

BC/25709

IB/81139



UNICAMP

HIBRIDAÇÕES INTERESPECÍFICAS, INTERGENÉRICAS, INTERGRUPAIS,
INTERSUBTRIBAIS, INTERTRIBAIS E INTERSUBFAMILIARES
DE *Citrus* E GÊNEROS RELACIONADOS



RITA BORDIGNON

Orientador: Prof. Dr. Herculano Penna Medina Filho

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) *Rita Bordignon* e aprovada pela Comissão Julgadora.

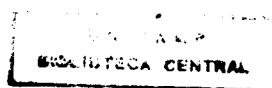
Rita Bordignon

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética.

CAMPINAS

Estado de São Paulo - Brasil

1995



A meus pais

Armando Luiz Bordignon (*in memoriam*)

e Norma Cadioli Bordignon

OFEREÇO

A meus filhos

Marina Bordignon Medina

e Ricardo Bordignon Medina

DEDICO

A meus sogros

Herculano Penna Medina

e Dixier Marozzi Medina

HOMENAGEIO

AGRADECIMENTOS

- Ao Instituto Agronômico de Campinas, à Seção de Genética e ao Centro de Citricultura "Sylvio Moreira" por possibilitar a realização destas investigações através de suas infra estruturas e apoio de dedicados pesquisadores e funcionários em várias fases desse trabalho.

- À Universidade Estadual de Campinas, particularmente ao Instituto de Biologia pelos conhecimentos adquiridos ao longo do curso de Pós-graduação.

- À Dra. Rosa Maria Lizana Ballvé pela grande contribuição à essas investigações e pela amizade durante tantos anos de convivência.

- Aos Drs. Joaquim Teófilo Sobrinho, diretor do Centro de Citricultura "Sylvio Moreira" e Jorgino Pompeu Júnior responsável pelo Banco de Germoplasma de Citros pela confiança e apoio à esse trabalho.

- À Srta. Solange Camargo pelo excelente trabalho de editoração e ao Sr. Ismael Cirilo Pinheiro pelo eficiente auxílio nos cruzamentos e condução das plantas.

- Ao Dr. Herculano Penna Medina Filho pela competente orientação, pelos ensinamentos e inestimável incentivo durante o curso de pós-graduação, realização das pesquisas e elaboração dessa tese.

- Aos Drs. Cláudio Luiz Messias, Rolf Dieter Illg e Rosa Maria Lizana Ballvé, membros da pré-banca e banca desta tese pelas correções, críticas e sugestões.

CONTEÚDO

| | Pág. |
|---|-------------|
| RESUMO | vii |
| SUMMARY | ix |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 7 |
| 2.1. Aspectos biológicos | 7 |
| 2.2. Melhoramento genético | 11 |
| 2.3. Identificação de híbridos após cruzamentos controlados | 14 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 18 |
| 3.1. Material Vegetal | 18 |
| 3.2. Polinizações controladas e obtenção de plantas híbridas e nucelares | 19 |
| 3.3. Identificação por eletroforese de isoenzimas das plantas híbridas obtidas nas polinizações controladas | 22 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 29 |
| 4.1. Metodologia de cruzamentos | 29 |

| | |
|---|----|
| 4.2. Identificação de híbridos através de eletroforese de isoenzimas e do caráter folha trifoliata | 33 |
| 4.3. Híbridações | 40 |
| 4.3.1. Híbridos interespecíficos e retrocruzamentos de <i>Poncirus</i> para <i>Citrus</i> | 40 |
| 4.3.2. Híbridos intergenéricos | 46 |
| 4.3.3. Híbridos intergrupais | 49 |
| 4.3.3.1. Cruzamentos envolvendo <i>Citropsis</i> spp., <i>Severinia buxifolia</i> e diversas espécies de <i>Citrus</i> | 49 |
| 4.3.3.2. Sunkifolias e Buxisunkis: híbridos distantes recíprocos entre <i>Citrus Sunki</i> e <i>Severinia buxifolia</i> | 50 |
| 4.3.4. Cruzamentos Intersubtribais | 54 |
| 4.3.5. Cruzamentos Intertribais | 56 |
| 4.3.6. Cruzamentos intersubfamiliares | 57 |
| 4.3.7. Considerações gerais sobre o resultado das híbridações | 58 |
| 5. CONCLUSÕES | 62 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 64 |
| 7. TABELAS | 77 |
| 8. FIGURAS | 98 |

**HIBRIDAÇÕES INTERESPECÍFICAS, INTERGENÉRICAS, INTERGRUPAIS,
INTERSUBTRIBAIS, INTERTRIBAIS E INTERSUBFAMILIARES
DE *Citrus* E GÊNEROS RELACIONADOS**

RITA BORDIGNON

RESUMO

Um total de 2833 híbridos de porta-enxertos para *Citrus* foram produzidos. Esses cruzamentos envolveram 14 espécies, 3 gêneros e 2 grupos taxonômicos da subtribo Citrinae. O germoplasma obtido e incorporado ao BAG de citros se constitui numa valiosa coleção de híbridos disponíveis para a seleção de novos porta-enxertos. Representa também uma considerável ampliação da variabilidade genética aproveitável para o melhoramento a longo prazo.

Quanto maior a distância taxonômica entre duas espécies, maior foi a dificuldade na obtenção de híbridos entre elas. Entretanto, esse fato não pode ser utilizado para prever a compatibilidade de um cruzamento específico. Isto só pode ser determinado por tentativas práticas.

Os híbridos Sunkifolias e Buxisunkis entre *Citrus sunki* e *Severinia buxifolia* são inéditos. Este é o primeiro caso de

obtenção de hibridações sexuais entre gêneros pertencentes à grupos taxonômicos diferentes da subtribo Citrinae. São vigorosos, enraizam facilmente por estaquia e são compatíveis em enxertia com *Citrus*. Tais híbridos tem grande interesse potencial como novos porta-enxertos e também como germoplasma para o melhoramento como fonte de genes de *Severinia* para introgressão em *Citrus* e seus híbridos.

Hibridação sexual clássica associada à identificação de híbridos através da eletroforese de isoenzimas é uma metodologia eficiente que pode ainda muito contribuir para o melhoramento dos citros.

INTERSPECIFIC, INTERGENERIC, INTERGRUPAL, INTERSUBTRIBAL,
INTERTRIBAL AND INTERSUBFAMILIAR HIBRIDIZATION OF *CITRUS* AND
RELATED GENERA

RITA BORDIGNON

SUMMARY

A total of 2833 rootstock hybrids for *Citrus* were produced. They comprised 14 species, 3 genera and 2 taxonomic groups of the subtribe Citrinae. This germplasm in the IAC citrus repository is an unvaluable collection of hybrids available for future rootstock selection. It also represents, a broadening of the genetic variability available for rootstock breeding in citrus on a long run.

The farther the taxonomic distance between two species, the greater the difficulty of obtaining hybrids between them. However, this cannot be used to forecast cross-compatibility of a specific cross. This only can be determined by actual attempts in crossing those species.

Sunkifolias and Buxisunkis, reciprocal sexual hybrids between *Citrus sunki* and *Severinia buxifolia* obtained in the present

investigation, constitute the first case of sexual intergroupal hybrids of subtribe Citrinae. They are vigorous, root easily and are graft-compatible with *Citrus*. There is considerable interest in them as potential new rootstocks, as well as source of *Severinia* genes for introgressing into *Citrus* and its hybrids breeding.

Classical sexual hybridization together with isozyme identification of hybrids is an efficient strategy that can still substantially contribute for citrus breeding.

1. INTRODUÇÃO

Entre as frutíferas, os citros ocupam em escala mundial o primeiro lugar em produção com 68 milhões de toneladas. Dessas, o Brasil contribui com 11,9 milhões e representa o maior produtor. Somos também, há mais de uma década, o maior exportador do mundo de suco concentrado de laranja com 72% do mercado mundial (PETROBRÁS, 1988). Essas exportações geram recursos anuais da ordem de U\$1,5 bilhões (GARCIA, 1992).

Em poucos anos, a produção evoluiu rapidamente. Passou de 6.000 ton em 1963 para 600.000 ton em 1984. De 76.000 ha plantados em 1974 contamos atualmente com 930.000 ha dessa cultura (NEVES, 1992) sendo que 80% se encontra no Estado de São Paulo. Estimativas recentes indicam que a produção da safra 95/96 deve se aproximar de 13 milhões de toneladas (DONADIO, 1995).

Reprodutivamente, os citros apresentam uma peculiaridade denominada poliembrionia. Em cada semente coexistem vários embriões onde apenas um deles é de origem zigótica formado pela união dos gametas masculinos e femininos. Os demais são apomíticos, vegetativos, também chamados de nucelares por se originarem do tecido nucelar materno.

A ocorrência desses clones nucelares tem uma consequência biológica importante. Originam plantas de mesmo genótipo mesmo se heterozigotas, resultando numa descendência uniforme.

Uma planta comercial de citros é constituída de dois genótipos distintos: a copa e o porta-enxerto. Pomares comerciais requerem copas e enxertos uniformes. Nas copas, essa uniformidade é obtida graças à propagação vegetativa feita através da enxertia por borbulhas. Nos porta-enxertos, essa constância genotípica é tentada, com êxito variável através da seleção dos "cavalinhos" na sementeira.

Em viveiros comerciais, essa seleção das plântulas nucelares das zigóticas é feita visualmente, separando-se para enxertia apenas aquelas morfologicamente uniformes, supostamente nucelares, descartando-se aquelas fora do padrão, de provável origem zigótica.

Apesar da enorme importância dos citros, poucos são os exemplos de clones de copas originados como resultado de programas

específicos de melhoramento. A maioria dos clones em cultivo é de origem remota, incerta, surgidos por variações somáticas espontâneas ou hibridações naturais que foram multiplicadas vegetativamente (DONADIO *et al.*, 1995). Com referência aos porta-enxertos, a situação é entretanto, diferente. Principalmente no EUA, muitos dos clones em cultivo foram resultado de programas de melhoramento genético (CASTLE, 1989).

Diversos são os problemas associados ao melhoramento de *Citrus*. Trata-se de uma espécie perene, de longo ciclo de semente à semente e longo período de juvenilidade. Se, por um lado a ocorrência de poliembrionia adventícia é vantajosa como um mecanismo para a eliminação de vírus, concomitante com a multiplicação vegetativa fiel de genótipos de interesse, por outro lado, é um fenômeno que dificulta tremendamente o melhoramento por reduzir ou mesmo impossibilitar a sobrevivência do embrião zigótico entre os vários embriões nucelares.

Além desses problemas mesmo quando os embriões zigóticos se desenvolvem normalmente, uma outra dificuldade se apresenta é a identificação das plantas híbridas deles originadas. Normalmente esse reconhecimento é feito no campo após vários anos de cultivo e análise de características morfológicas principalmente dos frutos. Tal procedimento, além de pouco eficiente é altamente dispendioso, limitando a exequibilidade da análise de grande número de indivíduos resultantes das hibridações. Por exemplo, se um

determinado cruzamento produz 10% de "seedlings" zigóticos (o que não é raro), de cada 100 árvores adultas no campo, somente 10 tem interesse em estudos pormenorizados. No entanto, até sua identificação, outras 90 plantas têm que ser analisadas e mantidas nesse período.

Nos citros é bem conhecido o marcador morfológico "trifoliata" de *Poncirus trifoliata*, dominante em relação a "folhas normais", unifolioladas de *Citrus*. Assim, quando esse clone, como genitor masculino, é utilizado em cruzamentos com *Citrus* as plantas resultantes que possuírem folhas com três folíolos são híbridas. A utilização desse marcador morfológico restrita portanto à tais cruzamentos. Para suplantar esses problemas tem-se utilizado a eletroforese de isoenzimas para identificar marcadores e com eles os híbridos oriundos de cruzamentos controlados. Essa técnica (MEDINA FILHO, 1983), desenvolvida nos anos 60 e 70 e aplicada aos citros nas décadas de 80 e 90 tem sido muito eficaz no apoio de programas práticos de melhoramento (BALLVÉ *et al.*, 1991).

A eletroforese é uma técnica de análise de proteínas. Essas proteínas (isoenzimas) servem como marcadores bioquímicos revelados pela análise de isoenzimas.

O Instituto Agrônomo de Campinas em seu Centro de Citricultura Sylvio Moreira localizado em Cordeirópolis mantém cuidadosamente um Banco Ativo de Germoplasma de Citros (BAG). Esse

BAG é considerado um dos mais extensos do mundo.

A necessidade premente do desenvolvimento de novos porta-enxertos para a citricultura (POMPEU Jr., 1990; 1994), a disponibilidade desse Banco de Germoplasma e a existência de um laboratório de eletroforese de isoenzimas na Seção de Genética possibilitaram o desenvolvimento do presente trabalho.

Esse plano teve como objetivo iniciar as etapas básicas de um programa de melhoramento genético para porta-enxertos em citros por meio da metodologia clássica de hibridações, adaptando-se porém à essa metodologia os procedimentos normalmente empregados na polinização controlada do cafeeiro. Especificamente, esse plano visa:

- a) em pragas e técnica de cruzamento de citros e café descritas, para produzir grande número de porta-enxertos híbridos entre clones elite. Identificar esses híbridos por eletroforese de isoenzimas. Nesses híbridos, a serem incorporados ao BAG para seleções futuras, poderão se associar características favoráveis de interesse agrônomo e industrial presentes em clones diferentes.
- b) ampliar a base genética para o programa de melhoramento, explorando tentativamente, hibridações interespecíficas, intergenéricas, intergrupais, intersubtribais e mesmo entre taxa

mais distantes.

- c) aumentar com essas investigações, os conhecimentos a respeito dos limites biológicos de compatibilidade de cruzamentos entre *Citrus* e gêneros da subfamília Aurantioideae.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos biológicos e taxonômicos

Entre os citros, existe grande variabilidade em relação ao tipo de planta bem como em relação aos frutos, quanto à forma, cor, tamanho, acidez, época de maturação, qualidade industrial, número de sementes e taxa de poliembrionia. Existe também grande diversidade, quanto à adaptadores edafo-climáticas, resistência à doenças e pragas e outros aspectos agronômicos.

O gênero *Citrus* e espécies relacionadas são membros da família Rutaceae (Tabela 1), subfamília Aurantioideae, subtribo Citrinae. Nessa subtribo Citrinae (Tabela 2) se encontram o gênero do grupo chamado "Citros Verdadeiros" formado por 6 gêneros: *Eremocitrus*, *Poncirus*, *Clymenia*, *Fortunella*, *Microcitrus* e *Citrus*.

Desses 6 gêneros, apenas *Poncirus*, *Fortunella* e *Citrus* são de importância econômica, destacando-se principalmente este último (SPIEGEL-ROY & VARDI, 1984)..

É incerto o centro de origem das principais espécies comercial com potencial. Segundo COOPER & CHAPOT (1977), as antigas escrituras chinesas sugerem a idéia que, com excessão do limão e do pomelo, os cultivares de citros se originaram na China.

A taxonomia de *Citrus* é bastante polêmica. Enquanto TANAKA (1954) considerava 145 e posteriormente 157 espécies, HODGSON (1961) propôs uma classificação em que as agrupa em 36 espécies somente. Já SWINGLE (SWINGLE & REECE, 1967) reconhece apenas 16 espécies como válidas.

KRUG (1943), estudando 13 gêneros da subfamília Aurantioideae e mais de 70 formas de *Citrus* determinou que o número básico de cromossomos é $x=9$ em todas as espécies estudadas. A grande maioria é diplóide com $2n=2x=18$ cromossomos, apesar de existirem naturalmente algumas formas poliplóides naturais e quimeras periclinais (BACCHI, 1940).

No gênero *Citrus*, as flores completas, hermafroditas, se desenvolvem nas axilas das folhas. Possuem de 4 a 8 pétalas e um cálice com 4 a 5 lóbulos com 15 a 30 estames. As anteras, com dois lóculos e deiscência longitudinal, se localizam ao redor do

pistilo, no mesmo nível do estigma.

O ovário é composto por 6 a 14 carpelos nos quais se desenvolvem as placentas contendo os óvulos. O óvulo maduro consiste do funículo, nucelo e um saco embrionário com 8 núcleos e 2 integumentos envoltórios.

O estigma se encontra receptivo entre 1 a 2 dias antes da antese e assim permanece por vários dias. Em algumas variedades pode ocorrer cleistogamia.

Salvo os casos de autoincompatibilidade, os citros são passíveis de autopolinização pela coincidência da receptividade do estigma com a deiscência das anteras. As células epidérmicas na superfície do estigma secretam um fluido viscoso com função de reter e promover a germinação dos grãos de pólen que se apresentam binucleados e aglomerados (CAMERON & SOOST, 1969).

Insetos polinizadores, principalmente as abelhas, visitam ativamente as flores promovendo, com isso, a polinização cruzada. Os grãos de pólen germinam na superfície estigmática e o núcleo generativo se divide formando dois gametas. No saco embrionário, um desses núcleos se funde com a oosfera e o outro com os dois núcleos polares, originando o núcleo do endosperma triplóide ($3n=27$), (FROST & SOOST, 1968).

Em condições normais, a fertilização ocorre de 2 a 8 dias após a polinização (CAMERON & SOOST, 1969), porém em alguns casos pode levar até 4 semanas (BACCHI, 1943).

Antes da primeira divisão do zigoto, o saco embrionário aumenta rapidamente de tamanho com a formação de vacúolos e muitas células do nucelo são desorganizadas. As informações de literatura sobre a época da primeira divisão do zigoto parecem indicar uma influência da variedade e das condições ambientais. Assim, enquanto que em alguns casos a primeira divisão zigótica pode levar até 4 meses (FROST & SOOST, 1968), em outros, pode ser de apenas 2 a 4 semanas (OSAWA, 1912). BACCHI (1943) se refere a este período como sendo 50 dias. As subseqüentes divisões originam um embrião completo, consistindo do hipocótilo, radícula, cotilédones e plúmula (FROST & SOOST, 1968).

