

BC/27479

IB/80599



UNICAMP

O REDUZIDO NÚMERO DE SEMENTES POR FRUTO EM

Citrus Sunki (EX. TANAKA) E SUAS

IMPLICAÇÕES BIOLÓGICAS

BIBLIOTECA
Instituto de Biologia
UNICAMP

MARLI REZENDE TESSARINI DE CARVALHO

Orientador: Prof. Dr. Herculano Penna Medina Filho

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.

Este trabalho foi aprovado para a redação final
em 14/12/95
pela Comissão de Tese de
Carvalho
e aprovado pela Comissão Julgadora.

CAMPINAS

Estado de São Paulo - Brasil

1995

CAMP
UNIVERSIDADE ESTADUAL

UNIDADE	12
NO	4/10
DATA	27/4/95
PROF.	[assinatura]
Nº	11.000.820.283

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

C253r Carvalho, Marli Rezende Tessarini de
O reduzido número de sementes por fruto em *Citrus Sunki* (Ex. Tanaka) e suas implicações biológicas / Marli Rezende Tessarini de Carvalho . - - Campinas, SP : [s.n.], 1995.

Orientador : Herculano Penna Medina Filho.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. Cítricos. 2. Sementes - Viabilização. 3. Polinização.
4. Isoenzimas. 5. Reprodução. I. Medina Filho, Herculano Penna II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 14 de Dezembro de 1995.

BANCA EXAMINADORA:

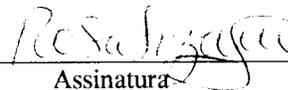
TITULARES:

P Prof. Dr. HERCULANO PENNA MEDINA FILHO (Orientador)



Assinatura

Dr.ª ROSA MARIA LIZANA BALLVÉ



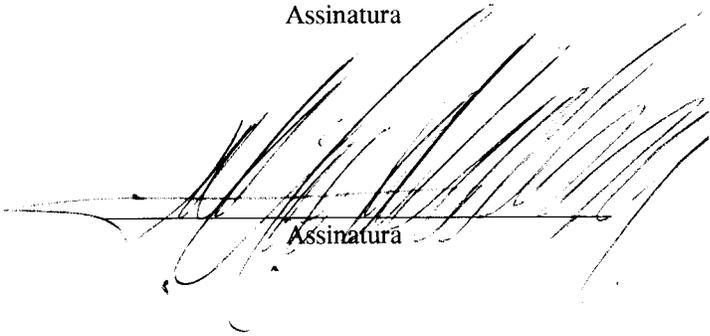
Assinatura

Prof. Dr. ROLF DIETER ILLG

Assinatura

SUPLENTE:

Prof. Dr. AQUILES EUGÊNICO PIEDRABUENA



Assinatura

APROVADA

O seu prazer tornava as minhas realizações
mais valiosas. Sua singeleza, carinho e ternura
tornaram-se para mim, exemplo e modelo de vida.

A minha mãe

OFEREÇO

A maior luz da minha vida, meus filhos

Ana Carolina e Lucas

A meu marido, José Romeu,

com muito amor

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- Ao Instituto Agronômico de Campinas, Seção de Genética e ao Centro de Citricultura "Sylvio Moreira", por possibilitar a realização dessas investigações.
- Ao Instituto Agronômico de Campinas, Seção de Citologia em especial a Dr^a. Cecília A.F.P. Maglio e ao Senhor Onivaldo Camargo, pela inestimável ajuda.
- À Universidade Estadual de Campinas, particularmente ao Instituto de Biologia, pela minha formação científica.
- Ao Dr. Herculano Penna Medina Filho, pela orientação objetiva e competente com que conduziu as pesquisas e elaboração dessa tese.
- A Dr^a. Rosa Maria Lizana Ballvé, pelo espírito científico com que colaborou para a realização em diversas fases deste trabalho, participação na banca e pela amizade.

- Aos amigos da Seção de Genética do Instituto Agronômico de Campinas, pela ajuda na realização deste trabalho; em especial, à Rita Bordignon na realização das polinizações, acompanhamento, colheita e análise dos frutos em Cordeirópolis, à Maria Bernadete Silvarolla nas preparações citológicas, Walter José Siqueira e Oliveira Guerreiro Filho pelas valiosas sugestões e apoio nas análises e utilização do computador, Ismael Cirilo Pinheiro pela eficiente condução dos experimentos e Solange Camargo pela competente editoração.

- Ao Dr. Aquiles Piedrabuena pela colaboração nas análises estatísticas e como membro da pré-banca e ao Dr. Rolf Dieter Illg, membro da pré-banca e banca desta tese.

- Aos meus sogros Romeu Rosas de Carvalho e Edith Porto de Carvalho, pelo carinho, amor e dedicação aos meus filhos durante o período deste trabalho e pelo apoio e incentivo que sempre me deram.

- Ao Departamento de Crédito Rural da Nossa Caixa Nosso Banco pela compreensão para a continuação desse trabalho, durante o período que estive neste departamento.

CONTEÚDO

	Pág.
RESUMO	vii
SUMMARY	ix
INTRODUÇÃO	01
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	06
Classificação botânica e centro de origem	06
Características Biológicas	08
Poliembrionia	11
Número de sementes e a esterilidade nos citros	16
Número de sementes e a incompatibilidade nos citros	18
A planta cítrica comercial e a importância do porta-enxerto	19
Tangerina sunki como porta-enxerto	21
MATERIAL E MÉTODOS	23
Hipótese A	23
Hipótese B	26
Fertilidade do pólen	26

Megasporogênese	28
Hipótese C	31
Determinação da porcentagem de plantas nucelares e zigóticas (híbridas)	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
Hipótese A	40
Hipótese B	46
Fertilidade do pólen	46
Megasporogênese	47
Hipótese C	48
CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
TABELAS	68
FIGURAS	84

O REDUZIDO NÚMERO DE SEMENTES POR FRUTO EM *Citrus sunki* (EX. TANAKA) E SUAS IMPLICAÇÕES BIOLÓGICAS

MARLI REZENDE TESSARINI DE CARVALHO

RESUMO

Estudou-se as causas biológicas do reduzido número de sementes da tangerina Sunki (*Citrus sunki*), um porta-enxerto promissor para a citricultura brasileira. Três hipóteses foram levantadas e investigadas: 1) Existência de uma limitação biológica para produção de sementes, o que estaria, no ovário, anatomicamente relacionada a um pequeno número de óvulos, 2) Ocorrência de algum grau de esterilidade, devido a desenvolvimento anormal do saco embrionário e/ou dos grãos de pólen, 3) Existência de auto-incompatibilidade.

Foram feitos estudos histológicos e observações de frutos e sementes, bem como realizadas polinizações com várias outras espécies e cultivares. Concluiu-se que

apesar da tangerina Sunki produzir normalmente apenas duas a três sementes viáveis tem entretanto, potencial biológico para produzir até 17 sementes por fruto em média. A formação de gametas tanto masculinos como femininos é normal. A causa principal para o reduzido número de sementes por fruto é devido a um grau acentuado de auto-incompatibilidade. Quando polinizada com outras espécies há um aumento significativo no número de sementes/fruto, de magnitude que depende do polinizador específico utilizado.

Apesar de biologicamente possível e praticamente exequível aumentar sensivelmente o número de sementes da tangerina Sunki através do uso de polinizadores adequados, esse aumento no número de sementes é, no entanto, acompanhado por um aumento proporcional no número de plantas híbridas (zigóticas) e não de nucelares como seria comercialmente de interesse.

THE REDUCED NUMBER OF SEEDS PER FRUIT IN *Citrus sunki* (EX. TANAKA)
AND ITS BIOLOGICAL IMPLICATIONS

MARLI REZENDE TESSARINI DE CARVALHO

SUMMARY

Biological causes for the reduced number of seeds per fruit in the Sunki mandarin (*Citrus sunki*), a promising rootstock for citrus in Brazil, are studied. Three hypothesis were investigated: 1) Existence of a biological limitation anatomically related to a reduced number of ovules in the ovary, 2) Occurrence of sterility due to abnormal formation of the embryo sac and/or pollen grains, 3) Self-incompatibility.

Histological studies of the ovary, observations of fruits and seeds as well as pollinations with other species lead to the conclusion that although Sunki usually yields only two to three viable seeds per fruit it has however, a biological potential to produce in average up to 17 seeds per fruit. The formation of male and female gametes is normal. The main reason for the reduced number of seeds is the self-

incompatibility of this clone. When pollinated with other species there is a significant increase in the number of seeds/fruit of a magnitude dependent on the pollen source.

Although biologically and practically possible to increase the number of seeds/fruit with adequate pollinators, the increase of seeds is nevertheless accompanied by a proportional increase in the number of hybrid plants (zygotics) and not of nucelar clones as would be commercially desirable.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A citricultura desempenha um papel de grande importância na economia brasileira. O Brasil é o maior produtor e exportador de suco concentrado de laranja e o primeiro consumidor de fruto cítrico *in natura* do mundo. O estado de São Paulo é responsável por 85% da produção do país. A produção total de cítricos no mundo em 92/93 foi de 75 milhões de toneladas, das quais 16 milhões foram produzidos no Brasil seguido de 13 milhões nos E.U.A.. A produção de suco concentrado no mundo é de 26,5 milhões toneladas das quais 11,7 milhões foram produzidas no Brasil e 9,6 milhões o nos E.U.A. (FAO/93/94). As previsões indicam que não há perspectiva de mudança neste quadro para essa década.

Apesar disso, a citricultura brasileira é vulnerável sob vários aspectos. Um deles é a utilização em larga escala do limão cravo (*Citrus limonia*) como porta-enxerto. Cerca de 90% de nossos pomares estão enxertados sobre esse clone.

A utilização de plantas cítricas enxertadas, passou a ter aceitação por volta de 1840 quando a doença "podridão do pé", causada por um fungo *Phytophthora* spp,

começou a se propagar pelos países citrícolas do Mediterrâneo. A laranjeira doce *Citrus sinensis* era então o porta-enxerto mais utilizado no Brasil no início desse século sendo então substituída pela laranjeira Azeda (*Citrus aurantium*) que apresentava vantagens em relação à primeira, principalmente por ser altamente resistente à gomose de *Phytophthora*.

Com o aparecimento do vírus da tristeza em 1940, outros porta-enxertos passaram a ser empregados, Tanto *C. sinensis* como *C. aurantium* são intolerantes a esse vírus de ocorrência generalizada e transmitido eficientemente pelo pulgão preto, comum em nossos pomares. A laranja azeda foi então substituída pelo limão Cravo (*C. limonia*).

C. limonia destaca-se pela sua precocidade, rusticidade e alta produção, sendo atualmente o porta-enxerto mais utilizado no Brasil. Nos últimos anos o aparecimento de outros problemas fitossanitários, principalmente o declínio, vem-se evidenciando a necessidade de diversificar os porta-enxertos dos pomares e de encontrar alternativas para substituir o limão Cravo.

Em termos gerais, além da resistência à pragas e moléstias vasculares, das raízes e do tronco, o porta-enxerto induz à variedade de copa alterações no desenvolvimento, influenciando também outros aspectos como tamanho e qualidade

dos frutos e do suco, início de produção, produtividade, época de maturação, tolerância a deficiências hídricas entre outras.

A utilização das características de porta-enxertos específicos na citricultura permite um monitoramento racional da produtividade, adiantamento ou atraso na maturação dos frutos, solução de problemas de sazonalidade da cultura, resistência a doenças etc, possibilidades tais que têm motivado o interesse na diversificação dos porta-enxertos.

Entre os porta-enxertos alternativos testados a testes durante vários anos, a tangerina Sunki (*Citrus Sunki*) tem se destacado bastante. Trata-se de um clone de grande potencial devido a suas características agrônômicas e principalmente no que diz respeito à resistência ao declínio, um problema fitossanitário de etiologia complexa cujo agente causal é desconhecido. Dos experimentos acerca da resistência ao declínio, realizados com vários porta-enxertos, entre eles o limão Cravo, limão Volkameriano, diversos citranges, tangerinas Cleópatra e Sunki, somente a Cleópatra apresenta uma certa tolerância. O declínio aparece nas plantas enxertadas sobre Cleópatra somente após 12 anos. A tangerina Sunki é a única que tem se mostrado realmente resistente até o presente sendo, todos os demais porta-enxertos, suscetíveis.

Desta maneira, a tangerina Sunki tem despertado um grande interesse prático e científico pois o declínio representa um problema econômico importante. Causa anualmente a morte de cerca de dez milhões de árvores em São Paulo. Embora resistente ao declínio a tangerina Sunki tem sua utilização em escala comercial ainda limitada pela susceptibilidade à gomose cujo controle químico onera os produtores e por apresentar poucas sementes por fruto. Uma das características comercialmente importante de um porta-enxerto é ter razoável número de sementes por fruto. A tangerina Sunki apresenta, tipicamente, uma a tres sementes por fruto.

O presente trabalho teve por objetivo investigar as razões e implicações desse baixo número de sementes por fruto da tangerina Sunki, investigando-se três hipóteses que poderiam explicar esse reduzido número de sementes.

Hipótese A) Existência de uma limitação natural, anatômica, para produção de sementes/fruto, a qual seria decorrente de um reduzido número de óvulos/lóculo e/ou segmentos/ovário na flor.

Hipótese B) Ocorrência de esterilidade devido a alguma possível anormalidade na formação dos gametas masculinos e/ou femininos resultando em pequena produção de sementes.

Hipótese C) Presença de auto-incompatibilidade.

