

OBTENÇÃO DE PORTA-ENXERTOS INTERGENÉRICOS EM CITROS¹

JOSÉ DARLAN RAMOS², MOACIR PASQUAL³, VALTEMIR GONÇALVES RIBEIRO e
LUÍS EDUARDO CORRÊA ANTUNES⁴

RESUMO - Com o objetivo de diversificar porta-enxertos para citricultura em razão da suscetibilidade dos cítricos a doenças e pragas, híbridos de *Poncirus trifoliata* (L.) com limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck), obtidos e já instalados no pomar da Universidade Federal de Lavras, MG, foram estudados, para verificar a possibilidade de sua aceitação como futuros porta-enxertos. Em estudos comparativos entre os parentais masculino e feminino com os híbridos, frutos coletados foram mensurados, suas sementes, contadas, e os embriões, excisados e inoculados *in vitro*, determinando-se a taxa de poliembria. Verificou-se que quanto às características número total de sementes, número de sementes viáveis e diâmetro total do fruto não houve influência dos parentais. A taxa de poliembria dos frutos obtidos pela polinização artificial (2,39 embriões/semente) não foi mantida nos frutos das progênies híbridas (1,21 embriões/semente), podendo estas ser caracterizadas como monoembriônicas, porém foi similar à do parental feminino, que em média apresentou 1,41 embrião/semente.

Termos para indexação: melhoramento de plantas, propagação, polinização, cultura de tecidos, poliembria, limão 'Cravo', *Citrus limonia*, *Poncirus trifoliata*.

OBTAINMENT OF INTERGENERIC ROOTSTOCKS IN CITRUS

ABSTRACT - Inbreds *Poncirus trifoliata* (L.) Raf x Rangpur limes (*Citrus limonia* Osbeck) from the orchard of Universidade Federal de Lavras, MG, Brazil, were obtained as rootstocks for pest and disease resistance. Studies comparing male and female progenitors with their inbreds were carried out: fruits harvested were measured, seed numbers were taken, and polyembryony index was determined by excising the embryos at several development stages and inoculating them *in vitro*. The trifoliolate trend of male progenitor ('Trifoliata' lemon) kept the dominance over the normal female progenitor ('Cravo' lemon). No progenitor dominance for seed total number, viable seeds number, and fruit diameter was observed. Fruit polyembryony index obtained through artificial pollination (2.39 embryos/seed) were maintained in inbred progenies (1.21 embryo/seed), indicating that such traits are able to be characterized as monoembryonics, although they were similar to the female progenitor which showed 1.41 embryo/seed.

Index terms: plant improvement, propagation, pollination, tissue culture, polyembryony, Rangpur lime, *Citrus limonia*, *Poncirus trifoliata*.

INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa, atualmente, a primeira posição em produção e exportação de suco de laranja concentrado congelado. A citricultura, apesar de inú-

meras dificuldades, vem apresentando incremento considerável na área plantada, e suas perspectivas futuras são promissoras, principalmente pela diversificação de mercados consumidores (Del Grossi et al., 1992). O País possui condições edafoclimáticas favoráveis à citricultura, embora a maior produção verificada nos últimos anos tenha sido causada unicamente pelo aumento da área plantada. A produtividade é muito baixa, em comparação com a de outros países.

Inúmeros porta-enxertos são disponíveis, porém apresentam deficiências, em menor ou maior grau. Nos últimos anos, a propagação de citros tem-se

¹ Aceito para publicação em 10 de março de 1997.

² Eng. Agr., Dr., Prof. Adjunto, Univ. Fed. de Lavras (UFLA), Caixa Postal 37, CEP 37200-000 Lavras, MG. Bolsista do CNPq.

³ Eng. Agr., Dr., Prof. Titular, UFLA. Bolsista do CNPq.

⁴ Eng. Agr., M.Sc., Pós-Graduando/Fitotecnia, UFLA. Bolsista do CNPq.

concentrado na utilização do limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck), que, segundo Pompeu Júnior (1990), está presente em 80% dos pomares nacionais. O uso generalizado dessa espécie torna a citricultura brasileira geneticamente vulnerável (Passos, 1980), pois o limão 'Cravo' é susceptível a algumas doenças, principalmente ao declínio.

Diante do exposto, verifica-se a necessidade de diversificar a utilização de porta-enxertos, o que pode ser feito por meio do melhoramento genético.