Simultaneamente à formação do embrião zigótico, outros embriões são formados a partir de células do nucelo, originando-se as chamadas sementes poliembrionicas. A poliembrionia é de ocorrência generalizada entre os citros. Algumas formas são, no entanto, tipicamente monoembrionicas como algumas tangerinas e tangores. Enquanto que nesses, o único embrião formado tem sua origem a partir do zigoto, nas formas poliembrionicas existem nenhum, um ou raramente mais que um embrião sexual maduro, sendo os demais assexuais oriundos do desenvolvimento de células do nucelo (STRASSBURGER, 1878; SOOST & CAMERON, 1975). Essas células

nucleares localizadas próximas à micropila dão origem, por uma série de divisões mitóticas aos embriões adventícios das sementes poliembriônicas. Da germinação e desenvolvimento desses embriões, resultam as plantas nucleares, geneticamente idênticas à planta genitora.

Em casos menos frequentes, a poliembrionia pode ter uma origem não nuclear. FROST (1938) e BACCHI (1943) sugeriram a ocorrência de poliembrionia do tipo monozigótica pela fissão do embrião sexual.

Um terceiro tipo de poliembrionia foi sugerido por BACCHI (1943) e BANERJI (1954) respectivamente em *C. paradisi* e *C. grandis*, após observarem citologicamente 2 gametófitos em um único óvulo, os quais, teoricamente, levariam a formação de gêmeos dizigóticos ou não idênticos. De fato, os três tipos de poliembrionia ocorrem em *Citrus* (nuclear, mono e dizigótica) isso realmente ocorre, tendo sido geneticamente demonstradas em MEDINA FILHO *et al* (1993).

2.2. Melhoramento genético

Devido à poliembrionia e à conseqüente reprodução fiel de genótipos através dos clones nucleares, o melhoramento genético de porta enxertos de *Citrus* tem se baseado principalmente na hibridação de clones com características distintas, identificação

dos híbridos obtidos e avaliação do seu potencial agrônômico. Portanto, um aspecto de suma importância para um programa de melhoramento de porta-enxerto de citros são os cruzamentos controlados e a identificação dos híbridos obtidos.

Os relatos de WEBBER, (1900, 1906), WEBBER & SWINGLE (1905) e SWINGLE (1910) indicam que o trabalho de melhoramento de porta-enxertos foi iniciado antes de 1990 pelo USDA no estado da Flórida, visando o desenvolvimento de híbridos de *Poncirus trifoliata* e *C. sinensis* (laranja doce) com resistência ao frio. Denominados citranges, vários desses híbridos são utilizados comercialmente.

Diversos cruzamentos foram realizados entre 1920 e 1940 no USDA criando novas combinações de citranges e retrocruzamentos desses para a laranja doce. Híbridos foram também obtidos entre Kumquat (*Fortunella*) e trifoliatas (citruguats): entre citranges e Kumquat (citrangequat); *C. aurantifolia* (limas) e Kumquat (limequat); (TRAUB e ROBINSON, 1937; SWINGLE e ROBINSON, 1927).

Durante esse mesmo período desenvolveu-se também um extenso programa de cruzamentos na Universidade da Califórnia, no Centro de Pesquisas de Citros em Riverside, USA. Tais pesquisas, iniciadas por FROST (1926, 1935, 1940) deram maior ênfase ao desenvolvimento de novas copas. CAMERON et al (1965) com muitas informações acerca de genética contribuíram em muito para o programa de melhoramento iniciado por FROST.

Durante esse período, em ambas as localidades dos USA, Lake Alfred na Flórida e Riverside na Califórnia, estabeleceram-se extensos Bancos de Germoplasma, que forma base para esses e para os posteriores trabalhos de genética e melhoramento que se sucederam (SOOST e CAMERON, 1961). De tais coleções derivaram as principais introduções de *Citrus* e gêneros afins introduzidos no Instituto Agrônômico de Campinas pelo Dr. Sylvio Moreira.

Programas de hibridações e estudos relacionados à porta-enxerto foram também conduzidos em Java por TOXOPEUS (1933, 1936) e no Japão por NISHIURA & IWASAKI (1963). Esses estudos no Japão visavam principalmente o desenvolvimento de híbridos de trifoliata com resistência a baixas temperaturas.

Os trabalhos de hibridação continuaram, nas décadas subsequentes, a serem realizados principalmente na Flórida e na Califórnia (KUPPER & ROOSE, 1990). O interesse pelas hibridações entre diversas espécies de *Citrus* e ampliação dos bancos de germoplasma com outros gêneros afins foi constantemente renovado durante a evolução do parque citrícola. Isto se deve ao constante aparecimento de pragas e moléstias, cujo controle veio a ser feito pela substituição dos porta-enxertos em uso não só nos Estados Unidos como também no Brasil (MOREIRA & SALIBE, 1969).

Desde o início dos trabalhos de hibridação, verificou-se que em *Citrus* existe normalmente uma grande compatibilidade entre

espécies desse gênero, produzindo-se híbridos férteis e progênes vigorosas. Comparado à maioria das espécies de importância econômica, os limites de compatibilidade entre espécies e mesmo entre os gêneros afins de *Citrus* são muito mais amplos, não sendo difícil a hibridação entre eles. Esse fato tem sido bastante explorado pelos melhoristas e geneticistas dessa cultura conforme relatado por CAMERON e FROST, (1968).

É consenso entretanto, que os limites biológicos para as hibridações intergenéricas em *Citrus* estão confinados aos gêneros pertencentes ao grupo dos "Verdadeiros" não tendo sido obtidos híbridos de *Citrus* com qualquer outro gênero fora do grupo dos "Verdadeiros" (Figura 1) (SWINGLE & REECE, 1967; GROSSER *et al.*, 1988; IWAMASA *et al.*, 1988; GROSSER & GMITTER JR., 1990). Por essa razão, grande ênfase no melhoramento de citros tem sido dada às pesquisas de fusão de protoplastos (GROSSER *et al.*, 1989; OHGAWARA *et al.*, 1985; TUSA *et al.*, 1992; OHGAWARA *et al.*, 1989; VARDI, 1981; KOBAYASHI *et al.*, 1991; GROSSER *et al.*, 1992; LOUSADA *et al.*, 1992).

2.3. Identificação de híbridos após cruzamentos controlados

Poliembrionia e apomixia são comuns nos citros. Como mencionado anteriormente, nas sementes poliembriônicas os embriões nucelares de reprodução vegetativa, se desenvolvem juntamente com

o embrião zigótico. Conseqüentemente, após polinizações controladas, as progênies se constituem em uma mistura de híbridos e clones nucelares em proporções que variam principalmente com a direção do cruzamento. A não ser nos casos de cruzamentos entre certos taxa distantes ou, quando se usa *Poncirus trifoliata* como marcador, é grande a dificuldade de distinção entre esses dois tipos de plantas, a menos que sejam cultivadas por vários anos no campo e se avaliem seus frutos e características vegetativas.

É pois de grande conveniência que a identificação das plantas híbridas oriundas de embriões zigóticos, após os cruzamentos controlados, seja feita no estágio de "seedings", antes do plantio definitivo. A partir dessa identificação precoce em viveiro em casas-de-vegetação, os campos de observação para avaliações agronômicas podem então serem constituídos somente de plantas híbridas.

Para que isto seja possível, são necessários marcadores morfológicos dominantes ou codominantes reconhecíveis na fase de muda. Infelizmente, somente o caracter trifoliata, presente em *Poncirus trifoliata* satisfaz essa exigência ainda que parcialmente. Esse marcador é de valia apenas nos cruzamentos envolvendo essa espécie e limita também seu emprego somente como genitor masculino. Além desses problemas é necessário, também que os indivíduos de *Poncirus* sejam homozigotos para o alelo trifoliata ou. Caso sejam heterozigotos seus híbridos trifoliatas ocorrerão na proporção de

1:1 devido à segregação dos alelos na meiose.

Atualmente o método mais promissor e prático de identificação precoce de híbridos é a análise de padrões isoenzímicos obtidos através de eletroforese (WARNER *et al*, 1970; PIERCE & BREWBAKER, 1973; IGLESIAS *et al*, 1974; TORRES *et al*, 1978).

As proteínas são substâncias que tem carga elétrica e quando essas são submetidas a uma corrente elétrica num determinado meio de migração (gel de amido), elas se deslocam diferencialmente, principalmente de acordo com sua carga. Depois de terminada a eletroforese adiciona-se ao gel um substrato e um sal, ambos específicos para a isoenzima que se deseja visualizar. Dessa forma, observam-se no gel, bandas coloridas em diferentes posições e que se constituem nos marcadores bioquímicos. As bandas nos géis são portanto, fenótipos.

Como as enzimas são produto quase diretos dos genes, a ocorrência de formas multimoleculares ou isoenzimas se constituem em excelentes marcadores genéticos. São pouco influenciadas pelo ambiente, segregam, no geral, como fatores mendelianos simples e tem uma ação genética codominante. As aplicações dessa técnica no melhoramento de plantas são descritas por MEDINA FILHO (1983).

Trabalhando com citros, BALLVÉ *et al* (1991) relatam a caracterização de 31 clones de citros empregando-se seis sistemas

enzímicos. Em condições laboratoriais semelhantes, esses seis sistemas revelam, nos 31 clones estudados, a expressão de 7 locus e 25 alelos. Permite com isso, já a partir do primeiro par de folhas dos "seedlings", a distinção de híbridos e clones nucelares. A eficiência da técnica depende no entanto do cruzamento específico realizado e dos locus avaliados. Essa eficiência varia de 0 à 100% quando apenas um locus é considerado. A análise de mais de um locus aumenta a eficiência de identificação dos híbridos nos casos em que os locus dos parentais são heterozigotos para os mesmos alelos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

A maioria das plantas utilizadas no presente trabalho encontram-se em coleção viva no Centro de Citricultura Sylvio Moreira do Instituto Agronômico localizado em Cordeirópolis, SP. Essa coleção, composta de cerca de 1300 introduções, se encontra disposta em diferentes lotes que, coletivamente, compõem o Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de citros.

Na Tabela 3 são indicados os clones utilizados e seus respectivos números de identificação no BAG. Tais plantas, adultas, são vegetativamente propagadas por borbulha em porta-enxertos de tangerina Cleópatra ou limão Cravo. Alguns representantes de gêneros distantes de citros são, por motivos de incompatibilidade,

mantidos como pés-francos. Alguns poucos indivíduos dos gêneros *Pilocarpus*, *Clausena*, *Triphasia* e *Metrodorea* são externos ao BAG, pertencendo entretanto, ao Complexo Botânico Monjolinho do IAC em Campinas.

3.2. Polinizações controladas e obtenção de plantas híbridas e nucelares

Em Cordeirópolis e, no geral no Estado de São Paulo o florescimento dos citros cultivados se dá em Agosto-Setembro. Algumas introduções do BAG tem entretanto, uma época de florescimento um pouco diferente, antecipada ou atrasada em relação aos clones cultivados, podendo ocorrer, em alguns casos, várias vezes ao ano.

Durante o florescimento realizam-se as polinizações. Feita uma seleção dos clones a serem utilizados é então avaliada a disponibilidade de botões florais dos dois parentais a serem envolvidos nos cruzamentos. Apenas parte do plano de cruzamentos idealizado a priori é realizado. Pequenas mas significantes diferenças no florescimento ou deficiente produção de pólen dos genitores são suficientes para, na prática, impedir a realização de muitos cruzamentos.

Algumas das principais operações na realização de cruzamentos

são ilustradas nas Figuras 2 e 3. Os cruzamentos realizados são mostrados nas Tabelas 4 à 15.

Dois a quatro dias antes da antese, os botões florais do clone a ser utilizado como genitor feminino são emasculados. Nessa fase os estigmas ainda não estão receptivos e as anteras estão imaturas, indeiscentes. Os ramos após emasculação das flores são protegidos com saco de papel especial. Os botões florais fornecedores de grãos de pólen são colhidos de preferência na véspera da antese e mantidos em placas de Petri até a abertura da flor e liberação dos grãos de pólen.

Dois a cinco dias após a emasculação, os sacos são abertos e os estigmas, então receptivos, polinizados esfregando-se diretamente as anteras sobre eles. Em seguida, os sacos são novamente fechados e os ramos identificados. Procede-se desta maneira para evitar a autopolinização das flores ou contaminações por pólen estranho.

Após uma a duas semanas de polinização, os sacos de papel são removidos, os ramos e identificados com etiquetas metálicas, permanentes, marcados com fita para serem visualizados à distância. Periodicamente cada ramo é inspecionado, eliminando-se os novos botões florais que normalmente surgem em floradas subsequentes e contaminam os ramos de cruzamento.

Após a completa maturação dos frutos, procede-se a colheita e a remoção de suas sementes. Essas são lavadas, e, com pinças especiais, são removidas a testa e o tegumento que envolvem as sementes. São colocadas em seguida para germinar em placas de Petri com papel de filtro umedecido e mantidas em laboratório, sob temperatura ambiente.

A germinação é rápida, porém variável, de acordo com o material. Assim que se inicia, os embriões da semente, quando poliembriônica (Figura 4), são individualizados com uma pinça e cuidadosamente transplantados para bandejas tipo "speedling". Em seguida são cobertos com fina camada de areia lavada, molhados regularmente e mantidos em condições de laboratório até o aparecimento da parte aérea. Nesse estágio, são então levados para casa de vegetação para promover um rápido desenvolvimento.

Aos sessenta dias aproximadamente, as plântulas já possuem um a dois pares de folhas e se encontram numa fase em que é possível realizarem-se as análises de isoenzimas pela técnica de eletroforese para distinguir os híbridos dos clones nucelares. Para essas análises, é suficiente apenas parte de uma folha mesmo que pequena já é suficiente. Das folhas desenvolvidas retiram-se discos de 0,5cm de diâmetro com auxílio de um furador de rolhas. Uma vez analisadas, as plantas híbridas identificadas são transplantadas para o campo. De cada indivíduo são retirados borbulhas para a preservação e estudos posteriores com os híbridos. Após a retirada

de borbulhas, os híbridos são enxertados com copa de laranja Valência para avaliações diversas (Figura 4).

3.3. Identificação por eletroforese de isoenzimas das plantas híbridas obtidas nas polinizações controladas

As análises de isoenzimas foram realizadas na Seção de Genética do Instituto Agronômico em um equipamento desenvolvido segundo o modelo idealizado por TANKSLEY (1979). Esse equipamento é mantido à 3 ± 2 C° em câmara frigorífica com ventilação interna forçada. Em cada um dos quatro géis inserem-se até 40 amostras. Externamente à câmara frigorífica, se localizam as fontes de voltagem (Heathkit) com controle de voltagem e amperagem.

Após a corrida, cada gel é seccionado horizontalmente em até 5 camadas podendo, cada uma ser revelada para diferentes sistemas isoenzímicos.

Os procedimentos (BALLVÉ *et al.*, 1995) para a análise de isoenzimas realizados através da eletroforese, podem ser resumidos nas seguintes etapas:

I. Na véspera da corrida preparam-se os géis de amido hidrolizado de batata (Sigma) a 12% em solução tampão TRIS 0,018M - ácido cítrico 0,036M, pH entre 7,9 - 8,3, ajustado com

TRIS 0,73M.

Para a preparação do gel, o amido é dissolvido em 1/4 da solução tampão resfriada, sendo os 3/4 restantes fervidos e adicionados à essa suspensão agitando-se vigorosamente. Em seguida o gel ainda liquefeito é degaseificado pela aplicação de vácuo, colocado em moldes de acrílico os quais são mantidos à temperatura ambiente até o dia seguinte.

II. As folhas das plantas a serem analisadas são coletadas, lavadas e colocadas em saco plástico umedecido e mantidas em geladeira por até duas semanas. Durante esse período realizam-se as análises.

Para tanto, é retirado um disco de 1cm de diâmetro da folha do clone a ser avaliado o qual é macerado em placa acrílica, utilizando-se água como solução extratora e, para facilitar a maceração, adiciona-se um pouco de sílica lavada.

III. O macerado é absorvido em papel de filtro para eletroforese e este é inserido no gel de amido, previamente resfriado à 4°C por meia hora.

IV. Os géis são colocados nas câmaras frigoríficas e faz-se o contato com os eletrodos cujas cubas são previamente preenchidas com tampão de ácido bórico 0,3M pH 8,3 ajustado com NaOH 4N.

V. Inicia-se a eletroforese aplicando-se 25mA por gel sem ultrapassar 150V por 25 minutos para a inserção do extrato contido no papel de filtro no gel de amido. Após esse tempo as amostras são removidas e então aplica-se, durante uma hora, um máximo de 25mA e 150V. Posteriormente ajusta-se a amperagem para 30mA e após 40 minutos, ajusta-se a voltagem para 300V, cuidando-se para não ultrapassar 30mA. Tais condições promovem a migração do fronte para o anodo em cerca de 8,0 cm da origem. O processo completo leva um total de aproximadamente 4 horas.

VI. Terminada a eletroforese, os géis são seccionados em camadas horizontais utilizando um fio de aço tensionado que desliza sobre guias laterais de bastões de vidro de diferentes diâmetros.

VII. As camadas são então reveladas para os sistemas isoenzímicos à temperatura ambiente, lavadas e fixadas com glicerol 50% em água.