A tangerina Sunki, como outros porta-enxertos se reproduzem por apomixia facultativa. Suas progênes são constituídas de uma mistura de plantas nucelares (apomíticas) de genótipo igual a planta mãe (reprodução vegetativa) e plantas de origem zigótica para cuja formação houve a concorrência de gametas. Caso exista auto-incompatibilidade, em decorrência, para aumentar a produção de sementes, seria necessário um polinizador adequado. Neste caso, a implicação e consequência biológica em relação ao número e ou porcentagem de plantas nucelares e zigóticas na descendência deveriam ser também investigadas, uma vez que, comercialmente, as variedades copa são enxertadas somente sobre as plantas nucelares, uniformes, sendo as zigóticas descartadas na sementeira.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Classificação botânica e centro de origem

O gênero *Citrus* e outros relacionados são membros da família Rutacea, sub-família Aurantioideae, sub-tribo Citrinae da qual faz parte o grupo dos "Verdadeiros Citros". O grupo dos "Verdadeiros Citros" é composto de seis gêneros, dos quais são de importância agrônômica, *Citrus* e *Fortunella* (kumquat) como copas e *Poncirus*, como porta-enxerto (SWINGLE & REECE, 1967; SPIEGEL-ROY & VARDI, 1984).

Da mesma forma que outras plantas de valor econômico bem estudadas sob o aspecto taxonômico, a classificação taxonômica de *Citrus* é bastante contestável, acentuando-se as dúvidas principalmente a medida que a classificação aproxima-se de gêneros, espécies e variedades. Hibridação natural, ampla ocorrência de mutantes e o fenômeno da embrionia nucelar associadas à reprodução sexual e ao cultivo pelo homem desde épocas remotas são fatores que contribuem para uma grande complexidade do problema (SCORA, 1988). TANAKA (1954), sem dúvida a maior autoridade em taxonomic do gênero e afins, reconheceu 147 espécies e

posteriormente 157, enquanto que SWINGLE & REECE (1967) também de reconhecida competência na área, consideraram apenas 16 espécies (SPIEGEL-ROY & VARDI, 1984). A dificuldade é tal que um dos maiores evolucionistas modernos, G.L. STEBINS (1969) discutindo especificamente a complexidade do tema no primeiro simpósio internacional sobre citros na Califórnia chegou a inventar um interessante "conto de fadas" para tentar, através de metáforas, ilustrar adequadamente essa grande dificuldade. O autor chegou a conclusão que não existe um sistema correto ou incorreto de classificação.

A discussão, na verdade, transcende o problema dos *Citrus* e muito provavelmente é apenas mais um exemplo que reflete a necessidade de reformulações mais básicas como o próprio conceito do que seja realmente uma "espécie" como amplamente discutido por TEMPLETON, 1982.

Entre os citros, as tangerinas representam um grupo de espécies distintas e bastante diversas porém são mais próximas às laranjas que quaisquer outras espécies. SWINGLE (1943) classificou as tangerinas em três espécies apenas, enquanto que TANAKA (1954) em um extenso trabalho sobre o assunto as classifica em 36 espécies distribuídas em 5 seções botânicas. De acordo com SWINGLE, a tangerina Sunki seria *Citrus reticulata* var. *austera* sub-gênero *Eurocitrus*. Seguindo-se a classificação de TANAKA a tangerina Sunki, que aqui nos interessa, será referida no presente trabalho

como *Citrus sunki*. É uma espécie pertencente a Seção Acrumen - Subseção Microacrumen - Grupo Citriodora - Subseção Angustifolia juntamente com outras 9 espécies caracterizadas por flores e frutos pequenos e folhas pequenas porém largas e frutos também pequenos.

O centro de origem primitivo ou de diversificação dos citros tem sido motivo de especulação e discussão há muito tempo. O renomado taxonomista de citros, T. TANAKA (1954) concluiu que o centro de origem do grupo é o nordeste da Índia e norte de Burma. GMITTER & HU (1990) considerando a diversidade genética, juntamente com os mecanismos naturais de dispersão de plantas, sustentam a idéia de que a região de Yunnan na China teria um papel de destaque na origem e distribuição das espécies contemporâneas de *Citrus*. Entre elas, as tangerinas teriam se originado mais provavelmente no centroeste da China.

Características biológicas

As formas de citros de importância econômica têm muitas características em comum e são geralmente interférteis. Não raro os híbridos são também férteis. É comum a reprodução assexual via semente através do fenômeno conhecido como embrião nucelar é comum. A esterilidade e incompatibilidade ocorrem com frequência.

O número básico de cromossomos de *Citrus* e dos gêneros relacionados é $n=x=9$ (BACCHI, 1940; KRUG, 1943). As espécies de *Citrus* são na maioria diplóides, tendo sido identificadas na natureza alguns clones poliplóides. Muitos têm sido produzidos experimentalmente (CAMERON & SOOST, 1976).

As flores são completas, hermafroditas com 4 a 8 pétalas e um cálice com 4 a 5 lóbulos possuindo 15 a 30 estames. As anteras, com dois lóculos e deiscência longitudinal, se localizam ao redor do pistilo, próximas ou no mesmo nível do estigma.

A polinização cruzada ocorre com facilidade pelo vento mas principalmente devido a presença de insetos polinizadores, sendo as abelhas atraídas em grande quantidade nos dias de florescimento (CAMERON & SOOST, 1969).

O estigma se encontra receptivo entre 1 a 2 dias antes da antese e assim permanece por vários dias. Células epidérmicas no estigma secretam um fluido viscoso que ajuda a retenção e germinação de pólen. A auto-polinização pode facilmente ocorrer pela proximidade das anteras com o estigma (CAMERON & SOOST, 1969).

O grão de pólen germina na superfície estigmática e o núcleo generativo se divide para produzir os dois gametas. Quando o tubo polínico atinge o saco embrionário, um dos gametas fertiliza a oosfera e o outro se funde com os dois núcleos polares, originando o endosperma triplóide ($3n=27$) da semente.

De acordo com BACCHI (1943) nas espécies estudadas em *Citrus* sob condições favoráveis a fertilização pode ocorrer de 2 a 8 dias depois da polinização. Os megagametófitos se apresentam com as duas sinérgidas bem desenvolvidas e situadas na proximidade da micrópila, a oosfera entre as sinérgidas, um pouco mais distante da micrópila e dois núcleos polares, situados mais ou menos no centro do megagametófito. As três antípodas são bem menores que as sinérgidas. O estudo dos megásporos é normalmente realizado através de cortes histológicos do ovário.

No ovário, composto por 6 a 14 carpelos se desenvolvem as placentas contendo os óvulos. O óvulo maduro consiste no funículo, nucelo e um saco embrionário com 8 núcleos e 2 integumentos envoltórios (SCHENEIDER, 1967).

Um fator limitante na utilização da Sunki como porta-enxerto é o reduzido o número de sementes em seu fruto. A fim de investigar com detalhes as razões do baixo número de sementes/fruto é imprescindível abordar aspectos que estão relacionados com a biologia da reprodução e que possam ser a causa, ou interferir

com o número de sementes como a poliembrionia a esterilidade e a incompatibilidade.

Poliembrionia

A reprodução assexual por semente é de ocorrência generalizada tanto em *Citrus*, como em *Fortunella* e *Poncirus*. Essa reprodução assexuada por sementes ocorre graças ao fenômeno denominado poliembrionia.

A partir de uma única semente, duas, três ou mais plantas podem se desenvolver devido a existência de vários embriões. Entre eles, apenas um é de origem sexual, resultado da união dos gametas masculino e feminino. Os demais são assexuados, chamados nucelares, apomíticos ou apogâmicos. São formados a partir de células do nucelo, somáticas, sendo portanto geneticamente idênticos a planta mãe (FROST AND SOOST, 1968; BARRET, 1977; BARRET, 1981; CASTLE, 1987; MEDINA FILHO *et al.*, 1993).

Os embriões nucelares se originam externamente ao saco embrionário, na extremidade micropilar do nucelo. Sob o ponto de vista nutricional, esta é uma situação privilegiada. Com o crescimento, projetam-se para dentro do saco embrionário, onde se desenvolvem juntamente com o embrião de origem zigótica (TOXOPEUS, 1936).

Embora a embrião nucelar seja de grande valor para a reprodução comercial de porta-enxertos de citros produzindo plantas geneticamente uniformes é no entanto um obstáculo para o melhoramento do citros.

A maioria das espécies de *Citrus* são, em graus variáveis, poliembriônicas. Entretanto, algumas são monoembriônicas. Esses tipos normalmente não são utilizados como porta-enxertos comerciais pois produzem somente plantas zigóticas as quais devido à meiose e fertilização são, por certo, geneticamente variáveis.

Exceção as formas monoembriônicas, o embrião zigótico deve competir por espaço e nutrientes com os embriões nucleares. TOXOPEUS (1936) citado por FROST & SOOST, 1968 mencionou três fatores que seriam desfavoráveis ao desenvolvimento dos embriões zigóticos nas sementes poliembriônicas. A célula ovo começa a se dividir quando a maioria dos embriões nucleares já possuem várias células. Além disso, o embrião zigótico situa-se inicialmente no ápice do saco embrionário, região que parece ser nutricionalmente menos favorável ao transporte de nutrientes pelo sistema vascular. Finalmente, as plantas zigóticas, na maioria das vezes, seriam menos vigorosas que as nucleares.

Embriões zigóticos adicionais podem também ocorrer nas sementes porém são raros. São os casos dos gêmeos, monozigóticos e dizigóticos, sugeridos por FROST

(1938) e BACCHI (1943) respectivamente os quais foram geneticamente demonstrados por MEDINA FILHO *et al.*, 1993. Os gêmeos monozigóticos ocorrem pela fissão do embrião zigótico e nos dizigóticos pela formação de 2 gametófitos em um único óvulo que fertilizados por dois gametas distintos, levam a formação de gêmeos não idênticos.

Entre as espécies de *Citrus* o grau de poliembrionia é variável. Por exemplo, as laranjas doces (*C. sinensis*) possuem em média 2,5 embriões por semente, a laranja azêda (*C. aurantium*) apresenta em média apenas um embrião por semente. Monoembrionia está normalmente associada à produção de embriões zigóticos enquanto que a poliembrionia está associada a produção de embriões nucelares. Entretanto a porcentagem de plantas nucelares depende do polinizador. Por exemplo, o limão Rugoso (*C. jambhiri*) tem grande número de embriões em suas sementes e, normalmente, produz uma alta porcentagem de plantas nucelares. Quando artificialmente polinizado com *Poncirus trifoliata*, 46% das plantas obtidas são zigóticas (FROST & SOOST, 1968).

Existia um conceito generalizado de que a polinização e fertilização seriam necessárias para a iniciação de embriões adventícios. Estudos anatômicos de sementes não fertilizadas, de livre polinização e de polinização cruzada de cultivares poliembriônicos de *Citrus*, indicaram que independentemente de terem sido ou não

polinizados os embriões adventícios se desenvolveram em todas as regiões do nucelo (WAKANA & UEMOTO, 1987). São poucos entretanto os estudos a esse respeito, não se conhecendo quão geral são as conclusões acima, nem tampouco existem informações a respeito na tangerina Sunki.

Em trabalhos experimentais com porta-enxertos, em programas de melhoramento, e outros estudos básicos de biologia é de suma importância a correta distinção precisa entre plântulas zigóticas e as de origem nucelar. Quando o clone polinizador possui características morfológicas muito distintas, ou quando existem diferenças muito grandes no vigor as plantas zigóticas e nucleares são morfológicamente identificados com um certo grau de acerto (CASTLE, 1987). No geral é entretanto grande a dificuldade de separá-lo antes da frutificação.

O fato dos embriões nucleares e zigóticos coexistirem em uma única semente dando origem à plantas geneticamente distintas, tem gerado vários estudos de metodologia visando a distinção entre elas. Na prática os viveiristas tentam distingui-las através das diferenças morfológicas. Em trabalhos experimentais de genética e melhoramento, várias técnicas têm sido utilizadas visando minimizar o tempo e os custos dessa identificação. DEL BOSCO *et al.*, 1994, cita alguns métodos como análise de óleos essenciais (TEICH & SPIEGEL-ROY (1972), de flavóides e outros compostos bioquímicos. Entretanto esses compostos são de uso restrito além de limitados pela

falta de estudos genéticos sobre suas heranças. Na maioria dos casos são compostos do metabolismo secundário, de análise trabalhosa e interpretações genéticas duvidosas. Entretanto para a identificação inequívoca da origem reprodutiva das plantas require-se o uso de marcadores genéticos definidos.

O caráter folhas trifolioladas é tradicionalmente conhecido como um excelente marcador morfológico em *Citrus*. Este apresenta herança dominante em relação ao caráter monofoliolata de *Citrus* e está presente em *Poncirus trifoliata* e seus híbridos. É de grande valia. Porém é limitado aos casos quando o interesse é selecionar clones nucelares do genitor feminino ou identificar híbridos dessa espécie quando utilizada apenas como genitor masculino.

O melhor método para distinguir plântulas nucelares das zigóticas é sem dúvida a eletroforese de isoenzimas. Sua aplicação em *Citrus* tem sido estudada há mais de 20 anos (IGLESIAS *et al.*, 1974; TORRES *et al.*, 1978; TORRES *et al.*, 1978; MOORE & CASTLE, 1988; ANDERSON *et al.*, 1991) sendo hoje estabelecida em sólida base genética (BALLVÉ *et al.*, 1991). Diversos marcadores isoenzímicos são revelados pela eletroforese de isoenzimas realizada em eletroforese horizontal em géis de amido (BALLVÉ *et al.*, 1995).

Número de sementes e a esterilidade nos citros

A produção de sementes nos frutos dos citros pode ser afetada por diversos fatores, genéticos ou ambientais, envolvidos no desenvolvimento dos gametas, nos processos de polinização e fecundação ou mesmo no estímulo para o início da formação dos embriões nucelares.

