discussão.....	57
6	Conclusões.....	65
7	Referências Bibliográficas.....	66
	Considerações Gerais	69
	Referências Bibliográficas	72

RESUMO

MEDEIROS, M.R. de. Citogenética do 'Citravo' [*Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] e seus genitores e análise isoenzimática de poliembrões. Lavras: UFLA, 1998. 73p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).

O presente estudo foi desenvolvido no campus da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, no período de março a dezembro de 1997, objetivando a utilização de metodologias para análise citogenética do 'Citravo' [*Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] e seus genitores, bem como a identificação precoce de seus poliembrões, mediante análise isoenzimática. Foram realizados dois experimentos, sendo a análise de isoenzimas conduzida no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Agricultura e a análise citogenética no Laboratório de Citologia e Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia. No primeiro experimento, empregaram-se os sistemas isoenzimáticos glutamato oxalacetato transaminase (GOT), esterase (EST) e enzima málica (ME) em gel descontínuo 1D-PAGE com 7,5% de poliacrilamida no gel separador e 4,5% no gel concentrador, utilizando o sistema tampão-eletrodo tris-glicina pH 8,9. No segundo experimento, para a análise citogenética, foram testadas: técnicas de pré-tratamentos (hidroxiquinoleína, colchicina e água gelada) e coloração (Feulgen, Giemsa 1, 2 e 3%, orceína lacto-propionica 1 e 2% e carmim acético 1 e 2%). Raízes de 'Citravo' [*Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] e seus genitores foram submetidos a hidrólise utilizando-se HCl 1N em banho-maria a 60°C por 30 a 45 minutos, para raízes oriundas de sementes germinadas ou 15 minutos, nas mesmas condições, para raízes oriundas de cultura de tecidos 'in vitro'. A coloração com solução de Giemsa a 4% com tampão fosfato pH 6,8, por 45 a 60 minutos, apresentou resultados satisfatórios. Concluiu-se que dos sistemas isoenzimáticos avaliados, a GOT apresentou potencial como marcador bioquímico para o 'Citravo' e a resolução alcançada permitiu a contagem dos cromossomas dos materiais em estudo, todos apresentando 18 cromossomas ($2n=2x=18$).

Comitê Orientador: Lisete Chamma Davide - UFLA (Orientadora), Moacir Pasqual - UFLA; Renata Silva Mamm - UFLA

ABSTRACT

MEDEIROS, M.R. de. Cytogenetical study of 'Citravo' [*Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] and its parents and isoenzymatic analysis of polyembryos. Lavras: UFLA, 1998. 73p. (Dissertation - Master Program in Genetic and Plant Breeding).

The present study was developed on the campus of the Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, over period from March to December, 1997, with a view to aiming at the utilization of methodologies for cytogenetical analysis of 'Citravo' [*Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] and its parents, as well as the early identification of its polyembrios by means of isoenzymatic analysis. Two experiments were undertaken, were conducted, the isoenzymatic analysis, at the Analysis of Seeds Laboratory of the Agriculture Department, and the cytogenetical analysis at the Cytology and Vegetable Anatomy Laboratory of the Biology Department. In the first experiment, for confirmation of the hybrid character of 'Citravo' as well as for the identification of zigotic embryos, the isoenzymatic systems glutamate oxalacetate transaminase (GOT), sterase (EST), malate dehidrogenase (MDH) and malic enzyme (ME) on interrupted gel 1D-PAGE with 7,5% of polyacrilamide on the separator gel and 4,5% in the concentrating gel, utilizing the buffer-electrode tris-glicine pH 8,9. In the second experiment, the staining technics (Feulgen, 1, 2 and 4% Giemsa, 1 and 2% lacto-propionic orcein and 1 and 2% acetic carmin) and as pre-treatments hydroxiquinolein, colchicin and iced water were utilized. Roots of [*Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] and their parents were submetiled to the modified convencional smashing technics, being that the hydrolisis was done by utilizing 1N HCl in water bath at 60°C for 30 to 45 minutes for roots from seeds germinated, or 15 minutes under the some conditions for roots from 'in vitro' tissue culture. The coloration with 4% Giemsa solution with phosphate buffer pH 6,8 for 45 to 60 minutes showed satisfactory results. It follows that of the isoenzymatic systems evaluated, GOT presented a potential as a biochemical marker for 'Citravo', and the resolution achieved enabled the count of the chromosomes of the materials under study, all presenting $2n=2x=18$ chromosomes.

Guidance Committee: Lisete Chamma Davide - UFLA (Major Professor), Moacir Pasqual - UFLA and Renata Silva Mann - UFLA

CAPÍTULO 1

Citogenética do 'Cravo' [*Citrus limonia* Osbeck Cv. Cravo X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] e seus genitores e análise isoenzimática de poliembrões

1 Introdução Geral

O Brasil é o maior exportador de suco de laranja concentrado e congelado (Panorama..., 1996). Apesar disso, a citricultura brasileira mostra-se muito vulnerável a doenças e pragas, visto que cerca de 80% de suas plantas são enxertadas sobre um único porta-enxerto, o limoeiro 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo), muito susceptível ao 'Declínio dos Citros' (Passos, 1980; Pompeu Júnior, 1991; Koller, 1994).

O aumento da variabilidade genética do porta-enxerto 'Cravo' pode ser obtido através da introgressão de genes, o que torna-se simples pela facilidade com que algumas plantas se cruzam, permitindo as mais variadas combinações intergenéricas, interespecíficas e intraespecíficas. Contudo, a dificuldade na distinção entre "seedlings" zigóticos e nucelares em cruzamentos que envolvem mães poliembrônicas, tem se constituído em obstáculo considerável ao trabalho de melhoramento genético dos citros, pois impedem a detecção de indivíduos que possam conter combinações genéticas de interesse. Essa identificação é ainda mais complexa face à competição desvantajosa destes "seedlings" com aqueles de origem nucelar, os quais, além da superioridade numérica, são, em regra, mais vigorosos (Soost e Cameron, 1975; Koller, 1994).

Por outro lado, caso um candidato a porta-enxerto seja aprovado, a identificação dos "seedlings" nucelares será de grande importância para a obtenção de linhagens em programas de clones nucelares. As plantas adultas de

clones nucelares apresentam muitas vantagens em relação às plantas matrizes, destacando-se maior vigor, maior produtividade e sanidade, em relação a viroses que não possuem insetos vetores (Salibe e Rodrigues, 1971; Salibe, 1987).

Diversos estudos têm sido realizados buscando contornar este problema de distinção de "seedlings". Marcadores genéticos, morfológicos e bioquímicos já são utilizados para este fim (Iglesias, Lima e Simon, 1974; Torres, Soost e Diedenhofen, 1978; Torres, Soost e Mau-Lastovicka, 1982; Ballve et al., 1991).

Um dos objetivos do programa de melhoramento de citros da Universidade Federal de Lavras é o aumento da variabilidade genética do limoeiro 'Cravo', visando contornar atuais e futuros problemas que a citricultura brasileira possa apresentar.

Para atingir esse propósito foi realizado um cruzamento intergenérico, no qual se utilizou, como genitor feminino, o *Citrus limonia* Osbeck cv. 'Cravo' e, como genitor masculino, o *Poncirus trifoliata* (L.) Raf, objetivando a transferência do gene de resistência ao Declínio. Deste cruzamento foi obtido o 'Citravo' (Ramos, 1990).

Os 'Citravos' obtidos apresentaram características morfológicas de folhas, flores e frutos muito contrastantes. Também foi observado que alguns exemplares eram poliembriônicos e outros não, sugerindo que os genótipos dos genitores eram heterozigóticos para esse caráter, indicando aumento da variabilidade. Por isso, de sete plantas de 'Citravo', somente uma foi selecionada, o 'Citravo 5', pelo fato desse exemplar ser poliembriônico e ter apresentado maior número de frutos.

O presente estudo foi realizado objetivando a utilização de metodologias para análise citogenética do 'Citravo' [*Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] e seus genitores, bem como a identificação precoce de seus poliembriões, mediante análise isoenzimática.

2 Referencial Teórico

Reconhece-se que a classificação taxonômica das plantas cultivadas, sobretudo daquelas propagadas vegetativamente, é extremamente complexa e quando se trata de plantas que apresentam fertilidade interespecífica e que foram submetidas a um intenso e longo período de hibridação natural, como é o caso dos *Citrus*, a situação torna-se ainda mais complicada. A apomixia, que possibilita a perpetuação dos híbridos considerados como espécies pelos taxonomistas, evidentemente é outro fator de complicação (Giacometti, 1991).

Segundo Amaral (1982) e Koller (1994), um outro fator que dificulta a classificação taxonômica das plantas cítricas é que estas apresentam mutações genéticas com certa frequência, originando ramos e frutos com características diferentes dos restantes da mesma árvore.

Resultam disso as freqüentes modificações verificadas na classificação, não havendo ainda concordância entre os taxonomistas com relação a um sistema convincente para a sub-família Aurantioideae e, particularmente, para o gênero *Citrus* (Giacometti, 1973, citado por Koller, 1994; Giacometti, 1991).

Os citros, segundo Amaral (1982), pertencem à grande divisão Angiospermas, classe Dicotiledônea, subclasse Arquiclamídea, ordem das Geraniales, subordem Geranedeae, família Rutaceae e subfamília Aurantioideae.

As espécies cítricas podem pertencer aos gêneros *Citrus*, *Poncirus*, *Fortunella*, *Clymenia* ou *Microcitrus*, que apresentam uma grande variabilidade e facilidade de hibridações naturais (Amaral, 1982). O gênero *Poncirus* possui somente a espécie *P. trifoliata* (Linn.) Raf., sendo conhecida pelo nome de 'limoeiro trifoliado' devido à natureza das folhas (Amaral, 1982).

Diversas são as técnicas taxonômicas atuais, segundo Giacometti (1991), como a análise de DNA através de enzimas de restrição (RFLP): a quimiotaxonomia, sendo os óleos essenciais, incluindo os componentes terpenóides e não terpenóides, preferivelmente mais indicados; a taxonomia numérica, que expandiu-se graças ao desenvolvimento dos computadores e do processamento eletrônico de dados, sendo menos intuitiva, procurando a correlação de caracteres, permitindo a busca de relações evolutivas e a microscopia eletrônica de varredura que possibilita a diferenciação das espécies de *Citrus* e gêneros afins através da análise das características morfológicas dos grãos de pólen, os quais mostram considerável variabilidade em tamanho, forma e nos padrões esculturais da exina.

Nos últimos 50 anos, os taxonomistas, tanto de animais como de plantas, passaram a se preocupar com as relações evolutivas das espécies e desenvolveram a classificação filogenética, que lança mão de técnicas mais seguras, pois permitem a confirmação dos resultados obtidos através dos caracteres morfológicos usados pela classificação natural.

O estudo das relações genéticas, taxonômicas e filogenéticas entre organismos pode ser facilitado por novos conhecimentos alcançados na molécula, como a análise de isoenzimas separadas por eletroforese. A hipótese básica é de que um gene e seu produto polipeptídico são colineares e que o total de variação nos padrões de proteínas obtido por eletroforese pode oferecer uma estimativa da variação presente no genoma, possibilitando uma identificação precoce e segura quanto a origem dos embriões (Alfenas et al., 1991).

As técnicas de cultura de células, tecidos e órgãos 'in vitro' surgem como opção promissora, tanto como meio para contornar problemas enfrentados na aplicação das técnicas convencionais, quanto para substituição de alguma destas técnicas para solução destes problemas (Guimarães et al., 1989). O meio MS

(Murashige e Skoog, 1962) é o mais utilizado na cultura de tecidos da grande maioria das espécies estudadas. Entretanto, procurando otimizar o crescimento 'in vitro' e obter a maximização da indução de sobrevivência e desenvolvimento de poliembriões, a adequação do meio de cultivo 'in vitro' para embriões de citros em diferentes estádios embrionários torna-se muito importante.

A cultura dos citros, de relevante importância econômica, há muito vem sendo objeto de intensivos programas de melhoramento direcionados, entre outros aspectos, para finalidades como precocidade de produção, qualidade dos frutos, resistência a doenças e adaptação a condições edafoclimáticas diversas.

No panorama mundial de produção de frutas, a laranja ocupa o primeiro lugar, oscilando entre 50,7 e 57,8 milhões de toneladas por ano, seguida pela uva com valores semelhantes e pela banana e maçã com valores em torno de 40 milhões de toneladas anuais cada uma, segundo FAO (1995).

Os métodos clássicos de melhoramento utilizados no desenvolvimento de porta-enxertos estão limitados a problemas peculiares a este grupo de plantas, tais como apomixia do tipo embrionia nucelar, elevadas taxas de heterozigose, esterilidade masculina e feminina, além do longo período juvenil (Cameron e Frost, 1968; Hearn, Hutchison e Barret, 1974; Soost e Cameron, 1975; Soost, Williams e Torres, 1980; Cunha e Soares Filho, 1988; Souza Júnior, Cunha Sobrinho e Soares Filho, 1994). Além destes problemas, os melhoristas de citros deparam-se com dificuldades para a distinção precoce de "seedlings" nucleares daqueles de origem sexuada, havendo freqüentemente a necessidade de desenvolver tais "seedlings" até a frutificação, compreendendo um período de 5 ou mais anos, para que os zigóticos possam ser identificados (Cameron e Frost, 1968; Soost e Cameron, 1975; Cunha e Soares Filho, 1988; Ramos, 1990; Ollitrault e Roca Serra, 1992; Souza Júnior, Cunha Sobrinho e Soares Filho, 1994).

Cultivares conhecidas pela não produção de embriões nucelares são geralmente usadas como progenitor feminino ou, no caso de programas dirigidos para obtenção de porta-enxertos, o caráter dominante que determina o aparecimento de folhas trilobadas, presente em *Poncirus trifoliata*, é empregado como gene marcador. Tais medidas, apesar de apresentarem resultados satisfatórios em alguns experimentos, não são confiáveis devido a existência de plantas heterozigóticas, além de limitarem as possibilidades de cruzamento que poderiam ser realizados, o que implica na urgência de se obter um confiável conjunto de marcadores genéticos além dos poucos disponíveis.

Identificação de embriões zigóticos e nucelares de citros por análise eletroforética isoenzimática tem se mostrado muito eficiente em programas de melhoramento genético (Iglesias, Lima e Simon, 1974; Esen e Soost, 1974a; Esen e Soost, 1974b; Torres, Soost e Diedenhofen, 1978; Esen e Soost, 1976; Esen, Soost e Geraci, 1979; Soost, Williams e Torres, 1980; Ollitrault e Roca Serra, 1992; Cheng e Roose, 1995).

2.1 Melhoramento genético dos citros

Os primeiros trabalhos de melhoramento dos citros foram iniciados por W.T Swingle & H.J. Weber, em 1883, objetivando inicialmente resistência a doenças e, logo a seguir, resistência ao frio, mediante hibridações com *Poncirus trifoliata* (Soost e Cameron, 1975).

O melhoramento dos citros pode ter diversos objetivos, dependendo dos problemas de cultivo existentes nas regiões produtoras. No Brasil, os principais objetivos são a resistência ao Cancro Cítrico e ao Declínio, bem como a tolerância à Tristeza. Diversas instituições de pesquisa, tanto nacionais como internacionais, preocupam-se com a realização de estudos que possam servir de suporte ao desenvolvimento do melhoramento genético de citros. Entretanto,

poucos são os conhecimentos disponíveis sobre o controle genético da grande maioria dos caracteres relacionados a esse importante grupo de plantas (Santos Filho, Dantas e Cabral, 1986; Cunha e Soares Filho, 1988; Machado, 1992; Machado, 1997). Devido à elevada heterose observada em citros, nas progênes de natureza zigótica provenientes de hibridações, os caracteres fenotípicos não são uniformes, conforme se verifica por uma ampla variação de fenótipos na geração F₁ (Furr, 1969).