Na presente investigação, foram revelados seis sistemas isoenzímicos: APS (fosfatase ácida), GOT (glutamato oxaloacetato transaminase), ME (enzima málica), PGI (fosfoglucoisomerase), PGM (fosfoglucomutase) e PRX (peroxidase catódica e anódica), com as especificações abaixo, para a revelação, utilizando-se reagentes Sigma a seguir indicados:

APS (E.C.3.1.3.2. - Fosfatase ácida)

(Vallejos, 1983)

| | |
|---|--------|
| Fast Black K salt | 50 mg |
| Na Acetato 50 mM | 50 ml |
| MgCl ₂ .6H ₂ O 1 M | 1 ml |
| β - Naphthyl acid phosphate 1% em 50% acetona | 1,5 ml |

- Incubar no escuro

GOT (E.C.2.6.1.1. - Glutamato oxaloacetato transminase)

(Vallejos, 1983)

| | |
|---|--------|
| A. Tris (0,1M)-MgCl ₂ (0,04 M) pH 8,5 com HCl 3N | 100 ml |
| α - Ketoglurate | 100 mg |
| Aspartic Acid | 200 mg |
| B. Pyridoxal-5-P | 10 mg |
| Fast Blue BB salt | 150 mg |

- colocar sol. A em B momentos antes de incubar no escuro

ME (E.C.1.1.1.40 - Enzima málica)

(Tanksley, com pessoal à H.P.Medina Filho)

| | |
|---|--------|
| Malic Acid | 500 mg |
| NADP+ | 7 mg |
| MTT | 10 mg |
| PMS | 2 mg |
| TRIS (0,1 M)-MgCl ₂ (0,04 M) pH 7,5 com HCl 3N | 50 ml |

- ajustar pH 7,5 com 1N NaOH

- incubar no escuro

PGI (E.C.5.1.3.9. - Fosfoglucoisomerase)

(Vallejos, 1983)

| | |
|---|-------------|
| Fructose-6-P | 40 mg |
| NADP+ | 7 mg |
| MTT | 10 mg |
| PMS | 2 mg |
| TRIS (0,1 M)-MgCl ₂ (0,04 M) pH 7,5 com HCl 3N | 50 ml |
| Glucose-6-PDH-momentos antes de incubar | 15 unidades |

- incubar no escuro

PGM (E.C.2.7.5.1. - Fosfoglucomutase)

(Tanksley, com pessoal à H.P. Medina Filho)

| | |
|---|--------|
| Glucose-1-P | 150 mg |
| NADP+ | 7 mg |
| MTT | 10 mg |
| PMS | 2 mg |
| TRIS (0,1 M)-MgCl ₂ (0,04 M) pH 7,5 com HCl 3N | 50 ml |
| Glucose-6-PDH-momentos antes de incubar | |

- incubar no escuro

PRX (E.C.1.11.1.7. - Peroxidase)

(Vallejos, 1983 - Receita B)

| | |
|-------------------------------------|---------|
| A.3-Amino-9-ethylcarbazole | 50 mg |
| N.N. Dimethyl formamide | 3 ml |
| B. Na Acetate 50 mM pH 4,5 | 100 ml |
| C. H ₂ O ₂ 3% | 0,75 ml |

- Colocar sol. B em A e adicionar C momentos antes de incubar.

A revelação das bandas de isoenzimas dos sistemas acima, demora de alguns minutos até, no máximo, 3 horas à temperatura ambiente. Após a fixação, os géis são avaliados visualmente quanto à presença e posição relativa das bandas.

O processo de identificação dos híbridos através de seus genótipos de eletroforese se baseia na presença e segregação de alelos específicos encontrados nos genitores. Quando ambos os genitores são heterozigotos para os mesmos alelos, 50% dos híbridos são identificados por seus genótipos homozigotos resultantes da segregação meiótica e recombinação desses alelos. Os outros 50% dos híbridos, heterozigotos, ou são identificados por outros locus, ou confundidos com os nucelares. Esse processo é detalhadamente discutido em BALLVÉ *et al* 1991. Uma vez identificados como híbridos, as plantas ainda em casa de vegetação em Campinas, são separadas e depois transplantadas para o campo em Cordeirópolis.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Metodologia de cruzamentos

No decorrer do presente estudo, as milhares de polinizações realizadas, o grande número de frutos colhidos e os híbridos deles obtidos vem indicar, sem dúvida, a eficácia dos procedimentos para polinização controlada descritos por CAMERON E FROST (1968), mostrando que essa metodologia se aplicou muito bem aos objetivos do presente trabalho e às condições em que aqui foi realizado (Tabelas 5, 7, 9, 11, 13 e 15).

Conforme discutido por esses autores, os cruzamentos dos citros podem ser realizados também sem a proteção dos ramos antes e após as polinizações. Nesse caso, os estigmas são polinizados imediatamente após a emasculação. CAMERON E FROST (1968) fazem essa

afirmação baseados na informação de FURR *et al* (1963) que as abelhas raramente visitam as flores de citros se as pétalas forem removidas durante a emasculação.

No presente trabalho, a primeira série de polinizações foram realizadas fazendo-se a proteção dos ramos. No último ano, esse procedimento não foi adotado. Verificou-se que casos de contaminação por pólen estranho foram raros para os dois procedimentos, indicando, que realmente, a proteção com sacos de papel não é essencial. Isso simplifica bastante e aumenta muito a rapidez na execução das polinizações controladas. Algumas contaminações foram verificadas, tendo se originado por autofecundação devido a ocasionais manipulações desenvolvidas no processo de castração e ou polinização.

Cabe salientar que, com poucos recursos investidos na execução dos cruzamentos um expressivo número de híbridos obtidos, foi feito o que corrobora a eficiência dos procedimentos empregados.

Um outro fato que vem consolidar a eficiência da metodologia empregada, foi a obtenção inédita dos híbridos recíprocos entre *C. sunki* e *S. buxifolia* denominados Sunkifolias e Buxisunkis, os quais serão discutidos no item 4.3.3.2.

Sabe-se que o reconhecimento do pólen compatível ocorre na superfície do estigma das plantas. Por essa razão, YAMASHITA,

(1981); PANDEY, (1963); SHIVANNA E RANGAWAMY, (1965) E VAN TUYL et al., (1982) experimentaram a aplicação do fluido estigmático de genitores masculinos na superfície do estigma de genitores incompatíveis, com o objetivo de evitar as reações de incompatibilidade, promovendo com isso, a hibridação de espécies que normalmente não se cruzam ou autofecundações de clones autoincompatíveis. Baseando-se nessas informações, tentou-se a hibridação distante de *C. sunki* com *Severinia buxifolia* (Tabela 2), apesar da literatura indicar que os cruzamentos de citros somente seriam compatíveis quando realizados entre espécies ou entre gêneros pertencentes ao mesmo grupo taxonômico. Aplicou-se, nessa primeira tentativa, o fluido estigmático de *Severinia* sobre o estigma de *Sunki* antes de sua polinização por *Severinia*.

Como foram obtidos híbridos desse cruzamento, tido como impossível, pensou-se inicialmente que a razão desse sucesso foi devida ao fluido estigmático aplicado. Entretanto, em ocasião subsequente, realizaram-se cruzamentos sem a aplicação de fluido estigmático, obtendo-se outro híbrido *Sunkifolia* e dois *Buxisunkis* (recíprocos). Esses resultados indicaram que, pelo menos no presente caso, o sucesso da obtenção de híbridos tão distantes não foi devido à aplicação de fluido estigmático, e sim à outras razões como serão discutidas no item 4.3.3.2..

Especial atenção é necessária para a fonte de pólen a ser utilizada nos cruzamentos. O procedimento aqui empregado à esse

respeito é proveniente da metodologia normalmente empregada nas polinizações com o cafeeiro (KRUG, 1935) conforme explicado a seguir.

Na véspera dos cruzamentos, pela manhã, são coletados botões ainda não abertos ou iniciando a antese, antes das 9:00hs, pois é rara a ocorrência das abelhas nesse período. Esses botões são então colocados em placas de Petri fechadas e sem umidade como é feito com cafeeiro. Os botões florais de citros não necessitam de umidade nas placas para promover a abertura da flor e liberação do pólen. Na verdade, qualquer adição de umidade às placas prejudica a antese das flores. Para apressar a antese, é conveniente colocar as placas de Petri com os botões recém colhidos por cerca de uma hora ao sol da manhã. Esse procedimento promove no geral uma rápida e abundante liberação de pólen, permitindo que as polinizações sejam feitas na mesma manhã da coleta dos botões. Após abertura das flores, as placas são mantidas à sombra e se prestam para a polinização por mais um dia.

Uma situação diferente ocorre porém, com as flores de *Feroniella oblata*. Interessantemente, observou-se que a deiscência das anteras dessa espécie somente ocorreu após quatro dias da coleta, quando as flores foram deixadas em ambiente seco e fresco sob ar condicionado do laboratório. Nesta ocasião, as anteras se encontravam bastante desidratadas e já com coloração marrom. Os grãos de pólen, de coloração amarelo pálido, eram abundantes na

superfície das anteras podendo então, serem utilizados nas polinizações. Como nenhum híbrido foi obtido com o pólen de *Feroniella* assim produzido, investigou-se a viabilidade desse pólen através de testes de germinação em lâminas de vidro com solução de sacarose apropriada (LINSKENS, 1964). Verificou-se que a viabilidade do pólen de *Feroniella* é normal. Cabe salientar que, em condições de campo em Cordeirópolis, raramente foram observadas flores de *Feroniella* com anteras deiscentes. A produção de frutos também foi pequena, durante esses anos. Trata-se de material botânico exótico pouco adaptado às nossas condições.

Concluindo, a metodologia de cruzamento e os procedimentos empregados se mostraram bastante adequados e eficientes para a produção de híbridos de porta-enxertos de citros em nossas condições.

4.2. Identificação de híbridos através de eletroforese de isoenzimas e do caráter trifoliata

A ocorrência de poliembrionia nos citros traz consigo a consequente dificuldade para distinguirem-se, após cruzamentos controlados, os híbridos dos clones nucelares. Esses últimos, não tem valor para o melhoramento genético. Por essa razão e devido à insuficiência de marcadores morfológicos, é que utiliza-se a eletroforese de isoenzimas na identificação de híbridos.

Uma exceção à essa afirmação se refere ao fator morfológico folha trifoliata. A maioria dos gêneros da subfamília Aurantioideae possui folhas unifoliadas. Folhas trifolioladas ocorrem entretanto em *Poncirus trifoliata*, *Swinglea glutinosa*, *Triphasia trifolia* e *Luvunga*. A característica "folha trifoliolada", é condicionada em *Poncirus* por um ou dois pares de genes dominantes em relação ao caráter folha unifoliada de *Citrus* (TOXOPEUS, 1962). Invariavelmente, os híbridos F_1 entre *Citrus* e *Poncirus* são trifoliolados. Não se tem informação sobre o número de locus e ação gênica envolvida na expressão desse caráter nas outras espécies trifolioladas.

Embora seja um bom marcador morfológico, sua utilização prática no melhoramento restringe-se somente à identificação de híbridos entre *P. trifoliata* e *Citrus*, com a restrição adicional de ser o processo válido apenas quando *P. trifoliata* é o genitor masculino. No cruzamento recíproco, isto é, quando *P. trifoliata* é o genitor feminino, não é possível distinguir os híbridos pelo caráter folhas trifolioladas, pois as plantas nucelares também possuem essa característica.

Os híbridos *C. sunki* x *P. trifoliata* (Tabela 7) foram identificados através desse marcador morfológico. Entretanto, ele não pôde ser utilizado nos cruzamentos recíprocos dessa combinação e também em Trifoliata x Azeda (Tabela 7), os híbridos foram identificados através de eletroforese.

O cruzamento Trifoliata (♀) x Azeda (♂) representa um bom exemplo do valor da análise de isoenzimas na identificação de híbridos de citros. Sem essa técnica, não poderiam ter sido reconhecidos os híbridos entre essas espécies, visto terem falhado completamente as tentativas de hibridações recíprocas. Os cruzamentos Azeda x Trifoliata, 152 flores de Azeda foram polinizadas não se obtendo, entretanto, nenhuma descendência. As flores de Azeda, apesar de grandes e de fácil emasculação, são extremamente sensíveis à manipulação, ocorrendo sua abscisão à menor injúria. Híbridos de Azeda (utilizada como genitor feminino) foram somente obtidos, quando se efetuaram castrações especialmente cuidadosas.

O caráter trifoliata foi também utilizado na identificação de híbridos de Sunki com Citremon São Jacinto, Citremon 46216, Citrumelo Sacaton e introduções, 1693, 1707, 1708, 1709 e 1697. Como pode ser verificado na Tabela 4 esses materiais são híbridos ou derivados de híbridos de *Poncirus*, sendo, portanto, heterozigotos para o caráter trifoliata. Dessa forma, seus híbridos com Sunki ocorreriam teoricamente na proporção de 1 trifoliata: 1 unifoliata. Devido à praticidade da avaliação visual, selecionaram-se apenas os híbridos com folhas trifolioladas ficando os híbridos unifoliados, que só poderiam ser identificados por eletroforese, confundidos com as plantas nucelares e foram então descartados.

Entre os diversos tipos de cruzamentos realizados, atenção

especial foi dada à hibridações interespecíficas entre clones elite de porta-enxertos visando produzir híbridos associando qualidades de interesse presentes em ambos genitores.

Tais hibridações se referem principalmente aos cruzamentos de limão Cravo Limeira, tangerina Sunki, laranja Azeda São Paulo e Trifoliata Davis A, por razões que serão discutidas no item 4.3.1.

Na Figura 5 são mostrados alguns géis de isoenzimas de plantas obtidas desses cruzamentos. Na Tabela 16 são indicados em detalhes esses cruzamentos, seus genótipos para sete locus isoenzímicos e os genótipos dos híbridos resultantes desses cruzamentos. Nota-se que nesses cruzamentos, os genótipos que identificam os híbridos variam conforme o cruzamento específico considerado.

Por exemplo, no cruzamento Sunki x Azeda, os locus Aps-1, Got-1 e Me-1 não contribuem para identificar os híbridos. Ambos genitores são homozigotos para os mesmos alelos em cada um desses três locus. Entretanto, Got-2 e Pgm-1, isoladamente identificam 50% dos híbridos, visto terem os demais o mesmo genótipo das plantas nucelares, idêntico ao genitor feminino Sunki. Já através do locus Prxa-1 são identificados 75% dos híbridos, pois é esperado que apenas um em cada quatro híbridos tenham o mesmo genótipo (FM) da tangerina Sunki.

Para esse mesmo cruzamento, com o locus Pgi-1 discrimina-se

100% das plantas híbridas obtidas. Na progênie desse cruzamento todas as plantas que ocorrerem com genótipo FF são consideradas nucelares e as plantas com genótipo WF e FS, sem dúvida, híbridas.

Nesse caso do cruzamento de Sunki x Azeda apenas com a utilização de 1 loco isoenzímico (Pgi-1) é possível a identificação de 100% dos híbridos. Entretanto, em outros cruzamentos, como por exemplo Sunki x Cravo, é necessária a análise simultânea de vários locos para a identificação de cerca de 100% dos híbridos obtidos. Neste caso (cruzamento 2 da Tabela 16), através de Got-1 são identificados 50% dos híbridos e da mesma forma, através dos locos Got-2, Pgi-1 e Prxa-1 metade dos híbridos são identificados. Considerando a análise simultânea dos 4 locos, a possibilidade de uma planta híbrida ter o mesmo genótipo de uma nucelar para os 4 locos, seria $1/2 \times 1/2 \times 1/2 \times 1/2 = 6,25\%$. Isto significa que 93,75% dos híbridos podem ser inequivocamente identificados. Isto é possível porque uma mesma amostra de uma planta pode ser analisada para cinco sistemas isoenzímicos diferentes. Portanto os híbridos são identificados e confirmados através de vários locos distintos.

Utilizando-se esse mesmo raciocínio foram identificados os híbridos dos demais cruzamentos indicados na Tabela 16, e nos outros cruzamentos realizados ressalta feita à consideração que se segue.

Para alguns cruzamentos, os genitores envolvidos haviam sido pouco investigados, não tendo sido submetidos à uma análise genética minuciosa como a que se havia procedido com os clones elite de porta-enxertos acima discutidos. Mesmo nesses casos, a eletroforese também permite uma identificação dos híbridos através de uma análise mais simplificada. Nos híbridos observa-se um padrão de bandas de isoenzimas composto pela associação dos padrões de seus genitores, independente de uma interpretação genética detalhada dessas bandas.

Dos cruzamentos *Severinia buxifolia* x *Citrus sunki* e seus recíprocos, resultaram os híbridos Sunkifolias e Buxisunkis (Figura 6). Tais híbridos, oriundos de taxa tão distantes (Figura 7) apresentavam, já aos 6 meses da germinação, folhas e espinhos bem distintos dos clones nucelares de Sunki e *Severinia* não existindo maiores dificuldades na sua identificação visual. A morfologia das folhas e a asa do pecíolo são intermediárias àquelas dos genitores (Figura 6). As análises isoenzímicas de Pgi-1, Pgm-1, Got-1, Got-2 e Prxa-1 confirmaram inequivocamente a natureza híbrida dessas plantas.

C. sunki é homozigota FF para Pgi-1. Em *S. buxifolia* verificou-se a ocorrência de um novo alelo para esse locus, aqui denominado B. *S. buxifolia* é heterozigota BS, sendo o alelo S comum à diversas outras espécies de *Citrus*. Para Prxa-1, *Severinia* à semelhança de *C. sunki*, é heterozigota FM. É interessante salientar

que apesar da distância taxonômica entre *Citrus* e *Severinia* deve existir uma homeologia razoável entre esses dois gêneros no que diz respeito aos locus Prxa-1 e Pgi-1, visto que nos Sunkifolias e Buxisunkis, o produto dos alelos de cada espécie em cada um desses dois locus se combinam, formando heterodímeros.

O sistema isoenzímico GOT em *Citrus* apresenta 2 locus: Got-1 e Got-2, sendo este último, provavelmente um locus duplicado em *tandem* no genoma (BALLVÉ *et al*, 1991) A interpretação genética desse sistema em *S. buxifolia* e seus híbridos é complexa, não tendo sido possível estabelecer uma correspondência genética desses locus entre as duas espécies. Sunkifolias e Buxisunkis, entretanto apresentam um padrão composto da associação das bandas das espécies genitoras. Essa situação, conforme discutido anteriormente, permite da mesma forma identificar tais híbridos pela eletroforese de isoenzimas.

Para o locus Pgm-1, Sunki é homozigota FF sendo *Severinia* homozigota para o alelo P, que ocorre em *Poncirus trifoliata*. Sunkifolias e Buxisunkis se mostram nos géis, heterozigotos FP.

Concluindo, as análises de isoenzimas mostraram-se suficientemente eficientes para a identificação precoce de híbridos de citros. Na Tabela 17, encontram-se os genótipos para sete locus isoenzímicos de alguns genitores utilizados nas hibridações. O carácter morfológico folha trifoliata mostrou-se igualmente

eficiente. É porém, nos anos que pode ser utilizado, muito mais prático e rápido e deve ser preferido à eletroforese de isoenzimas principalmente quando um grande número de plantas necessita ser analisado. O emprego desse marcador fica entretanto, restrito à hibridações com *Poncirus* e seus derivados, quando participam nos cruzamentos como genitores masculinos.

4.3. RESULTADO DAS HIBRIDAÇÕES REALIZADAS

4.3.1. Híbridos interespecíficos e retrocruzamentos de *Poncirus* para *Citrus*

Ao contrário da maioria das espécies botânicas bem estudadas, poucas são as barreiras biológicas que evitam a hibridação interespecífica entre os *Citrus*. Dessa forma, conhecem-se híbridos como os tangelos (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*), tangores (*Citrus reticulata* x *Citrus sinensis*), etc (Figura 1).