UENO (1986) relata que a esterilidade em citros pode ser de três tipos: 1) esterilidade gametofítica masculina ou feminina, 2) auto-incompatibilidade ou 3) esterilidade causada pelo aborto precoce do embrião. A esterilidade completa ou parcial do pólen é frequente no germoplasma de citros (BARRET, 1981). Por exemplo, a laranja Bahia por exemplo é partenocarpica. Raramente produz sementes devido a esterilidade do pólen. O saco embrionário é entretanto funcional e quando polinizada com outras variedades, há então produção de sementes. Já a Satsuma produz algum pólen, entretanto os frutos são normalmente sem sementes, a não ser que exista uma fonte eficiente para fornecer pólen para a polinização cruzada (FROST & SOOST, 1968).

A maioria dos cultivares de tangerinas e pomelos tem alta porcentagem de pólen funcional. Já entre muitos limões, limas e clones de laranjas com baixo número de sementes por fruto, muitas anormalidades meióticas tem sido relatadas.

Temperaturas abaixo de 19°C parecem também aumentar as anormalidades meióticas em cultivares de limão, resultando em um aumento da esterilidade (SOOST & CAMERON, 1975).

De acordo com FROOST & SOOST (1968) é bastante comum entre as espécies e variedades de Citrus algum grau de esterilidade de pólen ou dos óvulos.

Um dos métodos para avaliar a fertilidade do pólen é a coloração em carmim acético ou em solução de iodo. Entretanto, nem sempre os grãos de pólen que desenvolvem coloração com esses reagentes são viáveis. De acordo com HENNY (1977) a germinação "in vitro" em solução de sacarose é um método mais preciso que a simples coloração com carmim acético para testar a fertilidade do pólen.

Existindo uma produção normal de pólen viável, a falta de sementes em certas formas de citros pode ser devido a uma esterilidade do megásporo devido a degeneração ou anormalidades durante o desenvolvimento do saco embrionário. É o caso do pomelo Marsh e de outras formas com baixo número de sementes por fruto (FROST & SOOST, 1968). A megasporogênese é geralmente estudada através de inclusão de ovários em parafina seguido de cortes histológicos e coloração apropriada.

A produção normal de frutos e sementes pode depender ainda de compatibilidade gamética.

Número de sementes e a auto-incompatibilidade nos citros

Auto-incompatibilidade é normalmente definida como a incapacidade do pólen funcional germinar e/ou fecundar flores da própria planta.

A auto-incompatibilidade gamética pode ser responsável pela falta de "pegamento" dos frutos ou mesmo por um reduzido número de sementes por fruto nos citros. Pode também influenciar na porcentagem de plantas zigóticas como exemplificado pelo limão rugoso e pelo *Poncirus* que aumentaram a porcentagem de plantas zigóticas de 2% para 46% e de 27% para 87% respectivamente quando foram polinizados por clones mais compatíveis (SOOST & CAMERON, 1975). De acordo com FROST & SOOST (1968) vários cultivares de *C. limon*, *C. limetioides* e *C. sinensis* e todos os cultivares de *C. grandis* apresentam auto-incompatibilidade do tipo gametofítico.

Alguns estudos têm sido realizados, com objetivo de determinar se as espécies auto-incompatíveis, requerem polinização cruzada para a produção de frutos e qual é seu efeito nas características dos frutos dessas espécies. Frutos com muita semente

sugerem a existência de um polinizador efetivo (HEARN, 1969). Em tangor Murcote, o excesso de sementes é o principal problema no mercado da fruta. LUPO & EISIKORWITCH (1991) estudaram as possibilidades de reduzir o número de sementes, eliminando agentes polinizadores como as abelhas e verificaram que o tangor Murcote necessita de polinização para o pegamento dos frutos e que é auto-compatível. Evitando-se a polinização dessa variedade impede-se também o pegamento dos frutos.

Outro tangor estudado sob esse aspecto foi o cultivar Ellendale. VITHANAGE (1991), investigou o efeito de auto-fecundação e de diferentes fontes pólen na quantidade de sementes, observando significativas diferenças no número de sementes produzidas entre as fontes utilizadas. Apesar de auto-compatível, Ellendale produz menos frutos e sementes por fruto quando auto-polinizado que quando polinizado pela tangerina Murcote ou Emperor.

A planta cítrica comercial e a importância do porta-enxerto

A planta cítrica comercial é formada por duas entidades geneticamente distintas. A copa e o porta-enxerto, que interagem entre si e com o meio. O porta-enxerto afeta grande número de características hortícolas além de conferir resistência a diversas doenças e condições ambientais. Tem portanto um papel determinante na aptidão regional da cultura.

De modo geral os porta-enxertos diferem na tolerância a vários fatores do solo e stress ambiental. Esta variação entre os porta-enxertos está diretamente relacionada com expansão e limitação de áreas apropriadas para a cultura. Além disso, interagem com a copa e com o meio ambiente, afetando a nutrição mineral, crescimento, produtividade e vários aspectos da qualidade do fruto.

A utilização da enxertia em citros tem também o objetivo de reduzir o período de juvenilidade. As árvores que se originam a partir de sementes apresentam durante vários anos um estado fisiológico de imaturidade, não produzem e apresentam grande número de espinhos (CASTLE *et al.*, 1989).

A relação entre os tecidos na região de união da copa e porta-enxerto é comumente conhecida como afinidade ou compatibilidade. É de importância fundamental para o sucesso e performance comercial do pomar.

Um bom porta-enxerto deve apresentar várias características desejáveis como resistência a doenças e pragas, compatibilidade com a copa, induzir a produção de frutos em abundância e de alta qualidade (RECUPERO & RUSSO, 1992). Deve ainda possuir outras características de importância como número satisfatório de sementes por fruto e alta taxa de embrionia nucelar em suas sementes. O fenômeno da embrionia nucelar em citros garante a uniformidade genética do porta-enxerto

propagado através de suas sementes enquanto a da copa é garantida pela enxertia de borbulhas de plantas matrizes selecionadas.

Tangerina Sunki como porta-enxerto

Citrus Sunki, oriunda do sudeste de Yunnan na China (GMITTER & HU, 1990) é comumente conhecida em alguns países como "sour mandarin" e no Brasil como tangerina Sunki.

Como pé franco ou enxertada sobre limão Cravo ou tangerina Cleópatra é altamente produtiva, apresentando grande número de frutos oblongos, menores que os da maioria das tangerinas, com cerca de 2,5 a 3,5 cm de diâmetro, sendo o seu suco bastante ácido.

Como porta-enxerto tem no geral uma performance muito boa e uma adaptação relativamente ampla. Na Flórida por exemplo, árvores enxertadas em Sunki são mais produtivas e de melhor qualidade de suco, que aquelas sobre Cleopatra (CASTLE, 1987). Seu vigor no viveiro é considerado médio sendo indicada como cavalo para laranjas, tangerinas e pomelos (POMPEU JÚNIOR, 1991). É amplamente utilizada na China e na Índia (HODGSON, 1968).

Em testes comparativos com outros porta-enxertos de interesse nas nossas condições, a tangerina Sunki tem sido bastante promissora em muitos aspectos. Em solos argilosos induz produções semelhantes as do limão Cravo porém menores quando em solos arenosos. A aparência dos frutos e a qualidade do suco são melhores que os produzidos pelo limão Cravo e a maturação deles é mais lenta, o que proporciona colheita mais tardia (POMPEU JÚNIOR, 1991). Tem baixa resistência a gomose porém boa tolerância a tristeza e a xyloporose, e é afetada pela exocorte, o que é incomum para as tangerinas. Sua principal característica, que a distingue dos demais porta-enxertos, é ser o único resistente ao declínio cujo agente causal está ainda em estudo, e é considerada um dos problemas fitossanitários mais graves da citricultura (ROSSETTI, 1991). Um resumo de trabalhos, realizado por DONADIO *et al.*, 1995 indica que entre diferentes porta-enxertos a Sunki se destaca na indução precoce de produção e no vigor para as seguintes laranjas doce (*C. sinensis*) utilizadas como copa: Natal, Seleta, Westin e Baianinha. Com relação ao tamanho da copa a Sunki é o porta-enxerto que induz o maior tamanho das árvores depois do tangelo Orlando.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

As plantas utilizadas neste trabalho encontram-se no Banco Ativo de Germoplasma de Citros (BAG) e fazem parte de uma coleção viva do Instituto Agronômico de Campinas localizado no Centro de Citricultura "Sylvio Moreira" em Cordeirópolis (SP). Encontram-se propagadas vegetativamente por enxertia em porta-enxerto de limão Cravo ou de tangerina Cleópatra.

Na Tabela 1, observaram-se esses materiais e seus respectivos números de identificação no BAG.

Conforme mencionado no item 1, foram investigadas três hipóteses que poderiam explicar o baixo número de sementes.

Hipótese A

Para investigar a possibilidade de existir na tangerina Sunki uma limitação natural, anatômica, para produção de sementes, procedeu-se a contagem do que

poderia estar relacionado a um reduzido número de segmentos/fruto e/ou reduzido número de óvulos/segmento e conseqüentemente no ovário. Em cada fruto avaliado, removeu-se a casca e contou-se o número de segmentos. Esses segmentos foram seccionados longitudinalmente e as sementes normais, abortadas e óvulos não desenvolvidos foram separados e contados (Figuras 2 e 3). Avaliou-se 50 frutos maduros de livre polinização da tangerina Sunki 200 e Sunki Tietê durante dois anos consecutivos.

Em diversos porta-enxertos comercialmente utilizados a produção de sementes é normal. Entretanto não se têm informações quanto ao número de sementes abortadas e de óvulos não desenvolvidos que ocorrem normalmente em seus frutos.

Com a finalidade de se conhecer esses parâmetros e comparar a tangerina Sunki, com outros porta-enxertos que produzem quantidades satisfatórias de sementes, estas mesmas avaliações foram realizadas, em 50 frutos maduros de livre polinização dos seguintes porta-enxertos: limão Cravo (*C. limonia*), tangerina Cleópatra (*C. reshni*), Sheekawasha (*C. depressa*), limão Volkamericano (*C. limon*), Trifoliata Rich 16-6 (*Poncirus trifoliata*), Citrange Troyer (*Poncirus trifoliata* x *Citrus sinensis*), Trifoliata Limeira (*Poncirus trifoliata*), laranja Caipira Comum (*C. sinensis*) e tangelo Orlando (*C. reticulata* x *C. paradisi*) (Figuras 2 e 3). Para os dois primeiros,

as observações foram também realizadas por dois anos consecutivos. Além de frutos de livre polinização foram ainda estudados sob o mesmo aspecto, 50 frutos maduros da tangerina Sunki Tietê obtidos pela polinização controlada com a tangerina Sheekawasha (*C. depressa*).

Afim de investigar se o número de sementes por fruto depende da posição do fruto na árvore, foram realizados dois experimentos.

No primeiro estudou-se a relação com os pontos cardeais, Norte, Sul, Leste e Oeste. Para esse experimento foram utilizadas cinco plantas de Sunki Tietê, e contados o número de sementes normais, em 20 frutos maduros de livre polinização, em cada uma das posições cardeais.

No segundo experimento investigou-se a possibilidade do número de sementes/fruto ser dependente da posição do fruto no ramo, na região mais externa ou mais interna da copa. Foi utilizada uma árvore de Sunki Tietê, quatro ramos, nove posições em cada ramo e três frutos maduros de livre polinização em cada posição do ramo.

O delineamento utilizado foi o de Blocos ao Acaso e para a análise estatística os dados foram transformados em $\sqrt{x+0,5}$.

Hipótese B

Na segunda hipótese de estudo desse trabalho procurou-se investigar-se o baixo número de sementes da Sunki estaria relacionado com uma possível esterilidade fosse ela na formação dos gametas masculinos e/ou dos gametas femininos. Para tanto, avaliou-se a fertilidade dos grãos de pólen e a formação do saco embrionário.

Fertilidade do pólen

A fertilidade do pólen foi primeiramente avaliada através da sua coloração em carmim acético. Como nem todo pólen que se colore com carmim é viável, esta foi também avaliada através da sua germinação *in vitro*.

Flores de Sunki foram colhidas antes da antese, guardadas em caixas plásticas com algodão úmido até a abertura das flores e deiscência das anteras. Retirado o pólen, este foi então colocado em lâminas às quais se adicionou carmim-acético. Foram feitas cinco lâminas e contados três a cinco campos de cada lâmina num total de 3000 grãos de pólen.

Tentativamente, foram também realizados estudos preliminares do comportamento meiótico em botões florais de diversos tamanhos através da técnica de carmim acético de acordo com o seguinte protocolo:

1. Fixação das anteras em álcool absoluto e ácido acético, na proporção de 3:1.

Renovar o fixador após 24 horas conservando-os em refrigerador.

2. Esmagar as anteras em uma gota de carmim acético, com um mordente de ferro mantendo-o em contato com o carmim até que este comece a se tornar azulado nos lados da gota.

3. Colocar a lamínula fazendo pressão com os dedos, cobrindo-a com papel de filtro.

4. Aquecer levemente fazendo a lâmina passar rapidamente sobre a chama de uma lamparina.

5. Selar e examinar.

Para a realização da técnica de germinação de pólen *in vitro* foi empregado sacarose de fabricação Merck, água destilada, pH 7,0.

Os grãos de pólen foram colocados em sete lâminas e sobre os quais uma gota pendente de solução de sacarose MERCK em água destilada. Sete concentrações diferentes foram tentadas.

As concentrações de sacarose utilizadas foram: 0, 5, 10, 20, 30, 40 e 60% de sacarose sendo que na última concentração foi utilizado além da sacarose meio nutritivo completo. O meio completo foi utilizado por existirem referências de que em alguns casos, somente a sacarose não é suficiente para suprir os nutrientes necessários para o crescimento do tubo polínico, mascarando as avaliações de viabilidade (HENNRY, 1977). Para o meio completo foi utilizado 0,1g de H_3BO_3 ; 0,3g $Ca(NO_3).4H_2O$; 0,2g de $MgSO_4.7H_2O$; 0,1g de KNO_3 /litro pH 7,0.