Os trabalhos de melhoramento de espécies cítricas tiveram início na França por A. Bernard, em 1894, com a obtenção de alguns híbridos (Citranges) com maior resistência ao frio. Contudo, referências antigas são escassas, principalmente as relacionadas com hibridações interespecíficas, que são importantes para o trabalho de melhoramento. A maioria dos cítricos pertence aos gêneros *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus*, apesar de apresentarem grande variabilidade (Cameron & Soost, 1976) e facilidade de hibridações naturais (Chapot, 1975; Moreira, 1980). Quando são feitos trabalhos de hibridação artificial visando à obtenção do híbrido, este não se desenvolve satisfatoriamente, por problemas ligados à poliembrionia (Moreira et al., 1947; Frost & Soost, 1968).

A poliembrionia é caracterizada pela presença de dois ou mais embriões na mesma semente (Moreira et al., 1947; Gurgel & Soubiê Sobrinho, 1951). É um fenômeno comum em muitas espécies de citros, cujas sementes geralmente apresentam o desenvolvimento desses embriões nucleares concomitantemente ao embrião sexual, que surge na extremidade micropilar do nucelo, projetando-se para dentro do saco embrionário (Maheshwari & Swamy, 1958). Segundo vários autores, a poliembrionia é dominante sobre a monoembriônica (Russo & Starrantino, 1975).

Poucos são os conhecimentos genéticos disponíveis sobre caracteres relacionados aos citros. Dada a elevada heterose, progênies de natureza zigótica provenientes de hibridações são muito desuniformes, apresentando ampla variação de caracteres na geração F1, sendo a ocorrência de herança simples raramente indicada (Furr, 1969). Tangerinas e *P. trifoliata* são poliembrionicos. O

limão 'Cravo', entretanto, possui baixa e constante porcentagem de poliembrionia (Prates & Pompeu Júnior, 1981).

Em face dos inúmeros problemas apresentados pelo gênero *Citrus*, como esterilidade gamética, longo período juvenil e polembriônica, a biotecnologia apresenta alternativas viáveis que quando utilizadas são instrumentos valiosos, principalmente em trabalhos de melhoramento. A técnica de cultura de embriões favorece estudos mais aprofundados na área de fisiologia e melhoramento, pois permite o resgate de embriões híbridos imaturos oriundos de cruzamentos incompatíveis (Pasqual & Pinto, 1988).

É necessário pensar no melhoramento genético das variedades-copa e na seleção de porta-enxertos adequados aos desafios impostos pela citricultura, com o objetivo de aumentar a produtividade.

No melhoramento genético, o 'Trifoliata' é muito empregado, pois além de produzir híbridos de boa qualidade é portador de um gene marcador que passa para os descendentes, tornando mais fácil a identificação do híbrido quando a variedade receptora do pólen é poliembrionica e seus descendentes herdam folhas trifolioladas (Cameron & Frost, 1968).

Vários híbridos intergenéricos têm sido produzidos utilizando-se o gênero *Poncirus* como parental masculino, a exemplo de híbridos como Citranges (*P. trifoliata* x *Citrus sinensis*), e Citrumelos (*P. trifoliata* x *C. paradisi*).

Todavia, a herança do caráter, em cruzamentos que compreendem a participação de *Poncirus*, é mais complexa. A análise de progênies de 14 híbridos de *Citrus* tendo como ancestral o *Poncirus* sugere que mais de um gene deva estar envolvido na manifestação da poliembrionia, presumindo-se a presença não de um, mas de mais de dois genes dominantes e complementares, supondo-se que ele seja heterozigoto em ambos os genes.

De forma semelhante, diversas cultivares poliembrionicas de citros poderiam ser heterozigotas ou homozigotas em relação a um ou em ambos os genes dominantes, de modo que a progênie de híbridos dessas cultivares eventualmente apresentaria grande variação de proporções de indivíduos poliembrionicos e monoembriônicos (Cameron & Soost, 1976).

A busca incessante de porta-enxertos ananicas tem incentivado os pesquisadores a testarem o 'Trifoliata' e seus híbridos. Essa busca tem trazido vantagens, pois apesar da baixa produção por planta, apresenta alta produção por área, quando elevadas densidades de plantio são empregadas. Outras características importantes são a excelente qualidade que esse porta-enxerto induz aos frutos da variedade nele enxertada, e sua resistência à "gomose", como pôde ser verificado por Feichtenberger et al. (1977), testando quatro híbridos e quinze seleções de 'Trifoliata', tendo como copa a laranja 'Hamlin'.

