

Melhoramento genético de plantas cítricas

*Roberto Pedroso de Oliveira*¹
*Walter dos Santos Soares Filho*²
*Marcos Antonio Machado*³
*Ester Alice Ferreira*⁴
*Walkyria Bueno Scivittaro*⁵
*Abelmon da Silva Gesteira*⁶

Resumo - Os citros encontram-se entre as espécies mais estudadas no mundo. Há várias décadas, são conduzidos programas de melhoramento genético de cultivares porta-enxerto e copa, principalmente na África do Sul, Austrália, Brasil, China, Espanha, Estados Unidos, França, Israel, Itália e Japão. Das estratégias clássicas, e mais recentemente as ferramentas da biotecnologia utilizadas no melhoramento genético de citros, destacam-se a hibridação sexual controlada, a seleção de mutantes espontâneos ou induzidos e de híbridos naturais, a hibridação somática via fusão de protoplastos, o mapeamento genético, o sequenciamento de genoma e a transformação de plantas que têm sido usados na obtenção de novas cultivares cítricas. Ressalta-se a importância de aspectos relacionados a diversidade genética, taxonomia e biologia reprodutiva de *Citrus* (L.) e gêneros afins, tais como a heterozigosidade, apomixia, poliembrião, ploidia, juvenildade, partenocarpia, autoincompatibilidade, esterilidade gamética e zigótica. Estes são apontados para as perspectivas futuras na área de melhoramento genético de plantas cítricas.

Palavras-chave: Fruta cítrica. Hibridação sexual. Hibridação somática. Mutante espontâneo. Mapeamento genético. Sequenciamento de genoma. Transformação genética.

INTRODUÇÃO

Os citros estão entre as fruteiras mais plantadas, consumidas e pesquisadas no mundo, visto sua importância econômica e social. Embora apresentem grande diversidade de gêneros, espécies, cultivares e clones, os plantios comerciais de citros restringem-se a um número relativamente pequeno de cultivares, sendo importante a ampliação dessa base genética em busca da sustentabilidade da cadeia produtiva.

O melhoramento genético de citros é dirigido tanto a cultivares porta-enxertos, como a cultivares-copa e suas interações.

Em se tratando de porta-enxertos, têm-se buscado com as pesquisas principalmente características como:

- a) compatibilidade com as cultivares-copa;
- b) indução de alta produtividade e qualidade de frutos;
- c) redução de porte;
- d) tolerância a fatores abióticos, como seca, salinidade e frio;
- e) tolerância/resistência a fatores bióticos, tais como tristeza, gomose de *Phytophthora*, declínio, morte-

súbita-dos-citros e nematoide *Tylenchulus semipenetrans*;

- f) adaptação a solos calcários e pesados

Considerando-se as cultivares-copa para produção de frutos de mesa, o melhoramento genético de citros busca genótipos que produzam frutas saborosas, fáceis de descascar, sem sementes, de colorações intensas da casca, da polpa e do suco, com épocas de produção mais precoces e mais tardias, com alto teor de sólidos solúveis, acidez equilibrada e tolerantes ao cancro cítrico e à mancha-marrom-de-alternária

¹Eng^o Agr^o, D.Sc., Pesq. EMBRAPA Clima Temperado/Bolsista CNPq, Pelotas-RS, e-mail: roberto.pedroso@embrapa.br

²Eng^o Agr^o, D.Sc., Pesq. EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA, e-mail: walter.soares@embrapa.br

³Eng^o Agr^o, Ph.D., Pesq. IAC - Centro APTA Citros Sylvio Moreira, Cordeirópolis-SP, e-mail: marcos@centrodecitricultura.br

⁴Eng^a Agr^a, D.Sc., Pesq. EPAMIG Sul de Minas/Bolsista FAPEMIG, Lavras-MG, e-mail: ester@epamig.br

⁵Eng^a Agr^a, D.Sc., Pesq. EMBRAPA Clima Temperado, Pelotas-RS, e-mail: walkyria.scivittaro@embrapa.br

⁶Eng^o Agr^o, D.Sc., Pesq. EMBRAPA Mandioca e Fruticultura/Bolsista CNPq, Cruz das Almas-BA, e-mail: abelmon.gesteira@embrapa.br

(OLIVEIRA et al., 2011ab). Quanto às cultivares-copa para indústria, têm-se direcionado o melhoramento genético para maior produção de sólidos solúveis totais (SST) por área cultivada, maior porcentagem de suco por fruto e ampliação do período de colheita (SPIEGEL-ROY; GOLDSCHMIDT, 2008).