Uma vez inoculadas, as lâminas foram mantidas em câmara úmida permanecendo por 4 horas sendo então analisadas sob microscopia a intervalos de 6 horas durante 3 dias.

Megasporogênese

Para estudar a formação do saco embrionário na tangerina Sunki foram observados cortes histológicos de ovário os quais foram incluídos e seccionados na

Seção de Citologia do Instituto Agronomico de Campinas pela Dr^a. CECÍLIA A.F.P. MAGLIO.

Foram colhidos 8 botões florais em diferentes estádios de desenvolvimento. A seguir foram desidratados, incluídos e seccionados resultando em cerca de 200 lâminas permanentes. As secções foram feitas com uma espessura de 8 a 12 micras, dependendo da textura do material, em cortes transversais e longitudinais.

A técnica utilizada para a análise citológica da megasporogênese encontra-se detalhada em MEDINA & CONAGIN (1964) e é, resumidamente, descrita a seguir:

Fixação - As flores são colhidas e fixadas em solução de ácido acético 3:1 durante 24 horas e transferidas para álcool 70°GL. Depois de fixadas, passam por um processo de limpeza, onde são retirados pétalas, anteras e pistilo.

Desidratação - O material depois de fixado e limpo passa por uma série de 7 soluções de álcool etílico e butílico de concentrações diferentes pertencendo por um período de 1 hora em cada uma dessas.

Infiltração - O material é colocado em um becker pequeno juntamente com o álcool butílico absoluto substituindo-se gradativamente o álcool pela parafina, até a eliminação total do álcool.

Inclusão - O material é então transferido para caixinhas de papel sobre placa de um termostato juntamente com a parafina onde se posicionam os ovários para os cortes. Deixa-se a parafina esfriar, retira-se a caixinha de papel, corta-se em pequenos cubos de parafina, aplicando-os a pedaços de madeira.

Cortes e montagem - Os cortes são feitos em espessuras 8, 10 e 12 microns. Para a montagem da lâmina é necessário passar 1 gota de albumina esfregando-se até o total secamento e colocar 1 a 2 gotas de H₂O destilada no ponto onde vai ser colocado o material. Colocar em placa quente até a fita distender cerca de 1mm em cada lado. Após essa operação as lâminas são deixadas para secar por 15 dias.

Coloração - Para serem coloridas pela hematoxilina os cortes devem ser desparafinados e hidratados na seguinte sequência:

- a) xilol 1 - 5 minutos
- b) xilol 2 - 5 minutos
- c) duas passagens pelo álcool absoluto por 5 minutos cada

- d) passagens em álcoois gradativamente mais diluídos: 90%, 70%, 50% e 30%, 5 minutos cada
- e) 4 a 5 lavagens em água
- f) alúmen de Ferro a 4% durante 2 horas
- g) 4 a 5 lavagens em água
- h) solução aquosa em hematoxilina de 0,5% por tempo mínimo de 12 horas
- i) 4 a 5 lavagens em água
- j) diferenciação em alúmen de ferro a 1% ao microscópio
- l) lavagem em água em 2 horas
- m) passagens em álcoois gradativamente mais fortes 30%, 50%, 70% e 90% - 5 minutos cada uma
- n) duas passagens em álcool absoluto - 5 minutos cada
- o) duas passagens em xilol 5 a 10 minutos cada
- p) montagem em bálsamo do Canadá.

Hipótese C

Uma outra possibilidade para explicar o baixo número de sementes da Sunki seria auto-incompatibilidade. Para investigar essa hipótese, a Sunki foi polinizada com o próprio pólen (auto-polinização), polinizada com pólen de diferentes clones (polinizações controladas) e, para se ter uma idéia aproximada da influência das

abelhas no número de sementes da Sunki, protegeram-se ramos com telas de nylon (Figura 1B). Como controle de todos esses tratamentos foram deixadas botões florais à livre polinização.

No total foram realizados 11 tratamentos.

Foram utilizados 171 ramos que apresentavam uma grande variação no número de flores, totalizando 4077 flores tratadas. Os tratamentos e o número de flores utilizadas por tratamento se encontram na Tabela 2.

Em todos os tratamentos, procedeu-se uma limpeza nos ramos selecionados, eliminando-se as flores abertas e pequenos botões que ainda não se encontravam em estágio adequado para polinização. Na Figura 1A é mostrado o estágio de desenvolvimento das flores utilizadas nesses tratamentos. A seguir detalham-se os procedimentos para cada tratamento.

Livre polinização: Após a limpeza dos ramos selecionados, as flores foram contadas e os ramos etiquetados. Sendo a livre polinização o controle para os demais tratamentos, para cada ramo de auto-polinização, protegido e de polinização cruzada, foi marcado também um ramo de livre polinização.

Auto fecundação: Os botões florais foram abertos, expondo os estigmas, que foram então polinizados com o pólen de outras flores da mesma árvore sem contudo serem emasculadas. As flores polinizadas foram contadas e os ramos etiquetados.

Ramos protegidos com tela: Para exclusão de abelhas foram utilizados saco de nylon de malha retangular de 1x2mm (Figura 1B e 1C). Os ramos selecionados e limpos foram então ensacados e etiquetados.

Polinizações: Como fontes de pólen foram utilizados polens dos seguintes clones: Limão Cravo (*C. limonia*); Laranjas doces (*C. sinensis*): Pera, Hamlin, Natal e Valência; Sheekawasha (*C. depressa*); Tangerina Cravo (*C. reticulata*); Tangor Murcote (*C. reticulata* x *C. sinensis*). As flores desses clones apresentando pólen foram colhidas e no mesmo dia realizaram-se os cruzamentos. Para isso, botões florais da Sunki foram abertos, para expor os estigmas e então polinizados, sem contudo proceder-se a emasculação.

Em todos os tratamentos foram realizadas avaliações periódicas, desde o pegamento dos frutos, até a completa maturação dos mesmos.

Após a maturação esses frutos foram colhidos, procedendo-se a contagem das sementes normais de cada fruto. Esses dados foram analisados estatisticamente

através do teste de Dunnet, utilizando o programa de computador SANEST (Sistema de Análise Estatística).

Uma vez verificado que alguns polinizadores promoviam um substancial aumento no número de sementes por fruto, seria necessário prosseguir as investigações determinando-se a origem reprodutiva dessas sementes extras como sendo nucelares ou zigóticas. Para tanto, as sementes normais de cada tratamento foram plantadas no Centro Experimental de Campinas, na Fazenda Santa Eliza e em uma amostra das plantas resultantes das progênes de cada tratamento determinou-se a porcentagem de plantas de origem nucelar e zigótica.

Essa amostragem foi realizada de acordo com a disponibilidade, variando de 45 a 201 plantas por tratamento.

Determinação da porcentagem de plantas nucelares e zigóticas (ou híbridas)

Para se estimar a porcentagem de plantas nucelares e zigóticas (híbridas) nas progênes obtidas dos diversos tratamentos realizados, utilizou-se conjuntamente marcadores isoenzímicos e o marcados morfológico "largura da asa do pecíolo da folha".

Os marcadores isoenzímicos utilizado foram os locos Prx_a-1, Got-1 e Got-2, revelados pela técnica de eletroforese de isoenzimas desenvolvida na Seção de Genética do IAC em gel de amido com equipamento descrito por TANKSLEY (1979) e de acordo com o protocolo descrito em BALLVÉ *et al.*, (1995).

Resumidamente é transcrito a seguir:

1. Para a preparação do gel utiliza-se amido hidrolizado de batata Sigma a 13% em solução tampão TRIS 0,018M - ácido cítrico 0,036M, pH entre 7,9 - 8,3, ajustado com TRIS 0,73M. 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 liquefeito é degaseificado pela aplicação de vácuo e colocado em placas de moldes de acrílico mantidas à temperatura ambiente até o dia seguinte em que efetua-se a corrida.
2. Retira-se um disco de 1cm de diâmetro das folhas das plantas a serem analisadas que, após lavado, é macerado em placa acrílica sobre almofadas resfriadas. Utiliza-se água destilada como solução extratora e para facilitar a maceração adiciona-se à ela sílica lavada.

3. O extrato é absorvido em papel de filtro para eletroforese o qual é inserido no gel de amido previamente resfriado à 4°C por meia hora.
4. 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 NaOH4N.
5. Inicia-se a eletroforese aplicando-se 25mA por gel sem ultrapassar 150V por 25 minutos para que o extrato contido no papel de filtro seja transferido para o gel de amido. Após, são removidas as amostras e aplica-se durante 1 hora, uma corrente máxima de 25mA e 150V. Posteriormente ajusta-se a amperagem para 300V, não excedendo 30mA. Tais condições promovem a migração do fronte para o anodo em cerca de 8,0cm da origem. O processo completo leva aproximadamente 4 horas.
6. Após a interrupção da corrente, os géis são seccionados em camadas horizontais por meio de um fio de aço tensionado deslizando sobre guias laterais de bastões de vidro de diferentes diâmetros.

7. As camadas são então reveladas para os diversos sistemas isoenzímicos à temperatura ambiente. Após completada as reações de coloração, as camadas são lavadas e fixadas com glicerol 50% em água.

Analisaram-se os locos isoenzímicos Prx_a-1, Got-1 e Got-2 utilizando-se as seguintes soluções de revelação:

PRX - (Peroxidase) (VALLEJOS, 1983 - Receita B)

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

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

GOT - Glutamato oxaloacetato transaminase (VALLEJOS, 1983)

A - TRIS (0,1m) - MgCl₂ (0,04m) pH 8,5 com HCl 3N 100ml

Ketoglurate	100mg
-------------	-------

Aspartic Acid	200mg
---------------	-------

B - Pyridoxal -5-P 10mg

Fast Blue BB salt	150mg
-------------------	-------

- Colocar solução A em B momentos antes de incubar no escuro.

Os genótipos para Prx_a-1, Got-1 e Got-2 da tangerina Sunki e os outros clones envolvidos nesse estudo encontram-se na Tabela 3.

Nos tratamentos de livre-polinização, auto-fecundação e ramos protegidos somente o loco Prx_a-1 pode ser utilizado. A Sunki é heterozigota FM para esse loco, portanto a segregação zigótica resultaria em plantas com genótipo FF, FM e MM na proporção de 1:2:1 respectivamente, sendo discriminados apenas os segregantes FF e MM pois, os segregantes FM confundem-se com os nucelares de mesmo genótipo, Portanto o número de plantas zigóticas identificadas por esse loco corresponde então

à metade das existentes. O número total foi então estimado multiplicando-se por dois o número de plantas identificadas.

Seguindo esse mesmo raciocínio foram analisadas as plantas das progênes dos cruzamentos controlados, utilizando-se também outros locos isoenzímicos discriminativos em cada caso específico. Os procedimentos e implicações dessas análises estão bem estabelecidas e amplamente discutidas em BALLVÉ *et al.*, (1991).

O marcador morfológico "asa do pecíolo foliar" foi também utilizado na determinação da origem reprodutiva, das plantas dos cruzamentos de Sunki com as laranjas doces, tangerina Cravo e Murcote. Esse marcador permite visualmente a caracterização de híbridos através da largura da asa do pecíolo (BALLVÉ *et al.*, dados não publicados). A tangerina Sunki apresenta folhas com pecíolo não alado, enquanto as laranjas doces apresentam pecíolo foliar alado. A tangerina Cravo e Murcote, apesar de não apresentarem folhas com pecíolo alado apresentam em suas progênes plantas com pecíolo alado. Isso é devido ao fato desses clones serem provavelmente híbridos de laranjas doces (tangores).

As plantas das progênes dos cruzamentos de Sunki (pecíolo não alado) com laranjas doces (pecíolo alado) que apresentavam folhas com pecíolo alado foram classificadas como híbridas (Figura 5A).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

RESULTADOS E DISCUSSÃO

HIPÓTESE A

Uma das possibilidades para explicar o baixo número de sementes da tangerina Sunki, seria a existência de uma limitação anatômica para a produção de sementes. Esta limitação seria ocasionada por uma pequena quantidade de óvulos no ovário.

Procedeu-se a contagem do número de sementes normais viáveis, abortadas (inviáveis) e o número de óvulos não desenvolvidos, cuja somatória representa o número de óvulos originalmente presentes no ovário da flor nos frutos maduros. Foi também contado o número de segmentos desses frutos maduros de tangerina Sunki e outros porta-enxertos que representa o número de lóculos ou carpelos na flor.

Na Tabela 4, nota-se que entre os diversos porta-enxertos estudados, não existe muita variação no número de segmentos dos frutos, o que corresponde ao número de lóculos no ovário das respectivas flores. O menor número corresponde

aos trifoliatas, com cerca de 7 segmentos/fruto sendo que o maior corresponde ao da Cleópatra com cerca de 12 segmentos/fruto. A Sunki situa-se em posição intermediária com cerca de 9 segmentos/fruto.

Maiores variações entretanto, são observadas em relação ao número médio de óvulos por segmento que varia de 1,9 para Sunki, Cleópatra e Sheekawasha até 7,8 para o limão Volkameriano.

O potencial biológico para a produção de sementes mostrou variações devido as variações dos componentes desse parâmetro, uma vez que para se obter esse potencial, multiplicou-se o número médio de segmentos/fruto pelo número médio de óvulo por segmento.

A tangerina Sunki apresenta em média um potencial de 17 sementes/fruto, que se situa entre os mais baixos dos diversos porta-enxertos estudados. Entretanto este não é por certo o único fator que estaria limitando o número de sementes na tangerina Sunki.

Um fator importante envolvido no reduzido número de sementes na Sunki é a porcentagem de sementes normais em relação ao número de óvulos disponíveis no

ovário. A análise desse parâmetro mostra que na tangerina Sunki apenas 16% dos óvulos do ovário se transformam em sementes normais no fruto maduro.