O objetivo deste trabalho foi obter híbridos promissores como porta-enxertos para citricultura.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no setor de Fruticultura e no laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), durante o período de outubro de 1987 a fevereiro de 1995. As plantas utilizadas foram selecionadas da coleção de variedades de porta-enxertos. Como parental masculino, utilizou-se o *Poncirus trifoliata*, e como parental feminino, o limão 'Cravo'.

Os cruzamentos controlados entre 'Trifoliata' e 'Cravo' foram feitos na época de floração plena dos parentais, no mês de outubro de 1987. As flores masculinas foram colhidas na fase de balão e armazenadas em temperatura ambiente em placas-de-petri contendo papel-filtro, até a antese. Após dois ou três dias, quando ocorria a liberação dos grãos de pólen, estando, estes, aptos para germinação no tubo polínico, foram efetuadas as polinizações das flores do parental feminino, as quais também estavam na fase de balão.

Selecionou-se uma flor em cada ramo, a qual foi emasculada, polinizada, protegida com saco de papel e identificada com etiqueta, e a proteção foi retirada trinta dias após a realização do cruzamento. As demais flores do ramo foram eliminadas.

Após doze semanas, os frutos foram colhidos e levados ao laboratório de Biotecnologia da UFLA. Os frutos foram lavados em água corrente, mensurados, suas sementes retiradas, contadas e colocadas em solução para desinfestação com hipoclorito de sódio a 1%, por 20 minutos. A seguir, foram levadas para câmara de fluxo laminar, onde seus embriões foram excisados com o auxílio de pinça e bisturi sob estereomicroscópio com aumento de quarenta vezes. Os embriões foram contados e colocados em tubos de ensaio contendo meio MS, e após o surgimento das folhas trifolioladas foram identificados como híbridos.

Feita a caracterização dos híbridos, esses embriões foram transferidos para outros tubos individualmente, onde se desenvolveram. Quando apresentavam em torno de três pares de folhas, foram removidos dos tubos de ensaio, suas raízes foram lavadas em água corrente para a retirada de resíduos do meio de cultura, e transplantados para vasos contendo substrato estéril (areia lavada e pó de xaxim na proporção de 1:1). As plantas foram cobertas com sacos de plástico e mantidas nas mesmas condições de laboratório, por uma semana. Em seguida, foram transferidas para casa de vegetação e os sacos de plástico foram abertos; após quinze dias, as plantas foram transportadas para vasos devidamente esterilizados e adubados, onde, já aclimatadas, receberam os cuidados normais de plantas nessas condições. Quando atingiram o tamanho de 50 a 60 cm, foram transplantadas para local definitivo, no Setor de Fruticultura da UFLA.

Após a primeira floração e o desenvolvimento dos frutos, estes foram selecionados na mesma fase já citada anteriormente (12 a 15 semanas após a polinização), sendo coletados no mês de fevereiro de 1995, abertos, e avaliados os seguintes caracteres: número total de sementes, número de sementes viáveis, diâmetro do fruto, e taxa de poliembrião, expressa pelo número total de embriões excisados por fruto, dividido pela quantidade total de sementes.

Para comparação dos dados obtidos, foram feitas as mesmas observações, nas épocas adequadas, nos parentais e nos frutos provenientes de hibridação controlada. Os frutos foram colhidos quando apresentavam diâmetro que facilitasse a individualização e a contagem dos embriões, o que se caracterizou por uma faixa ideal de viabilidade de sementes. A faixa do limão 'Cravo' esteve entre 27 e 35 mm, a do 'Trifoliata' entre 27 e 34 mm, e na das sementes resultantes do cruzamento verificou-se que os diâmetros dos frutos estavam entre 28 e 33 mm, dez semanas após a polinização (Ramos, 1990).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verifica-se, na Tabela 1, que o parental masculino apresentou valores mais elevados em relação a todas as características analisadas.

Frutos provenientes do cruzamento artificial e do híbrido apresentaram menor número total de sementes do que a média dos pais. Os dados sugerem que esse caráter não apresenta dominância. Porém, é um dado promissor, principalmente para o híbrido que apresentou aproximadamente nove sementes por fruto, pois o número de sementes por fruto é muito importante, uma vez que os porta-enxertos cítricos são propagados por sementes.