Atualmente, os projetos de pesquisa relacionados ao melhoramento de citros são dirigidos à criação de novas variedades de copa e porta-enxerto melhor adaptadas aos trópicos. Os maiores objetivos do melhoramento genético de citros têm sido: obtenção de variedades porta-enxerto ananizantes com a finalidade de diminuir os espaçamentos e, conseqüentemente, aumentar o estande e a produtividade; obtenção de variedades porta-enxerto resistentes ou tolerantes a estresses ambientais como seca, salinidade, resistência a doenças e obtenção de variedades copa precoces e de meia estação. (Salibe e Rodriguez, 1969; Salibe e Rodriguez, 1971; Platt e Opitz, 1973; Hearn, Hutchison e Barret, 1974; Hoffmann e Fachinello, 1980; Ieki, 1981; Pompeu Júnior, Figueiredo e Pio, 1983; Moore, 1986; Castle, 1987; Salibe, 1987; Ollitrault, 1992; Salibe et al., 1992; Zekri, 1993; Koller, 1994).

A hibridação é um processo de melhoramento de citros que vem sendo utilizado por técnicos de muitos países há bastante tempo, sem que grandes resultados fossem obtidos. Isso deve-se, principalmente, ao fato de a maioria das espécies e variedades apresentarem sementes altamente poliembrionicas e também devido às formas poliembrionicas terem normalmente uma constituição genética extremamente heterozigota. A produção de híbridos com características superiores é sempre desejável e alguns projetos nesse sentido estão em

desenvolvimento, tanto para copas como para porta-enxertos (Pompeu Júnior, Figueiredo e Pio, 1983).

A seleção massal é o método mais comum e também parece ser o mais adequado para o melhoramento de plantas cítricas. Nos citros é bastante conhecida a ocorrência de mutações, espontâneas ou induzidas. É através da seleção desse material superior que têm sido obtidos os melhores resultados em todo o mundo (Pompeu Júnior, Figueiredo e Pio, 1983).

Porém, devido à necessidade de intensificar esforços para obter-se maior variabilidade, principalmente com porta-enxertos, já que o mais difundido, o *Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo, ocupa praticamente 80% dos pomares brasileiros acarretando grande vulnerabilidade genética (Passos, 1980; Pompeu Júnior, 1991; Koller, 1994) e também à relativa facilidade de cruzamentos entre os citros, a hibridação pode ser uma boa alternativa para programas de melhoramento dos citros.

2.1.1 Dificuldades do melhoramento genético dos citros

Nos citros é relativamente fácil a obtenção de cruzamentos intervarietais e interespecíficos, bem como intergenéricos, que podem ocorrer naturalmente, facilitados pelo próprio aspecto morfológico das suas flores.

Segundo Nassar (1991), citado por Koller (1994), cada flor dos citros contém de quatro a cinco pétalas brancas ou avermelhadas e purpúreas em algumas espécies. O número de estames varia de vinte a quarenta e o pistilo é único. A receptividade do estigma das flores inicia-se dois dias antes da abertura dos botões florais, prolongando-se até dois dias após a abertura das pétalas. A deiscência das anteras ocorre após a abertura das flores. O pólen é pegajoso, caracterizando polinização entomófila que favorece cruzamentos, daí resultando

em elevada heterozigose. A autopolinização também é freqüente devido à proximidade das anteras com o estigma.

Assim sendo, seria relativamente fácil incorporar numa variedade as características desejáveis existentes em outras variedades, espécies e gêneros. Entretanto, a elevada heterozigose das plantas cítricas e a complexidade dos mecanismos genéticos tornam muito difícil a obtenção dos resultados desejados, de sorte que os sucessos até agora alcançados são muito raros (Koller, 1994).

A poliembrionia das sementes da maioria das espécies e variedades de plantas cítricas é outro empecilho ao melhoramento porque, segundo Koller (1994), se, de um lado, a predominância da germinação dos embriões nucelares tem possibilitado a perpetuação natural de características varietais, por outro lado ela prejudicou a germinação dos embriões zigóticos ou híbridos e a distinção precoce dos "seedlings" híbridos dos nucelares.

2.2 Poliembrionia: ocorrência e importância em citros

A poliembrionia é um fenômeno de ocorrência freqüente em sementes de citros, caracterizada pelo desenvolvimento de dois ou mais embriões a partir de uma única semente.

Em programas de melhoramento via hibridação controlada objetivando reunir em uma planta as características desejadas de duas variedades ou cultivares, sejam da mesma espécie e gênero ou de espécies e gêneros diferentes, a poliembrionia é desvantajosa. Isto porque, freqüentemente, o embrião zigótico no melhoramento das sementes poliembriônicas de citros não germina sob condições naturais, dificultando os programas de melhoramento de porta-enxertos e copas. O que normalmente ocorre é o desenvolvimento de embriões originados de células nucelares localizadas ao redor do saco embrionário. Esses embriões, denominados nucelares ou adventícios, de origem somática, inibem competitivamente o

desenvolvimento do embrião zigótico, sendo da mesma constituição genética da planta mãe. O número de embriões presentes em sementes poliembriônicas de citros é variável, estando na dependência da cultivar em questão e até mesmo variando em uma mesma planta (Frost e Soost, 1968).

✕ A vantagem da poliembrião de sementes da maioria das cultivares de citros é a obtenção de clones nucelares, permitindo que, no Brasil, pela produção, seleção e cultivo de embriões nucelares, se conseguisse purificar de viroses as principais cultivares plantadas, com um progresso marcante no aumento de produtividade dos pomares de citros. Basicamente o processo consiste em polinizar as flores de uma cultivar com pólen de *Poncirus trifoliata*. Os híbridos resultantes apresentam folhas com três folíolos, permitindo identificar os "seedlings" nucelares, não resultantes da fecundação e, portanto, com características semelhantes às da planta mãe (Koller, 1994).

A poliembrião em citros é normalmente conseqüente da apomixia, forma de propagação vegetativa por sementes, que tem por princípio a formação de uma nova planta geneticamente idêntica àquela que lhe deu origem. A apomixia responsável pela poliembrião dos citros é do tipo embrião adventícia ou nucelar (Cameron e Frost, 1968; Hanna, 1991; Naumova, 1993).

2.3 Embrião adventícia

Muitas espécies e cultivares dos gêneros *Citrus*, *Poncirus*, *Fortunela*, *Mangifera* e *Syzygium*, têm a característica de reproduzir-se por apomixia do tipo agamospermia apospórica ou poliembrião, formando vários embriões a partir da diferenciação de células individuais do nucelo. Os embriões normalmente se originam e se desenvolvem na extremidade micropilar do nucelo, projetando-se para dentro do saco embrionário juntamente com o embrião de origem sexuada (Wilms et al., 1983; Pasqual, 1985). Como os embriões adventícios são

originados de células individuais do óvulo, externas ao megagametófito, esse processo é denominado apomixia esporofítica.

As células que formarão o embrião nucelar começam a se desenvolver primeiramente na região da chalaza, em seguida na região da micrópila e ao longo da lateral do saco embrionário. Entretanto, o crescimento dos embriões adventícios ou nucleares não ocorre na chalaza, mas quase que exclusivamente nas proximidades da micrópila (Esen e Soost, 1977; Bruck e Walker, 1985a, 1985b). Tais características parecem ser decorrentes da restrição de nutrientes na região da chalaza ou mesmo algum mecanismo promovido pelo saco embrionário para inibir a divisão das células iniciais aí localizadas (Wakana e Uemoto, 1987 e 1988). Para Esen e Soost (1977), ocasionalmente pode ocorrer a formação de embriões nucleares até mesmo na região da chalaza.

As células que darão origem ao embrião adventício não são circundadas por uma estrutura megagametofítica, mas sim pelas células nucleares. Em suma, a embriogênese nucelar gera um esporófito independente da estrutura do saco embrionário (Esan, 1973; Esen e Soost, 1977; Bruck e Walker, 1985a, 1985b; Koltunow, 1993) sendo que este se desenvolve diretamente de uma célula do nucelo (Cameron e Frost, 1968; Starrantino e Russo, 1980; Hanna, 1991; Naumova, 1993).

O grau de poliembrião ou o número total de embriões por semente pode ser influenciado pela cultivar, por condições ambientais, estado nutritivo do fruto, cultivar polinizadora. Para uma mesma espécie do gênero *Citrus*, tem sido encontrados de 1 a 40 embriões por nucelo (Cameron e Frost, 1968; Frost e Soost, 1968; Esen e Soost, 1977).

Polinização e fertilização são consideradas pré-requisito essencial para a embriogênese de citros (Frost e Soost, 1968; Kochba, Spiegel-Roy e Safran, 1972; Dobzhansky, 1973; Esen e Soost, 1977) visto que a fecundação é

necessária por estar diretamente ligada à formação do endosperma que alimentará o novo embrião. Porém, já tem sido registrada a formação de sementes em *C. sinensis* Osb. e *C. paradisi* Macf. (pomelo) e de embriões 'in vitro' sem polinização em meio de cultura rico em nutrientes (Pasqual, 1985). Há evidências de que, com certos híbridos interespecíficos, a polinização é definitivamente requerida, ao passo que algo menos claro é a necessidade de fertilização da célula-ovo que deve ocorrer de 3 dias a 4 semanas após a polinização, sendo que a divisão do zigoto inicia-se logo a seguir (Pasqual, 1985).

Em experimento com variedades cítricas poliembriônicas, Starrantino e Russo (1980) e Moore (1985 e 1986) também obtiveram, em condições de cultivo 'in vitro' de óvulos não fertilizados, embriões nucelares sem a ocorrência da fertilização, reforçando a hipótese de que a dupla fertilização, característica das angiospermas para a embrião nucelar, seria desnecessária, sendo importante apenas a fecundação do núcleo espermático com os dois núcleos polares para a formação do endosperma e conseqüente suprimento dos embriões.

Como existe em citros um elevado grau de heterozigose devido a polinização cruzada, facilidade de mutações espontâneas e prevaecimento da poliembrião, alelos recessivos são acumulados, tendo a embrião adventícia um importante papel na diferenciação evolucionária (Cameron e Frost 1968).

Além disso, por essas peculiaridades pode ser percebido o grande impacto da apomixia na agricultura dos países pobres, onde o agricultor pouco utiliza sementes híbridas, mas sim suas próprias sementes (Hanna, 1995).

2.3.1 Expressão da embrião adventícia

No gênero em estudo, somente duas espécies (*Citrus medica* e *Citrus grandis*) apresentam cultivares monoembriônicas. Para as outras espécies, o grau de poliembrião pode variar de acordo com as variedades. A poliembrião tem

caráter genético dominante e seu grau é determinado por pequeno número de genes dentro do gênero *Citrus* (Cameron e Soost, 1980).

Nas sementeiras de cultivares poliembriônicas, as proporções de descendentes zigóticos e nucelares variam em função das condições ambientais e segundo os polinizadores (Khan e Roose, 1988; Ollitrault e Rocca Serra, 1992). Devido às dificuldades na identificação precoce de "seedlings" zigóticos dos nucelares, muitas técnicas foram utilizadas para tentar elevar a proporção de zigóticos. Por isso, uma rigorosa escolha das condições ambientais, dos tratamentos químicos, a cultura 'in vitro' de embriões imaturos ou de óvulos, assim como irradiação de botões florais um mês antes da antese, permitem melhorar, sensivelmente, a obtenção de plantas híbridas. Segundo Ollitrault e Rocca Serra (1992), ainda é possível, para cultivares monoembriônicas, induzir a produção de clones nucelares, por meio de cultura 'in vitro' de nucelos separados.

2.4 Métodos de identificação dos embriões apomíticos

Um dos principais obstáculos ao melhoramento dos *Citrus*, via hibridação controlada, é a apomixia e a poliembrião, por isso é desejável ao fitomelhorista o quanto antes identificá-las. A utilização de isoenzimas como marcadores moleculares visa identificar precocemente (aos dois meses) o tipo de embrião resultante (Iglesias, Lima e Simon, 1974; Torres, Soost e Diedenhofen, 1978; Torres, Soost e Mau-Lastovicka, 1982; Wilms et al., 1983; Wakana e Uemoto, 1987, 1988).

O teste de progênie para alógamas pode ser utilizado como forma de identificação de plantas apomíticas, através da morfologia da descendência de plantas heterozigotas ou de polinização aberta, indicando o tipo de reprodução predominante e a sua frequência, se é facultativa ou obrigatória (Schulz-Schaeffer, 1980). Também podem ser identificadas pela produção de progênie

maternal de mãe homocigota recessiva, ou mesmo pelo alto número de sementes viáveis e/ou progênie maternal uniforme, em plantas com número de cromossomas irregular (Schulz-Schaeffer, 1980).

Há tendência de utilização de marcadores moleculares para os genes que controlam a apomixia já no estado de 'seedlings', entretanto, a técnica não identifica se esta apomixia é facultativa ou obrigatória (Hanna, 1995).

Os testes citológicos são mais rápidos que as técnicas convencionais para identificação do tipo de reprodução podendo-se, inclusive, no caso da reprodução assexuada, detectar a forma existente. Técnicas de clareamento do óvulo e sua observação possibilitam melhor descrição dos sacos embrionários formados, com apenas dois a três dias após a coleta desses óvulos (Young, Sherwood e Bashaw, 1979), o que pode possibilitar a identificação da embrião adventícia ainda na antese. As células do nucelo que vão originar os embriões adventícios já mostram uma estrutura diferenciada (citoplasma denso) antes da polinização; são as células denominadas "iniciais" ou "primordiais" (Wilms et al., 1983). Nas cultivares monoembriônicas de citros não há formação destas células iniciais (Moore, 1985).

As variedades cítricas monoembriônicas produzem somente o embrião sexual, a não ser que haja uma ocasional duplicação ou triplicação do embrião (Cameron e Soost, 1980).

2.4.1 Utilização da espécie *Poncirus trifoliata*

A utilização do *Poncirus trifoliata* como polinizador de 'Citros' tem sido empregada para, além da transferência de resistência ao Declínio, a identificação de "seedlings" zigóticos, já que o caráter trifoliado deste mostra completa dominância sobre a condição monofoliada presente no gênero *Citrus*.

O uso de *P. trifoliata* como marcador morfológico apresenta, apesar de ser uma técnica simples, resultados duvidosos, visto que padrões de segregação em gerações avançadas sugerem que dois genes principais, ou talvez um gene duplicado, estejam envolvidos na herança do caráter (Cameron e Frost, 1968; Iglesias, Lima e Simon, 1974; Soost e Cameron, 1975; Cunha e Soares Filho, 1988; Pio, 1993; Souza Júnior, Cunha Sobrinho e Soares Filho, 1994).

O emprego de *P. trifoliata* como parental obrigatório, estreita a base genética para a obtenção de híbridos (Iglesias, Lima e Simon, 1974), além de ser incompatível com a principal variedade copa utilizada no Brasil, a laranjeira 'Pera' (*C. sinensis*), segundo Souza Júnior, Cunha Sobrinho e Soares Filho (1994).

Toxopeus (1962) observou que em alguns híbridos de *C. grandis* com limão 'Meyer' *C. meyeri* Tan. houve uma tendência em apresentar pequeno número de folhas trilobadas. De forma semelhante, este autor verificou que cruzamentos entre *C. grandis* e *C. hystrix* deram origem a algumas plantas trifoliadas, percebendo-se, apesar do reduzido número de 'seedlings' F₁, uma relação de 3 plantas monofoliadas: 1 planta trifoliada. Com base nestes resultados, Toxopeus (1962) propõe que o caráter trifoliado seja governado por dois genes, C e D, de ação complementar, sugerindo para *C. grandis* o genótipo Ccdd (ou ccDd) e para *C. hystrix* ccDd (ou Ccdd), de modo que cruzando essas espécies obter-se-ia uma população F₁ segregando para a presença de folhas trilobadas na relação dada. Considerando-se a dominância do caráter trifoliado de *Poncirus* sobre o monofoliado de *Citrus*, o referido pesquisador sugere também que *P. trifoliata* seja homocigoto para os genes C e D.

Existem, porém, evidências indicativas de que muitas plantas de *Poncirus*, que é um gênero monotípico, sejam heterocigotas para esse caráter, sendo por isso um marcador morfológico pouco confiável (Iglesias, Lima e

Simon, 1974; Torres, Soost e Diedenhofen, 1978, Torres, Soost e Mau-Lastovicka, 1982; Cunha e Soares Filho, 1988; Souza Júnior, Cunha Sobrinho e Soares Filho, 1994; Cheng e Roose, 1995). Além disso, o emprego de *P. trifoliata* como progenitor obrigatório estreita a base genética para a obtenção de híbridos.