Analisando-se os parâmetros, número de segmentos, número de óvulos/segmento, número de segmentos, número de óvulos no ovário (potencial) e porcentagem de sementes/óvulo, observa-se que a tangerina Sunki tem potencial para produzir em média 17 sementes/fruto, não existindo portanto uma limitação anatômica acentuada para a produção de sementes.

A tangerina Cleópatra, a qual produz cerca de 19 sementes normais por fruto, assim o faz graças a um potencial (23) não muito maior que o da Sunki, mas devido a uma porcentagem maior de sementes normais/óvulo, cerca de 83%.

De forma semelhante, a tangerina Sheekawasha tem praticamente o mesmo número de segmentos por fruto, de óvulos/segmentos e conseqüentemente o mesmo potencial que a Sunki. Apresenta no entanto 12 sementes por fruto porque, da mesma forma que a Cleopatra, apresenta uma maior porcentagem de sementes normais/óvulo.

O limão Volkameriano e os trifoliatas Rich e Limeira, que produzem entre 24 e 28 sementes normais/fruto possuem apenas de 7 a 9 segmentos/fruto. Entretanto

existem em cada um desses segmentos 6 a 8 óvulos, dos quais 37% a 64% deles se tornam sementes normais no fruto maduro.

O limão Cravo em relação a estes parâmetros, situa-se em posição intermediária, seja em relação ao número de segmentos, ao número de óvulos/segmento e a porcentagem de óvulos que se transformam em sementes normais.

Concluindo, o baixo número de sementes na tangerina Sunki é devido a uma porcentagem reduzida de óvulos que se transformam em sementes normais associado à um relativamente baixo porém não muito limitante potencial anatômico para a produção de sementes.

A causa dessa reduzida porcentagem de sementes normais/óvulo será discutida nas hipóteses B e C. Quando a Sunki foi polinizada com pólen da tangerina Sheekawasha verificou-se conforme esperado que não houve modificações maiores no número de segmentos/fruto ou no número de óvulos/segmento e portanto no número de óvulos/ovário. Entretanto, produziu acima de 8 sementes normais/fruto em razão de um aumento significativo na porcentagem de sementes normais por óvulo decorrente de uma compatibilidade maior do pólen da Sheekawasha como será discutido em mais detalhes no item referente a hipótese C.

Comparando-se o clone da Sunki oriundo de Tietê com o clone 200 verifica-se que ambos possuem essencialmente o mesmo número de segmentos/fruto, o mesmo número de óvulos/segmento e conseqüentemente o mesmo potencial anatômico. O maior número de sementes/fruto da Sunki Tietê é devido a uma maior porcentagem de sementes normais/óvulo. É interessante ressaltar que a introdução de Tietê foi feita por existir a informação original que naquela cidade ocorria um clone de Sunki que produzia mais sementes que o clone existente no Centro de Citricultura. Entretanto, como todos os trabalhos se referem a Sunki introdução 200 não se deu muita ênfase nas investigações dessas diferenças, porém seria de interesse, maiores estudos a respeito desse clone e suas diferenças com a introdução 200.

Na Tabela 5 se encontram a porcentagem de sementes normais, abortadas e óvulos não desenvolvidos por fruto dos diversos porta-enxertos. Verifica-se uma ampla variação nesses parâmetros estudados.

É interessante notar em todos os porta-enxertos, que a porcentagem de óvulos não desenvolvidos é aproximadamente igual ou maior que a porcentagem de sementes abortadas e que no geral, essa porcentagem de óvulos não desenvolvidos é relativamente alta. É digno de nota que os dois extremos em termos de porcentagem de sementes normais, ou seja a Cleópatra com 83% de sementes normais e tangelo

Orlando com 8% de sementes normais, são também inversa e respectivamente os extremos quanto a porcentagem de óvulos não desenvolvidos. Nas Figuras 2 e 3 são mostrados os frutos e sementes normais, abortadas e óvulos não desenvolvidos desses diversos porta-enxertos.

Os dois clones de Sunki tem porcentagens similares de sementes abortadas e óvulos não desenvolvidos. Quando a Sunki foi polinizada pela Sheekawasha, verifica-se que permanece praticamente inalterado a porcentagem de óvulos abortados enquanto que reduz-se sensivelmente a porcentagem de sementes abortadas e conseqüentemente aumenta a porcentagem de sementes normais. Aparentemente, esse aumento na porcentagem de sementes normais se dá às expensas da redução no número de sementes abortadas. Esse fenômeno mereceria ser melhor investigado. Talvez essas sementes abortadas sejam consequência de uma incompatibilidade pós-zigótica devido ao colapso do embrião zigótico em desenvolvimento, resultante de genes deletérios em homozigose nos embriões oriundos de auto-fecundação.

Nas Tabelas 6, 7, 8 e 9 são apresentados os resultados obtidos no estudo sobre o número de sementes normais/fruto em diversas plantas de Sunki Tietê, em relação a posição na copa e aos pontos cardeais.

Apesar das médias apresentarem diferenças, as análises de variâncias mostram não existir diferenças significativas nem entre as diversas plantas do mesmo

clone de Sunki utilizados nesses estudos, nem em relação a posição dos frutos na copa (N, S, L e O) e nem em relação as diferentes posições dentro dos ramos.

Hipótese B

Outra possibilidade para explicar o baixo número de sementes normais da Sunki, seria a existência de esterilidade gamética masculina ou feminina. Para testar essa hipótese procedeu-se a estudos de fertilidade do pólem e observações sobre formação do saco embrionário em cortes histológicos de ovário.

Fertilidade do pólem

Através da coloração do pólem em carmim-acético pode-se observar que a tangerina Sunki apresenta uma grande porcentagem de grãos de pólem "cheios". Cerca de 93% das células se colorem com carmim acético (Figura 4D).

Conforme chamado atenção por SOOST & CAMERON, 1975 nem sempre todo o pólem que se colore com carmim acético ou iodo é necessariamente viável. Uma informação adicional sobre a viabilidade do pólem em Citrus obtém-se com a observação de sua germinação *in vitro*.

Verificou-se neste estudo que o pólen da tangerina Sunki é produzido em abundância e germina muito bem em soluções de 5 a 60% de sacarose, ocorrendo porém mais rapidamente na solução com 5% de sacarose. Após 39 horas todos os tratamentos apresentavam uma germinação acima de 95%, (Figura 4E), evidenciando portanto não existir qualquer problema na produção ou germinação do pólen da tangerina Sunki.

Concluindo, a tangerina Sunki produz pólen em abundância e apresenta uma alta fertilidade do pólen descartando-se portanto qualquer relação com o baixo número de sementes desse clone.

Megasporogênese

Os cortes histológicos mostraram que a tangerina Sunki apresenta em média 8 lóculos por ovário e 2 óvulos por lóculo (Figura 4C), fato que coincide com as contagens do número de segmentos por fruto maduro e com o número médio de óvulos por ovário inferidos pela soma do número de sementes viáveis, abortadas e óvulos não desenvolvidos (Tabela 4).

Cerca de 144 óvulos foram examinados histologicamente. Nos diferentes ovários examinados pode-se observar os vários estádios da formação do saco

embrionário, desde a formação da célula mãe do megásporo, até o saco embrionário completo com oito núcleos (Figura 4A e 4B).

Observou-se em todos os exemplos examinados que a tangerina Sunki apresenta formação normal do saco embrionário conforme descrito por BACCHI (1943). As lâminas elaboradas no presente trabalho foram comparadas com as lâminas originais obtidas de O. BACCHI ainda mantidas na Seção de Citologia do Instituto Agrônomo de Campinas verificando-se a equivalência de ambas.

Hipótese C

A terceira possibilidade investigada que poderia explicar o baixo número de sementes da Sunki, seria a existência de auto-incompatibilidade neste clone. A auto-incompatibilidade é definida como a impossibilidade, ou mesmo uma dificuldade do pólen da mesma planta de fecundar ou ser funcional em suas próprias flores.

No intuito de se investigar essa hipótese realizaram-se polinizações controladas de flores da Sunki com pólen de 10 clones diferentes de *Citrus*. Como controle foram marcados ramos contendo botões florais aos quais não se aplicou nenhum tipo de pólen, deixando-os à livre polinização. Adicionalmente a esse

controle, outros ramos foram protegidos com telas de nylon de malha grossa as quais excluem a possibilidade de as abelhas efetuarem polinizações.

Procedeu-se também a auto-polinizações controladas em flores de diversos ramos.

Na Tabela 10 encontram-se os resultados dessas diversas polinizações verificando-se o expressivo total de 2407 frutos e cerca de aproximadamente 10.000 sementes obtidas.

Na tabela 11 estão os resultados das médias do número de sementes por ramo de cada tratamento, os quais foram utilizados para a análise de variância.

As variâncias desses tratamentos se mostraram homogêneas pelo teste de Bartlett ($\chi^2_{\text{corrig}} = 13,4$ não significativo para 10 GL), o que permitiu, após transformação dos dados em $\sqrt{x+0,5}$, a análise de variância mostrada na Tabela 12. Como F resultou significativo, empregou-se o teste bilateral de Dunnett para avaliar as diferenças entre as médias dos diversos tratamentos em relação ao controle livre polinização (Tabela 13).

Verifica-se que à semelhança de observações anteriores, discutidas na hipótese A, a tangerina Sunki produziu em média 2,5 sementes normais por fruto, independentemente se as flores foram deixadas à livre polinização, auto polinizadas artificialmente ou protegidas das abelhas.

Diferentemente, as polinizações realizadas com outros clones resultaram invariavelmente em um aumento do número médio de sementes por fruto, embora não tenham sido estatisticamente significante os resultados com as laranjas Valência Hamlim e Pera (Tabela 10).

O incremento mais expressivo no número de sementes ocorreu quando a tangerina Sunki foi polinizada com a Sheekawasha, aumentando de 2,5 para 8,4 sementes normais por fruto. Esse índice é uma média e representa a realização de cerca da metade do potencial biológico para produção de sementes da Sunki. Porém, entre os 190 frutos analisados desta polinização vários chegaram a exibir o potencial máximo de 16 a 17 sementes/fruto.

A análise estatística mostrada na Tabela 12, revelou que não há diferença entre livre polinização, auto polinização, ramo protegido com tela e polinização com as laranjas, exceção feita à Natal. Em termos de médias verifica-se que o polinizador mais eficiente foi a Sheekawasha e os menos eficientes Pera, Hamlin e Valência.

Ocupam uma posição intermediária a Murcote e a tangerina Cravo. É interessante notar que a Sheekawasha é uma tangerina, Pera, Hamlin e Valência são laranjas e a Murcote e a tangerina Cravo apesar dessa última ser referida como tangerina, são ambas na verdade tangores, isto é, híbridos entre laranjas e tangerinas. Não se pode concluir se esses graus de compatibilidade, maior por uma tangerina, menor com laranjas e intermediário com tangores representam biologicamente uma relação causal ou apenas uma simples coincidência. De qualquer forma esses fatos sugerem maiores investigações a respeito.

Os dados das polinizações mostram claramente que existe auto-incompatibilidade na tangerina Sunki. Essa auto-incompatibilidade não é entretanto total. Isso é evidente pelos resultados das auto-polinizações onde obteve-se uma média de 2,55 sementes/fruto.

Os ramos protegidos por sacos de nylon os quais excluem as abelhas, consideradas como o principal agente polinizador do citros, produziram frutos com um número médio de 2,36 sementes, equivalentes à aqueles de livre polinização e de auto-polinização. Esses dados serão discutidos à luz das observações que se seguem.

De posse dos resultados acima, em ano subsequente, realizou-se experimento a fim de obter informações adicionais sobre a biologia da reprodução da tangerina

Sunki. Foram realizadas emascações em 34 botões florais os quais foram então protegidos com saco de papel. Um total de 20 botões florais sem emasculados foram também protegidos com sacos de papel, excluindo-se não só abelhas como também insetos menores, além de propiciar um micro ambiente protegido de ventos. Em outro tratamento 65 botões florais foram protegidos com tela de nylon usados anteriormente como controle e marcaram-se também ramos de flores de livre polinização, contendo 90 botões florais.

Os resultados se encontram na Tabela 14 e mostram que não se obtiveram frutos de flores emasculadas, aparentemente indicando que a tangerina Sunki necessita do estímulo da polinização para o desenvolvimento de frutos.

Esse estímulo parece também ser necessário para o desenvolvimento normal de sementes a julgar pelo fato de que ramos protegidos com saco de papel terem produzidos em média frutos com apenas 0,5 sementes normais.

Os ramos de livre polinização produziram frutos com 1,5 sementes tendo havido uma redução para 1,2 sementes quando esses foram protegidos por saco de nylon o qual exclui as abelhas porém não evita insetos menores e ficando também as flores expostas ao vento. Isso não ocorre quando existe a proteção de sacos de papel que causaram a redução para 0,5 sementes/fruto. Esses dados parecem indicar que o

vento e/ou insetos menores como os trips, que visitam abundantemente as flores de citros, sejam eficientes agentes polinizadores da tangerina Sunki.

Em resumo, pode-se concluir pelas discussões acima que a polinização é necessária para o desenvolvimento de sementes da tangerina Sunki e que quando a fonte polinizadora é o próprio clone a produção de sementes é reduzida devido a existência de auto-incompatibilidade.

O número de sementes desse clone pode ser bastante aumentado pela escolha de polinizadores adequados o que em termos práticos, a primeira vista, poderia ser a solução do problema do reduzido número de sementes interplantando a Sunki entre clones compatíveis, de florescimento simultâneo e intensificando a polinização cruzada através da instalação de apiários no local.

Entretanto antes que tal prática pudesse ser considerada seria necessário conhecer as implicações biológicas de tal procedimento.