Após mais de um século da criação do primeiro programa oficial de melhoramento genético de citros, coordenado pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos – United States Department of Agriculture (Usda), na Flórida, em 1893, muitos avanços foram obtidos, sobretudo nos Estados Unidos, Brasil, Espanha, França, Itália, China, Japão, Israel, Austrália, África do Sul, dentre outros países.

Este artigo, de forma sintética, discute as principais estratégias clássicas, assim como o uso de ferramentas da biotecnologia, em apoio ao melhoramento genético de citros. São abordados, ainda, temas como barreiras biológicas e genéticas existentes, além de aspectos relacionados com a diversidade genética, taxonomia e biologia reprodutiva de *Citrus* (L.) e gêneros afins.

DIVERSIDADE GENÉTICA E TAXONOMIA

O sudeste da Ásia em especial o leste da Índia, o norte de Burma e o sudoeste da China, é considerado o centro de origem e de diversidade dos citros (SOOST; ROOSE, 1996).

A domesticação das espécies de citros iniciou-se nessas regiões e em localidades adjacentes, de onde se espalharam para quase todo o mundo, tendo chegado ao Brasil por volta da metade do século 16, em navios portugueses (SPIEGEL-ROY; GOLDSCHMIDT, 2008).

Os citros apresentam grande diversidade, em função de sua genética e biologia. Parte dessa diversidade encontra-se armazenada em importantes bancos de germoplasma, localizados no Centro APTA Citros Sylvio Moreira, vinculado ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), em Cordeirópolis, SP; na Embrapa Mandioca e Fruticultura, em

Cruz das Almas, BA; no Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (Ivia), em Valência, na Espanha; no Usda, em Riverside, na Califórnia, Estados Unidos; no National Citrus Germplasm Repository (NCGR), em Beibei, na China; dentre outros. A maioria desses bancos de germoplasma vem sendo mantida no campo. No entanto, em função de certas doenças, como huanglongbing (HLB, ex-greening), e de seus vetores, parte desses germoplasmas está sendo transferida para ambientes protegidos. A distribuição das cultivares conhecidas de citros obedece à proporção de 39% de laranjeiras doces [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], 5% de laranjeiras azedas (*Citrus aurantium* L.), 21% de tangerineiras (diversas espécies), 15% de limoeiros [verdadeiros *Citrus limon* (L.) Burm. f. e limeiras ácidas *Citrus latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka e *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle], 10% de pomeleiros (*Citrus paradisi* Macfad.) e de torangeiras [*Citrus maxima* (Burm.) Merr.] e 10% de outras espécies e híbridos (MACHADO et al., 2005).

A taxonomia dos citros é bastante complicada, em função da ampla diversidade de gêneros e espécies e de seus processos de geração. Isto ocorre pela possibilidade de hibridização natural entre as espécies, embriologia nuclear, pela ocorrência de mutações espontâneas e pelo consequente grande número de cultivares e de híbridos existentes (SPIEGEL-ROY; GOLDSCHMIDT, 2008).

Swingle (1967) classifica o gênero *Citrus* em dois subgêneros (*Citrus* e *Papeda*), contendo 16 espécies e um amplo número de híbridos intra e interespecíficos.

Tanaka (1961), com base em estudos botânicos e de distribuição geográfica, classifica o gênero *Citrus* em 162 espécies.

Nicolosi et al. (2000) comentam que estudos em *Citrus* realizados na década de 1970 por R. W. Scora, confirmados por H. C. Barret e A. M. Rhodes, sugerem a existência de somente três espécies verdadeiras: *Citrus maxima*, *Citrus medica* e *C. reticulata sensu* Swingle, considerando as demais como espécies híbridas.

Gradativamente, a taxonomia dos citros está sendo esclarecida, principalmente pelo crescente uso de marcadores moleculares e do sequenciamento de genoma.

Além da diversidade genética presente em *Citrus*, há aquela encontrada em gêneros próximos, que pode ser transferida por hibridação sexual controlada.

Assim, existem genes interessantes aos programas de melhoramento genético relativos à tolerância a frio em *Poncirus* (Rafinesque); boro em *Severinia* (Tenore); *Phytophthora* em *Citropsis* (Engl.) Swingle & M. Kellerm.; nematoide em *Microcitrus* (Swingle), e sais em *Eremocitrus* (Swingle) (SPIEGEL-ROY; GOLDSCHMIDT, 2008).