2.4.2 Análise de isoenzimas

Marcadores genéticos são quaisquer características, processos bioquímicos ou fragmentos de DNA que permitam a distinção de indivíduos geneticamente diferentes.

O sucesso de um programa de melhoramento genético depende, em parte, da variabilidade genética dos progenitores. Portanto, a sua avaliação é extremamente importante em programas envolvendo hibridações, por fornecer parâmetros para identificação de progênes que, quando cruzados, possibilitam maior efeito heterótico na progênie e a maior probabilidade de obter genótipos superiores nas gerações segregantes (Price et al., 1984; Bordignon, Medina Filho e Ballve, 1990; Amaral Júnior et al., 1996).

Um dos mais difíceis problemas no melhoramento genético de plantas é a identificação de progênes que contêm a recombinação gênica desejável para as características de interesse. Do ponto de vista do melhorista, dois fatores estão envolvidos nesse processo: a criação da variabilidade e a seleção. Para a maioria das espécies de importância agrônômica, a criação de variabilidade é obtida pela hibridação entre genitores contrastantes. A identificação de recombinantes superiores dentro das populações segregantes requer a utilização de sistemas de avaliação das características de interesse (Borém, 1997).

Em caso de plantas apomíticas, a identificação das progênes é também de suma importância para o sucesso do melhoramento. Em consequência da

poliembrião, surge a dificuldade de identificação das plantas híbridas originadas de cruzamentos controlados. As progênes, por via de regra, constituem-se numa mistura de híbridos e de clones nucleares idênticas ao progenitor feminino (Frost e Soost, 1968; Iglesias, Lima e Simon, 1974; Torres et al., 1978; Torres, Soost e Diedenhofen, 1978; Torres, Soost e Mau-Lastovicka, 1982, Torres et al., 1985; Moore e Castle, 1988; Roose e Traugh, 1988; Abdullah et al., 1990; Ballve et al., 1991; Ollitrault, Ollitrault e Cabasson, 1992; Koller, 1994).

Um dos sistemas tradicionalmente usados na determinação da variabilidade têm sido os marcadores morfológicos. No entanto, tais marcadores, na maioria das vezes, necessitam de muitos anos para serem eficientemente avaliados, implicando no alto custo de implantação de pomares que nem sempre se mostram úteis, por erros na identidade das plantas devido a falhas na identificação e/ou misturas de gemas, plântulas, sementes, estacas, pólen e cruzamentos não efetivos durante as fases do programa de melhoramento. Além disso, nem sempre é possível encontrar um bom marcador morfológico que não sofra influências ambientais ou que apresente correlação juvenil-adulto.

Atualmente, o método mais promissor na identificação precoce de híbridos de citros a análise de padrões isoenzimáticos obtidos por eletroforese (Iglesias, Lima e Simon, 1974; Torres et al., 1978; Torres, Soost e Diedenhofen, 1978; Torres, Soost e Mau-Lastovicka, 1982, Torres et al., 1985; Moore e Castle, 1988, Roose e Traugh, 1988; Hidaka e Omura, 1989; Ballve et al., 1991). Essa técnica também tem se mostrado promissora em estudos de outras espécies frutíferas, como a identificação de híbridos de pêsego e mamão, como marcadores isoenzimáticos em abacate, noz e uva, e para caracterização de cultivares de damasco, morango, maçã, amêndoa e ameixa (Tanskley e Orton, 1987).

Muitas técnicas bioquímicas foram experimentadas para distinguir precocemente "seedlings" zigóticos de nucelares, como análise de óleo essencial das folhas (Pieringer e Edwards, 1967) e análises isoenzimáticas, sendo que estas últimas são mais uma performance para análise de rotina (Iglesias, Lima e Simon, 1974; Torres et al., 1978; Torres, Soost e Diedenhofen, 1978; Torres, Soost e Mau-Lastovicka, 1982; Torres et al., 1985; Moore e Castle, 1988, Roose e Traugh, 1988; Hidaka e Omura, 1989; Ballve et al., 1991).

Pela relativa simplicidade, baixo custo e a possibilidade de analisar vários locos simultaneamente, o que permite a diferenciação de indivíduos intimamente ligados e, ainda, o fato de se constituir um produto direto da ação gênica, é que a análise de isoenzimas tem se tornado cada vez mais confiável em relação a outros métodos baseados na avaliação de características morfológicas. A principal vantagem da técnica eletroforética isoenzimática é a codominância, sendo que esta interação alélica caracteriza-se pelo fenótipo do heterozigoto apresentar-se como uma mistura dos fenótipos de seus progenitores homozigóticos, estando os dois alelos presentes no heterozigoto ativos e independentes. Em termos bioquímicos, cada alelo do heterozigoto condiciona a formação de um polipeptídeo ou enzima (Ramalho, Santos e Pinto, 1995).

A avaliação e interpretação de um conjunto de caracteres, para determinação daqueles que efetivamente contribuem para a discriminação genotípica, são altamente desejáveis no início de qualquer programa de melhoramento genético, por isso, acredita-se que o uso de marcadores bioquímicos isoenzimáticos possa ser alternativa promissora para identificação de embriões oriundos de espécies poliembriônicas, como os citros.

O termo isoenzima foi proposto por Markert e Moller para as múltiplas formas moleculares de uma enzima, compartilhando uma atividade catalítica, derivada de um tecido de um organismo isolado (Peirce e Brewbaker, 1973).

A eletroforese em gel pode mostrar que a estrutura primária do polipeptídeo varia entre os indivíduos. A variação pode ser diretamente associada com diferenças genéticas. Esta técnica permite a caracterização, na molécula, da quantidade e tipos de variabilidade genética em populações de qualquer organismo e uma estimativa da extensão da diversidade genética entre as espécies.

As isoenzimas são controladas geneticamente por um ou vários genes, que podem ser alelos situados em um mesmo loco ou em locos diferentes, respectivamente (Tanskley e Orton, 1983; Alfenas et al., 1991). A variabilidade dos padrões enzimáticos de uma população é geralmente atribuída à segregação genética e designada polimorfismo. A expressão isoenzimática é codominante, sendo ambos os alelos de um loco de um indivíduo diplóide expressos e visualizados. As bandas visualizadas em um zimograma podem representar isoenzimas codificadas por mais de um loco gênico em um mesmo gel, sendo a migração de bandas de cada loco visualizada em zonas distintas (Iglesias, Lima e Simon, 1974; Soost, Williams e Torres, 1980; Tanskley e Orton, 1983; Padma e Reddy, 1988; Alfenas et al., 1991; Alfenas, 1998).

A vantagem da técnica de eletroforese está no fato de que a variação do padrão de bandas pode ser diretamente associada à variação nos genes que codificam as enzimas variantes. O padrão de bandas é tratado como um fenótipo analisado por testes genéticos que determinam quais bandas são codificadas por genes alélicos e quais são especificadas por genes em diferentes locos. Além da vantagem da codominância, a análise é bastante simplificada porque as bandas sempre segregam como fatores mendelianos simples (Gottlieb, 1971; Alfenas et al., 1991; Kunieda, 1992; Santos, 1992; Rodrigues, 1995; Gomide 1996; Alfenas, 1998).

As isoenzimas foram os primeiros marcadores genéticos estudados em citros (Button, Vardi e Spiegel-Roy, 1976; Torres, Soost e Diedenhofen, 1978).

Depois que Iglesias, Lima e Simon (1974) verificaram que diferenças nos padrões isoenzimáticos poderiam ser empregadas no reconhecimento de "seedlings" zigóticos e nucelares em grupos taxonômicos poliembrionicos dos citros, diversos estudos foram conduzidos objetivando a avaliação de vários sistemas enzimáticos capazes de possibilitar uma rápida e segura distinção destes dois grupos de "seedlings" (Button, Vardi e Spiegel-Roy, 1976; Esen e Scora, 1977; Torres, Soost e Didenhofen, 1978; Soost, Williams e Torres, 1980; Torres, Soost e Mau-Lastovicka, 1982; Sawazaki et al., 1992; Souza Júnior, Cunha Sobrinho e Soares Filho, 1994).

A análise do polimorfismo isoenzimático pode ser igualmente usada em programas 'in vitro' para ter certeza da origem somática dos calos e embriões obtidos em cultura de óvulos (Ollitraul et al., 1988, citados por Ollitraul e Rocca Serra, 1992) ou verificar o produto de programas de fusões somáticas.

Apesar das limitações devido à variabilidade genética dos genitores, as isoenzimas málica (ME), peroxidases (PO), esterases (ES), malato desidrogenase (MDH), fosfoglucomutase (PGM), fosfoglucoisomerase (PGI) e glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) têm sido analisadas em plântulas de poucos dias 'in vitro' e oferecem boas perspectivas no programa de melhoramento de citros na seleção de "seedlings" zigóticos nos primeiros estágios de desenvolvimento das progênes (Iglesias, Lima e Simon, 1974; Button, Vardi e Spiegel-Roy, 1976; Soost e Williams e Torres, 1980; Torres et al., 1985; Moore e Castle, 1988; Roose e Traugh, 1988; Sawazaki et al., 1992; Souza Júnior, Cunha Sobrinho, Soares Filho, 1994).

Nesses casos, os marcadores isoenzimáticos têm importante função porque não só permitem uma seleção da planta muito precocemente, além do menor custo e economia de tempo. Em muitos casos de identificação da planta, a presença de pólen ou cruzamentos indesejáveis podem ser detectados, o que

contribui para a redução do tamanho dos experimentos de seleção. A análise de divergência genética entre um grupo de genitores, baseada em padrões isoenzimáticos, tem sido avaliada com objetivo de identificar as combinações híbridas, possibilitando a recuperação de genótipos superiores nas gerações segregantes (Price et al., 1984; Gomide, 1996). Além disso, segundo Cruz e Regazzi (1994), citados por Gomide (1996), a avaliação da divergência genética, com base em evidências científicas, também é de grande importância no contexto da evolução das espécies, uma vez que provê informações sobre recursos disponíveis e auxilia na localização e no intercâmbio dos mesmos.

Porém, segundo Price et al. (1984) e Werner, (1992), a eficiência das isoenzimas como marcadores biológicos naturais para a quantificação da variabilidade genética baseia-se em um pré-requisito essencial, que é a ocorrência de polimorfismo.

2.4.3 Citogenética dos citros

O número de cromossomas no gênero *Citrus* é $2n = 18$ (Esen e Soost, 1971; Rocca Serra e Ollitrault, 1992). No entanto, "seedlings" e plantas adultas poliplóides têm sido encontradas (Murkherjee e Cameron, 1958; Esen e Soost, 1971; Ollitrault e Rocca Serra, 1992; Oiyama, 1992; Rocca Serra e Ollitrault, 1992). Alguns poliplóides foram identificados (*Fortunella hindsii*, limão Tahiti) ou produzidos artificialmente (Oiyama, 1983; Rocca Serra e Ollitrault, 1992). A diploidia é regra igualmente válida para os onze gêneros seguintes da sua subfamília Aurantiodeae: *Severinia*, *Triphasia*, *Citropsis*, *Aeglopsis*, *Feronia*, *Murraya*, *Afraegle*, *Atalantia*, *Clausena*, *Eremocitrus*, *Micromelum*, segundo Esen e Soost (1971) e Iwamaşa e Nito (1988), citados por Rocca Serra e Ollitrault (1992).



Nas sementeiras de sementes poliembriônicas, a frequência de tetraplóides espontâneos varia de 1 a 3%; a poliembrião age sob efeito genético mas pode ser modificada por fatores fisiológicos e ambientais. Iwamasa e Nito (1988), citados por Rocca Serra e Ollitrault (1992), observaram entre 1% a 20% de poliplóides em algumas variedades cítricas. Tais tetraplóides seriam provenientes de uma duplicação do complemento cromossômico de células nucelares do óvulo antes da embriogênese somática ou durante a megasporogênese (Barrett e Hutchison 1982, citados por Rocca Serra e Ollitrault, 1992).

Alguns triplóides podem ser igualmente obtidos nas descendências de hibridação interespecíficas ou intergenérica entre diplóides, sendo derivados da fecundação de um gameta feminino não reduzido por um gameta masculino haplóide. A frequência de gametas não reduzidos varia, segundo o genótipo, entre menos de 1% a cerca de 20% (Esen e Soost, 1971). Segundo Oiyama (1992), cruzamentos de tetraplóides 'kawano-natsudaidai' com várias cultivares diplóides resultam na produção de embriões maduros, os quais se desenvolvem em 30-49% das sementes obtidas. A triploidia tem como consequência a esterilidade gamética. Poucos triplóides naturais foram identificados, sendo o limão 'Tahiti' o mais conhecido (Rocca Serra e Ollitrault, 1992). Esen e Soost (1972) observaram alguns aneuplóides vindos de cruzamentos diplóides com tetraplóides, com número de cromossomas variando entre 19 a 41. Os autores também verificaram que níveis de ploidia superiores a 4x são raros.

Soost e Cameron (1975) e Rocca Serra e Ollitrault (1992) notaram que, apesar de uma aptidão não negligenciável para produzir descendentes triplóides ou tetraplóides, a poliploidia parece cumprir um papel negligenciável na evolução dos citros. Isso poderá ser explicado pelo baixo vigor e fertilidade nesses níveis de ploidia, sendo uma desvantagem seletiva evolutiva. Além disso, as cultivares tetraplóides têm como características baixos rendimentos, casca do fruto fina e

irregular, de pouco interesse para o consumo humano. Mas constituem importantes genitores, em cruzamentos com diplóides, objetivando-se variedades triplóides aspermas.

No gênero *Citrus*, com propósito de maior precisão da análise cariotípica, algumas metodologias têm sido empregadas. Uma delas é a maceração enzimática para degradação da parede celular ao invés do método convencional de agitação, tal como o proposto por Nishiyama (1960) citado por Ito et al. (1992), feito com as cultivares 'Yuzu' (*C. junos* Sieb. ex Tanaka), tangerina 'Dancy' (*C. reticulata* Blanco), laranja 'Trovita' (*C. sinensis* Osbeck) e limão 'Lisbon' (*C. limon* Burm. L.).

O emprego de técnicas de bandeamento também tem sido utilizado objetivando uma análise cariotípica mais precisa para o mapeamento e engenharia cromossômica. Estes métodos foram importantes, por exemplo, para construção de mapas citológicos de *Oryza sativa*, *Prunus* e *Diospyrus*. (Ito et al., 1992). Em *Citrus*, o fluorocromo DAPI induziu forte banda fluorescente sob iluminação UV, fornecendo imagens bem claras dos cromossomas nas prometáfases. Segundo esses autores, os corantes DAPI e Giemsa podem produzir bandas específicas com algumas modificações dos processos de coloração, permitindo estudos sobre a forma dos cromossomas.

Entretanto, a dificuldade na observação dos cromossomas de espécies frutíferas arbóreas está na observação dos mesmos (Murkherjee e Cameron, 1958; Esen e Soost, 1971; Soost e Cameron, 1975; Oiyama, 1981; Ito et al., 1992). Em espécies de citros, este fato tem levado a maioria dos trabalhos a identificarem somente o número de cromossomas e características como constrições secundárias através de técnicas de coloração convencional.

No trabalho desenvolvido por Esen e Soost (1971), feito com as cultivares Okitsu da linhagem 'Yuzu' (*Citrus junus* Sieb. ex Tanaka), tangerina 'Dancy'

(*C. reticulata* Blanco), laranja 'Trovita' (*C. sinensis* Osbeck), laranja 'Valencia' (*C. sinensis* Osbeck), limão 'Lisbon' (*C. limon* Burm. L'q.) e 'Ben-di-zao' (*C. succosa* hort. ex Tanaka), foram utilizadas raízes pré-tratadas com o-isopropil-N-fenilcarbanato (IPC) e coloração com orceína lacto-propiónica. Com essa técnica, os autores conseguiram boa contração e visualização dos cromossomas e observaram ainda aneuplóides em algumas cultivares estudadas, com o número de cromossomas variando entre 19 a 41, não sendo mencionada a presença de constrição secundária. A observação de aneuplóides em citros pode ser confundida com a presença de constrições secundárias (Guerra et al. 1997) já que estas podem dar a impressão de tratarem-se de cromossomas inteiros.