Quando se obtém sementes de livre polinização da tangerina Sunki a maioria das plantas obtidas são nucelares devido, a ocorrência de embriões apogâmicos. No entanto quando se realizam hibridações da Sunki com alguns clones, um grande número de híbridos é obtido (MEDINA, inf. pessoal). Por essa razão se fez necessário prosseguir a presente investigação no sentido de se conhecer a porcentagem de

plantas nucelares, (de interesse para os viveiristas) quando a Sunki fosse polinizada por clone mais compatível capaz de induzir um aumento no número de sementes.

O resultado desse estudo, no qual determinou-se a porcentagem de híbridos entre as plantas obtidas dos frutos oriundos de livre polinização, de ramos protegidos, auto-fecundadas e polinizados com oito diferentes clones de citros se encontram na Tabela 15.

Para determinar a origem (nucelar ou zigótica) das plantas nas progênes dos diversos tratamentos, utilizou-se eletroforese de isoenzimas e o marcador "asa do pecíolo da folha" (Figura 5A, 5B e 5C).

Verifica-se que, embora a Sunki produza pequeno número de sementes quando por livre polinização, auto-fecundada ou com ramos protegidos, o que na verdade são polinizações com o próprio pólen, 98% ou mais das plantas produzidas são nucelares. As restantes são zigóticas, oriundas por auto-fecundação, o que mostra que a auto-incompatibilidade da Sunki não é total.

Ao contrário, quando polinizada por pólen de outros clones, o número de sementes aumenta consideravelmente, porém reduz-se drasticamente a porcentagem de plantas nucelares obtidas de tais sementes (Tabela 16). Dessa forma,

quando polinizada pela Sheekawasha por exemplo, a Sunki produz 8,4 sementes/fruto das quais no entanto apenas 2,4 em média são nucelares, o que é bastante semelhante ao número médio de plantas nucelares produzidas pela livre polinização desse clone. Verifica-se (Tabela 16) que o mesmo ocorre, com pequenas variações para os demais clones testados como polinizadores da Sunki.

Em resumo, conclui-se que apesar de possível aumentar-se o número de sementes/fruto da Sunki com polinizadores adequados o número de plantas nucelares correspondentes a esses frutos, permaneceria inalterado, o que em termos práticos inviabilizaria tal procedimento. Como apenas oito clones foram estudados talvez fosse possível através de investigações mais extensivas, identificar clones específicos que possam induzir um aumento no número de sementes sem contudo aumentar proporcionalmente o número de híbridos nessas sementes.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

As investigações sobre as causas do reduzido número de sementes da tangerina Sunki, realizadas no presente trabalho indicaram que:

- 1º) O potencial máximo de sementes por fruto em Citrus corresponde ao número máximo de óvulos por ovário da flor. Comparada com outros porta-enxertos que produzem razoável número de sementes por fruto, a tangerina Sunki tem baixo potencial. Entretanto se esse potencial fosse inteiramente realizado a tangerina Sunki poderia produzir até 17 sementes por fruto. Não existe portanto uma grande limitação anatômica. Das 17 possíveis apenas 2 a 3 são sementes normais, sendo que as restantes não se desenvolvem ou abortam.

- 2º) A formação dos gametas masculinos é normal com produção de pólen abundante e de alta fertilidade. É também normal a formação do saco embrionário. Por conseguinte tais fatores não poderiam ser responsáveis pelo baixo número de sementes da tangerina Sunki.

- 3º) A principal causa do baixo número de sementes por fruto na tangerina Sunki é um alto grau de auto-incompatibilidade evidenciado pela alta taxa de sementes não desenvolvidas ou abortadas.
- 4º) Polinização com clones específicos podem aumentar significativamente o número normal de 2 a 3 sementes/fruto fazendo o mesmo se aproximar do potencial biológico de 17 sementes/fruto. Entretanto tais polinizações resultam em grande número de híbridos, permanecendo praticamente inalterado o número de plantas nucelares/frutos. Investigações extensivas poderão identificar entre a diversidade genética existente algum clone que como polinizador seja capaz de induzir um aumento no número de sementes da tangerina Sunki sem contudo aumentar proporcionalmente o número de híbridos e com isso aumentar o número de plantas nucelares por fruto.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, C.M.; CASTLE, W.S. & MOORE, G.A. Isozymic identification of zygotic seedlings in Swingle citrumelo (*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*) nursery and field populations. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. Vol. 116(2). 1991.
- 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.; BORDIGNON, R.; MEDINA FILHO, H.P.; SIQUEIRA, W.J.; TEÓFILO SOBRINHO, J. & POMPEU JÚNIOR, J. Isoenzimas na identificação precoce de híbridos e clones nucelares no melhoramento de citros. *BRAGANTIA*, 50(1):57-76. 1991.

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. Genetica. 1995.

BARRET, H.C. Intereneric hybridization of *Citrus* and other genera in citrus cultivar improvement. Proc. Int. Soc. Citriculture. 2:586-589. 1977.

BARRET, H.C. Breeding cold-hardy citrus scion cultivares. Proc. Int. Soc. Citriculture. 61-66. 1981.

CAMERON, J.W. & FROST, 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, p. 325-370. 1968.

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. p.261-265. 1976.

CASTLE, W.S. A Review of *Citrus* seed Biology and its relationship to nursery practices.

Proc. Int. Soc. Citriculture. 113-119. 1981.

CASTLE, W.S. Citrus Rootstocks. In: R.C. Rom and R.F. Carlson (eds.). Rootstocks for

fruit crops N.Y. 361-399. 1987.

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, 47p., 1989.

DEL BOSCO, S.F.; MATRANGA, G. & GRACI, G. Isozyme analysis of citrus rootstock

populations to identify zygotic seedlings. Adv. Hort. Sci, 8:71-74. 1994.

DONADIO, L.C.; FIGUEREDO, J.O. & PIO, R.M. Variedades cítricas brasileiras.

Jaboticabal, Funep. 228p. 1995.

FAO. Situacion y perspectivas de los productos básicos. 1993-1994.

FROST, H.B. The Genetics and Citology of Citrus Current Sci. Especial Number of

Genetics:24-27. 1938.

FROST, H.B. & SOOST, R.K. Seed reproduction: development of gametes and embryos.

In: W. Ruther, L.D. Batchelor, and H.J. Webber (eds.). The Citrus industry vol. II. Univ. of California. Berkeley. 1968.

GMITTER Jr., F.G. & XULAN HU. The possible role of Yunnan, China, in the origin of contemporary *Citrus* species (Rutacea). *Economic Botany*, 44(2). p.267-277. 1990.

GMITTER, F.G.; DENG, X.X. & HEARN, C.J. Cytogenetic mechanisms underlying reduced fertility and seedlessness in Citrus. VII Int. Citrus Congress, Italy. 1992.

HEARN, C.J.; REECE, P.C. & FENTON, R. Self-Incompatibility and the effects of different pollen sources upon fruit characteristics of four citrus hybrids. *Proceedings of First International Citrus Symposium*. Vol I. 1969.

HENNY, R.J. Effect of sucrose level, medium composition and pH on the *in vitro* germination of pollen from *Spathiphyllum floribundum* (Lindl. & André). *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 90:304-306. 1977.

HODGSON, R.W. Horticultural varieties of Citrus. IN: W. Reuther, L.D. Batchelor and H.J. Webber (eds.). The Citrus industry vol. II. Univ. of California, Bekerley. 1968.

IGLESIAS, L.; LIMA, H. & SIMON, J.P. Isozyme identification of zygotic and nucellar seedings in *Citrus*. J. Hered. 65:81-84. 1974.

KRUG, C.A. Chromosome numbers in the subfamily Aurantioideae with special reference to the genus *Citrus*. Bot. Gaz. 104:602-611. 1943.

LUPO, A. & EISIKOWITCH, D. Pollination in Murcot cultivar of Citrus (Rutacea), the influence on seed number and productivity. Acta Horticulture 288:276-281. 1991.

MEDINA, D.M. & CONAGIN, C.H.T.M. 1964. Técnicas Citológicas, IAC. Publicação 2610.

MEDINA FILHO, H.P. Eletroforese em gel de amido:aplicações em genética e melhoramento de plantas. Campinas, Instituto Agronômico. 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.

MOORE, G.A. & CASTLE, W.S. Morphological and isozymic analysis of open-pollinated citrus rootstock population. Journal of Heredity. Washington, 79(1):59-63. 1988.

POMPEU Jr. J. Porta-enxertos. IN: O. RODRIGUES; F. VIÉGAS; J. POMPEU Jr., A.S. AMARO, eds. Citricultura Brasileira. Vol. I. 265-280. Fundação Cargil. 2ª ed. 1991.

RECUPERO, R.G. & RUSSO, M.R. Nucellar Embryony and ability to originate Polyembrionic seeds in some hybrids of *Citrus lacipes* (swing). Proc. VII Int. Citrus Congress. Italy. 1992.

ROSSETTI, V. Doenças dos citros. IN: O. RODRIGUES; F. VIÉGAS; J. POMPEU Jr., A.S. AMARO, eds. Citricultura Brasileira. Vol. I. 668-721. Fundação Cargil. 2ª ed. 1991.

SCHEENEIDER, H. The anatomy of citrus. IN: W. Reuther; L.D. Batchelor & W. J. Webber, eds. The citrus Industry. Vol. I. Univ. of Calif. Press. Berkeley. p.1-22. 1967.

SCORA, R.W. Biochemistry, Taxonomy and Evolution of Modern cultivated *Citrus* Proc. Sixth Int. Citrus Congress. 277-289. 1988.

SOOST, R.K. The incompatibility gene system in *Citrus*. Proc. First. Int. Citrus Symposium. Vol. I:189-190. 1969.

SOOST, R.K. & CAMERON, J.W. Citrus. Advances in Fruit Breeding. J. Janick and J.N. Moore Perdue (eds.). 508-540. 1975.

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. p. 335-372. 1984.

STEBBINS, G.L. The effect of asexual reproduction on higher plant genera with special reference to Citrus. proc. first. Intern. Symposium, Vol. I. 1969.

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. p.190-430. 1967.

TANAKA, T. Species problem in *Citrus*. Japanese Society for the Promotion of Sciences, Ueno, Tokio. 152 pp. 1954.

TANKSLEY, S.D. An efficient and economical design for starch gel electrophoresis. Report of the Tomato Genetics 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.

TEMPLETON, A.R. Genetic architectures of speciation. IN: A.R. Liss. ed. *Mechanisms of speciation*. Inc. N.Y. pg.105-121. 1982.

TEÓFILO SOBRINHO, J.; POMPEU JR., J; & FIGUEIREDO, J.O. Dez anos de experiência com porta-enxertos alternativos. *Informativo Coopercitrus*. 48:16-22, 1990.

TORRES, A.M.; SOOST, R.K. & DIEDENHOFEN, U. Leaf isozymes as genetic markers in *Citrus*. *Amer. J. Bot.* 65(8):869-881. 1978.

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

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.

UENO, I. & HIRAI, M. Identification of zygotic embryo in poliembrionic citrus seed by the cotyledon color. *Bull Fruit. Trees. Res. STN. B* 10:35-49, 1983.

UENO, I. Studies on the inheritance of citrus flower characteristics. *Bull. Fruit. Trees. Res. STN.* 13, 1986.

VALLEJOS, C.E. Enzyme activity staining. In: TANKSLEY, S.D. & ORTON, T.J., eds. *Isozymes in plant genetics and breeding. Part A.* Eusevier, Amsterdam. p. 469-516. 1983.

VITHANGE, V. Effect of different pollen parents on seediness and quality of "Ellendale" tangor. *Scientia Hort.* 48:253-260. 1991.

WAKANA, A. & UEMOTO, S. Adventive embryogenesis in *Citrus*. The occurrence of adventive embryos without pollination or fertilization. Amer. J. Bot. 74(4):517-530. 1987.

TABELAS

FIGURAS

TABELA 1. Introduções de citros e afins utilizadas e sua identificação no BAG do Instituto Agronômico de Campinas.

INTRODUÇÃO	IDENTIFICAÇÃO
Tangerina Sunki (<i>C. Sunki</i>)	Col. Clones Velhos n° 200 Quadra 57 Banco de Matrizes
Cleópatra - col. nova (<i>C. reshni</i>)	Col. Clones Velhos n° 199
Sheekawasha (<i>C. depressa</i>)	Col. Clones Velhos n° 201 (Suen Kat)
Laranjas doces (<i>C. sinensis</i>)	
Hamlin	Col. Clones Velhos n° 73
Pera	Col. Clones Velhos n° 154
Natal	Col. Clones Velhos n° 164
Valência	Col. Clones Velhos n° 161
Caipira Comum	Col. Clones Velhos n° 140
Limão Cravo Limeira (<i>C. limonia</i>)	Quadra 30 n° 863
Limão Volkameriano (<i>C. limon</i>)	Banco de Matrizes
Tangelo Orlando (<i>C. reticulata</i> x <i>C. paradisi</i>)	Col. Clones Velhos n° 240
Tangerina Cravo (<i>C. reticulata</i>)	Col. Clones Velhos n° 182
Tangor Murcote (<i>C. reticulata</i> x <i>C. sinensis</i>)	Col. Clones Novos n° 820
Trifoliata Limeira (<i>Poncirus trifoliata</i>)	Col. Clones Velhos n° 205
Trifoliata Rich 16-6 (<i>Poncirus trifoliata</i>)	Col. Clone Novo n° 838
Citrange Troyer (<i>P. trifoliata</i> x <i>C. sinensis</i>)	Col. Clone Novo n° 1326

TABELA 2. Número de ramos e de flores utilizadas na tangerina Sunki para produzir frutos por livre polinização nas quais excluíram-se as abelhas (proteção com tela de nylon de malha grossa) e por polinizações controladas utilizando-se o próprio pólen (auto polinização) ou pólen de diversos clones de citros.