Na Tabela 5 são mostrados os resultados das hibridações interespecíficas de *Citrus*, nelas incluídos retrocruzamentos de primeira e segunda geração de *Poncirus* para *Citrus*. Esses resultados confirmam as afirmações acima. O objetivo principal dos cruzamentos das Tabelas 4 e 5 foi a obtenção de híbridos entre clones elite de porta-enxertos, híbridos de *Poncirus* e outros materiais como tangelo Orlando, limão Volkameriano e Sheekawasha.

Grande ênfase foi dada nos cruzamentos de *Citrus sunki*, *C. aurantium* e *C. limonia*. Híbridações envolvendo a tangerina Sunki foram priorizadas por ser ela o único porta-enxerto a mostrar resistência ao declínio em testes de vários anos. Sunki não é utilizada em larga escala devido a susceptibilidade à gomose (FEICHTEMBERGER, 1990). O declínio, ou "blight" como é chamado nos EUA (CASTLE, 1989), é uma doença responsável pela morte de 10 milhões de árvores por ano no Brasil (POMPEU Jr., 1994), causando enormes prejuízos econômicos. O limão Cravo sobre o qual se assenta 90% do parque citrícola nacional, é altamente susceptível ao declínio.

A laranja Azeda, outrora a base da citricultura paulista, não mais foi utilizada após a introdução do CTV (*Citrus tristeza virus*) em 1937. O CTV causa a doença denominada tristeza que, transmitido pelo pulgão preto, mata as copas de laranjas-doce enxertadas sobre esse porta-enxerto. Não fosse esse problema que na década de 40 dizimou os pomares do Estado de São Paulo, a laranja Azeda estaria hoje sendo utilizada, como ainda o é na região do Texas nos EUA, devido ao vigor na sementeira e em campo, excelente qualidade que confere às frutas das copas nela enxertada e à alta resistência à gomose de *Phytophthora* (FEICHTEMBERGER, 1990).

A laranja Azeda foi substituída pelo limão Cravo, vigoroso, rústico e resistente ao CTV na década de 40. Com a incidência do declínio na década de 70, surgiu então, a necessidade de substituir

o limão Cravo por um porta-enxerto resistente à essa doença, à tristeza e também com bom nível de tolerância à gomose de *Phytophthora*.

Os híbridos obtidos entre Sunki e Azeda, Sunki e Cravo e seus recíprocos estarão, no futuro, sendo testados para essas características.

Uma vez que os clones de citros são altamente heterozigotos, tentou-se obter grande número de híbridos entre os clones elite visando aumentar a chance de serem obtidas plantas que associem diversas características de interesse, presentes nos genitores envolvidos nos cruzamentos. Espera-se, por exemplo, que entre os híbridos Sunki x Azeda e recíprocos, exista pelo menos algum que seja resistente ao declínio como a Sunki e à gomose como a Azeda, e também com razoável taxa de poliembrionia e induza boa qualidade de frutos como ambos os pais.

É interessante notar nos cruzamentos de Sunki como genitor feminino a alta taxa de híbridos em relação ao número de plantas obtidas (Tabela 5).

A tangerina Sunki produz em sua descendência de polinização aberta não mais que 30% de plantas zigóticas, ou seja, produz razoável quantidade de plantas nucelares (MEDINA FILHO, dados não publicados). Entretanto, a alta taxa de híbridos obtidos (plantas

zigóticas) em cruzamentos com a Sunki contrasta com a taxa de nucelares obtidas na descendência normal desse clone.

Isso talvez seja devido à uma propensão natural da Sunki para produzir plantas zigóticas quando polinizadas com pólen compatível, e em caso inverso, produzir nucelares quando polinizadas com pólen incompatível. O fato da Sunki produzir plantas por autofecundação entre os "descartes" de sementeira comercial (MEDINA FILHO, dados não publicados) indica entretanto que este clone tem, pelo menos, certa autocompatibilidade. Esta porém não seria total, o que levaria em condições de livre polinização normais à produção de uma taxa razoável de clones nucelares. A biologia da reprodução da tangerina Sunki necessita de maiores estudos.

As hibridações entre Sunki e Cravo, sob o ponto de vista prático da citricultura revestem-se de uma grande importância. Procura-se associar nos híbridos entre esses clones (Tabela 5) a produtividade e a resistência ao declínio da Sunki (TEÓFILO SOBRINHO *et al.*, 1990) com a excepcional rusticidade em campo e performance em viveiro do limão Cravo (POMPEU JÚNIOR, 1990).

Além disso, seria também necessário que esse híbrido apresentasse em relação à gomose, pelo menos o mesmo nível de resistência do limão Cravo que é comerciável tolerável. Existem grandes esperanças que, entre os 468 diferentes híbridos dessa combinação, pelo menos um tenha essas características desejadas.

Nesses cruzamentos entre clones elite, procurou-se também realizar, na medida do possível, os cruzamentos em ambas as direções, utilizando-se o mesmo clone tanto como genitor masculino quanto feminino. Duas foram as razões principais para a realização dos cruzamentos recíprocos.

A primeira é que desconhecia-se a taxa de poliembrionia e o grau de dificuldade na obtenção de híbridos entre eles. Essas são informações que somente foram adquiridas após a realização dos cruzamentos. Na literatura não caso inexistem informações a respeito.

A segunda razão é a produção de híbridos de constituição nuclear semelhantes, em citoplasmas distintos. A literatura está repleta de exemplos de características agronômicas condicionadas por interações núcleo-citoplasmáticas (JONES & EMSWELER, 1936; THOMPSON, 1961).

Analisando-se a Tabela 5, principalmente para os seis primeiros cruzamentos, nos quais um grande número de flores foram polinizadas, verificam-se grandes diferenças entre o número de híbridos obtidos por flores polinizadas, entre o número de plantas por frutos colhidos e entre o número de híbridos identificados em relação ao número de plantas obtidas.

Isso se deve à diversos fatos. Sunki, Cravo e Azeda diferem

bastante quanto à:

- a) Capacidade de suportar a manipulação de suas flores, quando das operações de emasculação e polinização.
- b) Capacidade de promover o pegamento dos frutos e manter um desenvolvimento normal até a maturidade, mesmo quando pouca ou nenhuma semente viável encontra-se em seu interior.
- c) Frequência de sementes poliembrionicas por fruto e taxa de poliembrionia nessas sementes.
- d) Compatibilidade específica com o pólen do genitor masculino.
- e) Capacidade de produzir híbridos.

Um exemplo interessante que ilustra bem essa discussão é o caso do cruzamento Sun Chu Sha Kat x Sunki, no qual foram obtidas 417 plantas a partir de apenas 20 frutos (Tabela 5). Isso se deve ao fato da Sun Chu Sha Kat possuir grande número de sementes por fruto e essas terem normalmente dois ou mais embriões. A produção de híbridos de Sunki em tais sementes poliembrionicas resultou extremamente baixa. De 417 plantas obtidas, apenas seis eram híbridas. Situações bastante semelhantes foram observadas com a tangerina Sun Chu Sha Kat em hibridações com Cravo e Azeda. Isto contrasta bastante com os cruzamentos Sunki x Azeda e Sunki x

Cravo, onde Sunki, como genitor feminino propiciou a obtenção de grande número de híbridos e poucos nucelares.

Em resumo, os novos híbridos interespecíficos produzidos correspondem à 32 combinações diferentes das quais, 25 tem a tangerina Sunki como um dos genitores.

Vários anos serão necessários para avaliar esses híbridos interespecíficos aqui produzidos. Representam uma grande variabilidade genética disponível para a seleção de porta-enxertos para a citricultura.

4.3.2. Híbridos Intergenéricos

Nas hibridações intergenéricas, os esforços foram concentrados em cruzamentos com *Poncirus trifoliata* devido à característica enanicante e também à qualidade das frutas que confere às copas sobre ele enxertadas. O clone Davis A foi empregado, porque, de acordo com as informações de POMPEU JR. (comunicação pessoal), ele representa o melhor clone disponível de *Poncirus* o qual, além das características acima, possui razoável compatibilidade em enxertos com a laranja Pêra.

As características da tangerina Sunki e da laranja Azeda, mencionadas no item 4.3.1, estimularam a realização de cruzamentos entre *Poncirus* esses clones no intuito de se obterem híbridos de

porta-enxertos tolerantes ao declínio, à gomose e enanizantes. A atual citricultura tende, cada vez mais, a aumentar a densidade de plantio nos pomares e à produção de frutos de alta qualidade para a industrialização. Essas características podem estar representadas nos híbridos obtidos.

No que concerne aos cruzamentos entre *Citrus* e *Poncirus*, não parece existir incompatibilidade. Das 468 flores polinizadas, obtiveram-se 195 híbridos. É curioso o resultado dos cruzamentos *Trifoliata* x *Sunki*. De 257 flores polinizadas, obtiveram-se apenas 2 frutos. Entretanto esses frutos geraram 21 plantas, das quais 20 eram híbridas. Esse resultado não seria muito esperado, visto serem as sementes do Davis A poliembriônicas e, portanto, não muito propensas à obtenção de híbridos em cruzamentos utilizando-o como genitor feminino.

Esses híbridos de *Trifoliata* representam também, à semelhança dos híbridos interespecíficos, um excelente material para a seleção de novos porta-enxertos. A nível de viveiro, tem-se observado vários exemplares com grande vigor vegetativo em vários exemplos.

De acordo com SWINGLE & REECE (1967), parece não existir maiores dificuldades nos cruzamentos de *Citrus* com *Fortunella* ou *Eremocitrus*. Vários outros híbridos intergenéricos existentes (Figura 1) sugerem não haver grandes problemas para obter outros híbridos intergenéricos. Exceção é feita aos cruzamentos envolvendo

Clymenia e *Microcitrus*.

Clymenia não está representada no BAG de Cordeirópolis. *Microcitrus australasica* (limão Faustrine) é bastante prolífico, porém outros representantes desse gênero, tem crescimento reduzido não foram visto florescer e são pouco adaptados às nossas condições.

Fora do grupo da Subtribo Citrinae, o único cruzamento intergenérico tentado foi entre *Murraya paniculata* e *Clausena excavata* (Tabela 7). Ambas pertencerem à Subtribo Clauseninae, mas são morfologicamente bastante diferentes. Das 32 flores polinizadas não foram obtidos frutos.

Diferentemente da maioria dos gêneros da subfamília Aurantioideae, que são diplóides com 18 cromossomos (KRUG, 1943), *Clausena lansium* é poliplóide com 78 cromossomos somáticos (SANTOS & GUERRA, 1993). Quanto à espécie *C. excavata* aqui investigada não se tem informações sobre seu número de cromossomos. Entretanto, mesmo que *C. excavata* fosse também poliplóide, seria temeroso explicar que não se cruza com *Murraya* devido à diferenças nos graus de ploidia, mas esse poderia ser um fator importante. Um maior número de polinizações seriam necessárias para a obtenção de informações mais precisas.

4.3.3. Híbridos Intergrupais

4.3.3.1. Cruzamentos envolvendo *Citropsis* sp, *Severinia buxifolia* e diversas espécies de *Citrus*

As hibridações intergrupais realizadas se resumem em cruzamentos de *S. buxifolia* do grupo dos "Primitivos", com várias espécies do gênero *Citrus* que pertencem ao grupo dos "Verdadeiros". A única exceção é o cruzamento de *C. sunki* com *Citropsis* sp, este último do grupo dos "Próximos à Citros" (Tabela 8).

Das tentativas de hibridações intergrupais, apenas obteve-se sucesso nas hibridações *Citrus sunki* x *Severinia buxifolia* e seus recíprocos (Tabela 9). Tais cruzamentos produziram seis híbridos em 516 flores. Nenhum outro híbrido de *Severinia* foi obtido embora 344 flores, de 9 outras espécies de *Citrus* tenham sido polinizadas com *Severinia*.

Tampouco obteve-se em 129 flores sucesso nas tentativas de cruzamentos de duas espécies de *Citrus* (*C. sunki* e *C. reshni*) com *Citropsis* que pertence ao grupo dos "Próximos a Citros". BARRET, (1977) e IWAMASA *et al.*, (1988) também não conseguiram híbridos entre *Citrus* x *Citropsis*.

Aparentemente existe uma certa compatibilidade entre *C. sunki*

e *S. buxifolia*. Não ocorreria porém, entre *S. buxifolia* e outras espécies de *Citrus*. Esse fato vem reafirmar a idéia de ser difícil generalizações a respeito de compatibilidade entre gêneros e espécies diferentes baseados na classificação taxonômica ou afinidades bioquímicas e moleculares (MEDINA FILHO *et al.*, 1984). Os mecanismos de isolamento entre espécies são complexos e não permitem inferências baseadas em características morfológicas utilizadas para a classificação taxonômica. Informações seguras somente são conhecidas através de tentativas experimentais de cruzamentos controlados.

Devido à sua importância, os híbridos entre *Citrus* do grupo dos "Verdadeiros" e *Severinia* do grupo dos "Primitivos", serão comentados com mais detalhes no item 4.3.3.2. a seguir.

4.3.3.2. Sunkifolias e Buxisunkis: híbridos distantes recíprocos entre *Citrus Sunki* e *Severinia buxifolia*

A subtribo Citrinae da subfamília Aurantioideae é dividida taxonomicamente em três grupos: o grupo dos "Citros Primitivos", o grupo dos gêneros "Próximos à Citros" e o grupo dos "Citros Verdadeiros". O gênero *Citrus* e cinco outros pertencem à este último grupo (Tabela 2).

Os híbridos interespecíficos como os tangelos, lemonanges,

tangores, etc, são comuns em citros (Figura 1), enquanto que os híbridos intergenéricos, de acordo com a literatura pertinente (BARRET, 1977; GROSSER *et al.*, 1988 e GROSSER & GMITTER JR, 1990; CAMERON & FROST, 1968; IWAMASA *et al.*, 1988), são possíveis somente entre gêneros pertencentes ao mesmo grupo. Dessa forma, os híbridos conhecidos até o presente como os citrunquats, eremolemons, citranges, faustrimedins, etc (Figura 7) são todos híbridos entre representantes dos "Citros Verdadeiros". Supostamente este fato viria corroborar a idéia da impossibilidade de se obterem híbridos intergrupais.

Na primeira tentativa de cruzamentos entre essas duas espécies, 156 botões florais de *C. sunki* em diferentes estádios de desenvolvimento receberam na superfície de seus estigmas o fluido estigmático de *Severinia*. Em seguida foi colocado o pólen dessa espécie, à semelhança das tentativas de YAMASHITA, (1981) para suplantar autoincompatibilidade em *Citrus* e de PANDEY, (1963); SHIVANNA & RANGASWAMY, (1969) e VAN TUYL *et al.*, (1982) para evitar incongruidades em outras plantas.

Dos seis frutos obtidos dessas polinizações foram extraídas oito sementes monoembriônicas, as quais originaram sete plantas, três das quais verificaram-se híbridas. Uma vez que polinizações normais sem o fluido estigmático não foram realizadas nessa ocasião - pois tomou-se por certa a impossibilidade de obtenção de tais híbridos através dos métodos de polinizações convencionais -

permaneceu a dúvida se o sucesso de tais hibridações distantes tinha sido devido à polinização em botões imaturos, à aplicação do fluido estigmático ou à uma certa compatibilidade natural até então desconhecida entre os genitores utilizados.

No ano seguinte, tentou-se também o cruzamento recíproco polinizando-se 219 flores de *Severinia buxifolia* sem qualquer procedimento especial. Obtiveram-se três frutos, cada um com uma semente monoembriônica de cotilédones verde-escuros. Duas germinaram normalmente e resultaram híbridos que foram denominados Buxisunkis. Das novas polinizações de Sunki com *Severinia* obteve-se mais um Sunkifolia. Portanto, o sucesso na obtenção dos Sunkifolias e Buxisunkis se deve a um certo grau de compatibilidade entre essas duas espécies.

Tentativas para obter híbridos entre essas duas espécies foram infrutíferas em Riverside, nos EUA (CAMERON & FROST, 1968) e em Saga, no Japão (IWAMASA *et al.*, 1988). Por essa razão, tem-se nesses países recorrido à fusão de protoplastos como um método alternativo às infrutíferas tentativas de cruzamentos entre essas e outras espécies (GROSSER *et al.*, 1992; GROSSER, 1991; LOUSADA *et al.*, 1992; OHGAWARA *et al.*, 1985; OHGAWARA *et al.*, 1989; GROSSER *et al.*, 1988).

A obtenção desses híbridos sexuais diplóides Sunkifolias e Buxisunkis é de grande interesse científico e prático. Tanto quanto

se sabe, representam o primeiro caso de hibridações entre gêneros distantes pertencentes à grupos distintos da subtribo Citrinae (Figura 7) e contesta um conceito generalizado na literatura citrícola.

Os seis indivíduos híbridos diferentes representam combinações distintas de genes nucleares de *Severinia* e de *Citrus*, vez que foram obtidos por via sexual, portanto, passando pela meiose e segregação de seus alelos. O fato de esses híbridos terem sido obtidos em ambas as direções é também bastante interessante. Isso amplia as possibilidades de explorar interações núcleo-citoplasmáticas desses genótipos com o citoplasma de ambas as espécies.

Esses híbridos, caso sejam férteis, pode não ser também úteis como "pontes genéticas" para transferir genes de interesse de *Severinia* para outras espécies de *Citrus*, gêneros relacionados ou seus híbridos.

A tangerina Sunki, entre vários porta-enxertos testados em larga escala no Brasil, é o único que se mostra resistente ao "declínio dos citros". A Sunki não tem sido atualmente utilizada em larga escala como porta-enxerto de laranjas devido à susceptibilidade à gomose de *Phytophthora*. *Severinia buxifolia* é considerada altamente resistente à este fungo, à vários nematóides que causam problemas práticos à citricultura, à salinidade e parece

conferir às copas de laranjas nela enxertadas excelente qualidade do suco. Entretanto, *Severinia* não é utilizada como porta-enxerto devido ao crescimento extremamente vagaroso na sementeira e à susceptibilidade ao vírus da tristeza, para o qual a *Sunki* é resistente.

Investigações futuras deverão determinar o potencial agrônômico desses seis híbridos, dos quais quatro já se mostram bastante vigorosos.