A técnica de Oiyama, feita com as cultivares tangerina 'Clementine' (*C. clementina* Hort. ex. Tanaka), 'Ellendale', 'Mediterranean Sweet' (SW: *C. sinensis* Osbeck), 'Kanton Orange' e 'Kawano-natsudaidai' (*C. natsudaidai* Hayata), foi baseada no pré-tratamento em solução 0,002M 8-hidroxiquinoleína e coloração em solução de orceína lacto-propiónica, apresentando bons resultados quanto a condensação e dispersão dos cromossomas, aumentando a frequência de células com boa coloração. Poliplóides foram observados, não sendo mencionada a presença de aneuplóides nem constrições secundárias (Oiyama, 1981; Oiyama, 1983; Oiyama e Kobayashi, 1990, 1991; Oiyama et al., 1991; Oiyama, 1992).

Bons resultados também foram encontrados por Murkherjee e Cameron (1958) para *Poncirus trifoliata* diplóide e tetraplóide, mesmo sem pré-tratamento e com coloração com orceína acética. Os autores não mencionaram a presença de constrições secundárias.

A detecção de níveis diferentes de ploidia no material biológico estudado é possível, haja vista que, em culturas de citros encontram-se, com relativa facilidade, indivíduos poliplóides (Oiyama, 1983; Rocca Serra e Ollitrault, 1992),

Além disso, a frequência de gametas não reduzidos varia segundo o genótipo, entre 1% a cerca de 20% em citros (Esen e Soost, 1971).

A constrição secundária é controlada geneticamente e, em função da dominância, é um marcador citológico com possibilidade de evidenciar a hibridação. Em estudos entre diferentes espécies do gênero *Crepis*, ficou comprovada a existência de uma série alélica com graus variáveis de dominância. Por meio de cruzamento intergenérico, o híbrido passava a apresentar as RONS dos genitores. Como as constrições secundárias variam em posição nos cromossomas entre espécies diferentes e a RON ativa se manifesta na metáfase como constrição secundária, é possível identificar qual RON está ativa e a proveniência de um dos genitores (Swanson, Merz e Young, 1981). Assim, pelo fato de o 'Citravo' ser oriundo de cruzamento intergenérico, a constrição secundária é uma alternativa para a identificação do híbrido e seus genitores.

3 Referências Bibliográficas

- ABDULLAH, G.; COUMANS, M.; VILLEMUR, P.; JONARD, R. Les hybridations intergénériques entre *Poncirus trifoliata* L. Raf. et *Citrus meyeri* Y. Tan. ou Tangelo nova: La détermination par l'électrophorèse des embryons zygotiques ou nucellaires chez les plantes issues des hybridations *P. trifoliata* x Tangelo nova. *Fruits*, Paris, v.45, n.6, p.591-597, Nov./Dec.1990.
- ALFENAS, A.C. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, 1998. 574p.
- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais. Viçosa: SIF, 1991. 242p.
- AMARAL, J.D. Os citrinos. Lisboa: Clássica, 1982, 3 ed. p.25-45.
- AMARAL, JÚNIOR, A.T.do; CASALI, V.W.G.; FINGER, F.L.; CRUZ, C.D.; SILVA, L.F.C. da. Variabilidade morfo-agronômica e isoenzimática entre acessos de moranga (*Cucurbita maxima* Duch.). *Revista Ceres*, Viçosa, v.43, n.249, p.581-590, set./out. 1996.
- BALLVE, R.M.L.; BORDIGNON, R.; MEDINA FILHO, H.P.; SIQUEIRA, W.J.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; POMPEU JÚNIOR, J. Isoenzimas na identificação precoce de híbridos e clones nucelares no melhoramento de citros. *Bragantia*, Campinas, v.50, n.1, p.57-76, abr. 1991.
- BARROS, L.M. Caracterização morfológica e isoenzimática do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), tipos comuns e anão precoce, por meios de técnicas multivariadas. Piracicaba: USP/ESALQ, 1991. 256p. (Tese - Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- BORDIGNON, R.; MEDINA FILHO, H.P.; BALLAVE, R.M.L. Melhoramento genético de citros no Instituto Agronômico. *Laranja*, Cordeirópolis, v.11, n.1, p.167-176, 1990.
- BORÉM, A. Melhoramento de plantas. Viçosa: UFV, 1997. 547p.

- BRUCK, D. K.; WALKER, D. B. Cell determination during embryogenesis in *Citrus jambhiri* II. Epidermal differentiation as a out-time event. **American Journal of botany**, Columbus, v.72, n.10, p. 1602-1609, Oct. 1985a.
- BRUCK, D.K.; WALKER, D.B. Cell determination during embryogenesis in *Citrus jambhiri*. I. Ontogeny of the epidermis. **Botanical Gazette**, Chicago, v.146, n.2, p.188-195, June 1985b.
- BUTTON, J.; VARDI, A.; SPIEGEL-ROY, P. Root peroxidase isoenzymes as an aid in *Citrus* breeding and toxonomy. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.47,n.2, p.119-123, 1976.
- CAMERON, J. W.; SOOST, R.K. Sexual and nucellar embryony in F₁ hybrids and advanced crosses of *Citrus* with *Poncirus*. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.104, n.3, p.408-110, May 1980.
- CAMERON, J.W. ; FROST, H.B. Genetics, breeding, and nucellar embryony. In: REUTHER, W., BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J. (eds.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1968. v.2, p.325-370.
- CASTLE, W.S. Citrus rootstocks. In: ROM, R.C.; CARLSON, R.F. **Rootstocks for fruit crops**. New York: A Wiley-Interscience Publication, Johnwiley & Sons, 1987. p.361-399.
- CHENG, F.S.; ROOSE, M. Origin and inheritance of dwarfing by the citrus rootstock *Poncirus trifoliata* 'Flying Dragon'. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.120, n.2, p.286-291, Mar. 1995.
- CUNHA, M.A.P. da; SOARES FILHO, W.dos S. Melhoramento genético dos citros: novas variedades copa e porta-enxerto. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.10, n.3, p.63-70, abr. 1988.
- DOBZHANSKY, T. **Genética do processo evolutivo**. São Paulo: Polígono, 1973. 453p.
- ESAN, E. B. **A detailed study of adventive embryogenesis in the Rutaceae**. Riverside: University of California, 1973. 233p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia).
- ESEN, A. ; SOOST, R.K. Inheritance of browning of young shoot extracts of *Citrus*. **The Journal of Heredity**, Baltimore, v.65,n.2, p.97-100, Feb. 1974a.

- ESEN, A.; SCORA, R.W. Amylase polymorphism in *Citrus* and some related genera. **American Journal of Botany**, Baltimore, v.64, n.3, p.305-309, Marc. 1977.
- ESEN, A.; SCORA, R.W. Amylase polymorphism in *Citrus* and some related genera. **American Journal of Botany**, Baltimore, v.64, n.3, p.305-309, Marc. 1977.
- ESEN, A.; SOOST, R. K.; GERACI, G. Genetic evidence for the origin of diploid megagametophytes in *Citrus*. **The citrus industry: anatomy, physiology, genetics, and reproduction**. Riverside: University of California, 1979. v.2, n.1, p.5-8.
- ESEN, A.; SOOST, R.K. Aneuploidy in citrus. **American Journal of Botany**, Columbus, v.59, n.3, p.473-477, Mar. 1972
- ESEN, A.; SOOST, R.K. Peroxidase polymorphism in *Citrus*. **The Journal of Heredity**, Baltimore, v.67, n.4, p.199-203, Aug. 1976.
- ESEN, A.; SOOST, R.K. Polyphenol oxidase-catalysed browning of young shoot extracts of *Citrus* taxa. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.99, n.6, p.484-489, Nov. 1974b.
- ESEN, A.; SOOST, R.K. Unexpected triploids in *Citrus*: their origin, identification and possible use. **The Journal of Heredity**, Baltimore, v.62, n.5, p.329-333, Nov./Dec. 1971.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAO Yearbook Anuaire Production**. Roma, 1995. 233p. (FAO Estatistic Serie, 130).
- FROST, H.B.; SOOST, R. K. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In: REUTHER, W.; **The citrus industry: anatomy, physiology, genetics, and reproduction**. Riverside: University of California, 1968. v.2, p.290-324.
- FURR, J. R. Citrus breeding for the arid Southwestern United States. In: CHAPMAN, H. D. **Proceedings of the First International Citrus Symposium**. Riverside: Riverside Color, 1969. p.191-197.

- GIACOMETTI, D.C. Taxonomia das espécies cultivadas de citros baseada na filogenética. In: RODRIGUES, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A.A. *Citricultura brasileira*, Campinas: Fundação Cargill, 1991, v.1, 2 ed. p.143-163.
- GOMIDE, M.L. *Análise isozimática e atividade da fosfatase ácida em linhagens de pimentão (Capsicum annuum L.)*. Viçosa, UFV, 1996. 57p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- GOTTLIEB, L.D. Gel electrophoresis: new approach and the study of evolution. *Bioscience*, New York, v.21, n.18, p.939-944, Sept. 1971.
- GUERRA, M.; PEDROSA, A.; SILVA, A.E.B.; CORNÉLIO, M.T.M.; SANTOS, K.; SOARES FILHO, W.S. Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a citrus germoplasm bank. *Brazilian Journal of Genetics*, São Paulo, v.20, n.3, p. 489-496, 1997.
- GUIMARÃES, C.T.; RIBEIRO, I.; TEIXEIRA, S.L.; LANI, E.R.G. Melhoramento genético de *Citrus sinensis* cv. Pêra através de técnicas de cultura de tecidos. In: SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 1, Viçosa, 1989. Resumos... Viçosa: UFV, 1989. p.94.
- HANNA, W. W. Apomixis in crop plants - cytogenetic basis and role in plant breeding. GUPTA, P. K.; TSUCHIYA, T. (eds.). *Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution*. Part A. Amsterdam: Elsevier, 1991. p.229-242.
- HANNA, W. W. Use of apomixis in cultivar development. *Advances in Agronomy*, New York, v.54, p.333-350, 1995.
- HEARN, C.J.; HUTCHISON, D.J.; BARRET, H.C. Breeding citrus rootstocks. *HortScience*, Alexandria, v.9, n.4, p.357-358, July 1974.
- HIDAKA, T.; OMURA, M. Control of embryogenesis in citrus cell culture: regeneration from protoplasts and attempts to Callus Bank. *Bulletin of Fruit Tree Research Station, Japan*, n.16, Série B, p.1-17, 1989.
- HOFFMANN, S.M., FACHINELLO, J.C. Uso de porta-enxertos em fruticultura. *Agros*, Pelotas, v.15, n.1, p.21-38, 1890.

- IEKI, H. Resistance of citrus hybrid seedlings to scab, *Elsinöe fawcetti* Bitanc. & Jenkins. **Bulletin of Fruit Tree Research Station, Tsukuba**, n.8, p.139-145, 1981. (Série B).
- IGLESIAS, L., LIMA, H., SIMON, J.P. Isoenzyme identification of zygotic and nucellar seedlings in *Citrus*. **The Journal of Heredity, Baltimore**, v.65, n.2, p.81-84, Mar./Apr. 1974.
- ITO, Y.; OMURA, M.; NESUMI, H.; YOSHIDA, T. Improvement of preparation and observation methods for *Citrus* chromossomes. **Bulletin of Fruit Tree Research Station, Tsukuba**, v.23, n.3, p.57-66, Sept. 1992.
- KHAN, I. A.; ROOSE, M. L. Frequency and characteristics of nucellar and zygotic seedlings in three cultivars of trifoliate orange. **Journal of American Society for Horticultural Science, Alexandria**, v.113, n.1, p.105-110, Jan. 1988.
- KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P.; SAFRAN, H. Adventive plants from ovules and nucelli in *Citrus*. **Planta, Berlin**, v.106, p.237-245, 1972.
- KOLLER, O.C. *Citricultura: laranja, limão e tangerina*. Porto Alegre: Rigel, 1994. 446p.
- KOLTUNOW, A. M. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **The Plant Cell, Rockville**, v.5, n.10, p.1425-1437, Oct. 1993.
- KUNIEDA, S. *Análise de isoenzimas para identificação de *Meloidogyne* spp. e da patogênese de *M. javanica* ao ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*)*. Viçosa: UFV, 1992. 52p. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia).
- MACHADO, M.A. *Biotechnology na citricultura*. **Biotechnology: Ciência & Desenvolvimento, Brasília**, n.1, p.8-10, maio, 1997.
- MACHADO, M.A. Programa de Biotechnology em citros do laboratório da Estação Experimental Sylvio Moreira do IAC. Fundação IAC, Campinas. **Laranja, Cordeirópolis**, v.13, n.1, p.307-324, jan. 1992.
- MOORE, G. A. 'In vitro' propagation os *Citrus* rootstocks. **Hortscience, Alexandria**, v. 21, n.2, p.300-301, Apr. 1986.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-479, 1962
- MURKHERJEE, J.K.; CAMERON, J.W. Tree size and chromosome number in a trial of tetraploid trifoliolate orange as a citrus rootstock. **Proceedings of American Society of Horticultural Science**, Ithaca, v.72, p.267-272, 1958.
- NAUMOVA, T.N. Apomixis in angiosperm: necellar and integumentary embryoni. Boca Raton: CRC, 1993. 513p.
- OIYAMA, I. A technique for chromosome observation in root tip cells of citrus. **Bulletin of Fruit Tree Research Station**, Tsukuba, n.3, p.62-69, 1981. (Série D).
- OIYAMA, I. Studies on polyploidy breeding in citrus with special reference to the production of tetraploid breeding. **Bulletin of Fruit Tree Research Station**, Tsukuba, n.3, p.1-68, 1992. (Extra Number).
- OIYAMA, I. Studies on the polyploidy breeding in citrus. III. Occurrence of triploids in the progenies of diploid sweet oranges crossed with diploids. **Bulletin of Fruit Tree Research Station**, Tsukuba, n.5, p.1-8, 1983. (Série D).
- OIYAMA, I.; KOBAYASHI, S. Citrus pentaploids from small seeds of diploid x diploid crosses. **HortScience**, Alexandria, v.26, n.3, p.292-293, Mar. 1991.
- OIYAMA, I.; KOBAYASHI, S. Polyembryony in undeveloped monoembryonic diploid seeds crossed with a citrus tetraploid. **HortScience**, Alexandria, v.25, n.10, p.1276-1277, Oct. 1990.
- OIYAMA, I.; KOBAYASHI, S.; YOSHINAGA, K.; OHGAWARA, T.; ISHII, S. Use of pollen from a somatic hybrid between *Citrus* and *Poncirus* in the production of triploids. **HortScience**, Alexandria, v.26, n.8, p.1082, Aug. 1991.
- OLLITRAULT, P. Somatic embryo grafting: a promising technique for citrus breeding and propagation. **Fruits**, Paris, v.47, p.212-218, 1992. (Número Especial).

- OLLITRAULT, P.; OLLITRAULT, F.; CABASSON, C. Induction de calcs embryogènes d'agrumes par culture d'ovules: Détermination isoenzymatique de l'origine tissulaire des embryons. *Fruits*, Paris, v.47, p.124-134, 1992. (Número Especial).
- OLLITRAULT, P.; ROCCA SERRA, D. L'amélioration des agrumes: II. Créations variétales et biotechnologies. *Fruits*, Paris, v.47, p.124-134, 1992. (Número Especial).
- PADMA, A.; REDDY, G.M. Peroxidase isozymes in the developing endosperm of mayze. *The Journal of Heredity*, Baltimore, v.53,n.2, p.252-254, 1988.
- PANORAMA da citricultura brasileira. *Circuito Agrícola/ ABRACEN*, São Paulo, v.4, p.7-9, jun. 1996.
- PASQUAL, M. Regeneração de plantas 'in vitro' e radiosensitividade de tecidos nucelares de citros. Piracicaba: ESALQ, 1985. 106p. (Tese - Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- PASSOS, O. S. Melhoramento de citros na Califórnia (EUA 3) e sugestões para a citricultura brasileira. Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMPF, 1980. 9p. (Miscelânea, 2).
- PEIRCE, L.C.; BREWBAKER, J.L. Applications of isozyme analysis in horticultural science. *HortScience*, Alexandria, v.8,n.1, Feb., 1973.
- PIERINGER, A.P.; EDWARDS, G.J. Identification of nucellar and zygotic Citrus seedling by infrared spectroscopy. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, Riverside, v.86, p.226-234, 1967.
- PIO, R.M. A utilização do trifoliata na citricultura. *Laranja*, Cordeirópolis, v.14, n.2, p.581-610, ago. 1993.
- PLATT, R. G.; OPITZ, K. W. The propagation of citrus. In: REUTER, W. (ed.). *The citrus industry*, Riverside: University of California, 1973. v.3, p.1-47.
- POMPEU JÚNIOR, J. Porta-enxertos. In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A.A. *Citricultura brasileira*. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v.1, p.265-280.