	Nº RAMOS	Nº FLORES
Livre polinização	53	1280
Proteção com tela	11	453
Auto polinização	31	834
Polinização com		
Limão Cravo	19	243
Pera	8	247
Hamlin	8	138
Valência	8	211
Natal	6	299
Sheekawasha	14	297
Murcote	4	65
Tangerina Cravo	5	112

TABELA 3. Genótipos de três locos isoenzímicos e característica "asa do pecíolo da folha" utilizados como marcadores genéticos para identificar plantas de origem nucelar ou zigóticas em progênes da tangerina Sunki obtidas por livre polinizações, autofecundações e polinizações por diversos clones de citros abaixo relacionadas.

	PRx _a -1	GOT-1	GOT-2	Pecíolo da Folha
Sunki	FM	SS	FF/MM	não alado
Limão Cravo	MM	FS	FS/FM	não alado
Laranja Pera	FF	SS	FI/MM	alado
Laranja Hamlin	FF	SS	FI/MM	alado
Laranja Valencia	FF	SS	FI/MM	alado
Laranja Natal	FF	SS	FI/MM	alado
tangerina Sheekawasha	FF	SS	FM/MM	não alado
tangerina Cravo	FM	SS	FI/MM	não alado
Tangor Murcote	MM	SS	FM/MM	não alado

TABELA 4. Número médio de sementes normais, abortadas e óvulos não desenvolvidos por fruto, de segmentos por fruto de óvulos por segmento e de óvulos por ovário (capacidade anatômica máxima de sementes por fruto) em diversos porta-enxertos para citros avaliados em 2 anos. Ilustrações nas Figuras 3 e 4.

ANO	PORTA ENXERTO	Sementes/fruto			Seg/ Fruto	Óvulos/ Seg	N°Máx. Sts/fr
		Normais	Abortadas	Óvulos n.d.			
92	Sunki (200)	1,8	8,9	6,6	9,1	1,9	17,2
	Cleópatra	19,3	1,0	4,0	12,5	1,9	24,3
	Limão cravo	14,4	2,0	31,0	9,7	4,9	47,4
	Shekwasha (201)	11,6	0,4	8,7	10,9	1,9	20,8
93	Sunki Tiete (BM)	5,4	5,9	5,5	8,6	2,0	17,1
	Sunki (200)	3,6	7,1	6,7	8,6	2,0	17,3
	Sunki Tiete (pol. Sheekawasha)	8,0	2,3	4,2	8,1	1,8	14,5
	Cleópatra	18,0	1,6	1,1	11,0	1,9	20,8
	Limão Cravo	12,1	1,5	22,7	8,7	4,1	35,8
	Limão Volkameriano	26,3	3,4	41,7	9,1	7,8	71,4
	Trifoliata Rich 16-6	27,9	1,8	14,0	7,0	6,2	43,6
	Trifoliata Limeira	24,1	5,2	23,1	7,1	7,4	52,5
	Citrange Troyer	9,8	14,6	21,1	7,8	5,8	45,7
	Laranja Caipira Comum	7,4	1,6	33,6	10,2	4,2	42,7
Tangelo Orlando	3,0	0,6	35,5	11,3	3,5	39,2	

TABELA 5. Capacidade máxima de sementes por fruto, número e porcentagem de sementes normais, abortadas e óvulos não desenvolvidos dos diversos porta-enxertos.

Porta-enxerto	Capacidade máxima	% Sts Normais Prod.	% Sts Normais	% Sts abortadas	% Óvulos não Desenv.
Sunki	17,2	2,7	15,7	44,0	40,3
Sunki Tietê	17,1	5,4	31,6	34,3	34,1
Sunki (pol. Sheekawasha)	16,5	8,0	48,5	20,0	31,5
Cleópatra	22,6	18,7*	82,7	5,9	11,4
Limão cravo	41,6	13,3*	32,0	4,2	42,1
Sheekawasha	20,8	11,6	55,8	2,1	57,9
Limão Volkameriano	71,4	26,3	36,8	4,7	58,5
Trifoliata Rich 16-6	43,6	27,9	64,0	4,0	32,0
Trifoliata Limeira	52,5	24,1	46,1	10,0	44,0
Citrange Troyer	45,7	9,8	21,4	32,1	46,3
Laranja Caipira Comum	42,7	7,4	17,3	3,9	78,8
Tangelo Orlando	39,2	3,0	7,7	1,6	90,7

* = Média de dois anos.

TABELA 6. Número médio de sementes normais/fruto em diversas plantas da tangerina Sunki Tietê oriundos de frutos localizados nas faces Norte, Sul, Leste, Oeste.

PLANTA	N	S	L	O
1	6,0	3,4	6,2	3,5
2	4,7	4,7	5,7	7,4
3	4,1	5,2	3,2	4,6
4	5,3	6,6	7,4	8,6
5	5,4	5,1	7,2	3,5
6	5,2	3,2	5,1	9,0

TABELA 7. Análise de variância do número médio de sementes normais/fruto em diversas plantas da tangerina Sunki Tietê faces Norte, Sul, Leste e Oeste referidas na Tabela 6. Dados transformados em $\sqrt{x+0,5}$.

Análise de Variância

CAUSAS DA VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F
Plantas	5	0,6976427	0,1395285	1,3327
Pontos Cardeais	3	0,2593031	0,0864344	0,8256
Resíduo	15	1,5707190	0,1046946	
Total	23	2,5273648		

Média Geral: 2,413267

Coefficiente de Variação: 13,408%

TABELA 8. Número médio de sementes normais em três frutos de uma planta da tangerina Sunki Tietê localizados em 9 posições no ramo sendo a posição 1 a mais externa na copa e a 9 a mais interna, próxima ao tronco principal, avaliadas em 4 ramos diferentes (repetições).

RAMO	POSIÇÃO NO RAMO								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	2,3	2,7	3,3	3,3	3,3	3,3	3,7	1,3	3,7
B	2,0	0,3	2,0	1,3	1,3	2,0	3,3	5,3	6,0
C	1,0	3,0	3,0	3,7	5,0	5,3	3,0	10,0	1,3
D	2,3	2,0	1,3	2,0	1,0	0,7	3,0	2,7	4,0
Média	1,9	2,0	2,4	2,6	2,6	2,8	3,2	4,8	3,8

TABELA 9. Análise de variância dos dados da Tabela 8, transformados em $\sqrt{x+0,5}$.

Análise de Variância

CAUSAS DA VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F
Plantas	3	0,9934817	0,3311606	1,6370
Pontos Cardeais	8	1,5432791	1,1929099	0,9536
Resíduo	24	4,8552497	0,2023021	
Total	35	7,3920103		

Média Geral: 1,789693

Coefficiente de Variação: 25,132%

TABELA 10. Total de frutos obtidos e número médio de sementes normais/fruto da tangerina Sunki submetidos a diversos tratamentos referidos na Tabela 2.

TRATAMENTO	TOTAL FRUTOS	SEMENTES/FRUTO
Livre polinização	914	2,68
Proteção com tela	459	2,55
Auto polinização	169	2,36
Polinização com		
Limão Cravo	54	4,87
Pera	146	3,37
Hamlin	91	3,93
Valência	114	4,05
Natal	145	5,51
Sheekawasha	190	8,40
Murcote	67	5,83
Tangerina Cravo	58	6,24

TABELA 11. Número médio de sementes/fruto em cada ramo dos diversos tratamentos referidos nas Tabelas 2 e 10.

LP	AP	PT	LC	PER	HAM	VAL	NAT	SHE	MUR	TC
2,66	3,72	0,94	4,71	3,14	3,45	6,60	6,83	10,91	6,33	8,11
2,42	3,85	1,80	7,33	5,93	3,75	4,38	6,60	7,47	9,08	5,61
3,15	2,66	2,14	5,00	3,28	1,50	3,00	3,32	8,68	4,31	4,31
4,69	2,00	2,00	3,00	3,58	3,85	4,30	7,63	5,74	5,67	7,00
4,22	1,00	2,43	4,50	2,73	3,75	2,38	4,87	6,21		4,56
3,20	0,67	4,33	2,00	1,22	7,11	6,47	4,41	13,22		
0,60	4,00	3,16	8,33	4,14	4,90	4,60		9,88		
2,43	2,25	2,33	8,50	3,76	4,13	1,86		8,14		
2,71	0,50	2,16	5,00					4,94		
2,13	2,85	2,61	8,00					12,17		
1,07	3,80	2,61	6,00					8,24		
1,60	2,75		4,83					6,78		
1,71	2,33		6,50					9,91		
2,00	2,19		4,50					7,50		
3,67	3,65		2,00							
2,47	1,75		3,00							
3,37	2,90		5,00							
1,55	3,71		4,75							
3,66	3,64		3,00							
1,56	1,80									
3,03	3,13									
2,11	2,28									
3,66	2,73									
3,45	3,00									
4,30	3,40									
1,80	1,22									
1,92	3,00									
3,57	2,10									
3,86	4,96									
3,16	2,45									
4,07	1,68									
3,07										
1,50										
3,18										
2,00										
2,30										
1,27										
3,36										
3,64										
2,54										
1,94										

LP=livre polinização; AP=auto polinização; PT=proteção com tela; LC=limão Cravo; PER=Pera; HAM=Hamlin; VAL=Valência; NAT=Natal; SHE=Sheekawasha; MUR=Murcote e TC=tangerina Cravo.

TABELA 12. Análise de Variância dos dados (transformados em $\sqrt{x+0,5}$ da Tabela 11.

Análise de Variância

CAUSAS DA VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F
Tratamento	10	24,144393	2,4144393	20,7**
Resíduo	144	16,832391	0,1168916	
Total	154	40,976784		

Média Geral: 2,058504

Coefficiente de Variação: 16,609%

TABELA 13. Teste bilateral de Dunnet para médias de tratamentos referidos na Tabela 2.

TRATAMENTO	Nº REPETIÇÕES	MÉDIAS	5%	1%
Livre polinização (Test.)	41	2,69		

Polinizada com				
Sheekawasha	14	8,41	**	**
Murcote	4	6,24	**	**
Tangerina Cravo	5	5,84	**	**
Natal	6	5,51	**	**
Limão Cravo	19	4,87	**	**
Valência	8	4,05	NS	NS
Hamlin	8	3,37	NS	NS
Pera	8	3,77	NS	NS
Auto polinização	31	2,55	NS	NS
Prot. com tela	11	2,36	NS	NS

** Tratamentos que diferem da testemunha

NS Tratamentos que não diferem na testemunha

TABELA 14. Número de flores, frutos obtidos e sementes normais/fruto em tangerina Sunki após os botões florais terem sido submetidos a diversos tratamentos.

TRATAMENTO	FLORES	FRUTOS	SEMENTES NORMAIS	STS/ FRUTO
Livre polinização	90	23	35	1,5
Flores Protegidas com tela nylon (s/ emasculas)	65	31	38	1,2
Flores Protegidas com saco papel (s/ emasculas)	20	6	3	0,5
Flores Protegidas com saco papel (emasculados)	34	0	--	--

TABELA 15. Total de plantas analisadas por progênie de cada tratamento, número e porcentagem de híbridos (ou plantas de autofecundação) identificadas nessas progênies.

TRATAMENTO	PLANTAS ANALISADAS	HÍBRIDOS IDENTIFICADOS	% HÍBRIDOS
Livre polinização	201	2	1,0
Auto polinização	96	2	2,0
Proteção com tela	84	1	1,3
Polinização com tela			
Limão Cravo	75	57	76,0
Pera	79	50	63,2
Hamlin	70	54	77,1
Valência	96	69	71,8
Natal	138	105	76,0
Sheekawasha	105	73	69,5
Tangerina Cravo	82	46	56,0
tangor Murcote	45	20	44,5

TABELA 16. Número médio de sementes normais por fruto, número de plantas nucelares por fruto e complementarmente de plantas híbridas/fruto estatisticamente diferentes da testemunha "livre polinização" da tangerina Sunki polinizada por diferentes clones.

TRATAMENTO	SEMENTES/ FRUTO	NUCELARES/ FRUTO	HÍBRIDOS/ FRUTO
Tangerina Sheekawasha	8,4	2,4	5,6
Tangor Murcote	6,2	3,5	2,8
Tang. Cravo	5,8	2,6	3,4
Laranja Natal	5,5	1,3	4,4
Limão Cravo	4,8	1,1	3,6
Livre Polinização	2,7	2,6	0,1*

* = Zigóticas, produtos de autofecundação.

FIGURA 1

- A. Inflorescência da tangerina Sunki preparada e limpa contendo apenas botões florais próximos a antese.

- B. Ramos protegidos com tela de nylon contendo frutos maduros de tangerina Sunki.

- C. Tangerina Sunki 200 mostrando alta produção de frutos e alguns ramos protegidos com tela de nylon.

FIGURA 1



FIGURA 2

A. Frutos maduros de diversos porta-enxertos. Da esquerda para a direita: tangerina Sunki, tangerina Cleópatra, limão Cravo, citrange Troyer, limão Volkameriano, tangelo Orlando, trifoliata Limeira, trifoliata Rich 16-6, laranja Caipira Comum.

B. Frutos maduros de tangerina Sunki, tangerina Cleópatra e limão Cravo (da esquerda para a direita) com os respectivos número médio de sementes normais produzidas.

C. Fruto maduro de tangerina Sunki e número de sementes correspondente ao seu potencial de produção de sementes (17 sementes por fruto).