TABELA 1. Número total de sementes por fruto (NTS), número de sementes viáveis (NSV), diâmetro dos frutos em mm (DF) e taxa de poliembriõnia (TP) nos parentais ('Cravo' e 'Trifoliata'), 'Cravo' em polinização artificial e híbridos ('Cravo' x 'Trifoliata').

Característica	Parental Feminino 'Cravo'	Parental Masculino 'Trifoliata'	'Cravo' (polinização artificial)	Híbrido ('Cravo' x 'Trifoliata')
NTS	12,77	28,93	10,20	9,33
NSV	12,13	26,61	8,40	8,22
DF	27,14	39,43	30,77	31,27
TP	1,41	2,90	2,39	1,21

O número de sementes viáveis apresentou comportamento similar à característica anterior. Esse caráter é primordial, pois talvez seja até mais importante que o número de sementes, uma vez que são essas sementes que apresentam maior probabilidade de germinação, resultando em maior número de plantas obtidas por semente.

Analisando-se o caráter diâmetro de frutos, observa-se que o seu comportamento também não apresentou diferenças significativas em relação aos anteriores. O diâmetro, que na verdade pode ser considerado como peso e tamanho do fruto, tanto em relação aos frutos da polinização artificial como em relação ao híbrido, apresenta comportamento comum às características citadas. Assim sendo, pode-se deduzir que a expressão desse caráter não tem nenhuma relação com dominância e é necessário, tanto no tocante a este como a outros caracteres, um estudo de herança, para melhor elucidação do tipo de segregação existente.

Verifica-se que a melhor taxa de poliembriõnia foi apresentada pelo híbrido (1,21), o que, na prática, caracterizaria essa semente como monoembriônica. Também evidencia que a taxa de poliembriõnia do híbrido é próxima à do parental feminino (1,41), e que há segregação do caráter, relacionada com a taxa de poliembriõnia adquirida nos frutos de polinização artificial (2,39); o caráter fora herdado pelo progenitor masculino (2,90). Esses resultados contrastam com os obtidos por Parlevliet & Cameron (1959), Cameron & Frost (1968), Furr

(1969), Russo & Starrantino (1975), Soost & Cameron (1975), Cameron & Soost (1976), que afirmam que a poliembriõnia é dominante sobre a monoembriõnia. Entretanto, é prudente verificar produções futuras, estudando-se esse caráter por vários anos, pois a interação genótipo ambiente pode estar interferindo nos resultados.

Alguns trabalhos feitos por Parlevliet & Cameron (1959) mostram segregação 1:1 nos cruzamentos entre pais monoembriônicos envolvendo a tangerineira 'Ponkan' (*C. reticulata*). Cameron & Frost (1968) mencionam, contudo, que cruzamentos envolvendo a tangerineira 'Clementina' (*C. clementina*) como parental feminino e *Poncirus trifoliata*, que é uma espécie poliembriônica, mostram resultados discrepantes em F1, observando-se que entre 32 híbridos testados, 31 pareceram ser monoembriônicos. Tais resultados são semelhantes aos obtidos no presente trabalho.

De acordo com o que foi descrito, sugere-se a realização de testes de progênie para os parentais envolvidos no presente trabalho, para elucidar o comportamento dos híbridos e sua possível utilização como eventuais porta-enxertos.

Os resultados obtidos quanto ao número total de sementes e sementes viáveis qualificam a progênie obtida como bom porta-enxerto, pois, estas características refletem um dos pontos importantes para escolha de cavalos cítricos. Os híbridos obtidos estão plantados no pomar da Universidade Federal de Lavras desde fevereiro de 1989 e apresentam, em média, além das características já mencionadas, altura de copa de 2,3 m, e os diâmetros, a 40 cm do solo, de 5,03 cm e 1,21 m de copa.

CONCLUSÕES

1. É possível obter híbridos intergenéricos entre *Poncirus trifoliata* e limão 'Cravo'.
2. O híbrido obtido (*P. trifoliata* x limão 'Cravo') apresenta menor número de sementes que os parentais envolvidos no cruzamento.
3. Quanto às características taxa de poliembriõnia, número total de sementes e diâmetro do fruto, há necessidade de estudos mais profundos de progênie para determinação do tipo de herança.