- POMPEU JÚNIOR, J.; FIGUEIREDO, J.O.; PIO, R.M. Melhoramento de variedades copas e porta-enxertos. In: SEMANA DA CITRICULTURA, 5, Cordeirópolis, 1983. Anais... Cordeirópolis: EEL-IAC, 1983. n.4, p.305-318.
- PRICE, S.C.; SHUMAKER, K.M.; KAHLER, A.L.; ALLARD, R.W.; HILL, J.E. Estimatives of population differentiation obtained from isozyme polymorphisms and quantitative characters. *The Journal of Heredity*, Baltimore, v.75,n.2, p.141-142, Mar./Apr.1984.
- RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; PINTO, C. A. B. P. *Genética na Agropecuária*. 4 ed. São Paulo: Editora Globo, 1995. 359p
- RAMOS, J. D. Taxa de poliembrionia e identificação do embrião sexual 'in vitro' dos porta-enxertos *Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Lavras: ESAL, 1990. 73p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- REISER, L.; FISHER, R. L. The ovule and the embryo sac. *The Plant Cell*, Rockville, v.5, n.10, p.1291-1301, Oct 1993.
- ROCCA SERRA, D. de; OLLITRAULT, P. L'amélioration des agrumes: I. Les ressources génétiques. *Fruits*, Paris, v.47, p. 115-123, 1992. (Número Especial).
- RODRIGUES, J.P.F. *Análise de isoenzimas em progênes de meios-irmãos de urucum (Bixa orellana L.)*. Viçosa: UFV, 1995. 74p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- SALIBE, A.A. Clones nucelares de citros no Estado de São Paulo. *Laranja*, Cordeirópolis, v.2, n.8, p.443-466, dez 1987.
- SALIBE, A.A.; RODRIGUEZ, O. Melhoramento da laranja Hamlin, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v.21, n.2, p.365-366, 1969.
- SALIBE, A.A.; RODRIGUEZ, O. Precocidade de produção de clones nucelares de citros. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v.23, n.1, p.219-220, 1971.

- SANTOS FILHO, H.P.; DANTAS, J.L.L.; CABRAL, J.R.S. Programa de pesquisa com biotecnologia do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Cruz das Almas, v.8 , n3 , p.23-37, jan. 1986.
- SANTOS, I.C. dos. Avaliação da variabilidade genética de *Trichoderma* por isoenzimas, RFLP e RADP. Piracicaba: USP/ESALQ, 1992. 85p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- SAWAZAKI, H.E.; SODEK, L.; PIO, R.M.; MÜLLER, G.W. Identificação de espécies de citros mediante polimorfismo enzimático. *Bragantia*, Campinas, v.51, n.2, p.121-128, set. 1992.
- SCHULZ-SCHAEFFER, J. Cytogenetics: plants, animals, humans. New York: Springer-Verlag, 1980. 446p.
- SILVA, R. Bandeamento fluorescente e marcador RAPD em espécies próximas ao Pinus de Tecun Umán. Lavras: UFLA, 1996. 55p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- SOOST, R. K.; WILLIAMS, T. E.; TORRES, A. W. Identification of nucellar and zygotic seedlings of *Citrus* with leaf isozymes. *HortScience*, Alexandria, v.15, n.6, p.728-729, Dec. 1980.
- SOOST, R.K.; CAMERON, J.W. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (eds.). *Advances in fruit breeding*. West Lafayette, Indiana: Purdue University, 1975. p.507-540.
- SOUZA JÚNIOR, M.T.; CUNHA SOBRINHO, A.P. da; SOARES FILHO, W.dos S.; BAHIA, R.de C. Caracterização de germoplasmas de citros mediante emprego de zimograma de GOT. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Cruz das Almas, v.16, n.3, p.47-55, Dez. 1994.
- STARRANTINO, A.; RUSSO, F. Seedlings from undeveloped ovules of ripe fruits of polyembryonic *Citrus* cultivars. *HortScience*, Alexandria, v.15 , n.3, p.296-297, June 1980.
- SWANSON, C.P.; MERZ, T.; YOUNG, W.J. Nucleolar organizers. In: _____. *Cytogenetics; the chromosome in division, inheritance and evolution*. 2. ed. London: Prentice-Hall International, 1981. p. 85-103.

- TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. Isozymes; in plant genetics and breedings. Amsterdam: Elsevier Science, 1987. pt.B, 472p.(Developments in plant genetics and breeding, 1B).
- TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. Isozymes; in plant genetics and breedings. Amsterdam: Elsevier Science, 1983. pt.A, 450p.(Developments in plant genetics and breeding, 1A).
- TORRES, A.M.; DIEDENHOFEN, U.; BERGH, B.O.; KNIGHT, R.J. Enzyme polymorphisms as genetic markers in the avocado. *American Journal of Botany*, Columbus, v.65, n.8, p.134-139, Sept. 1978.
- TORRES, A.M.; MAU-LASTOVICKA, T.; WILLIAMS, T.E.; SOOST, R.K. Segregation distortion and linkage of *Citrus* and *Poncirus* isozymes genes. *The Journal of Heredity*, Baltimore, v.76, n.4, p.289-294, July/Aug. 1985.
- TORRES, A.M.; SOOST, R.K.; DIEDENHOFEN, U. Leaf isozymes as genetics markers in *Citrus*. *American Journal of Botany*, Columbus, v.65, n.8, p.869-881, Aug. 1978.
- TORRES, A.M.; SOOST, R.K.; MAU-LASTOVICKA, T. Citrus isozymes: genetics and distinguishing nucellar from zygotic seedling. *Journal of Heredity*, Baltimore, v.73, n.2, p.335-339, Mar. 1982.
- TOXOPEUS, H., Notes on the genetics of few leaf characters in the genus *Citrus*. *Euphytica*, Wageningen, v.11,n.1, p.19-25, Feb. 1962.
- WAKANA, A.; UEMOTO, S. Adventive embryogenesis in Citrus (Rutaceae). II. Postfertilization development. *American Journal of Botany*, Columbus, v.75, n.7, p.1033-1047, July 1988.
- WAKANA, A.; UEMOTO, S. Adventive embryogenesis in Citrus. I. The occurrence of adventive embryos without pollination or fertilization. *American Journal of Botany*, Columbus, v.74, n.4, p.517-530, July 1987.
- WERNER, D.J. Catalase polymorphism and inheritance in peach. *HortScience*, Alexandria, v.27, n.1, p.41-43, Jan. 1992.
- WILMS, H. J.; VAN WENT, J.L.; CRESTI, M.; CAMPOLINI, F. Adventive embryogenesis in *Citrus*. *Caryologia*, Florence, v.36, n.1, p.65-78, Feb. 1983.

- YOUNG, B. A.; SHERWOOD, R. T.; BASHAW, W. C. Cleared-pistil and thick-sectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.57, n.15, p.1668-1672, Aug. 1979.**
- ZEKRI, M. Salinity and calcium effects on emergence, growth and mineral composition of seedlings of eight citrus rootstocks. *Journal of Horticultural Science*, Madison, v.68, n.1, p.53-62, Jan. 1993.**

CAPÍTULO 2

Citogenética do 'Citravo' [*Citrus limonia* Osbeck Cv. Cravo X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] e seus genitores

1 Resumo

A citricultura brasileira mostra-se muito vulnerável a doenças e pragas, uma vez que cerca de 80% de suas plantas são enxertadas sobre um único porta-enxerto, o limoeiro Cravo, muito susceptível ao 'Declínio dos Citros'. Por isso, há necessidade de se desenvolver novas cultivares por meio de melhoramento genético, visando contornar esse problema. A análise citogenética é importante pré-requisito em programas de melhoramento, visto que a ploidia pode interferir no sucesso dos cruzamentos. O 'Citravo' está sendo avaliado citogeneticamente pela primeira vez, e seus genitores não tiveram uma análise do complemento cromossômico anterior ao cruzamento controlado. Este trabalho objetivou a avaliação dos cromossomas do material genético utilizado em programa de melhoramento genético da UFLA, via hibridação controlada, onde *Poncirus trifoliata* e *Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo foram utilizados como genitores masculino e feminino, respectivamente. Foram testadas: técnicas de pré-tratamentos (hidroxiquinoleína, colchicina e água gelada) e coloração (Feulgen, Giemsa 1, 2 e 3%,orceína lacto-propiónica 1 e 2% e carmim acético 1 e 2%). Raízes de 'Citravo' [*Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] e seus genitores foram submetidas a hidrólise, utilizando-se HCl 1N em banho-maria a 60°C por 30 a 45 minutos, para raízes oriundas de sementes germinadas, ou 15 minutos, nas mesmas condições, para raízes oriundas de cultura de tecidos 'in vitro'. A coloração com solução de Giemsa a 4% com tampão fosfato pH 6,8, por 45 a 60 minutos, apresentou resultados satisfatórios. Pré-tratamento com solução de 8-hidroxiquinoleína a 0,002M por 24 horas a 10°C apresentou cromossomas metafásicos bem compactados e separados, permitindo determinar com exatidão o número total de cromossomas do complemento. A resolução alcançada permitiu a contagem dos cromossomas dos materiais em estudo, todos apresentando $2n = 2x = 18$ cromossomas.

Comitê Orientador: Lisete Chamma Davide - UFLA (Orientadora), Moacir Pasqual - UFLA e Renata Silva Mann - UFLA

2 Abstract

Cytogenetical study of 'Cravo' [*Citrus limonia* Osbeck Cv. Cravo X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] and its parents

In spite of being the world's greatest citrus fruit and powder and frozen orange juice producer, Brazilian citrus culture presents itself very vulnerable since about 80% of its plants are grafted on a single rootstock, the lemon tree 'Cravo', very susceptible to the 'Decline of Citrus'. Therefore, there is need to develop new cultivars by means of genetical improvement, aiming to overcome this problem. The cytogenetical analysis is a important prerequisite in genetic improvement programmms, considering that the ploidis to affect on result of crosses. The 'Cravo' is being cytogenetically evaluated for the first time and its parents had not an analysis of the cromossomic complement prior the controlled cross. This work aimed at the evaluation of the chromosomes of the genetical material utilized in genetical improvement program of the UFLA, via controlled hybridization, where *Poncirus trifoliata* and *Citrus limonia* Osbeck cv. 'Cravo' were utilized as male and female parents, respectively. The staining technics (Feulgen, 1, 2 and 4% Giemsa, 1 and 2% lacto-propionic orcein and 1 and 2% acetic carmin) and as pre-treatments hydroxiquinolein, colchicin and iced water were utilized. Roots of [*Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] and their parents were submetiled to the modified convencional smashing technics, being that the hydrolisis was done by utilizing 1N HCl in water bath at 60°C for 30 to 45 minutes for roots from seeds germinated, or 15 minutes under the some conditions for roots from 'in vitro' tissue culture. The coloration with 4% Giemsa solution with phosphate buffer pH 6,8 for 45 to 60 minutes showed satisfactory results. Pre-treatment with 8-hydroxichinolein solution at 0,002M for 24 hours at 10°C presented quite compressed and separate metaphysic chromosomes, enabling to determine accurately the total chromosome number of the complement. The resolution achieved enabled the count of the chromosomes of the materials under study, (todos all) presenting $2n=2x=18$ chromosomes.

Guidance Committee: Lisete Chamma Davide - UFLA (Major Professor), Moacir Pasqual - UFLA and Renata Silva Mann - UFLA

3 Introdução

A citricultura brasileira mostra-se muito vulnerável a doenças e pragas devido ao fato de cerca de 80% de suas plantas serem enxertadas sobre um único porta-enxerto, o limoeiro 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo), este muito susceptível ao 'Declínio dos Citros' (Pompeu Júnior, 1991; Koller, 1994). Em consequência disso, o Brasil pode perder sua posição de maior exportador de suco de laranja concentrado e congelado do mundo (Panorama, 1996).

Assim sendo, foi obtida uma nova cultivar porta-enxerto 'Citravo' [*Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], tendo como objetivo principal a transferência de resistência ao declínio do *P. trifoliata* (Ramos, 1990). Por se tratar de um cruzamento intergenérico, pressupõe-se a ocorrência de variações no complemento cromossômico do híbrido em relação aos seus genitores.

Em função do pequeno tamanho dos cromossomas dos citros, alguns pesquisadores têm aperfeiçoados técnicas para contagem de cromossomas por meio de pré-tratamentos, fixação e coloração (Murkherjee e Cameron, 1958; Esen e Soost, 1971; Oiyama e Kobayashi, 1990 e 1991, Oiyama, 1992, Ito et al., 1992). Os trabalhos realizados têm mostrado que em *Citrus* e gêneros aparentados, o número básico de cromossomas é 9 e a grande maioria de suas espécies é diplóide ($2n = 2x = 18$).

No entanto, em plantações de citros encontram-se, com relativa facilidade, indivíduos poliplóides com 27, 36 e 54 cromossomas (Oiyama, 1983; Rocca Serra e Ollitrault, 1992). Entre poliplóides identificados encontram-se a limeira ácida Tahti (*C. latifolia* Tanaka) e o cunquateiro 'Hong-Kong' (*Fortunella hindisi*). Poliplóides também podem ser encontrados nas descendências de hibridações entre diplóides, sendo derivados da fecundação de

um gameta feminino não reduzido por um gameta masculino haplóide. A frequência de gametas não reduzidos varia, segundo o genótipo, entre menos de 1% a cerca de 20% em citros (Esen e Soost, 1971).

O estudo da ploidia é um pré-requisito importante para futuros programas de melhoramento, já que ela pode interferir no sucesso dos cruzamentos, levando à esterilidade gamética.

Considerando o que foi exposto acima e que o 'Citravo', bem como as plantas utilizadas no cruzamento do qual se originou, não haviam sido analisadas citogeneticamente, este trabalho teve como objetivo adequar uma metodologia para avaliar o complemento cromossômico do 'Citravo', verificar sua ploidia e compará-lo com seus genitores.

4 Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Citologia e Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Sementes de *Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo e do 'Citravo' [*Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] oriundas do pomar da UFLA foram coletadas, destegumentadas e colocadas para germinar por 18 dias em germinador com temperatura de 27°C. Quanto ao genitor *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., devido à dificuldade de se obter sementes pelo seu caráter caduco, as raízes utilizadas foram provenientes de cultura de embriões ou de meristema 'in vitro', realizada no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Agronomia da UFLA.

Para o preparo das lâminas, as pontas de raízes do limoeiro 'Cravo', 'Citravo' e *Poncirus trifoliata* foram pré-tratadas em solução de 8-hidroxiquinoleína a 0,002M por 24 horas a 10°C. As raízes foram fixadas em Carnoy - álcool etílico absoluto: ácido acético (3:1) por 24 horas e transferidas para álcool etílico 70%, onde permaneceram armazenadas a 4°C até o uso. Em seguida, as raízes foram lavadas em água deionizada por um período de 10 minutos, com três trocas. Para a hidrólise utilizou-se HCl 1N, por 30 a 45 minutos, em banho-maria a 60°C para raízes oriundas de sementes germinadas. Para raízes oriundas de cultivo 'in vitro' utilizou-se HCl 1N por 15 minutos também em banho-maria a 60°C e, para raízes de aspecto muito delicado, a hidrólise foi feita com HCl 1N por 15 minutos, porém a temperatura ambiente. Após esta etapa, as raízes passaram por um banho rápido em água deionizada gelada para interrupção da reação de hidrólise e, posteriormente, foram submetidas a água deionizada a temperatura ambiente por até 2 horas. Regiões

meristemáticas de pontas de raízes pré-tratadas foram transferidas para uma gota de ácido acético a 45% em uma lâmina bem limpa onde foi feito o esmagamento. As lamínulas foram removidas após congelamento em nitrogênio líquido por um minuto.