D. Idem B., limão Cravo.

E. Idem B., limão Volkameriano.

F. Idem B., trifoliata Rich 16-6.

FIGURA 2

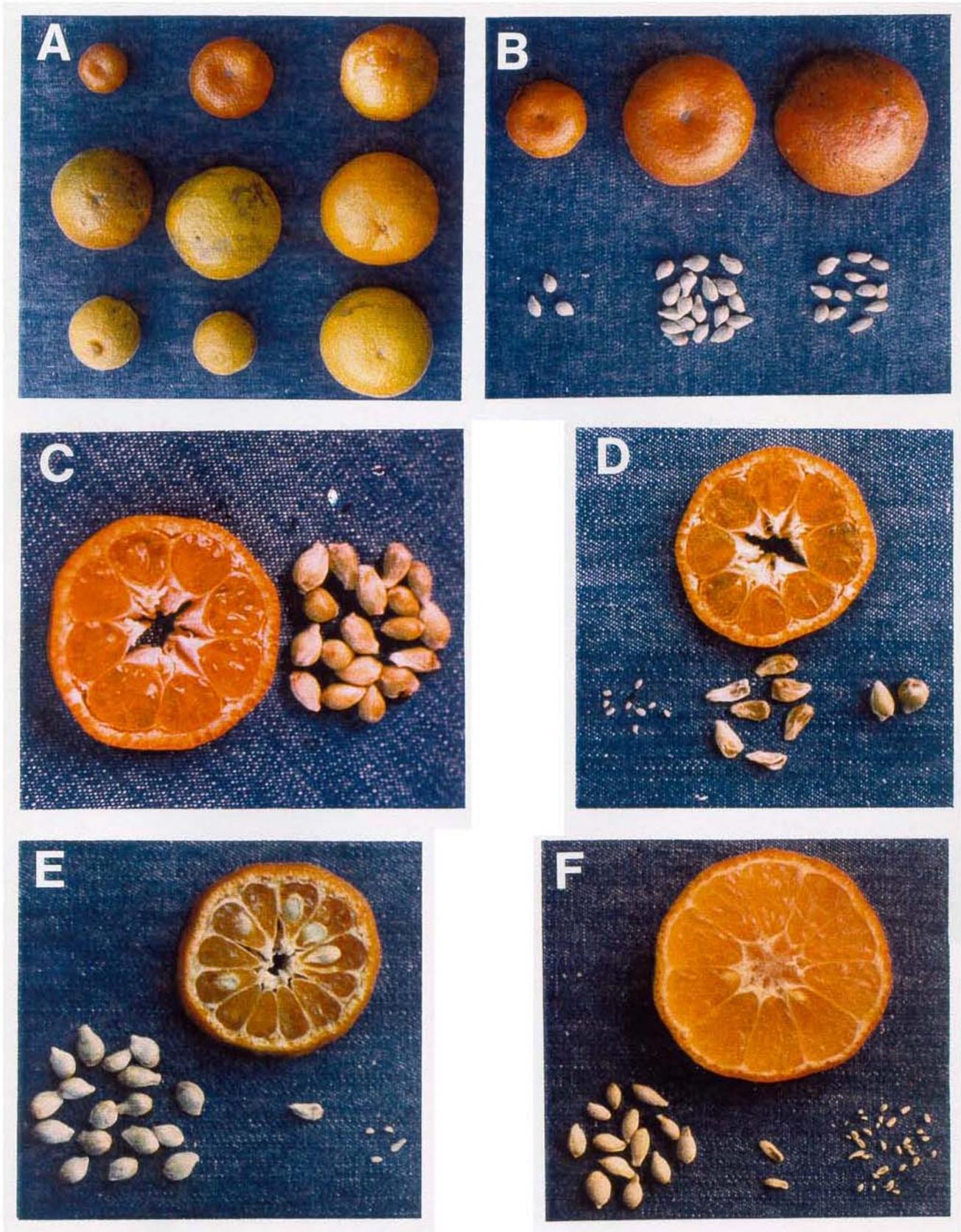


FIGURA 3

A. Fruto maduro de trifoliata Limeira, mostrando número médio de sementes normais, abortadas e óvulos não desenvolvidos.

B. Idem A, citrange Troyer.

C. Idem A, laranja Caipira Comum.

D. Idem A, tangelo Orlando.

E. Idem A, limão Volkameriano.

F. Idem A, Rich 16-6.

FIGURA 3

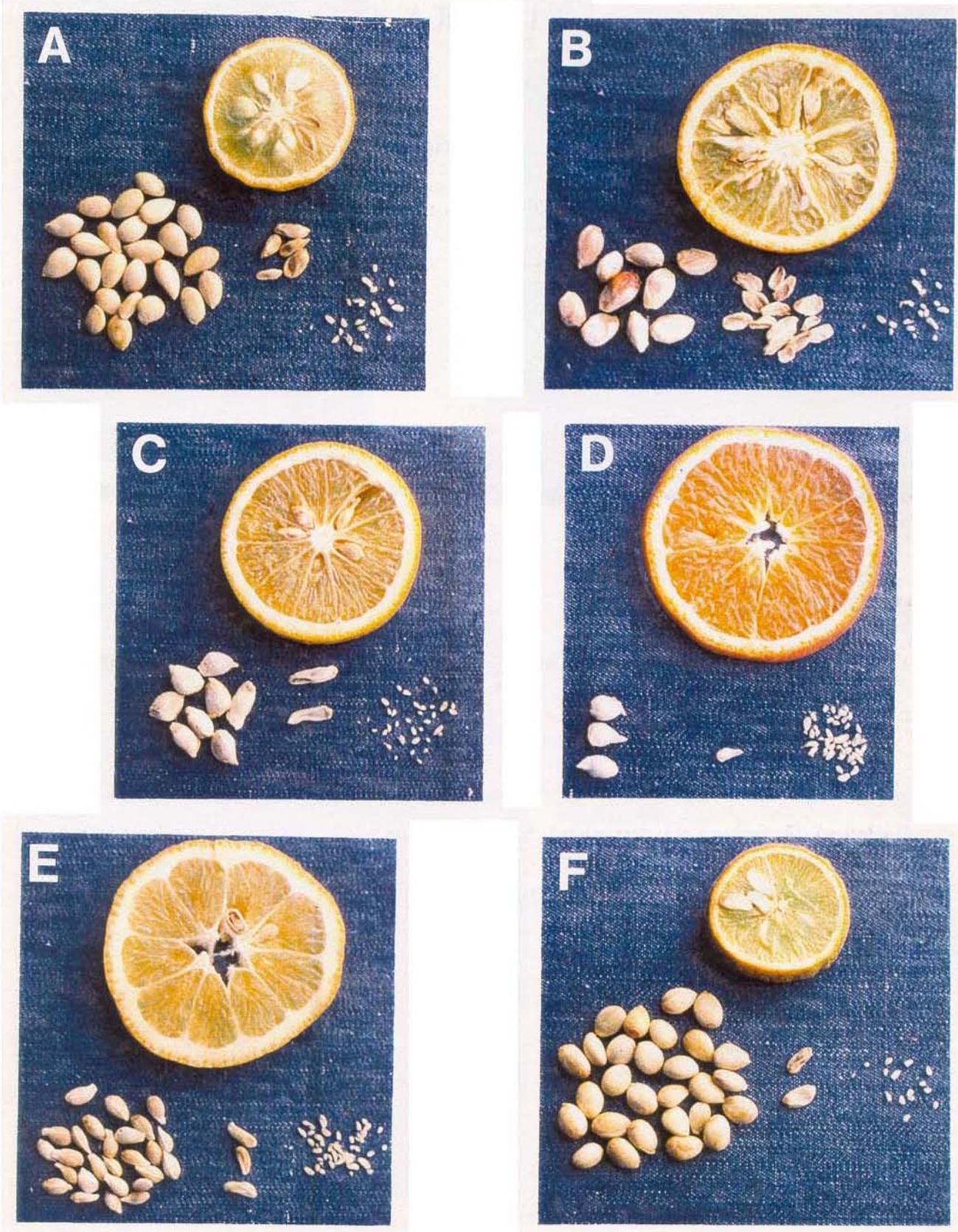


FIGURA 4

- A. Corte histológico de ovário da tangerina Sunki mostrando quatro dos oito núcleos existentes no saco embrionário.
- B. Idem A, em maior aumento.
- C. Corte histológico transversal de ovário mostrando nove lóculos contendo óvulos que, no fruto maduro, originariam os nove segmentos com as respectivas sementes.
- D. Grãos de pólen de tangerina Sunki coloridos com carmim acético mostrando alta viabilidade.
- E. Grãos de pólen de tangerina Sunki germinados *in vitro* em meio de sacarose (5%) mostrando alta taxa de germinação.

FIGURA 4

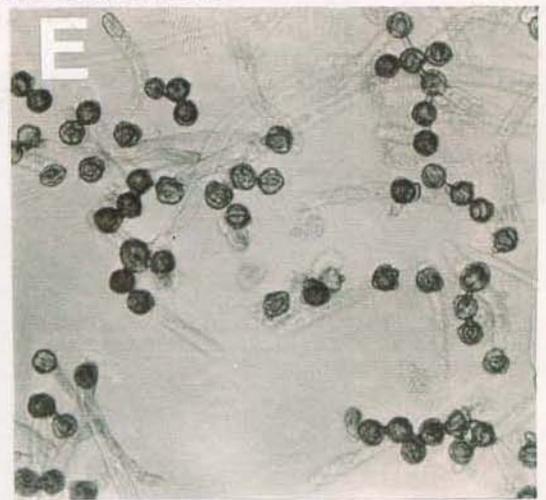
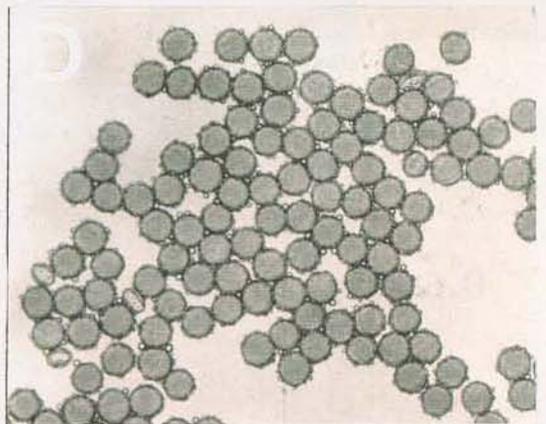
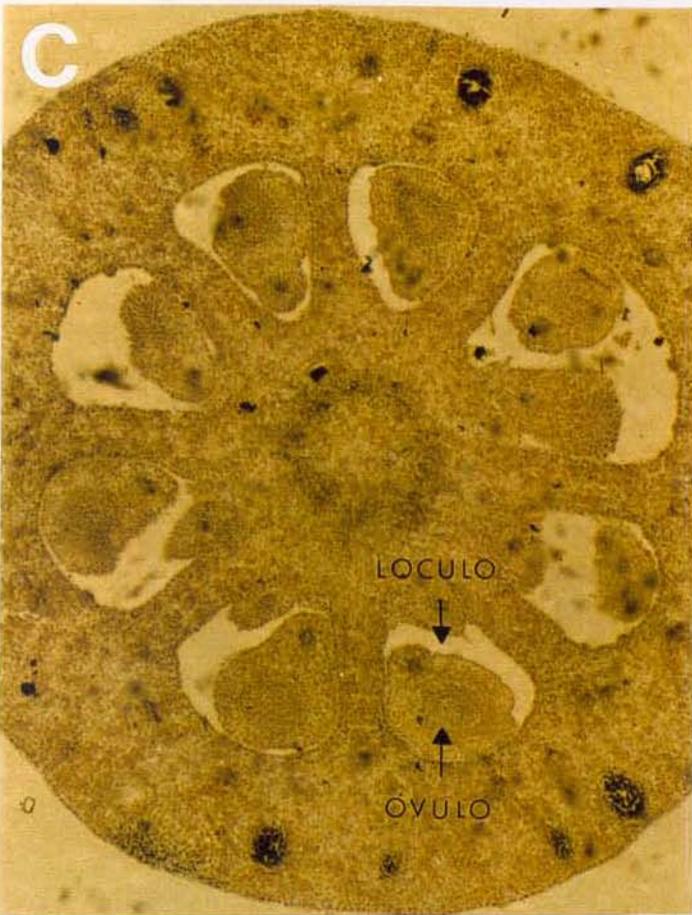
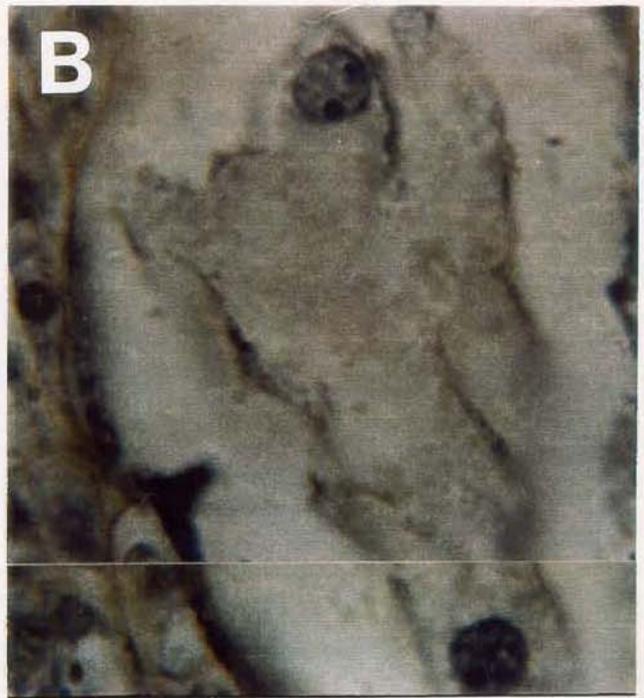


FIGURA 5

- A. Vista do canteiro contendo as plantas das progênies obtidas dos diversos cruzamentos controlados.
- B. Pecíolo não alado de folha da tangerina Sunki, pecíolo alado de laranja doce e de híbridos entre elas.
- C. Genótipos observados no loco PrX_a-1.
- D. Genótipos observados nos locos Got-1 e Got-2.

FIGURA 5