4.3.4. Cruzamentos Intersubtribais

Os cruzamentos entre subtribos da tribo Citreae foram representados por cruzamentos envolvendo *Triphasia trifolia* da subtribo Triphasiinae, *Feroniella oblata* e *Swinglea glutinosa* da subtribo Balsamocitrinae e *Citrus celebica*, *Citrus sunki* e *Poncirus trifoliata* da subtribo Citrinae.

Nenhum híbrido foi obtido apesar de intensas tentativas, principalmente de *Sunki* com *Swinglea* (511 flores), *Feroniella* (484) e *Triphasia* (144) (Tabela 11).

Embora não tenham sido obtidos híbridos, é digno de nota o grande número de frutos e plantas resultantes desses cruzamentos. Por exemplo, os cruzamentos *Sunki* x *Feroniella* produziram, de 71 frutos, 314 plantas, uma média de 4,4 plantas por fruto, bem

superior a 2,0 normalmente produzido pela Sunki em condições de livre polinização. Merece destaque o número de plantas por fruto de *Citrus celebica* (64).

De 333 flores de Sunki polinizadas com *Swinglea*, obtiveram-se 23 plantas típicas de *C. sunki*, com exceção de duas. Essas estão atualmente desenvolvendo o primeiro par de folhas, não tendo sido ainda submetidas à eletroforese de isoenzimas. A tentativa de cruzamento com *Swinglea* somente foi possível devido à uma florada extemporânea da Sunki visto aquela espécie florescer tardiamente, em fins de outubro em Cordeirópolis.

Como *Swinglea glutinosa* é uma espécie trifoliolada, seria lógico considerar a possibilidade de que, híbridos entre ela e *C. sunki* fossem também trifoliolados à semelhança dos híbridos *Citrus* x *Poncirus*. Essas duas plantas referidas na Tabela 11 possuem uma morfologia de folha atípica, podendo uma delas vir a ser trifoliolada.

Seria uma grande conquista científica se tais plantas fossem realmente híbridas entre as subtribos Citrinae e Balsamocitrinae, fato que estenderia os limites de obtenção de híbridos de *Citrus* com um gênero fora da subtribo Citrinae.

Swinglea glutinosa, nativa das Filipinas (SWINGLE & REECE, 1967) é bem adaptada à solos submetidos à alta temperatura, embora

possa suportar temperaturas próximas de zero no inverno.

Segundo BITTERS *et al* (1969), essa espécie é compatível em enxertos com *Citrus*, o que torna mais interessante ainda o potencial dessas plantas se forem híbridas. Entretanto, maiores comentários seriam prematuros.

4.3.5. Cruzamentos Intertribais

Os cruzamentos intertribais realizados, se resumem naqueles entre *Murraya paniculata* da tribo Clauseneae e representantes da tribo Citreae, subtribo Citrinae. Nenhum híbrido foi obtido, embora 614 flores tenham sido polinizadas artificialmente.

O potencial de *Murraya* como porta-enxerto de citros parece incerto. As tentativas de enxerto sobre *Murraya*, ou falham ou produzem plantas anãs, com pouco vigor (BITTERS *et al.*, 1969; 1977).

O interesse de se obterem híbridos com *Murraya* é devido à grande distância taxonômica entre os parentais. É evidente que quanto maior a distância taxonômica entre duas espécies, menores as possibilidades delas terem pragas e doenças comuns.

Em outras palavras, em termos de melhoramento, híbridos entre *Murraya* e *Citrus* poderiam ser de interesse, pois mesmo não se

conhecendo atualmente todo o potencial dessa espécie, um híbrido entre eleas, poderia no mínimo, ampliar a base genética para futuros trabalhos de melhoramento ou representar a solução para um futuro problema. A única referência encontrada na literatura sobre esses cruzamentos intertribais com citros, é o comentário de CAMERON & SOOST (1968), o qual segundo esses autores, TOXOPEUS em Java, teria obtido híbridos entre esses dois gêneros, embora muito fracos.

Infelizmente não se teve mais notícias, nem pela literatura nem por coleção de material vegetal distribuído à outros centros, dos supostos híbridos de TOXOPEUS que teriam sido produzidos pouco antes da 2ª guerra mundial, permanecendo dúvidas sobre a real existência desses híbridos.

4.3.6. Cruzamentos intersubfamiliares

Entre os cruzamentos intersubfamiliares, quatro diferentes espécies foram cruzadas, embora apenas duas subfamílias estivessem envolvidas. A Rutoideae com 86 gêneros e a Aurantioideae com 33 gêneros são as duas maiores subfamílias da família Rutaceae, a qual é composta por 150 gêneros (ENGLER, 1931).

Não foi encontrada na literatura, referências alguma sobre cruzamentos envolvendo *Citrus* e gêneros tão distantes localizados em Subfamília fora da Aurantioideae.

Os testes preliminares de enxertia de *Citrus* sobre *Metrodorea nigra* (MEDINA FILHO, dados não publicados), mostraram que as borbulhas de *Citrus sinensis* permanecem vivas por vários meses, iniciando mesmo um pequeno crescimento nessa espécie. Esse fato acena para a existência de pelo menos uma tênue congruidade entre esses gêneros de subfamílias diferentes da família Rutaceae.

Os cruzamentos intersubfamiliares ficam bastante limitados pela época de florescimento desses materiais. Nesse trabalho foram possíveis somente as tentativas de cruzamentos com híbridos de *Fortunella* por que florescem várias vezes durante o ano.

Das 386 flores polinizadas, nenhum fruto foi obtido desses cruzamentos.

4.3.7. **Considerações gerais sobre o resultado das hibridações**

Os resultados obtidos corroboram plenamente o conceito de que as hibridações interespecíficas em *Citrus* são obtidas sem dificuldades, o mesmo se aplicando às hibridações intergenéricas, pelo menos no que diz respeito ao grupo dos "Verdadeiros".

A dificuldade aumenta à medida que os clones utilizados nos cruzamentos vão ficando taxonomicamente mais distantes. Entre os vários cruzamentos intergrupais, foram obtidos somente os híbridos

Sunkifolias e Buxisunkis (*Citrus* x *Severinia*). Entre os intersubtribais, talvez tenha se conseguido um híbrido entre (*Citrus* x *SWINGLEA*). Nos cruzamentos intertribais, nenhum híbrido foi obtido, embora dos cruzamentos tenham sido colhidos vários frutos. Já nos intersubfamiliares, não somente híbridos foram obtidos, como sequer houve pegamento dos frutos. híbridos.

Devido à importância desses gêneros e espécies da subfamília Aurantioideae, um esforço especial deveria ser feito principalmente para introduzir no IAC outros gêneros e espécies, da coleção de Riverside na Califórnia. Dos 33 gêneros dessa subfamília, 25 são mantidos nessa coleção (USDA-ARS).

Essas introduções viriam enriquecer o BAG do Instituto Agronômico e permitir com isso, muitas outras investigações a respeito da genética e melhoramento dos citros. No BAG de Cordeirópolis que, sem dúvida é um acervo botânico importantíssimo, principalmente no que se refere às laranjas doces (*Citrus sinensis*), estão representados apenas 13 gêneros dessa importante subfamília.

Na subtribo Citrinae, por exemplo, entre o grupo dos "Primitivos", existe apenas o gênero *Severinia*, representado apenas por uma espécie. Dos dois gêneros que compõem o grupo dos "Próximos", encontra-se em coleção apenas *Citropsis* (embora erroneamente catalogado como *Atalantia*).

Entre os seis gêneros do grupo dos Verdadeiros, 4 estão presentes.

No decorrer desse trabalho, intenso esforço foi investido na obtenção de híbridos de porta-enxertos através de cruzamentos interespecíficos e intergenéricos. A reunião por hibridação de genomas distintos nesses exemplares híbridos não somente reúne características de interesse presentes em genitores diferentes como também cria a oportunidade para a expressão da variação genética transgressiva e para a variação nova ("novel variation"). Esta última se expressa nos híbridos como uma característica não encontrada em nenhum dos pais. Esse processo promove também a segregação de genes de interesse. Inicia, com a formação do híbrido, a sua introgressão em germoplasmas diversos. Com isso, aqueles genes de grande utilidade que se encontram em germoplasma não diretamente utilizável como porta-enxerto, portanto não aproveitados, tornam-se então pelo processo de hibridação, utilizáveis.

Apesar da poliembrionia nos citros, causar consideráveis dificuldades para a obtenção de híbridos, por outro lado, ela é extremamente vantajosa para a multiplicação uniforme e fiel dos híbridos então obtidos, possibilitando a sua utilização prática em trabalhos de seleção e plantios comerciais.

Os híbridos entre *C. limonia*, *C. aurantium*, *C. grandis*, *C.*

sunki, *C. depressa*, *C. reticulata*, *C. limon*, *C. paradise*, *Poncirus trifoliata*, *Severinia buxifolia*, e outros, foram enxertados com copas de laranja Valência e estarão sendo avaliados durante muitos anos, visando determinar seu potencial no melhoramento e sua utilização como novos porta-enxertos para a citricultura.

Os híbridos produzidos nesse trabalho se constituem em um importantíssimo material genético incorporado ao BAG do Instituto Agrônomo. Se encontra agora à disposição dos pesquisadores para seleção agrônoma e, sem dúvida, será estudado por muitos anos no futuro.

Historicamente, a citricultura no Brasil tem sobrevivido à ininterruptas ameaças de pragas, doenças e condições adversas do ambiente, graças à utilização prática da variabilidade genética à qual se adicionam os resultados do presente trabalho.

5. CONCLUSÕES

- 1) A técnica de cruzamentos utilizada se mostrou eficiente para a produção de grande número de híbridos de porta-enxertos de citros e gêneros afins.
- 2) Em termos amplos, quanto maior a distância taxonômica entre duas espécies, maior a dificuldade na obtenção de híbridos entre elas. Entretanto não é possível generalizações e previsões de compatibilidade em cruzamentos baseando-se na posição taxonômica dos genitores. Informações seguras somente são obtidas por tentativas reais de cruzamentos entre eles.
- 3) Ao contrário dos relatos na literatura, foi possível a obtenção de híbridos entre as espécies *Citrus sunki* e *Severinia buxifolia* como também seus recíprocos denominados Sunkifolias e

Buxisunkis. Essas hibridações entre espécies do grupo dos "Citros verdadeiros" e do grupo dos "Citros Primitivos" podem se constituir em uma "ponte genética" para transferir genes importantes de *Severinia* para *Citrus* e seus híbridos. Sunkifolias e Buxisunkis, inéditos no mundo, tem também grande potencial como novos porta-enxertos para a citricultura. Enraizam facilmente por estaquia e são compatíveis em enxertos com *Citrus*.

- 4) Um total de 2833 híbridos de porta-enxertos foram produzidos envolvendo 14 espécies, 3 gêneros e 2 grupos da subtribo Citrinae. Esse germoplasma representa não somente uma valiosa coleção de híbridos a serem por muitos anos avaliados diretamente como porta-enxertos, como também amplia a variabilidade aproveitável a longo prazo para a seleção e melhoramento de porta-enxertos de citros.
- 5) Existe ainda um enorme potencial para o melhoramento de citros a ser explorado através da estratégia clássica de hibridação sexual associada à identificação de híbridos através de eletroforese de isoenzimas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BACCHI, O. Observações citológicas em citrus. I. Número de cromossomos de algumas espécies e variedades. **J. Agron.**, Piracicaba. 3:249-258, 1940
- BACCHI, O. - Cytological observations in *Citrus*: III Megasporogenesis, fertilization and polyembryony. **Bot. Gaz.** 105:221-225. 1943.
- BALLVÉ, R.M.L.; MEDINA FILHO, H.P.; BORDIGNON, R. & LIMA, M.M.A. Methodology for starch gel electrophoresis and protocols for isozymes of 32 plant genera. **Rev. Brasil. Genet.** 1995, no prelo.
- BITTERS, W.P.; COLE, D.A. & BRUSCA, J.A. The citrus relatives as citrus rootstocks. **Proc. First. Intern. citrus Symposium.** Vol 1:411-415, 1969.
- BITTERS, W.P.; COLE, D.A. & MCCARTY, C.D. Citrus relatives are not irrelevant as dwarfing stocks or interstocks for citrus. **Proc. Int. Soc. Citriculture.** Vol 2: 561-567, 1977.
- BALLVÉ, R.M.L.; BORDIGNON, R.; MEDINA FILHO, H.P.; SIQUEIRA, W.J.; TEÓFILO SOBRINHO, J. e POMPEU JÚNIOR, J. Isoenzimas na identificação precoce de híbridos e clones nucelares no melhoramento de citros. **BRAGANTIA**, 50(1):57-76, 1991.

- BANERJI, I. Morphological and cytological studies on *Citrus grandis* Osbeck. **Phytomorphology**. 4:390-396, 1954.
- BARRET, H.C. Intereneric hybridization of *Citrus* and other genera in citrus cultivar improvement. **Proc. Int. Soc. Citriculture**. 2:586-589, 1977.
- CAMERON, J.W. & FROOST, H.B. Genetics, Breeding and Nucellar Embryony. **In**: W. Reuther, L.D. Butchelor and H.J. Webber, eds. **The Citrus Industry**. Vol. II. Univ. Calif. Press., Berkeley, 1968. p. 325-370.
- CAMERON, J.W. & SOOST, R.K. - *Citrus*. **In**: F.P. FERREIRA & F. WIT, eds. *Outlines of Perennial Crop Breeding in the Tropics*. Miscellaneous papers 4. The Netherlands. p. 129-162. 1969.
- CAMERON, J.W. & SOOST, R.K. Citrus. **In**: N.W. SIMMONDS, ed. **Evolution of Crop Plants**. Longman Inc., N.Y. 1976, p.261-265.
- CAMERON, J.W.; SOOST, R.K. & FROST, H.B. Encore and Pixie - two new mandarin hybrids with unusually late seasons of use. Calif. Agr. Expt. Sta. Bulletin **814**, 1965. 8p.

- CASTLE, W.S.; TUCKER, D.P.H.; KREZDORN, A.H. & YOUTSEY, C.O.
Rootstocks selection: the first step to success. **In:** J.T. WOESTE,
ed. **Rootstocks for Florida citrus**. Univ. Florida, Gainesville,
1989, 47p.
- COOPER, C. & CHAPOT, H. - Fruit production with special emphasis on
fruit for processing. **In:** S. NAGY; P.E. SHOW & M.K. VELDHUIS,
eds. **Citrus Science and Technology**. Vol. II. Avi Publ. Westport,
Connecticut, 1977, p. 1-27
- DONADIO, L.C. Painel citricola. **Informativo Coopercitrus**. 102:6,
1995.
- DONADIO, L.C.; FIGUEIREDO, J.O. & PIO, R.M. Variedades cítricas
brasileiras. Jaboticabal, FUNEP, 1995, 228p.
- ENGLER, A. Rutaceae. **In:** ENGLER, A. & PRANTL, K. eds. **Die
Naturlichen pflanzenfamilien**. 1931, 2^a ed. 19^a:187-359.
- ESEN, A & SOOST, R.K. Polyphenol oxidase catalysed browning of
young shoot extracts on *Citrus taxa*. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**,
99:484-489. 1974.
- FEICHTEMBERGER, E. Gomose de *Phytophthora* dos citros. **Laranja**,
Cordeirópolis. **11**(1):97-122, 1990.

FROST, H.B. Summary of the work of the research divisions. Citrus Expt. Sta, Plant Breeding. Univ. Calif. Agr. Expt. Sta. Rept. 925-26:55, 1926.

FROST, H.B. Four new citrus varieties - the Kara, Kinnow and Wilking mandarins and the Trovita orange. Univ. Calif. Agr. Expt. Sta. Bulletin **597**, 1935, 14p.

FROST, H.B. The Pearl tangelo - a new citrus variety. **Calif. Citrog.** **25**:346, 1940.

FROST, H.B. & SOOST, R.K. The water - culture method for growing plants without soil. Univ. Calif. Agr. Exp. Sta. Circular 347. 1968.

FURR, J.R.; CARPENTER, J.B. & HEWITT, A.A. Breeding new varieties of citrus fruits and rootstocks for the Southwest. **J. Rio Grande. Val. Hort. Soc.** **17**:90-107, 1963.

GARCIA, A. Suco de Laranja - mercado atual e perspectivas. Laranja, Cordeirópolis. **13**(1):1-28, 1992.

GONÇALVES, J.S.; OLIVEIRA, I.R.; MARTIN, N.B. & SOUZA, S.A.M. Mudanças na composição da área cultivada no Estado de São Paulo e suas regiões citrícolas, 1970/72 a 1987/89. São Paulo, Instituto de Economia Agrícola. Informações econômicas. **20**(12):69-92, 1990.

GROSSER, J.W. Hybrid rootstocks from cell-fusion offer great potential. **Citrus industry**. Dec. 41-42, 1991.

GROSSER, J.W. & GMITTER JR., F.G. Somatic hybridization of *Citrus* with wild relatives for germplasm enhancement and cultivar development. **HORTSCIENCE**, **25**(2):147-151, 1990.

GROSSER, J.W.; GMITTER JR., F.G. & CHANDLER, J.L. Intergeneric somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species: *Citrus sinensis* and *Severinia disticha*. **THEOR. APPL. GENETICS**, **75**:397-401, 1988.

GROSSER, J.W.; GMITTER JR., F.G.; SESTO, F.; DENG, X.X. & CHANDLER, J.L. Six new somatic citrus hybrids and their potential for cultivar improvement. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** **117**(1):169-173, 1992.

- GROSSER, J.W.; MOORE, G.A. & GMITTER JR., F.G.. Interspecific somatic hybrid plants from the fusion of "Key" lime (*Citrus aurantifolia*) with "Valencia" sweet orange (*Citrus sinensis*) protoplasts. *Scientia Hort.* **39**:23-29, 1989.
- HODGSON, R.W. Taxonomy and nomenclature in *Citrus*. **In**: Int. Org. of citrus virology, second conference. Florida, USA. 1961. **Proceedings**. p.1-7.
- IGLESIAS, L.; LIMA, H. & SIMON, J.P. Isozyme identification of zygotic and nucellar seedings in *Citrus*. **J. Hered.** **65**:81-84, 1974.
- IWAMASA, M.; NITO, N. & LING, J.T. Intra and intergeneric hybridization in the orange subfamily, Aurantioideae. **In**: Proc. **Sixth Intern. Citrus Congress**. Tel Aviv, Israel, 1988. p.123-130.
- JONES, H.A. & EMSWELLER, S.L. A male sterile onion. **Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.** **34**:583-585, 1936.
- KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I.; YOSHINAGA, K.; OHGAWARA, T. & ISHII, S. Fertility in a intergeneric somatic hybrid plant of *Rutaceae*. **Hort. Sci.** **26**(2):207, 1991.
- KRUG, C.A. Controle de polinização nas flores do cafeeiro, Campinas, Instituto Agronômico. 12p. Boletim Técnico n° 15: 1935.