A coloração foi feita com solução de Giemsa a 4% em tampão fosfato pH 6,8, por 45 a 60 minutos. A montagem das lâminas foi feita com Entellan.

As melhores metáfases foram fotografadas em fotomicroscópio Olympus BX 50, com objetiva de imersão 100X, no Laboratório de Fotomicroscopia do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). O filme utilizado foi Kodak Ektachrome ASA 64.

5 Resultados e Discussão

O 'Citravo' [*Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] apresentou $2n = 2x = 18$ cromossomas com tamanho e morfologia muito semelhantes, bem como seus genitores, o que dificultou a distinção entre os complementos dos genitores no híbrido (Figura 1). Esse resultado está de acordo com o observado por vários autores para o gênero *Citrus* e *Poncirus* (Frost e Soost, 1968; Esen e Soost, 1971; Oiyama, 1981; Oiyama, 1983, Oiyama et al., 1991; Ito et al., 1992; Guerra et al., 1997).

Apesar da dificuldade imposta pelo pequeno tamanho dos cromossomas, foi possível visualizar constrição secundária em algumas metáfases das três taxa analisadas. Porém, não houve repetitividade quanto ao número de constrições secundárias nas metáfases, impossibilitando a análise estatística. A presença da constrição secundária em algumas células, a princípio, foi confundida com a ocorrência de aneuploidia, pois mais de 18 cromossomas eram contados. No entanto, como propõem Guerra et al. (1997) para várias espécies de citros, as constrições secundárias sendo longas ou estando distendidas podem dar a impressão de tratarem-se de cromossomas inteiros. Na cultivar 'Cravo' de *Citrus limonia* foi observada uma constrição secundária terminal no maior cromossoma e uma proximal em um par de tamanho médio. Em *Poncirus trifoliata*, somente uma constrição secundária proximal pode ser detectada. No híbrido 'Citravo', a constrição secundária terminal do maior cromossoma e a proximal em um cromossoma mediano foram também visualizadas.

Guerra et al. (1997) também observaram uma constrição secundária proximal em *P. trifoliata*. Neste trabalho, os autores e avaliaram ainda híbridos entre *Citrus limonia* e *Citrus reshni*, não citando, porém, a ocorrência de

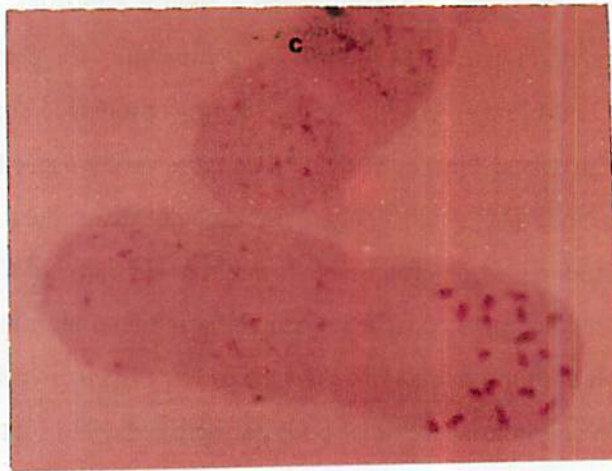
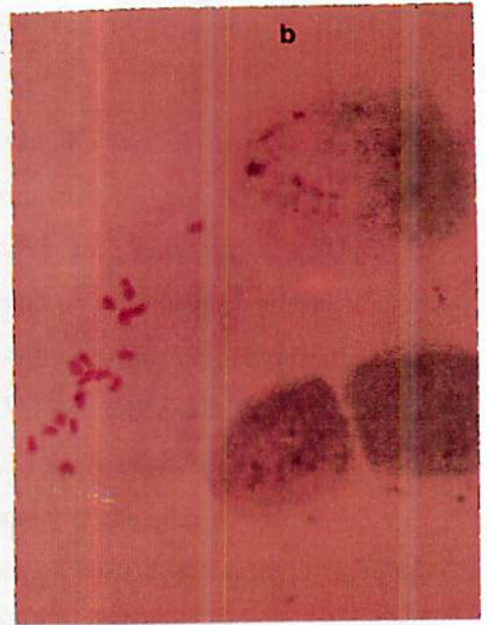


FIGURA 1 - Metáfases mitóticas: a- *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.; b- *Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo; c- [*Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.]. UFLA, Lavras - MG, outubro de 1997.

constricções secundárias nos mesmos, o que poderia sugerir a ausência destas estruturas em *C. limonia* ou a falta de dominância no controle da atividade das constricções secundárias desta espécie nos híbridos com *C. reshni*. Segundo Swanson, Merz e Young (1981), a constricção secundária é controlada geneticamente e, em função da dominância, é um marcador citológico com possibilidade de evidenciar a hibridação.

Com exceção das constricções secundárias, nenhuma diferença entre os três complementos avaliados pôde ser detectada, com a metodologia empregada. Técnicas de bandeamento e de análise de imagem poderiam contribuir para a identificação de cada genitor, o que facilitaria futuros estudos de análise genômica.

É importante salientar que a raiz é o material mais utilizado para análises citogenéticas pela facilidade de obtenção e manuseio. As raízes de citros originadas de sementes apresentam, na superfície, células epidérmicas cobertas por uma mucilagem secretada pela própria raiz e pelos microrganismos da rizosfera, além de pêlos radiculares. Abaixo da epiderme fica a hipoderme, com células maiores que as da epiderme e com indícios de suberização nas paredes internas (Schneider, 1968; Simões, Silva e Teixeira, 1989). Nas raízes crescidas 'in vitro', observaram-se algumas variações, comparadas com raízes originadas de sementes. O córtex adquire aspecto frouxo, com células grandes, separadas umas das outras por grandes espaços vazios, formando um espécie de aerênquima; pêlos radiculares não estão presentes (Simões, Silva e Teixeira, 1989). Concordando com Schneider (1968) e Simões, Silva e Teixeira (1989), as raízes de limão 'Cravo', *Poncirus trifoliata* e 'Citravo', oriundas de sementes germinadas e de cultura 'in vitro', via cultura de embriões, necessitaram de tratamentos diferentes para a hidrólise com HCl 1N, sendo que as últimas necessitavam de tempos menores de tratamento a temperatura ambiente, tendo apresentado um

aspecto mais delgado e menos vigoroso que aquelas obtidas de sementes germinadas.

6 Conclusões

1. As progênies [*Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], assim como seus genitores, são diplóides ($2n = 2x = 18$), não sendo encontrada poliploidia no material estudado.
2. Pré-tratamento com solução de 8-hidroxiquinoleína a 0,002M por 24 horas a 10°C é satisfatório para a visualização dos cromossomas do híbrido e seus genitores.
3. tempo para hidrólise em HCl 1N das raízes dos citros em estudo é de 30 a 45 minutos em banho-maria a 60°C para raízes oriundas de sementes germinadas, 15 minutos nas mesmas condições para raízes oriundas de cultura de tecidos 'in vitro' e, para aquelas de aspecto muito delicado, 15 minutos a temperatura ambiente.

7 Referências Bibliográficas

- ESEN, A.; SOOST, R.K. Aneuploidy in citrus. *American Journal of Botany*, Columbus, v.59, n.3, p.473-477, Mar. 1972
- ESEN, A.; SOOST, R.K. Unexpected triploids in *Citrus*: their origin, identification and possible use. *The Journal of Heredity*, Baltimore, v.62, n.5, p.329-333, Nov./Dec. 1971.
- FROST, H.B.; SOOST, R. K. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In: REUTHER, W.; *The citrus industry: anatomy, physiology, genetics, and reproduction*. Riverside: University of California, 1968. v.2, p.290-324.
- GUERRA, M.; PEDROSA, A.; SILVA, A.E.B.; CORNÉLIO, M.T.M.; SANTOS, K.; SOARES FILHO, W.S. Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a citrus germoplasm bank. *Brazilian Journal of Genetics*, São Paulo, v.20, n.3, p. 489-496, 1997.
- ITO, Y.; OMURA, M.; NESUMI, H.; YOSHIDA, T. Improvement of preparation and observation methods for *Citrus* chromosomes. *Bulletin of Fruit Tree Research Station, Tsukuba*, v.23, n.3, p.57-66, Sept. 1992.
- MURKHERJEE, J.K.; CAMERON, J.W. Tree size and chromosome number in a trial of tetraploid trifoliate orange as a citrus rootstock. *Proceedings of American Society of Horticultural Science*, Ithaca, v.72, p.267-272, 1958.
- OIYAMA, I. A technique for chromosome observation in root tip cells of *Citrus*. *Bulletin of Fruit Tree Research Station, Tsukuba*, n.3, p.62-69, 1981. (Série D).
- OIYAMA, I. Studies on polyploidy breeding in citrus with special reference to the production of tetraploid breeding. *Bulletin of Fruit Tree Research Station, Tsukuba*, n.3, p.1-68, 1992. (Extra Number).
- OIYAMA, I. Studies on the polyploidy breeding in citrus. III. Occurrence of triploids in the progenies of diploid sweet oranges crossed with diploids. *Bulletin of Fruit Tree Research Station, Tsukuba*, n.5, p.1-8, 1983. (Série D).

- OIYAMA, I.; KOBAYASHI, S. Citrus pentaploids from small seeds of diploid x diploid crosses. *HortScience*, Alexandria, v.26, n.3, p.292-293, Mar. 1991.
- OIYAMA, I.; KOBAYASHI, S. Polyembryony in undeveloped monoembryonic diploid seeds crossed with a citrus tetraploid. *HortScience*, Alexandria, v.25, n.10, p.1276-1277, Oct. 1990.
- OIYAMA, I.; KOBAYASHI, S.; YOSHINAGA, K.; OHGAWARA, T.; ISHII, S. Use of pollen from a somatic hybrid between *Citrus* and *Poncirus* in the production of triploids. *HortScience*, Alexandria, v.26, n.8, p.1082, Aug. 1991.
- PANORAMA da citricultura brasileira. Circuito Agrícola/ ABRACEN, São Paulo, v.4, p.7-9, jun. 1996.
- ROCCA SERRA, D. de; OLLITRAULT, P. L'amélioration des agrumes: I. Les ressources génétiques. *Fruits*, Paris, v.47, p. 115-123, 1992. (Número Especial).
- SCHENEIDER, H. The anatomy of citrus. In: REUTHER, W. (ed.). *The citrus industry*. Berkeley: University of California, 1968. v.2, p.1-85.
- SILVA, R. Bandeamento fluorescente e marcador RAPD em espécies próximas ao Pinus de Tecun Umán. Lavras: UFLA, 1996. 55p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- SIMÕES, M.O.M.; SILVA, E.A.M.; TELXEIRA, S.L. Estudo anatômico de raízes de *Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck, cv. Pêra, desenvolvidas 'in vitro' e em vermiculita. *Revista Ceres*, Viçosa, v.36, n.207, p.458-463, set./out. 1989.
- SOOST, R.K.; CAMERON, J.W. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (eds.). *Advances in fruit breeding*. West Lafayette, Indiana: Purdue University, 1975. p.507-540.
- SWANSON, C.P.; MERZ, T.; YOUNG, W.J. Nucleolar organizers. In: _____. *Cytogenetics; the chromosome in division, inheritance and evolution*. 2. ed. London: Prentice-Hall International, 1981. p. 85-103.

CAPÍTULO 3

Uso de marcadores isoenzimáticos para identificação de poliembrões do 'Citravo' [*Citrus limonia* Osbeck Cv. Cravo X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.]

1 Resumo

Visando contribuir para a redução da vulnerabilidade dos pomares brasileiros às doenças, foi obtido, na UFLA, um novo cultivar de porta-enxerto cítrico através de cruzamentos controlados entre *Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo, como genitor feminino e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., sendo o descendente denominado 'Citravo' [*Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.]. Para a identificação de poliembrões do 'Citravo', empregou-se os sistemas isoenzimáticos glutamato oxalacetato transaminase (GOT), esterase (EST), malato desidrogenase (MDH) e enzima málica (ME). Dos sistemas isoenzimáticos avaliados, com exceção da ME, observou-se que os embriões analisados apresentaram os mesmos perfis eletroforéticos, sugerindo-se tratar de embriões nucelares. Apesar de não ter sido identificado nenhum embrião zigótico, o sistema GOT mostrou-se mais estável independente do estágio de desenvolvimento. A não diferenciação dos embriões zigóticos dos nucelares pode ser explicada pela competição a favor de embriões nucelares ou pelo mecanismo de não formação e/ou desenvolvimento dos embriões zigóticos, provavelmente de origem genética, resultando em embriões com genótipos idênticos ao 'Citravo'.

Comitê Orientador: Lisete Chamma Davide - UFLA (Orientadora), Moacir Pasqual - UFLA e Renata Silva Mann - UFLA

2 Abstract

Use of isoenzymatic markers for identification of polyembrios of the 'Citravo' [*Citrus limonia* Osbeck Cv. Cravo X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.]

By aiming to contribute towards the reduction of vulnerability of the Brazilian orchards to diseases, a new cultivar of citrus rootstock was obtained at the UFLA, through controlled crosses between *Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo, as the female parent, and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., being the offspring named 'Citravo' [*Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.]. For the identification of 'Citravo' polyembrios, the isoenzymatic systems glutamate oxalacetate transaminase (GOT), sterase (EST), malate dehidrogenase (MDH) and malic enzyme (ME) on interrupted gel 1D-PAGE with 7,5% of polyacrilamide on the separator gel and 4,5% in the concentrating gel, utilizing the buffer-electrode tris-glicine pH 8,9. Of the isoenzymatic systems evaluated, GOT pointed out the hybrid character of 'Citravo'. In spite of no zygotic embryo having been identified, this proved more stable independent the developmental stage. The non-differentiation of the zygotic from the nucelar embryos may be accounted for by the competition in favor of nucelar embryos or by the non-formation mechanism and/or development of the zygotic embryos, of probably genetic origin, resulting into embryos with genotypes identical to 'Citravo'.

Guidance Committee: Lisete Chamma Davide - UFLA (Major Professor),
Moacir Pasqual - UFLA and Renata Silva Mann- UFLA

3 Introdução

Um dos objetivos do programa de melhoramento de citros na UFLA tem sido a obtenção da diversificação de porta-enxertos, uma vez que o Brasil, apesar de ser o maior produtor de citros e o maior exportador de suco concentrado de laranja do mundo, tem mostrado certa vulnerabilidade a doenças como declínio, cancro cítrico, gomose, dentre outras. Isto se deve ao fato de 80% de suas plantas terem como porta-enxerto o limoeiro 'Cravo' (Pompeu Júnior, 1991; Koller, 1994).

Cruzamentos entre citros, que possibilitem uma recombinação gênica e formação de novos genótipos, têm sido comuns, principalmente para a obtenção de porta-enxertos. Porém, os trabalhos de melhoramento genético, por meio de hibridações, são seriamente limitados devido à existência da poliembrionia, que dificulta a distinção precoce entre 'seedlings' zigóticos e nucelares. As progênes, via de regra, constituem-se numa mistura de híbridos e de clones idênticos ao genitor feminino. Esta identificação normalmente é feita no campo na primeira frutificação para o reconhecimento dos híbridos, que é um processo extremamente difícil, principalmente quando tais híbridos resultam de cruzamentos entre clones morfologicamente semelhantes (Soost e Cameron, 1975; Koller, 1994). Desta forma, técnicas que permitam a distinção destes genótipos num estágio precoce têm sido requeridas.

Assim, visando auxiliar os trabalhos de melhoramento, de acordo com algumas literaturas (Iglesias, Lima e Simon, 1974; Torres, Soost e Diedenhofen, 1978; Torres, Soost e Mau-Lastovicka, 1982; Torres et al., 1985; Ballve et al., 1991) e disponibilidade de material necessário no laboratório, avaliou-se a eficiência dos sistemas isoenzimáticos glutamato oxalacetato transaminase (GOT), esterase (EST), malato desidrogenase (MDH) e enzima málica (ME) para

a identificação precoce de embriões zigóticos e nucleares do 'Citravo'. Marcadores genéticos, morfológicos e bioquímicos já são utilizados para este fim (Iglesias, Lima e Simon, 1974; Torres, Soost e Diedenhofen, 1978; Torres, Soost e Mau-Lastovicka, 1982; Ballve et al., 1991).