4. O híbrido *P. trifoliata* x limão 'Cravo' comporta-se como monoembriônico.

REFERÊNCIAS

- CAMERON, J.W.; FROST, M.B. Genetics, breeding, and nucellar embryony. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, M.J. *The citrus industry*. Berkely: University of California, 1968. v.2, Ch.5, p.325-370.
- CAMERON, J.W.; SOOST, R.K. *Citrus*, In: SIMMONDS, N.W. (Ed.). *Evaluation of crop plants*. New York: Longuran, 1976. p.261-265.
- CHAPOT, H. The citrus plant. In: CHAPOT, H. *Citrus*. Switzerland: CIBA-GEIGY, 1975. p.6-13. (Technical Monograph, 4).
- DEL GROSSI, M.E.; SANTOS, F.O.; NOGUEIRA, A.E. Aspectos sócio-econômicos da citricultura. In: INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ. *A citricultura no Paraná*. Londrina, 1992. cap.1, p.7-27. (Circular, 72).
- FEICHTENBERGER, E.; MUNTANER, A.I.C. de; ROSSETTI, V.; LEITE, Y.R.; POMPEU JÚNIOR, J.; TEÓFILO SOBRINHO, J. Estudo comparativo da resistência à *Phytophthora* spp. em 15 seleções de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. como copa de laranja 'Hamlin' de clone nucelar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 4., 1977, Salvador. *Anais...* Salvador: SBF, 1977. p.131-136.
- FROST, H.B.; SOOST, R.K. Seed reproduction: development of gamets and embryos. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, M.J. *The citrus industry*. Berkely: University of California, 1968. v.2, Ch.4, p.290-323.
- FURR, J.R. Citrus breeding for the arid southwestern United States. In: CHAPMAN, H.D. (Ed.). *Proceedings of the First Internacional Citrus Symposium*. Riverside, CA: Riverside Color Press, 1969. v.1, p.191-197.
- GURGEL, J.T.A.; SOUBIHE SOBRINHO, J. Análise de poliembriõnia em *Citrus*, máxime em toranjas. *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"*, Piracicaba, v.8, n.155, p.727-746, 1951. Separata.
- MAHESHWARI, P.; SWAMY, N.S.R. Polyembryony and *in vitro* culture of *Citrus* and *Mangifera*. *The Indian Journal of Horticulture*, Bagalore, v.15, p.275-286, 1958.
- MOREIRA, C.S. Melhoramento de citros. In: RODRIGUES, O.; VEIGAS, F. *Citricultura brasileira*. Campinas: Fundação Cargill, 1980. v.1, p.195-223.
- MOREIRA, S.; GURGEL, J.T.A.; ARRUDA, L.F. Poliembriõnia em *Citrus*. *Bragantia*, Campinas, v.7, n.3, p.69-106, 1947.
- PARLEVLIET, J.E.; CAMERON, J.W. Evidence on the inheritance of nucellar embryony in citrus. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, Virginia, v.74, p.252-260, 1959.
- PASQUAL, M.; PINTO, J.E.B.P. Cultura de embriões. *Notícias da Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas*, Brasília, v.9, p.2-12, 1988.
- PASSOS, O.S. Melhoramento de citros na Califórnia (EUA) e sugestões para a citricultura brasileira. Cruz das Almas: Embrapa-CNPMPF, 1980. 9p. (Embrapa-CNPMPF. Miscelânea, 2).
- POMPEU JÚNIOR, J. Situação do uso de porta-enxertos no Brasil. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS PORTA-ENXERTOS, 1., 1990, Bebedouro. *Anais...* Jaboticabal: FUNEP, 1990. p.1-10.
- PRATES, H.S.; POMPEU JÚNIOR, J. Determinação preliminar de poliembriõnia e número médio de embriões, em sementes de *Citrus* e afins, do banco ativo de germoplasma do Instituto Agronômico de Campinas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 6., 1981, Recife. *Anais...* Recife: SBF, 1981. v.2, p.563-568.
- RAMOS, J.D. Taxa de poliembriõnia e identificação de embrião sexual "in vitro" dos porta-enxertos *Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Lavras: ESAL, 1990. 73p. Dissertação de Mestrado.
- RUSSO, F.; STARRANTINO, P. Studies on the heritability of polyembryony in *Citrus*. *Annali dell'Istituto Sperimentale per l'Agrumicoltura*, Acircale, v.5, p.51-67, 1975.
- SOOST, P.K.; CAMERON, J.W. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Eds.). *Advances in fruit breeding*. West Lafayette, Indiana: Purdue University Press, 1975. p.507-540.