- KRUG, C.A. Chromosome numbers in the subfamily Aurantioideae with special reference to the genus *Citrus*. **Bot. Gaz.** **104**:602-611, 1943.
- KUPPER, R.S. & ROOSE, M.L. Citrus rootstocks breeding and evaluation at the University of California, Riverside. 1990, 9p. (Mimeografado).
- LINSKENS, H.F. Pollen Physiology. **Annual Review of Plant Physiology**. Vol. 15:255-270, 1964.
- LOUSADA, E.S.; GROSSER, J.W.; GMITTER, JR., F.G.; NIELSEN, B.; CHANDLER, J.L.; DENG, X.X. & TUSA, N. Eight new somatic hybrid citrus rootstocks with potential for improved disease resistance. **Hort. Sci.** **27**(9):1033-1036, 1992.
- MEDINA FILHO, H.P. Eletroforese em gel de amido:aplicações em genética e melhoramento de plantas. Campinas, Instituto Agrônômico. 15p. - Circular 121. 1983.
- MEDINA FILHO, H.P.; BORDIGNON, R.; BALLVÉ, R.M.L. & SIQUEIRA, W.J. Genetic proof of the occurrence of mono and dizygotic hybrid twins in *Citrus* rootstocks. **Rev. Bras. Genet.** **16**(3):703-711, 1993.

- MEDINA FILHO, H.P.; CARVALHO, A.; SONDAHL, M.R.; FAZUOLI, L.C. & COSTA, W.M. Coffee breeding and related evolutionary aspects. **In:** J. JANICK, ed. **Plant Breeding Reviews**. Vol 2, 1984. Cap. 5, p.157-193.
- MOREIRA, S. & SALIBE, A.A. The contribution of research for the progressive changes in citrus rootstocks for south America. **Proc. First. Intern. Citrus Symposium**. Vol 1:351-357, 1969.
- NEVES, E.M. Citricultura paulista: Importância econômica e perspectivas. Laranja, Cordeirópolis. **13**(1):55-62, 1992.
- NISHIURA, M. & IWASAKI, T. Studies on citrus breeding. I. Variation os seed formation in citrus crossing. **Bul. Hort. Res. Sta. Japan [Okitsu], Ser. B, 2:1-13, 1963.**
- OHGAWARA, T.; KOBAYASHI, S.; ISHII, S.; YOSHINAGA, K. & OIYAMA, I. Somatic hybridization in *Citrus*: navel orange (*C. sinensis* Osb.) and grapefruit (*C. paradisi* Macf.). **Theor Appl. Genet.** **78**:609-612, 1989.
- OHGAWARA, T.; KOBAYASHI, S.; OHGAWARA, E.; UCHIMIYA, H. & ISHII, S. Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. **Theor. Appl. Genet.** **71**:1-4, 1985.

- OSAWA, I. Cytological and experimental studies in *Citrus* J. Coll. Agr. Imp. Univ. Tokio. **4**:83-116. 1912.
- PANDEY, K.K. Stigmatic secretion and bud-pollination in self and cross-incompatible plants. **Naturwissenschaften**. **50**:408-409, 1963.
- PETROBRÁS - Projeto Produtividade Agrícola. Fascículo 12, 4p. 1988.
- PIERCE, L.C. & BREWBAKER, J.L. Applications of isozyme analysis in horticultural science. **Hort. Sci.** **8**(1):17-22. 1973.
- PIERINGER, A.P. & EDWARDS, G.J. Identification of nucelar and zygotic citrus seedlings by infrared spectroscopy. **Proc. Am. Soc. Hort. Sci.** **86**:226-234. 1967.
- POMPEU, JR., J. Situação do uso de porta-enxertos no Brasil. **In**: Seminário Internacional de Citros I. Bebedouro, Brasil, 1990. **Anais**. p.1-10.
- POMPEU JR., J. Pesquisa de porta-enxertos apoia citricultura paulista. **Informativo Coopercitrus**: 91:18-20, 1994.
- SANTOS, K. & GUERRA, M. Padrão de bandas CMA em representantes de alguns gêneros próximos à *Citrus*. I. Tribo Clauseneae. **Revista Brasileira de Genética**. **16**(3)suplemento:183, **Resumos**, 1993.

- SHIVANNA, K.R. & RANGASWAMY, N.S. Overcoming self-incompatibility in *Petunia axillaris* (Lam.). Delayed pollination, pollination with stored pollen and bud pollination. **Phytomorphology**. **19**:372-380, 1969.
- SOOST, R.K. & CAMERON, J.W. Contrasting effects of acid and non-acid pummelos on the acidity of hybrid citrus progenies. **Hilgardia**. **30**:351-357, 1961.
- SPIEGEL-ROY, P. & VARDI, A. *Citrus*. In: P.V. Ammirato; D.A. Evans; W. R. Sharp & Y. Yamada, eds. **Handbook of Plant Cell Culture**. Vol. III. Mac Millan. Publ. Co. N.Y., 1984. p. 335-372.
- STRASSBURGER, E. Ueber Polyembryonie. **Jenaische Ztschr. fur Naturw..** **12**:647-667, 1878.
- SWINGLE, W.T. New types of citrus fruits for Flórida. **Proc. Fla. State Hort. Soc.** **23**:36-41, 1910.
- SWINGLE, W.T. & REECE, P.C. The botany of *Citrus* and its wild relatives. In: W. REUTHER; L.D. BATCHERLOR & W.J. WEBBER, eds. **The Citrus Industry**. Vol. I. Univ. of Calif. Press, Berkeley. 1967. p.190-430.
- SWINGLE, W.T. & ROBINSON, T.R. Citranges and some related hybrid fruits. U.S. Dept. Agr. Yearbook **1926**:223-225, 1927.

- SWINGLE, W.T.; ROBINSON, T.R. & SAVAGE, E.M. New citrus hybrids. U.S. Dept. Agr. Circular 181:20p, 1931.
- TANAKA, T. Species problem in *Citrus*. Japanese Society for the Promotion of Sciences, Ueno, Tokio. 1954. 152 pp.
- TANKSLEY, S.D. An efficient and economical design for starch gel electrophoresis. **Report of the tomato cooperative**, Davis, **29**:37-38, 1979.
- TEICH, A.H. & SPIEGEL-ROY, P. Differentiation between nucellar and zygotic *Citrus* seedlings by leaf shape. **Theor. Appl. Genet.** **42**:314-315. 1972.
- TEÓFILO SOBRINHO, J.; POMPEU JR., J; & FIGUEIREDO, J.O. Dez anos de experiência com porta-enxertos alternativos. **Informativo Coopercitrus.** **48**:16-22, 1990.
- THOMPSON, R. Studies on the inheritance of male sterility in the carrot (*Daucus carota* L. var. *Sativa*). **Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.** **78**:332-38, 1961.
- TORRES, A.M.; SOOST, R.K. & DIEDENHOFEN, U. Leaf isozymes as genetic markers in *Citrus*. **Amer. J. Bot.** **65**(8):869-881. 1978.

- TOXOPEUS, H.J. Die zuchtung von unterlagen fur *Citrus sinensis* Osb immun gegen *Phytophthora parasitica*, die ursache der "gum-disease" in Java. **Der zuchter**. **8**:1-10, 1936.
- TOXOPEUS, H.J. Some cases of bud variation in *Citrus* observed in Java. **Genetica**. **15**:241-252, 1993.
- TRAUB, H.P. & ROBINSON, T.R. Improvement of subtropical fruit crops: citrus. U.S. Dept. Agr. Yearbook **1937**:749-826, 1937.
- TUSA, N.; GROSSER, J.W.; GMITTER, JR., F.G. & LOUSADA, E.S. Production of tetraploid somatic hybrid breeding parents for use in lemon cultivar improvement. **Host. Sci.** **27**(5):445-447, 1992.
- USDA-ARS. National clonal germplasm repository for citrus and dates. Accessions of citrus and related Aurantioideae genera. 1060 Pennsylvania Avenue. Riverside, Calif. 1990.
- VALLEJOS, C.E. Enzyme activity staining. **In**: TANKSLEY, S.D. & ORTON, T.J., eds. **Isozymes in plant genetics and breeding**. Part A. Eusevier, Amsterdam, 1983. p.469-516.
- VAN TUYL, J.M.; MARCUCCI, M.C. & VISSER, T. Pollen and pollination experimentos VII. The effect of pollen treatment and application method on incompatibility and incongruity in *Lilium*. **Euphitica**. **31**:613-619, 1982.

- VARDI, A. Protoplast derived plants from different citrus species and cultivars. **Proc. Int. Soc. Citriculture**. Vol 1: p.149-152, 1981.
- VARDI, A.; BLEICHMAN, S. & AVIV, D. Genetic transformation of *Citrus* protoplasts and regeneration of transgenic plants. **Plant Sci.** **69**:199-206, 1990.
- WARNER, R.M.; UPADHYA, M.D. & BREWBAKER, J.L. Isozyme indicators of genetic relationships among *Citrus* species. **Hort. Sci.** **5**:125-127. 1970.
- WEBBER, H.J. Work of the United State Department of Agriculture ou plant hybridization. **J. Royal Hort. Soc.** **24**:128-138, 144, 1900.
- WEBBER, H.J. New fruit productions of the Department of Agriculture. **U.S. Dept. Agr. Yeabook.** **1905**:275-290, 1906.
- WEBBER, H.J. & SWINGLE, W.T. New citrus creations of the Department of Agriculture **U.S. Dept. Agr. Yearbook** **1904**:221-240, 1905.
- YAMASHITA, K. Stigma exudate application for overcoming self-incompatibility of hyuganatsu and hassaku. **Proc. Int. Soc. Citriculture.** **1**:48-51, 1981.

TABELA 1. Posição taxonômica da subfamília Aurantioideae, onde se encontra o gênero *Citrus*, na família Rutaceae (150 gêneros, 1600 espécies).

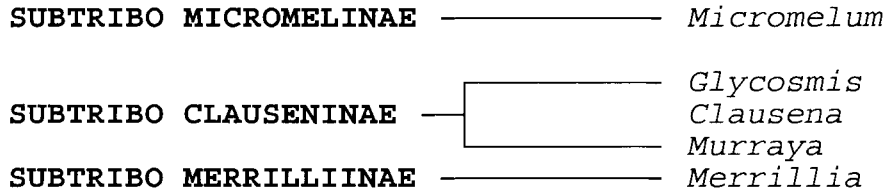
| |
|-------------------------|
| FAMÍLIA RUTACEAE |
|-------------------------|

| | |
|-------------------------------------|---|
| <u>Subfamília Rutoideae</u> | - 86 gêneros - 5 tribos - 17 Subtribos Subtribo 16, Pilocarpinae <i>Pilocarpus pinnatifolius</i> <i>Metrodorea nigra</i> |
| <u>Subfamília Dictyolomatoideae</u> | - 1 gênero |
| <u>Subfamília Flindersioideae</u> | - 2 gêneros |
| <u>Subfamília Spathelieodeae</u> | - 1 gênero |
| <u>Subfamília Toddalioideae</u> | - 25 gêneros |
| <u>Subfamília Aurantioideae</u> | - 33 gêneros 2 tribos 6 subtribos Subtribo 28 - Citrinae <i>Citrus</i> |
| <u>Subfamília Rhabdodendroideae</u> | - 1 gênero |

TABELA 2. Classificação taxonômica da subfamília Aurantioideae à qual pertence ao gênero *Citrus* (SWINGLE e REECE, 1967).

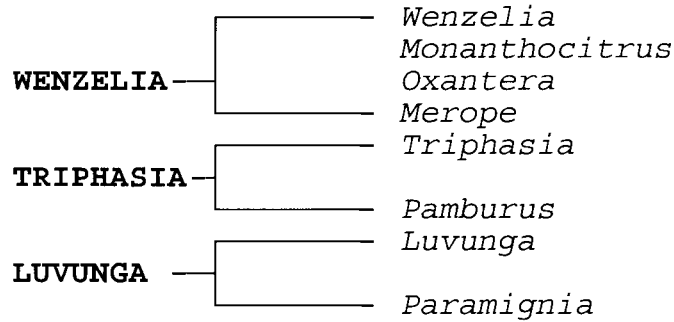
SUBFAMILIA AURANTIOIDEAE

TRIBO CLAUSENEAE

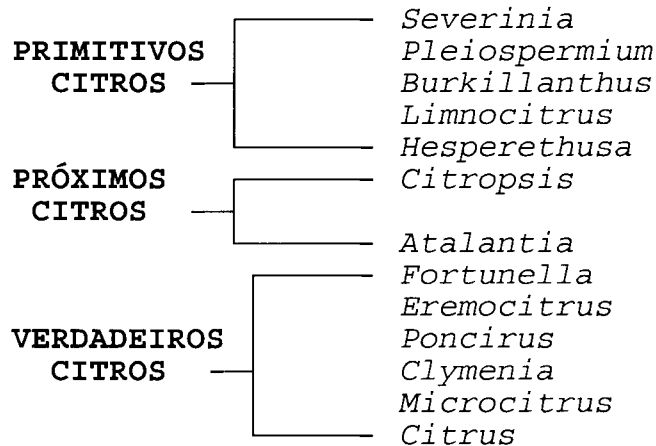


TRIBO CITREAE

SUBTRIBO TRIPHASIINAE



SUBTRIBO CITRINAE



SUBTRIBO BALSAMOCITRINAE

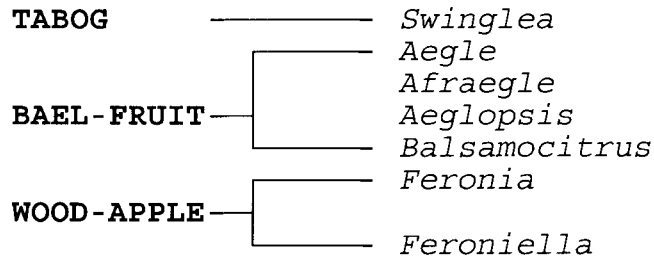


TABELA 3. Introduções de citros e afins utilizadas nos cruzamentos, sua localização nas coleções vivas do Instituto Agrônomo de Campinas e a identificação correspondente.

| INTRODUÇÃO | LOCALIZAÇÃO | IDENTIFICAÇÃO |
|---------------------------------------|---------------------|---|
| Tangerina Sunki | C.C., Cordeirópolis | Col. Clones Velhos n° 200 Quadra 57 Banco de Matrizes |
| Limão Cravo Limeira | C.C., Cordeirópolis | Quadra 30 n° 863 Banco de Matrizes |
| Laranja Azeda São Paulo | C.C., Cordeirópolis | Col. Clones Velhos n° 244 Quadra 16 n° 285 |
| <i>Poncirus trifoliata</i> Davis A | C.C., Cordeirópolis | Quadra 30 n° 848 |
| Tangerina Sun Chu Sha Kat | C.C., Cordeirópolis | Quadra 30 n° 1004 (RG035) Col. 5 Clones Novos n° 234 |
| Limão Volkameriano | C.C., Cordeirópolis | Banco de Matrizes |
| Tangerina Cleópatra | C.C., Cordeirópolis | Banco de Matrizes |
| Tangelo Orlando | C.C., Cordeirópolis | Banco de Matrizes |
| Sheekawasha | C.C., Cordeirópolis | Col. Clones Velhos n° 20 (Suen Kat) |
| Calamondim | C.C., Cordeirópolis | Col. Clones Velhos n° 421 |
| Toranja Chinesa | C.C., Cordeirópolis | Col. Clones Velhos N° 341 |
| Toranja Indochina | C.C., Cordeirópolis | Col. Clones Velhos n° 358 |
| Toranja Periforme | C.C., Cordeirópolis | Col. Clones Velhos n° 352 |
| Pomelo do Cabo | C.C., Cordeirópolis | Col. Clones Velhos n° 327 |
| Lima Americana | C.C., Cordeirópolis | Col. Clones Velhos n° 313 |

Continua

Continua

| INTRODUÇÃO | LOCALIZAÇÃO | IDENTIFICAÇÃO |
|--|---------------------|----------------------------|
| Lima Francesa | C.C., Cordeirópolis | Col.7 Clones Velhos n° 300 |
| Citremon São Jacinto | C.C., Cordeirópolis | Col. Clones Velhos n° 399 |
| Citremon 46216 | C.C., Cordeirópolis | Col. Clones Velhos n° 400 |
| Citrumelo Sacaton | C.C., Cordeirópolis | Col. Clones Velhos n° 405 |
| Limequat Eustis | C.C., Cordeirópolis | Col. Clones Velhos n° 425 |
| Citrance webberii | C.C., Cordeirópolis | Col. Clones Velhos n° 397 |
| Tangerina Miray | C.C., Cordeirópolis | RG 019 n° 1699 |
| Sunki x Trifoliata | C.C., Cordeirópolis | RG 019 n° 1697 |
| Citradia (Azeda x Trifoliata) | C.C., Cordeirópolis | RG 019 n° 1708 |
| Cravo x Trifoliata Swingle (citrumelo) | C.C., Cordeirópolis | RG 019 n° 1707 |
| | C.C., Cordeirópolis | RG 019 n° 1694 |
| Smooth Flat Seville x citrumelo Swingle | C.C., Cordeirópolis | RG 019 n° 1709 |
| (tangerina Shamooti x tangerina Mediterranea x trifoliata Swingle (citrumelo) | C.C., Cordeirópolis | RG 019 n° 1693 |
| <i>Citrus ichangensis</i> | C.C., Cordeirópolis | Col. Clones Velhos n° 373 |
| <i>Citrus macroptera</i> | C.C., Cordeirópolis | Col. Clones Velhos n° 377 |
| <i>Citrus celebica</i> | C.C., Cordeirópolis | Col. Clones Velhos n° 378 |