A enzima glutamato oxalacetato transaminase (GOT) está presente apenas na mitocôndria e se localiza na matriz mitocondrial, sendo uma enzima alostérica complexa. Ela participa da reação específica de transferência de aminogrupos de um aminoácido ao ácido α cetoglutamato para formar o ácido glutâmico e produzir o cetoácido e reage, em diferentes velocidades, com aproximadamente todos os outros aminoácidos protéicos em uma reação reversível. Essas reações ocorrem, sobretudo, no citoplasma e o ácido glutâmico, ao qual a membrana mitocondrial é permeável, entra na matriz, onde pode ser novamente transaminado ou ser desaminado pela glutamato desidrogenase (Conn e Stumpf, 1980). Desde que esta enzima atua na oxidação de aminoácidos (proteínas de reserva) fornecendo energia para as células (ciclo do ácido cítrico) e/ou na redução do α cetoglutamato para a síntese de aminoácidos, ela pode ter um importante papel na germinação de sementes (Brandão Júnior, 1996). Torres, Soost e Diedenhofen (1978) identificaram duas regiões, sendo que em Got-1 ocorrem quatro alelos P, F, M e S codificados para uma enzima dimérica.

A malato desidrogenase (MDH) catalisa a reação de malato à oxaloacetato, tendo uma importante função dentro do ciclo de Krebs, além de participar do movimento de malato através da membrana mitocondrial e fixação de CO₂ pelas plantas (Conn e Stumpf, 1980).

A enzima málica (ME) é encontrada ligada ao NAD na via de fixação de carbono das plantas (Conn e Stumpf, 1980) e foi estudada em citros por Torres, Soost e Mau-Lastovicka (1982) e Torres et al. (1985), que observaram duas regiões, sendo a Me-1 sem variabilidade para o gênero *Citrus* e, para Me-2

observaram cinco alelos codificados por uma enzima monômero, sendo os alelos F e R (em estado heterozigótico) encontrados em *Poncirus trifoliata*.

A esterase (EST), por ser uma enzima envolvida em reações de hidrólises de ésteres, pode variar de acordo com a presença de compostos orgânicos e carbamatos (Bilia, 1992), sofrendo alterações nos perfis nos diferentes estádios de uma mesma planta, principalmente pelo seu metabolismo, em que a produção de compostos orgânicos pode influenciar seu padrão (Brandão Junior, 1996).

4 Material e Métodos

Foram coletados frutos no pomar da UFLA, no mês de março, 100 a 120 dias após a polinização, com 3 a 4 cm de diâmetro, de uma mesma árvore obtida do cruzamento controlado entre *Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.

A obtenção dos embriões através do cultivo 'in vitro' deu-se no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da UFLA no período de março a maio de 1997. As sementes dos frutos foram previamente lavadas e removidas e, em câmara de fluxo laminar, a mucilagem foi retirada com etanol a 7% por 5 minutos e assepsia em hipoclorito de sódio 2% por 20 minutos, sendo posteriormente lavadas três vezes em água bi-destilada estéril.

Com o auxílio de microscópio estereoscópico, bisturi e pinça, as sementes foram excisadas longitudinalmente pela região oposta à micrópila. Todos os embriões de uma mesma semente foram inoculados em tubos de ensaio contendo o meio MS modificado com carvão ativado (1,35g, 60g de sacarose, 75% de sais de MS, 10,5g de ágar, 0,01mg de GA₃, 10mg de ABA em q.s.p. 1 litro), segundo Ribeiro (1997).

Os embriões permaneceram por 48 horas no escuro e, posteriormente, em sala de crescimento à temperatura de $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ com 16 horas de iluminação a 1500 lux.

As análises isoenzimáticas foram realizadas no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Agricultura da UFLA no período de agosto a dezembro de 1997.

Para a análise isoenzimática foram utilizadas folhas novas e brotações da planta matriz e folhas dos 'seedlings' oriundos da cultura de embriões. Estes

tecidos foram destacados, pesados, lavados para eliminar restos de meio de cultura e armazenados em freezer a -86°C .

A extração foi efetuada adicionando-se a 100mg de material vegetal macerado em nitrogênio líquido, 200 μL de tampão de extração (Tris-HCl 0,2M pH 8,0 contendo 0,4% de polivinilpirrolidona - 40; 0,1% de (mercaptoetanol; 0,4% de polietilenoglicol 6000 e 1mM de Etileno diamino tetracético), segundo Vieira (1996).

O homogeneizado foi incubado a 4°C por 24 horas e centrifugado a 14000 xg em centrífuga refrigerada do tipo Eppendorf a 4°C , por 60 minutos.

Posteriormente, 20 μL do sobrenadante de cada extração foram aplicados em géis de poliacrilamida a 4,5% (gel concentrador) e 7,5% (gel separador). As corridas foram desenvolvidas a 12mA no gel concentrador e 24mA no gel separador. Após as corridas, os géis foram revelados para os sistemas isoenzimáticos: malato desidrogenase (MDH), glutamato oxalacetato transaminase (GOT), esterase (EST) e enzima málica (ME), de acordo com as metodologias descritas por Alfenas et al. (1991).

5 Resultados e Discussão

A poliembrionia das sementes da maioria das espécies e variedades de plantas cítricas é conseqüente da apomixia, possibilitando o surgimento de "seedlings" zigóticos e nucelares. Os embriões nucelares, salvo quando sofrem mutação, são geneticamente idênticos à planta mãe (Starrantino e Russo, 1980; Naumova, 1993; Reiser e Fisher, 1993). Dessa maneira, a análise isoenzimática de poliembriões pode ser realizada por meio de comparação de bandas entre os "seedlings" e seus genitores.

Em função de não se conseguir sementes do genitor masculino, *Poncirus trifoliata*, devido a seu caráter caduco, não foi possível realizar a comparação entre este genitor e os poliembriões. É importante enfatizar que, de acordo com a literatura, é possível identificar o embrião híbrido mediante análise de isoenzimas, comparando os embriões entre si, podendo a técnica de eletroforese ser uma prática em potencial para a identificação precoce de poliembriões.

Assim, foi possível comparar os padrões de bandas dos sistemas enzimáticos, enzima málica (ME), malato desidrogenase (MDH) e esterase (EST) entre os 'seedlings' do 'Citravo' e a planta mãe (Figuras 1, 2, 3, respectivamente).

As diferenças nos padrões eletroforéticos para a planta mãe e os embriões podem ser explicadas pela diferença de estágio de desenvolvimento entre a planta mãe e os 'seedlings', apesar de ter sido utilizado o mesmo tecido vegetal. Alfenas et al. (1991) enfatizam que zimogramas obtidos de extratos de sementes, plântulas e folhas de plantas adultas, podem diferir entre si, porque certas enzimas, como as esterases e peroxidases, podem ser controladas por locos diferentes nas várias fases do desenvolvimento da planta ou nos vários tecidos, em função de diferenças na expressão gênica. Os autores ainda aconselham o uso

de um mesmo tecido ou mesmo estágio de desenvolvimento da planta, em todas as amostras analisadas, para o sucesso das isoenzimas como marcadores genéticos. Nesta investigação, no entanto, não foi possível usar o mesmo estágio de desenvolvimento e nem mesmo seria vantajoso, visto que os 'seedlings' teriam de estar no estágio adulto, o que inviabilizaria um dos objetivos deste trabalho, que é a identificação precoce dos embriões em citros.

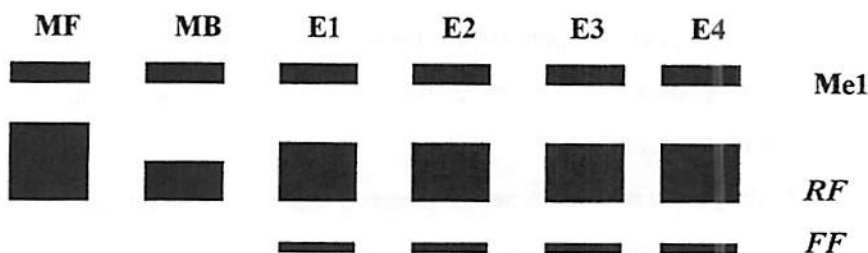


FIGURA 1 - Zimograma da enzima málica (ME) de tecidos foliares de Citravo obtido em gel de poliacrilamida. UFLA, Lavras-MG, dezembro de 1997.

MF = planta mãe, folha jovem;
 MB = planta mãe, brotações;
 E1, E2, E3, E4 = embriões.
 RF, FF = alelos

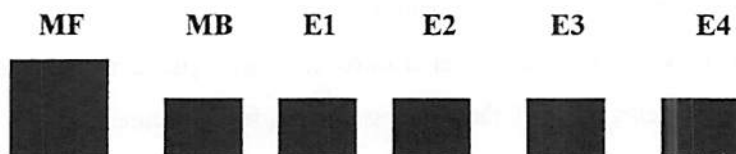


FIGURA 2 - Zimograma da enzima malato desidrogenase (MDH) de tecidos foliares de Citravo obtido em gel de poliacrilamida. UFLA, Lavras-MG, dezembro de 1997.

MF = planta mãe, folha jovem;
 MB = planta mãe, brotações;
 E1, E2, E3, E4 = embriões.

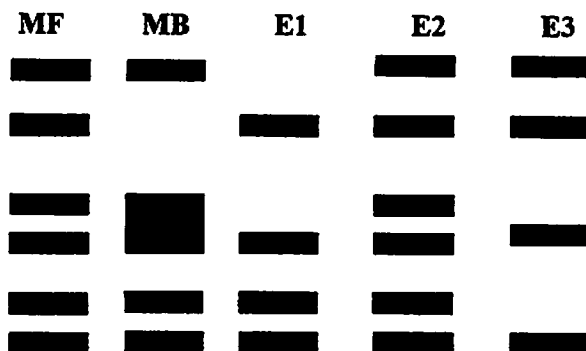


FIGURA 3 - Zimograma da enzima esterase (EST) de tecidos foliares de Citravo obtido em gel de poliacrilamida. UFLA, Lavras-MG, dezembro de 1997.

MF = planta mãe, folha jovem;
 MB= planta mãe, brotações;
 E1, E2, E3 = embriões.

As isoenzimas utilizadas podem ser separadas em três grupos, de acordo com sua resolução, como sugerido por Ballve e colaboradores (1991). No primeiro, encontra-se a malato desidrogenase (MDH), sistema de atividade estável, porém de resolução difusa, não permitindo uma distinção precisa entre as bandas (Figura 2). Um segundo grupo inclui a esterase (EST), que apresentou bandas nítidas com razoável resolução, bastante instável, parecendo ser afetada por fatores ambientais ou interações complexas (Figura 3). O terceiro grupo mostrou-se promissor, sendo estável e apresentando bandas nítidas e bem definidas, no qual o sistema glutamato oxalacetato transaminase foi incluído, pois mostrou estabilidade nos padrões isoenzimáticos para diferentes fases de desenvolvimento dos tecidos de uma mesma planta (Figura 4). Este sistema, para

as condições testadas, confirmou a origem híbrida do 'Citravo', bem como de seus embriões, os quais apresentaram os mesmos perfis eletroforéticos. Neste sistema, duas são as regiões observadas e identificadas por Torres, Soost e Diedenhofen (1978). Na região Got-1, próxima à origem, ocorrem quatro alelos codificando para uma enzima dimérica: alelos *P, F, M* e *S* com Rf 0,36; 0,25; 0,23 e 0,06, respectivamente. De acordo com os mesmos autores, os alelos *M* e *P* ocorrem em *Poncirus trifoliata* e em outros gêneros, enquanto que os alelos *F* e *S* são comuns a *Citrus*. No material biológico analisado neste trabalho, os resultados foram concordantes com a literatura, sendo que na árvore obtida do cruzamento entre *Poncirus trifoliata* e *Citrus limonia* foram encontrados os alelos *P, M* e os alelos *F, S*. Para esses alelos, conforme mostra a Figura 4, houve migração de bandas bastante distinta, além da eficiência deste loco como marcador em cruzamentos envolvendo *P. trifoliata* e limão 'Cravo'.

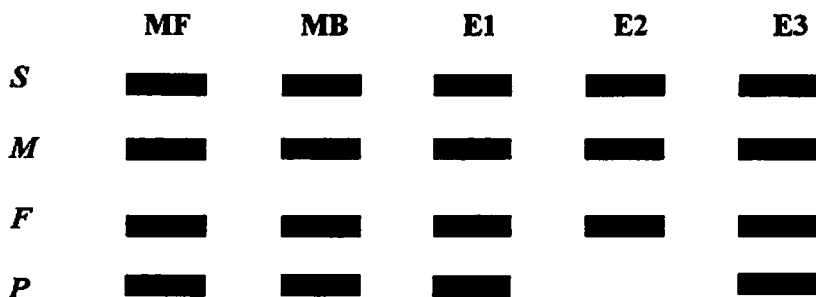


FIGURA 4 - Zimograma da glutamato oxalacetato transaminase (GOT) de tecidos foliares de Citravo obtido em gel de poliacrilamida. UFLA, Lavras-MG, dezembro de 1997.

MF = planta mãe, folha jovem;
 MB= planta mãe, brotações;
 E1,E2,E3 = embriões.
S, M, F, P = alelos

Outros alelos têm sido descritos no gênero *Citrus*, como o *I* e *T*. O alelo *I* tem migração intermediária entre os alelos *F* e *M*, estando presente apenas nas laranjas doces e na tangerina 'Cravo' (Ballve et al., 1991), as quais não foram empregadas nesta análise. A enzima glutamato oxalacetato transaminase (GOT), é uma enzima do grupo III, cujo sistema permitiu a identificação dos quatro alelos *P*, *F*, *M* e *S*.

Com relação a enzima málica (ME), trabalhos realizados por Torres, Soost e Mau-Lastovicka (1982) e Torres et al. (1985), mostraram duas regiões de resolução, uma delas próxima ao fronte e, portanto, mais rápida, denominada Me-1, de pouca coloração e sem variabilidade em *Citrus*; a outra região, de coloração intensa, mais lenta, identificada como loco Me-2 codificando para uma enzima monomérica. Cinco alelos têm sido descritos: *F*, *I*, *M*, *S* e *R*. Os alelos *M* e *S* ocorrem em condição heterozigota (*MI*) no limão rugoso (*Citrus jambhiri*) e (*SI*) em lima (*Citrus aurantifolia*); o alelo *R* foi encontrado somente em clones de *Poncirus trifoliata* em estado heterozigoto (*FR*); o alelo *F*, além de *Poncirus*, foi encontrado também em cidras (*Citrus medica*) e o alelo *I* é de distribuição generalizada, sendo homozigotas as laranjas, as tangerinas e a laranja azeda (*Citrus aurantium*).

Nas condições do presente trabalho, as regiões do loco Me-1 e Me-2 foram observadas para o germoplasma de 'Citravo' (Figura 1), confirmando mais uma vez sua origem híbrida. O loco Me-1, como anteriormente confirmado em outros estudos envolvendo o gênero *Citrus*, tem se mostrado bom marcador nos cruzamentos em que o *Poncirus trifoliata* é utilizado como genitor masculino, uma vez que, sendo homozigoto (*RR*) nesta espécie, os demais embriões nucelares e híbridos poderão ser facilmente distinguíveis (Ballve et al., 1991).

Para o sistema malato desidrogenase (MDH), as enzimas são codificadas na forma dimérica em dois locos parcialmente sobrepostos e não formam

heterodímeros inter locos. Este fato foi demonstrado no trabalho de Torres et al (1985), no qual a região mais rápida corresponde ao loco *Mdh2*, denominado *FF*, encontrado nas laranjas e tangerinas. Este sistema mostra mesmo padrão de bandas para genótipos de *P. trifoliata*: lima da pérsia, limão galego e limão cravo, não permitindo, portanto, a distinção clara dos possíveis embriões nucleares e zigóticos nem a confirmação do origem híbrida do 'Citravo'.

Para o sistema Esterase (EST), apesar de haver mostrado bandas nítidas, com relativa resolução, a atividade enzimática mostrou-se bastante instável. A esterase (EST), por ser uma enzima envolvida em reações de hidrólises de ésteres, pode variar de acordo com a presença de compostos orgânicos e carbamatos (Bilia, 1992), sofrendo alterações nos perfis nos diferentes estádios de uma mesma planta, principalmente pelo seu metabolismo, em que a produção de compostos orgânicos pode influenciar seu padrão (Brandão Junior, 1996). No gênero *Citrus*, a atividade desta enzima não se mostrou promissora para as condições do presente trabalho, provavelmente devido à formação de compostos do metabolismo secundário, como óleos essenciais.

Em todos os sistemas, com exceção da enzima esterase (EST), verificaram-se semelhanças nos padrões eletroforéticos para todos os embriões analisados, sugerindo tratem-se de embriões nucleares.

Dentro da variabilidade detectável nos sistemas enzimáticos analisados, deve-se considerar as alterações pós-transcrição e pós-tradução, as quais podem atingir somente uma parte da população de moléculas enzimáticas. Portanto, podem ocorrer bandas secundárias que não expressam a diversidade do DNA. Este fato é bem comum em enzimas pertencentes ao grupo I, como a malato desidrogenase (MDH) e a enzima málica (ME). Outro fato a ser considerado é o nível de variabilidade genética presente nos diferentes sistemas enzimáticos. As enzimas incluídas no Grupo II, como as esterases, são um bom exemplo para isto,

pois utilizam substratos múltiplos, freqüentemente de origem externa, e que respondem diretamente à diversidade ambiental (Alfenas, 1998). Portanto, estes fatos justificam a não eficiência destes sistemas em permitir a identificação da origem híbrida neste estudo.

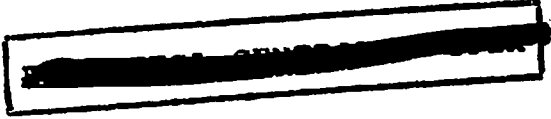
Deve-se considerar que uma possível hipótese para a não identificação do embrião zigótico do 'Citravo' pode estar relacionada ao estágio em que se encontravam os embriões (120 dias após a polinização) quando, provavelmente, somente os embriões nucelares, e, portanto, idênticos ao genitor feminino, devem ter sido resgatados. Isso pode ser explicado pela competição desvantajosa dos 'seedlings' zigóticos com aqueles de origem nucelar, os quais, além da superioridade numérica, são em regra mais vigorosos e, ainda, pela técnica de isolamento dos mesmos, uma vez que com a remoção dos embriões, grande parte do tecido de reserva é retirado, comprometendo a sua sobrevivência (Hoffmann e Fachinello, 1980; Koller, 1994).

Uma outra explicação para a ausência do embrião zigótico em todos os zimogramas, apesar do grande número de embriões amostrados, seria a existência de um mecanismo de controle para a não formação e/ou não desenvolvimento dos embriões zigóticos, provavelmente de origem genética. É relevante ressaltar que somente foram analisadas as provetas que apresentavam a sobrevivência de todos os embriões de um mesma semente, independente de seus estádios de desenvolvimento. Wakana e Uemoto (1987, 1988) suspeitaram de algum mecanismo promovido pelo saco embrionário para a inibição da divisão celular dos embriões localizados na região da chalaza, explicando o desenvolvimento quase que exclusivamente dos embriões nas proximidades da micrópila (Esen e Soost, 1977; Bruck e Walker, 1985a, 1985b). Além disso, algumas espécies de *Citrus* podem ser partenocárpicas e não existem informações sobre a diferença de intervalo de tempo entre a partenocarpia e a fertilização. Estudos que

permitted the induction of fertilization or that indicated the moment in which this occurs could facilitate the obtaining of zygotic embryos and, consequently, the possible identification using biochemical markers of isoenzymes.

6 Conclusões

1. Nas condições testadas, os sistemas enzimáticos glutamato oxalacetato transaminase (GOT), enzima málica (ME) e malato desidrogenase (MDH) permitiram a identificação dos embriões nucelares do 'Citravo' [*Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo X *Poncirus trifoliata* (L.)], sendo promissores marcadores bioquímicos para análise de poliembriões nucelares de citros.
2. O sistema enzimático glutamato oxalacetato transaminase (GOT) apresentou maior estabilidade nos padrões enzimáticos e resolução de bandas nítidas, independente do estágio de desenvolvimento da planta.



7 Referências Bibliográficas

- ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos.** Viçosa: UFV, 1998. 574p.
- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais.** Viçosa: SIF, 1991. 242p.
- BALLVE, R.M.L.; BORDIGNON, R.; MEDINA FILHO, H.P.; SIQUEIRA, W.J.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; POMPEU JÚNIOR, J. **Isoenzimas na identificação precoce de híbridos e clones nucelares no melhoramento de citros.** *Bragantia*, Campinas, v.50, n.1, p.57-76, abr. 1991.
- BILIA, D.A.C. **Comportamento de sementes de milho híbrido precoce e normal durante o armazenamento.** Piracicaba: ESALQ, 1992. 96p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- BRANDÃO JUNIOR, D. E. **Eletroforese de proteína e isoenzima na avaliação da qualidade de sementes de milho.** Lavras: UFLA, 1996. 110p. (Dissertação-Mestrado em Fitotecnia).
- BRUCK, D. K.; WALKER, D. B. **Cell detemination during embriogenesis in Citrus jambhiri II. Epidermal differentiation as a oul-time event.** *American Journal of botany*, Columbus, v.72, n.10, p. 1602-1609, Oct. 1985a.
- BRUCK, D.K.; WALKER, D.B. **Cell detemination during embryogenesis in Citrus jambhiri. I. Ontogeny of the epidermis.** *Botanical Gazette*, Chicago, v.146, n.2, p.188-195, June 1985b.
- CONN, E.C.; STUMPF, P.K. **Introdução à Bioquímica.** São Paulo: Edgard Bliicher, 1980. 451p.
- ESEN, A.; SOOST, R.K. **Adventive embryogeneseis in Citrus and its relation to pollinization and fertilization.** *American Journal of Botany*, Miami, v.6, n.6, p.607-614, July 1977.
- HOFFMANN, S.M., FACHINELLO, J.C. **Uso de porta-enxertos em fruticultura.** *Agros*, Pelotas, v.15, n.1, p.21-38, 1890.

- IGLESIAS, L., LIMA, H., SIMON, J.P. Isoenzyme identification of zygotic and nucellar seedlings in *Citrus*. **The Journal of Heredity**, Baltimore, v.65, n.2, p.81-84, Mar./Apr. 1974.
- KOLLER, O.C. **Citricultura: laranja, limão e tangerina**. Porto Alegre: Rigel, 1994. 446p.
- NAUMOVA, T.N. **Apomixis in angiosperm: nucellar and integumentary embryoni**. Boca Raton: CRC, 1993. 513p.
- POMPEU JÚNIOR, J. Porta-enxertos. In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A.A. **Citricultura brasileira**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v.1, p.265-280.
- REISER, L.; FISHER, R. L. The ovule and the embryo sac. **The Plant Cell**, Rockville, v.5, n.10, p.1291-1301, Oct 1993.
- RIBEIRO, V.G. **Localização de embriões zigóticos e nucleares em sementes de citros e ajustes do meio MS para o resgate de embriões imaturos 'in vitro'**. Lavras: UFLA, 1997. 61p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).
- SOOST, R.K.; CAMERON, J.W. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (eds.). **Advances in fruit breeding**, West Lafayette: Purdue University, 1975. p.507-540.
- STARRANTINO, A.; RUSSO, F. Seedlings from undeveloped ovules of ripe fruits of polyembryonic *Citrus* cultivars. **HortScience**, Alexandria, v.15, n.3, p.296-297, June 1980.
- TORRES, A.M.; MAU-LASTOVICKA, T.; WILLIAMS, T.E.; SOOST, R.K. Segregation distortion and linkage of *Citrus* and *Poncirus* isozymes genes. **The Journal of Heredity**, Baltimore, v.76, n.4, p.289-294, July/Aug. 1985.
- TORRES, A.M.; SOOST, R.K.; DIEDENHOFEN, U. Leaf isozymes as genetics markers in *Citrus*. **American Journal of Botany**, Columbus, v.65, n.8, p.869-881, Aug. 1978.
- TORRES, A.M.; SOOST, R.K.; MAU-LASTOVICKA, T. Citrus isozymes: genetics and distinguishing nucellar from zigotic seedling . **The Journal of Heredity**, Baltimore, v.73, p.335-339, 1982.

- WAKANA, A.; UEMOTO, S. Adventive embryogenesis in Citrus (Rutaceae). II. Postfertilization development. **American Journal of Botany**, Columbus, v.75, n.7, p.1033-1047, July 1988.
- WAKANA, A.; UEMOTO, S. Adventive embryogenesis in Citrus. I. The occurrence of adventive embryos without pollination or fertilization. **American Journal of Botany**, Columbus, v.74, n.4, p.517-530, July 1987.
- VIEIRA, M.G.G.C. Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). Lavras: UFLA, 1996. 114p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia).

Considerações Gerais

Este trabalho objetivou a análise citogenética do 'Citravo' [*Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo X *Poncirus trifoliata* (L.) e seus genitores e a análise isoenzimática de poliembriões.

Com relação à análise citogenética, além de adequar uma metodologia para avaliar o complemento cromossômico, objetivou-se também verificar sua ploidia, uma vez que o 'Citravo' ainda não havia sido avaliado citogeneticamente e, por resultar de hibridação interespecífica, havia a possibilidade de alterações cariotípicas.

Pelas características do complemento cromossômico dos citros, a metodologia convencional permitiu somente a contagem dos cromossomas, não se obtendo maiores informações estruturais; o 'Citravo' apresentou cromossomas com tamanho e morfologia muito semelhantes, bem como seus genitores, também sem diferença quanto a ploidia, apresentando todos $2n = 2x = 18$ cromossomas, estando de acordo com vários autores (Frost e Soost, 1968; Esen e Soost, 1971; Oiyama, 1981; Oiyama, 1983, Oiyama et al., 1991; Ito et al., 1992; Guerra et al., 1997).

Dessa forma, sugere-se utilizar técnicas de bandeamento fluorescente DAPI ou CMA ou banda C ou N. Esta última, para continuidade de estudos nesta linha, pode apresentar resultados satisfatórios, visto que, neste trabalho, foi possível visualizar constrição secundária em algumas metáfases dos três taxa analisados, com diferenças quanto ao número, posição e tipo de cromossoma. Contudo, não houve consistência nesse resultado. Segundo Swanson, Merz e Young (1981), a constrição secundária é controlada geneticamente e, em função da dominância, é um marcador citológico com possibilidade de evidenciar a hibridação.

Para a análise isoenzimática de poliembrões de 'Citravo', a cultura de embriões foi um pré-requisito importante para a maximização da indução de sobrevivência e desenvolvimento de poliembrões. Uma dificuldade nessa etapa relacionou-se ao fato de que todos os embriões de uma mesma semente foram implantados em uma mesma proveta, o que dificultou a análise da taxa de sobrevivência dos embriões, independente do seu estágio de desenvolvimento e, posteriormente para as provetas selecionadas, a coleta de folhas para análise de isoenzimas foi onerosa. Para evitar esses problemas, sugere-se a implantação de um embrião por proveta.

Os resultados da análise eletroforética pelos sistemas enzimáticos glutamato oxalacetato transaminase (GOT), enzima málica (ME) e malato desidrogenase (MDH) possibilitaram a distinção de poliembrões nucleares do 'Citravo', concordando com vários autores (Iglesias, Lima e Simon, 1974; Torres Soost e Diedenhofen, 1978; Torres, Soost e Mau-Lastovicka, 1982; Torres et al., 1985; Ballvé et al., 1991) e, nas condições testadas, revelaram ser promissores marcadores bioquímicos para análise de poliembrões de citros. O sistema enzimático esterase (EST), concordando com Brandão Júnior (1996), não se mostrou promissor para as condições testadas neste trabalho já que a atividade enzimática revelou-se muito instável, provavelmente devido à formação de compostos secundários, como os óleos essenciais.

Os resultados obtidos neste trabalho não possibilitaram a identificação de embriões zigóticos, provavelmente devido à ausência desses embriões já no momento da coleta dos frutos. A cultura de embriões com menos de 120 dias após a polinização já foi testada no Laboratório de Cultura de Tecidos da UFLA, não se obtendo a maximização da indução de sobrevivência e desenvolvimento de poliembrões de citros, não sendo, por isso, uma boa sugestão para resgatar o embrião zigótico.

Para a identificação da origem híbrida do 'Citravo' e de seus embriões, sugere-se a análise de isoenzimas de seus genitores também, o que não foi possível neste trabalho devido ao caráter caduco do genitor masculino, *Poncirus trifoliata*.

Referências Bibliográficas

- BALLVE, R.M.L.; BORDIGNON, R.; MEDINA FILHO, H.P.; SIQUEIRA, W.J.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; POMPEU JÚNIOR, J. Isoenzimas na identificação precoce de híbridos e clones nucelares no melhoramento de citros. *Bragantia*, Campinas, v.50, n.1, p.57-76, abr. 1991.
- BRANDÃO JUNIOR, D. E. Eletroforese de proteína e isoenzima na avaliação da qualidade de sementes de milho. Lavras: UFLA, 1996. 110p. (Dissertação-Mestrado em Fitotecnia).
- ESEN, A.; SOOST, R.K. Unexpected triploids in *Citrus*: their origin, identification and possible use. *The Journal of Heredity*, Baltimore, v.62, n.5, p.329-333, Nov./Dec. 1971.
- FROST, H.B.; SOOST, R. K. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In: REUTHER, W.; *The citrus industry: anatomy, physiology, genetics, and reproduction*. Riverside: University of California, 1968. v.2, p.290-324.
- GUERRA, M.; PEDROSA, A.; SILVA, A.E.B.; CORNÉLIO, M.T.M.; SANTOS, K.; SOARES FILHO, W.S. Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a citrus germoplasm bank. *Brazilian Journal of Genetics*, São Paulo, v.20, n.3, p. 489-496, 1997.
- ITO, Y.; OMURA, M.; NESUMI, H.; YOSHIDA, T. Improvement of preparation and observation methods for *Citrus* chromossomes. *Bulletin of Fruit Tree Research Station*, Tsukuba, v.23, n.3, p.57-66, Sept. 1992.
- OIYAMA, I. A technique for chromossome observation in root tip cells of *Citrus*. *Bulletin of Fruit Tree Research Station*, Tsukuba, n.3, p.62-69, 1981. (Série D).
- OIYAMA, I. Studies on the polyploidy breeding in citrus. III. Occurrence of triploids in the progenies of diploid sweet oranges crossed whit diploids. *Bulletin of Fruit Tree Research Station*, Tsukuba, n.5, p.1-8, 1983. (Série D).
- OIYAMA, I.; KOBAYASHI, S.; YOSHINAGA, K.; OHGAWARA, T.; ISHII, S. Use of pollen from a somatic hybrid between *Citrus* and *Poncirus* in the

production of triploids. *HortScience*, Alexandria, v.26, n.8, p.1082, Aug. 1991.

OLLITRAULT, P. Somatic embryo grafting: a promising technique for citrus breeding and propagation. *Fruits*, Paris, v.47, p.212-218, 1992. (Número Especial).

SWANSON, C.P.; MERZ, T.; YOUNG, W.J. Nucleolar organizers. In: ___. *Cytogenetics; the chromosome in division, inheritance and evolution*. 2.ed. London: Prentice-Hall International, 1981. p. 85-103.

TORRES, A.M.; MAU-LASTOVICKA, T.; WILLIAMS, T.E.; SOOST, R.K. Segregation distortion and linkage of *Citrus* and *Poncirus* isozymes genes. *The Journal of Heredity*, Baltimore, v.76, n.4, p.289-294, July/Aug. 1985.

TORRES, A.M.; SOOST, R.K.; DIEDENHOFEN, U. Leaf isozymes as genetics markers in *Citrus*. *American Journal of Botany*, Columbus, v.65, n.8, p.869-881, Aug. 1978.

TORRES, A.M.; SOOST, R.K.; MAU-LASTOVICKA, T. Citrus isozymes: genetics and distinguishing nucellar from zygotic seedling . *The Journal of Heredity*, Baltimore, v.73, p.335-339, 1982.