Continua

Continua

| INTRODUÇÃO | LOCALIZAÇÃO | IDENTIFICAÇÃO |
|---------------------------------|--------------------------------------|--|
| <i>Feroniella oblata</i> | C.C., Cordeirópolis | Col. Clones Velhos n° 410 |
| <i>Citropsis</i> spp. | C.C., Cordeirópolis | Col. Clones Velhos n° 413 (<i>Atalantia ceylanica</i>) |
| <i>Murraya paniculata</i> | C.C., Cordeirópolis IAC, Campinas | Col. Clones Velhos n° 415 C. Bot. Monjolinho, Seção Genética |
| <i>Severinia buxifolia</i> | C.C., Cordeirópolis | Col. Clones Velhos n° 419 Quadra 16 n° 397 |
| <i>Swinglea glutinosa</i> | C.C., Cordeirópolis | Quadra 30 n° 1327 |
| <i>Triphasia triflora</i> | IAC, Campinas | C. Bot. Monjolinho, Sede |
| <i>Clausena excavata</i> | IAC, Campinas | C. Bot. Monjolinho, Seção Floricultura |
| <i>Pilocarpus pinnatifolius</i> | IAC, Campinas | C. Bot. Monjolinho, Seção Genética |
| <i>Metrodorea nigra</i> | IAC, Campinas | C. Bot. Monjolinho, Sede |

TABELA 4. Híbridações (referidas na Tabela 5) entre espécies do gênero *Citrus* e retrocruzamentos de *Poncirus trifoliata* para *Citrus*.

| |
|-------------------------------------|
| HIBRIDAÇÕES INTERESPECÍFICAS |
|-------------------------------------|

| CRUZAMENTO | ESPÉCIES |
|-------------------------------|--|
| Sunki x Azeda | <i>Citrus sunki</i> x <i>Citrus aurantium</i> |
| Azeda x Sunki | <i>Citrus aurantium</i> x <i>Citrus sunki</i> |
| Sunki x Cravo | <i>Citrus sunki</i> x <i>Citrus limonia</i> |
| Cravo x Sunki | <i>Citrus limonia</i> x <i>Citrus sunki</i> |
| Cravo x Azeda | <i>Citrus limonia</i> x <i>Citrus aurantium</i> |
| Azeda x Cravo | <i>Citrus aurantium</i> x <i>Citrus limonia</i> |
| Sunki x Sun Chu Sha Kat | <i>Citrus sunki</i> x <i>Citrus reticulata</i> |
| Sun Chu Sha Kat x Sunki | <i>Citrus reticulata</i> x <i>Citrus sunki</i> |
| Sun Chu Sha Kat x Cravo | <i>Citrus reticulata</i> x <i>Citrus limonia</i> |
| Sun Chu Sha Kat x Azeda | <i>Citrus reticulata</i> x <i>Citrus aurantium</i> |
| Sunki x Sheekawasha | <i>Citrus sunki</i> x <i>Citrus depressa</i> |
| Sheekawasha x sunki | <i>Citrus depressa</i> x <i>Citrus sunki</i> |
| Azeda x Sheekawasha | <i>Citrus aurantium</i> x <i>Citrus depressa</i> |
| Sheekawasha x Azeda | <i>Citrus depressa</i> x <i>Citrus aurantium</i> |
| Sheekawasha x Cravo | <i>Citrus depressa</i> x <i>Citrus limonia</i> |
| Sunki x <i>C. ichangensis</i> | <i>Citrus sunki</i> x <i>Citrus ichangensis</i> |
| Sunki x Toranja Chinesa | <i>Citrus sunki</i> x <i>Citrus grandis</i> |
| Sunki x Toranja Indochina | <i>Citrus sunki</i> x <i>Citrus grandis</i> |
| Sunki x Limão Volkameriano | <i>Citrus sunki</i> x <i>Citrus limon</i> |

Continua

Continua

| CRUZAMENTO | ESPÉCIES |
|------------------------------|--|
| Sunki x Lima Americana | <i>Citrus sunki</i> x <i>Citrus aurantifolia</i> |
| Sunki x Tangelo Orlando | <i>Citrus sunki</i> x (<i>Citrus reticulata</i> x <i>Citrus paradisi</i>) |
| Sunki x Citremon São Jacinto | <i>Citrus sunki</i> x (<i>Poncirus trifoliata</i> x <i>Citrus limon</i>) |
| Sunki x Citremon 46216 | <i>Citrus sunki</i> x (<i>Poncirus trifoliata</i> x <i>Citrus limon</i>) |
| Sunki x citrumelo Sacaton | <i>Citrus sunki</i> x (<i>Poncirus trifoliata</i> x <i>Citrus paradisi</i>) |
| Sunki x citrus webberii | <i>Citrus sunki</i> x (<i>Citrus webberii</i>) |
| Sunki x 1697 | <i>Citrus sunki</i> x (<i>Citrus sunki</i> x <i>Poncirus trifoliata</i>) |
| Sunki x 1694 | <i>Citrus sunki</i> x <i>Citrus reticulata</i> |
| Sunki x 1699 | <i>Citrus sunki</i> x (<i>Citrus paradisi</i> x <i>Poncirus trifoliata</i>) |
| Sunki x 1707 | <i>Citrus sunki</i> x [<i>Citrus limonia</i> x (<i>Poncirus trifoliata</i> x <i>Citrus paradisi</i>)] |
| Sunki x 1708 | <i>Citrus sunki</i> x (<i>Citrus aurantium</i> x <i>Poncirus trifoliata</i>) |
| Sunki x 1709 | <i>Citrus sunki</i> x [<i>Citrus aurantium</i> x (<i>Poncirus trifoliata</i> x <i>Citrus paradisi</i>)] |
| Sunki x 1693 | <i>Citrus sunki</i> x [(<i>Citrus aurantium</i> x <i>Citrus reticulata</i>) x <i>Poncirus trifoliata</i>] |

TABELA 5. Cruzamentos interespecíficos de *Citrus* e retrocruzamentos de *Poncirus trifoliata* realizados e híbridos obtidos.

| |
|-------------------------------------|
| HIBRIDAÇÕES INTERESPECÍFICAS |
|-------------------------------------|

| CRUZAMENTO | FLORES POLINIZADAS | FRUTOS COLHIDOS | PLANTAS OBTIDAS | HÍBRIDOS |
|-------------------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|----------|
| Sunki x Azeda | 539 | 205 | 1181 | 902 |
| Azeda x Sunki | 1091 | 682 | 1096 | 222 |
| Sunki x Cravo | 441 | 116 | 489 | 418 |
| Cravo x Sunki | 1320 | 559 | 272 | 50 |
| Cravo x Azeda | 370 | 99 | 1099 | 187 |
| Azeda x Cravo | 592 | 388 | 60 | 22 |
| Sunki x Sun Chu Sha Kat | 62 | 46 | 432 | 6 |
| Sun Chu Sha Kat x Sunki | 68 | 20 | 417 | 6 |
| Sun Chu Sha Kat x Cravo | 102 | 8 | 176 | 4 |
| Sun Chu Sha Kat x Azeda | 83 | 20 | 427 | 12 |
| Sunki x Sheekawasha | 20 | 11 | 127 | 99 |
| Sheekawasha x sunki | 108 | 24 | 610 | 31 |
| Azeda x Sheekawasha | 8 | 0 | 0 | 0 |
| Sheekawasha x Azeda | 153 | 44 | 656 | 20 |
| Sheekawasha x Cravo | 89 | 27 | 391 | 21 |
| Sunki x <i>C. ichangensis</i> | 51 | 13 | 106 | 99 |
| Sunki x Toranja Chinesa | 95 | 19 | 68 | 31 |
| Sunki x Toranja Indochina | 41 | 3 | 1 | 1 |

Continua

Continua

| CRUZAMENTO | FLORES POLINIZADAS | FRUTOS COLHIDOS | PLANTAS OBTIDAS | HÍBRIDOS |
|--------------------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|----------|
| Sunki x Limão Volkameriano | 118 | 61 | 327 | 74 |
| Sunki x Lima Americana | 24 | 9 | 43 | -- |
| Sunki x Tangelo Orlando | 132 | 52 | 414 | 40 |
| Sunki x Citremon São Jacinto | 52 | 13 | 41 | 6 |
| Sunki x Citremon 46216 | 24 | 13 | 16 | 1 |
| Sunki x citrumelo Sacaton | 28 | 5 | 10 | 6 |
| Sunki x <i>Citrus webberii</i> | 15 | 6 | 40 | 31 |
| Sunki x 1697 | 79 | 40 | 139 | 43 |
| Sunki x 1694 | 18 | 9 | 67 | -- |
| Sunki x 1699 | 51 | 19 | 73 | 45 |
| Sunki x 1707 | 58 | 33 | 156 | 121 |
| Sunki x 1708 | 83 | 50 | 156 | 71 |
| Sunki x 1709 | 9 | 3 | 4 | 4 |
| Sunki x 1693 | 48 | 26 | 106 | 60 |

TABELA 6. Híbridações (referidas na Tabela 7) entre gêneros do grupo dos Citros Verdadeiros da Subtribo Citrinae e entre gêneros da Subtribo Clauseninae.

| |
|-----------------------------------|
| HIBRIDAÇÕES INTERGENÉRICAS |
|-----------------------------------|

| CRUZAMENTO | GÊNEROS | | |
|--------------------|---|---|---|
| Sunki x Trifoliata | CITRUS <i>C. sunki</i> | x | PONCIRUS <i>P. trifoliata</i> |
| Trifoliata x Sunki | PONCIRUS <i>P. trifoliata</i> | x | CITRUS <i>C. sunki</i> |
| Trifoliata x Azeda | PONCIRUS <i>P. trifoliata</i> | x | CITRUS <i>C. aurantium</i> |
| Azeda x Trifoliata | CITRUS <i>C. aurantium</i> | x | PONCIRUS <i>P. trifoliata</i> |
| Murraya x Clausena | MURRAYA <i>M. paniculata</i> | x | CLAUSENA <i>C. excavata</i> |

TABELA 7. Cruzamentos intergenéricos realizados e híbridos identificados.

| |
|----------------------------|
| HIBRIDAÇÕES INTERGENÉRICAS |
|----------------------------|

| CRUZAMENTO | FLORES POLINIZADAS | FRUTOS COLHIDOS | PLANTAS OBTIDAS | HÍBRIDOS |
|--------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|----------|
| Sunki x Trifoliata | 156 | 92 | 119 | 88 |
| Trifoliata x Sunki | 257 | 2 | 21 | 20 |
| Trifoliata x Azeda | 55 | 10 | 117 | 87 |
| Azeda x Trifoliata | 152 | 0 | 0 | 0 |
| Murraya x Clausena | 32 | 0 | 0 | 0 |

TABELA 8. Híbridagens (referidas na Tabela 9) entre grupos da subtribo Citrinae.

HIBRIDAÇÕES INTERGRUPAIS

| CRUZAMENTO | GRUPOS | |
|----------------------------------|--|---|
| Sunki x Severinia | VERDADEIROS <i>Citrus sunki</i> | x PRIMITIVOS <i>Severinia buxifolia</i> |
| Severinia x Sunki | PRIMITIVOS <i>S. buxifolia</i> | x VERDADEIROS <i>C. sunki</i> |
| Citropsis x Sunki | PRÓXIMOS <i>Citropsis sp</i> | x VERDADEIROS <i>C. sunki</i> |
| Cleopatra x Citropsis | VERDADEIROS <i>C. reshni</i> | x PRÓXIMOS <i>Citropsis sp</i> |
| Lima francesa x Severinia | VERDADEIROS <i>C. aurantifolia</i> | x PRIMITIVOS <i>S. buxifolia</i> |
| <i>C. celebica</i> x Severinia | VERDADEIROS <i>C. celebica</i> | x PRIMITIVOS <i>S. buxifolia</i> |
| Cravo x Severinia | VERDADEIROS <i>C. limonia</i> | x PRIMITIVOS <i>S. buxifolia</i> |
| Pomelo do Cabo x Severinia | VERDADEIROS <i>C. paradisi</i> | x PRIMITIVOS <i>S. buxifolia</i> |
| Toranja periforme x Severinia | VERDADEIROS <i>C. grandis</i> | x PRIMITIVOS <i>S. buxifolia</i> |
| <i>C. macroptera</i> x Severinia | VERDADEIROS <i>C. macroptera</i> | x PRIMITIVOS <i>S. buxifolia</i> |
| Calamondim x Severinia | VERDADEIROS (<i>Citrus sp</i> x <i>Fortunella sp</i>) | x PRIMITIVOS <i>S. buxifolia</i> |

TABELA 9. Cruzamentos intergrupais realizados e híbridos obtidos.

| |
|--------------------------|
| HIBRIDAÇÕES INTERGRUPAIS |
|--------------------------|

| CRUZAMENTO | FLORES POLINIZADAS | FRUTOS COLHIDOS | PLANTAS OBTIDAS | HÍBRIDOS |
|----------------------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|----------|
| Sunki x Severinia | 297 | 6 | 7 | 3 |
| Severinia x Sunki | 219 | 3 | 2 | 2 |
| Citropsis x Sunki | 103 | 0 | 0 | 0 |
| Cleopatra x Citropsis | 26 | 9 | 258 | 0 |
| Lima francesa x Severinia | 38 | 3 | 3 | 0 |
| <i>C. Celebica</i> x Severinia | 67 | 1 | 39 | 0 |
| Cravo x Severinia | 128 | 2 | 3 | 0 |
| Pomelo do Cabo x Severinia | 64 | 0 | 0 | 0 |
| Toranja periforme x Severinia | 22 | 0 | 0 | 0 |
| <i>C. macroptera</i> x Severinia | 6 | 0 | 0 | 0 |
| Calamondim x Severinia | 9 | 1 | 5 | 0 |

TABELA 10. Cruzamentos (referidos na TABELA 11) entre subtribos da tribo Citreae.

| |
|-----------------------------------|
| CRUZAMENTOS INTERSUBTRIBAS |
|-----------------------------------|

| CRUZAMENTO | SUBTRIBOS | | |
|--------------------------------|---|---|---|
| Sunki x Triphasia | CITRINAE <i>C. sunki</i> | x | TRIPHASIINAE <i>Triphasia trifolia</i> |
| <i>C. celebica</i> x Triphasia | CITRINAE <i>C. celebica</i> | x | TRIPHASIINAE <i>T. trifoli</i> |
| Sunki x Feroniella | CITRINAE <i>C. sunki</i> | x | BALSAMOCITRINAE <i>Feroniella oblata</i> |
| Feroniella x Sunki | BALSAMOCITRINAE <i>Feroniella oblata</i> | x | CITRINAE <i>C. sunki</i> |
| Swinglea x Trifoliata | BALSAMOCITRINAE <i>Swinglea glutinosa</i> | x | CITRINAE <i>Poncirus trifoliata</i> |
| Trifoliata x Swinglea | CITRINAE <i>P. trifoliata</i> | x | BALSAMOCITRINAE <i>Swinglea glutinosa</i> |
| Sunki x Swinglea | CITRINAE <i>C. sunki</i> | x | BALSAMOCITRINAE <i>S. glutinosa</i> |
| Swinglea x Sunki | BALSAMOCITRINAE <i>S. glutinosa</i> | x | CITRINAE <i>C. sunki</i> |

TABELA 11. Cruzamentos intersubtribais realizados.

| |
|------------------------------------|
| CRUZAMENTOS INTERSUBTRIBAIS |
|------------------------------------|

| CRUZAMENTO | FLORES POLINIZADAS | FRUTOS COLHIDOS | PLANTAS OBTIDAS | HÍBRIDOS |
|-------------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|----------|
| Sunki x Triphasia | 144 | 42 | 57 | 0 |
| C. celebica x Triphasia | 55 | 2 | 128 | 0 |
| Sunki x Feroniella | 415 | 71 | 314 | 0 |
| Feroniella x Sunki | 69 | 0 | 0 | 0 |
| Swinglea x Trifoliata | 27 | 0 | 0 | 0 |
| Trifoliata x Swinglea | 50 | 3 | 83 | 0 |
| Sunki x Swinglea | 339 | 13 | 23 | (2) |
| Swinglea x Sunki | 172 | 0 | 0 | 0 |

TABELA 12. Cruzamentos (referidos na Tabela 13) entre tribos da subfamília Aurantioideae.

| |
|---------------------------------|
| CRUZAMENTOS INTERTRIBAIS |
|---------------------------------|

| CRUZAMENTOS | | TRIBOS | |
|----------------------------------|---|--------|--|
| Sunki x <i>Murraya</i> | CITREAE <i>Citrus sunki</i> | x | CLAUSENEAE <i>Murraya paniculata</i> |
| Cravo x <i>Murraya</i> | CITREAE <i>C. limonia</i> | x | CLAUSENEAE <i>M. paniculata</i> |
| Limequat Eustis x <i>Murraya</i> | CITREAE (<i>C. aurantifolia</i> x <i>Fortunella</i> sp) | x | CLAUSENEAE <i>M. paniculata</i> |
| Severinia x <i>Murraya</i> | CITREAE <i>Severinia buxifolia</i> | x | CLAUSENEAE <i>M. paniculata</i> |
| Calamondim x <i>Murraya</i> | CITREAE (<i>Citrus</i> sp x <i>Fortunella</i> sp) | x | CLAUSENEAE <i>M. paniculata</i> |

TABELA 13. Cruzamentos intertribais realizados.

| |
|---------------------------------|
| CRUZAMENTOS INTERTRIBAIS |
|---------------------------------|

| CRUZAMENTO | FLORES POLINIZADAS | FRUTOS COLHIDOS | PLANTAS OBTIDAS | HÍBRIDOS |
|---------------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|----------|
| Sunki x Murraya | 182 | 42 | 60 | 0 |
| Cravo x Murraya | 52 | 3 | 48 | 0 |
| Limequat Eustis x Murraya | 53 | 0 | 0 | 0 |
| Severinia x Murraya | 263 | 0 | 0 | 0 |
| Calamondim x Murraya | 64 | 0 | 0 | 0 |

TABELA 14. Cruzamentos (referidos na Tabela 15) entre subfamílias da família Rutaceae.

| |
|---------------------------------------|
| CRUZAMENTOS INTERSUBFAMILIARES |
|---------------------------------------|

| CRUZAMENTOS | SUBFAMÍLIAS | |
|--------------------------------|---|---|
| Limequat Eustis x Jaborandi | AURANTIOIDEAE (<i>Citrus aurantifolia</i> x <i>Fortunella</i> sp) | x RUTOIDEAE <i>Pilocarpus pinnatifolius</i> |
| Murraya x Jaborandi | AURANTIOIDEAE <i>Murraya paniculata</i> | x RUTOIDEAE <i>Pilocarpus pinnatifolius</i> |
| Calamondim x Jaborandi | AURANTIOIDEAE (<i>Citrus</i> sp x <i>Fortunella</i> sp) | x RUTOIDEAE <i>Pilocarpus pinnatifolius</i> |
| Murraya x Metrodorea | AURANTIOIDEAE <i>Murraya paniculata</i> | x RUTOIDEAE <i>Metrodorea nigra</i> |

TABELA 15. Cruzamentos intersubfamiliares realizados.

CRUZAMENTOS INTERSUBFAMILIARES

| CRUZAMENTOS | FLORES POLINIZADAS | FRUTOS COLHIDOS | PLANTAS OBTIDAS | HÍBRIDOS |
|-----------------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|----------|
| Limequat Eustis x Jaborandi | 67 | 0 | 0 | 0 |
| Murraya x Jaborandi | 132 | 0 | 0 | 0 |
| Calamondim x Jaborandi | 87 | 0 | 0 | 0 |
| Murraya x Metrodorea | 100 | 0 | 0 | 0 |

TABELA 16. Cruzamentos entre clones elite de porta-enxerto. genótipos dos genitores e dos híbridos resultantes; grifados aqueles que identificam os híbridos.

| CRUZAMENTO ♀ x ♂ | L O C O S I S O E N Z Í M I C O S | | | | | | |
|---------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|---|----------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|
| | APS-1 | GOT-1 | GOT-2 | ME-1 | PGI-1 | PGM-1 | PRXa-1 |
| Sunki X Azeda <u>híbridos</u> | CC x CC CC | SS x SS SS | FF/MM x FM/MM FF/MM <u>FM/MM</u> | II x II II | FF x WS <u>WF FS</u> | FF x FS FF <u>FS</u> | FM x FS <u>FF FS</u> <u>FM MS</u> |
| Sunki X Cravo <u>híbridos</u> | CC x CC CC | SS x FS <u>FS</u> SS | FF/MM x FS/MM FF/MM <u>FS/MM</u> | II x II II | FF x FS FF <u>FS</u> | FF x FF FF | FM x MM FM <u>MM</u> |
| Cravo X Sunki <u>híbridos</u> | CC x CC CC | FS x SS FS <u>SS</u> | FS/MM x FF/MM <u>FF/MM</u> FS/MM | II x II II | FS x FF FF <u>FS</u> | FF x FF FF | MM x FM <u>FM</u> MM |
| Cravo X Azeda <u>híbridos</u> | CC x CC CC | FS x SS FS <u>SS</u> | FS/MM x FM/MM <u>FF/MM</u> <u>FM/MM</u> FS/MM <u>MS/MM</u> | II x II II | FS x WS <u>WF FS WS SS</u> | FF x FS FF <u>FS</u> | MM x FS <u>FM MS</u> |
| Sunki X Trifoliata <u>híbridos</u> | CC x NN CN | SS x PM <u>PS MS</u> | FF/MM x MT/SS <u>FM/MS</u> <u>FT/MS</u> | II x RR <u>IR</u> | FF x FS FF <u>FS</u> | FF x PM <u>FP FM</u> | FM x FF <u>FF</u> FM |
| Trifoliata X Sunki <u>híbridos</u> | NN x CC <u>CN</u> | PM x SS <u>PS MS</u> | MT/SS x FF/MM <u>FM/MS</u> <u>FT/MM</u> | RR x II <u>IR</u> | FS x FF <u>FF</u> FS | PM x FF <u>FP FM</u> | FF x FM FF <u>FM</u> |
| Trifoliata X Azeda <u>híbridos</u> | NN x CC <u>NC</u> | PM x SS <u>PS MS</u> | MT/SS x FM/MM <u>FM/MS</u> <u>MM/MS</u> <u>FT/MS</u> <u>MT/MS</u> | RR x II <u>IR</u> | FS x WS <u>WF FS WS SS</u> | PM x FS <u>FP PS FM MS</u> | FF x FS FF <u>FS</u> |

TABELA 17. Genótipos de sete locos isoenzímicos de alguns genitores utilizados em cruzamentos.

| INTRODUÇÃO | G E N Ó T I P O S | | | | | | |
|------------------------------------|-------------------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|
| | ME-1 | APS-1 | GOT-1 | GOT-2 | PGI-1 | PGM-1 | PRXa-1 |
| Tangerina Sunki | II | CC | SS | FF/MM | FF | FF | FM |
| Limão Cravo Limeira | II | CC | FS | FS/MM | FS | FF | MM |
| Laranja Azeda São Paulo | II | CC | SS | FM/MM | WS | FS | FS |
| <i>Poncirus Trifoliata</i> Davis A | RR | NN | PM | MT/SS | FS | PM | FF |
| Tangerina Sun Chu Sha Kat | | | SS | FF/MM | FF | FF | FF |
| Limão Volkameriano | II | CC | FS | FS/MM | -- | FF | MM |
| Tangerina Cleópatra | II | CC | SS | FF/MM | FF | FF | FF |
| Tangelo Orlando | II | CC | SS | ----- | FS | FM | FF |
| Sheekawasha | | | SS | FM/FM | FF | FF | FM |
| <i>Citrus webberii</i> | II | CC | FF | MM/MM | SS | SS | -- |
| 1699 | II | CC | FF | MM/MM | SS | PP? | FM |
| 1697 | II | CC | FS | FF/MM | FS | FP? | FM |
| 1708 | II | CC | PS | MM/MM | FS? | -- | FF |
| 1707 | II | CC | FS | ----- | FF | FP | FM |
| 1694 | II | CC | FS? | FS/MM | FS | -- | FF |
| 1709 | II | CC | PS | FM/MM | WS? | -- | MM |
| 1693 | II | CC | PS | FF/MM | FS? | FP | FF |
| <i>Citrus ichangensis</i> | II | CC | SS | FS/MM? | SS | FP | MS |
| <i>Citrus celebica</i> | II | CC | FS | MM/MM | SS | FM | MM |
| <i>Feroniella oblata</i> | -- | -- | -- | ----- | -- | -- | MM |
| <i>Severinia buxifolia</i> | -- | -- | -- | ----- | BS | PP | MM |
| <i>Swinglea glutinosa</i> | -- | -- | -- | ----- | WF? | PP | TT |
| <i>Triphasia triflora</i> | -- | -- | -- | ----- | -- | -- | TT |

FIGURA 1. Grupos da sub-tribo Citrinae, com seus gêneros e os híbridos conhecidos entre eles.

SUBTRIBO CITRINAE

PRIMITIVOS CITROS

SEVERINIA

- PLEIOSPERMIUM
- BURKILLANTHUS
- LIMNOCITRUS
- HESPERETHUSA

PROXIMOS CITROS

- CITROPSIS
- ATALANTIA

VERDADEIROS CITROS

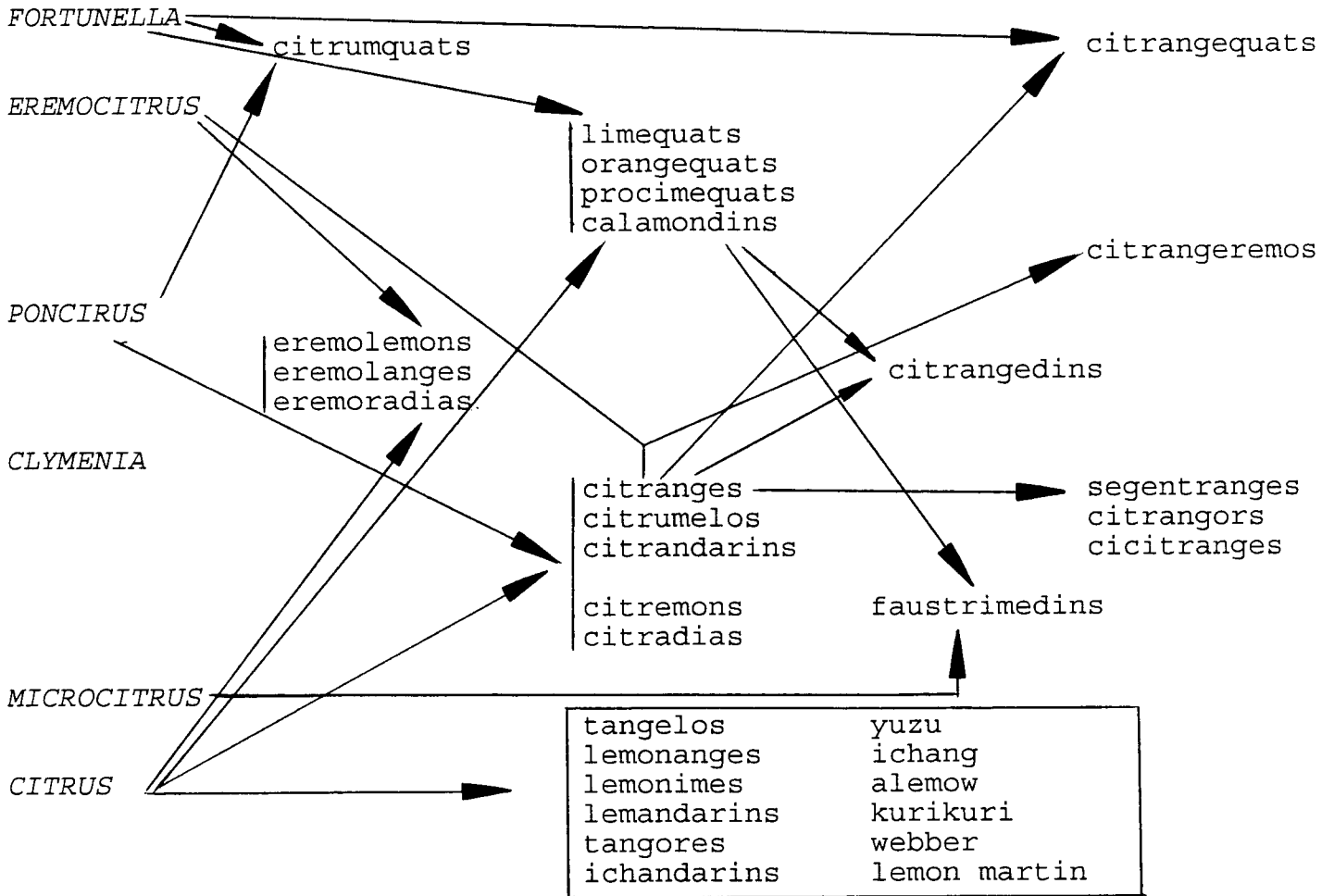


FIGURA 2**POLINIZAÇÃO CONTROLADA EM CITROS**

- A - Inflorescência antes da eliminação de flores abertas e "chumbinhos".
- B - Inflorescência com botões florais prontos para serem emasculados.
- C - Emasculação com remoção das pétalas, filetes e anteras.
- D - Inflorescência com flores emasculadas, mostrando os estigmas.
- E - Inflorescência emasculada e coberta com saco de papel.
- F - Abertura das flores e deiscência das anteras em placas.

FIGURA 2



FIGURA 3**POLINIZAÇÃO CONTROLADA EM CITROS (cont.)**

- A - Polinização dos estigmas receptivos.
- B - Estigma recém polinizado.
- C - Ramos polinizados, protegidos e identificados.
- D - Frutos de polinização controlada em fase final de desenvolvimento.

FIGURA 3



FIGURA 4
OBTENÇÃO DE PLANTAS

- A - Germinação de sementes poliembrionicas em placa de Petri.
- B - Plântulas transplantadas em bandejas tipo "speedling" em casa de vegetação.
- C - Campo de híbridos de porta-enxertos.
- D - Híbridos enxertados com laranja Valência para avaliações agronômicas.

FIGURA 4



FIGURA 5

IDENTIFICAÇÃO DE HÍBRIDOS ATRAVÉS DE ELETROFORESE DE ISOENZIMAS

- A - PGI-1 de Azeda, Cravo e Sunki e progênie do cruzamento Sunki x Azeda indicando híbridos FS e WF e nucelares FF (seta).
- B - PRXa-1 do cruzamento Cravo x Azeda, indicando seus genótipos, híbridos MS e FM e nucelares (MM) de Cravo (seta).
- C - GOT-1 e GOT-2 do cruzamento Sunki (SS; FF/MM) x Cravo (FS; FS/MM) e seus híbridos (FS; FS/MM) e nucelares (SS; FF/MM) (seta).
- D - PGI-1 (foto A) em maiores detalhes.

FIGURA 5

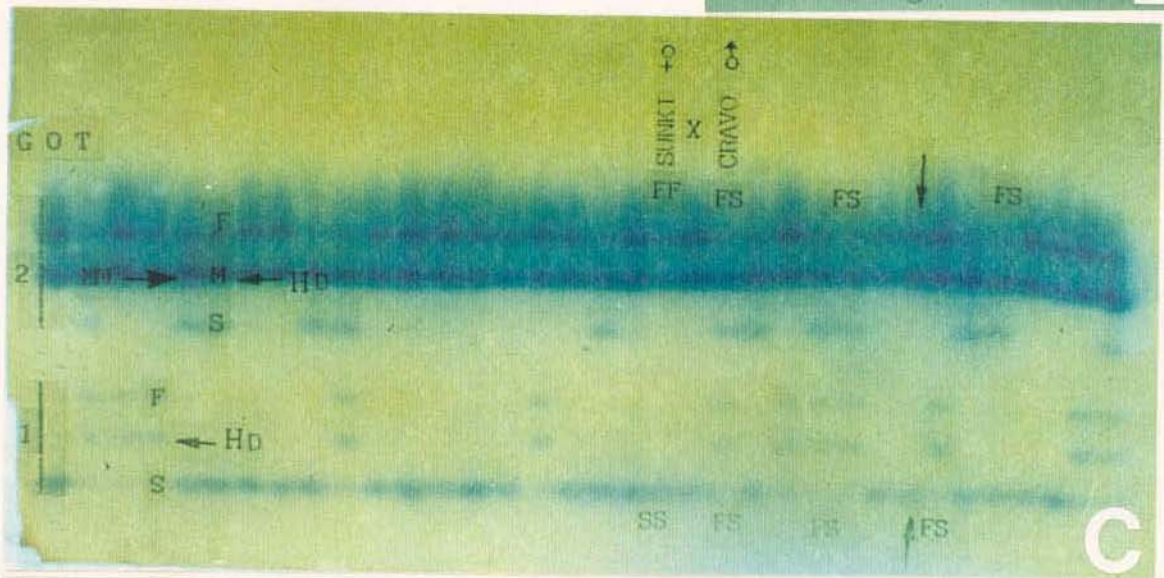
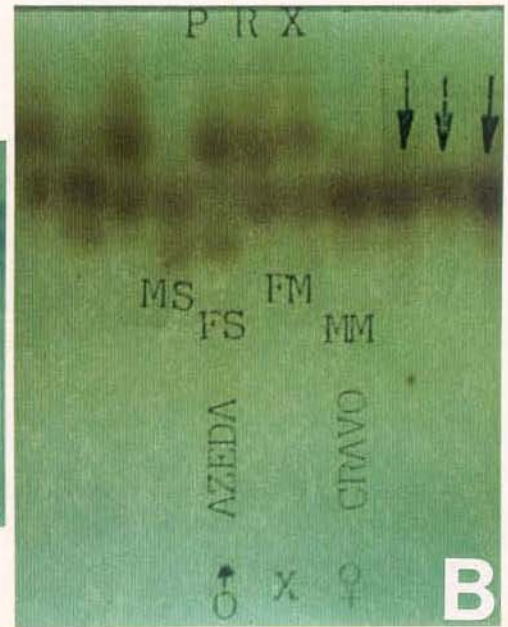
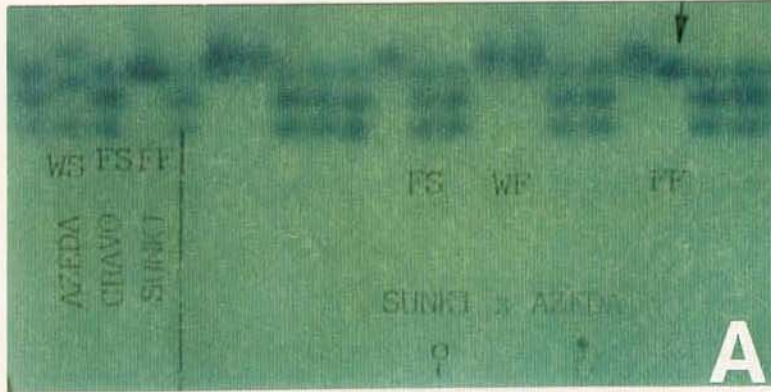


FIGURA 6**SUNKIFOLIAS E BUXISUNKIS: HÍBRIDOS INTERGRUPAIS
RECÍPROCOS DE CITRUS SUNKI X SEVERINIA BUXIFOLIA**

- A - Ramos e frutos de Sunki e Severinia (à direita)
- B - Ramo de Severinia, mostrando frutos e espinhos.
- C - Pecíolos das folhas de Severinia (à esquerda não alado), de Sunki (à direita, alado) e de Sunkifolia (centro, intermediário).
- D - GOT-1 e GOT-2 de Severinia (quatro primeiras amostras), Sunki (três amostras seguintes) e de Sunkifolias (setas).
- E - Ramo de Buxisunki, com folhas e espinhos vigorosos.
- F - Sunkifolias e Buxisunkis enxertados em limão Cravo.

FIGURA 6

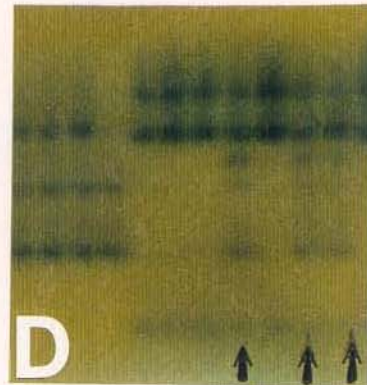


FIGURA 7. Híbridos conhecidos (entre "Citrus Verdadeiros") e os novos híbridos intergrupais produzidos, (Sunkifolias e Buxisunkis) entre *Citrus Sunki* e *Severinia buxifolia* pertencente ao grupo dos "Primitivos".

H I B R I D O S

SUBTRIBO CITRINAE