GENÉTICA E BIOLOGIA REPRODUTIVA

Os citros pertencem à família Rutaceae, subfamília Aurantioideae, compreendendo seis gêneros: *Fortunella* (Swingle), *Eremocitrus*, *Poncirus*, *Clymenia* (Swingle), *Microcitrus* e *Citrus*. Em geral, são espécies alógamas, sexualmente compatíveis, altamente heterozigotas e diploides, com número de cromossomos nas células somáticas $2n = 18$ (CAMERON; FROST, 1968) e com DNA nuclear medido em citometria de fluxo, variando de 0,8 picograma (pg) a 1,0 pg, a depender da espécie (OLLITRAULT; MICHAUX-FERRIERE, 1992).

A reprodução sexual ocorre por polinização cruzada e por autopolinização, podendo, também, haver a assexual por apomixia nuclear (CAMERON; FROST, 1968).

As cultivares de citros, em sua maioria, são altamente heterozigotas, havendo pouca informação sobre o controle genético de suas características. Muitas destas são poligênicas, sendo sua herança, portanto, controlada por vários genes. Por isso, a probabilidade de recombinação de genes em um híbrido de sucesso é pequena.

Também existem outras limitações aos programas de melhoramento genético por meio de hibridações sexuais controladas, tais como a pronunciada juvenildade dos

seedlings (plantas oriundas da germinação de sementes ou pés-francos) tanto zigóticos quanto nucelares, a apomixia (embrionia nucelar), que leva à poliembrionia e à necessidade de distinção entre indivíduos de origem sexuada (híbridos) e nucelar (SOOST; ROOSE, 1996). Fatores como estes, dentre outros, tornam longos e custosos os programas de melhoramento genético de citros, além de demandarem grandes áreas para a avaliação das cultivares em campo.

Heterozigosidade

O nível de heterozigosidade das espécies de citros é função da ocorrência dos processos de polinização cruzada, mutação gênica e embrionia celular, que ocorreram durante sua evolução. Assim, em limoeiros verdadeiros e em limeiras ácidas, a heterozigosidade é alta, decorrente da origem por hibridação interespecífica, enquanto em tangerineiras, como ‘Cleópatra’ (*C. reshni* hort. ex Tanaka) e ‘Sunki’ (*C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka), é baixa, sugerindo origem por autofecundação (MACHADO et al., 2005).

Adicionalmente, Ueda et al. (2003) determinaram graus de heterozigosidade de 15% a 55% em citros, sendo de 15% em cidreira (*C. medica* L.), 26% a 50% em tangerineiras, 51% em laranja doce e 55% em pomeleiros.

Apomixia e poliembrionia

A apomixia é um processo de reprodução assexual, em que embriões são formados a partir de células do tecido do óvulo, sem haver fusão de gametas (CAMERON; FROST, 1968). Em decorrência disso ocorre a formação de sementes poliembrionárias, sendo os embriões nucelares geneticamente idênticos à planta-mãe.

O nível de apomixia varia de acordo com as espécies e cultivares de citros. Em geral, os limoeiros verdadeiros apresentam número reduzido de embriões nucelares, enquanto as laranjeiras doces, laranja ‘Azeda’, a tangerineira ‘Ponkan’ (*C. reticulata* Blanco, o *Poncirus trifoliata* L. Raf.), os tangeleiros [tangerineira (diversas espécies, incluindo a mexeriqueira *C.*

deliciosa Ten.) x pomeleiro] e os citranjeiros (laranjeira doce x *P. trifoliata*) apresentam taxas elevadas de poliembrionia.

Em citros existem, ainda, cultivares monoembrionárias, como as tangerineiras ‘Wilking’ [mexeriqueira ‘Willowleaf’ x tangerineira ‘King’ (*C. nobilis* Lour.)]; ‘Kincy’ (tangerineira ‘King’ x tangerineira ‘Dancy’ *C. tangerina* hort. ex Tanaka); ‘Temple’ (tangoreiro, denominação generalizada de híbridos de tangerineira com laranja doce) e ‘Clementina’ (*C. Clementina* hort. ex Tanaka), os pomeleiros ‘Wheeny’ e ‘Sukega’, as toranjeiras e as cidreiras (MACHADO et al., 2005).

Embora a apomixia viabilize, na prática, a produção de porta-enxertos via sementes, em que várias plantas nucelares podem ser produzidas a partir de uma única semente, dificulta a obtenção e a seleção de híbridos em programas de melhoramento genético por meio de cruzamentos controlados.

Em termos evolutivos, a apomixia facultativa, que ocorre em citros, é uma vantagem. Por um lado, isto possibilita que se fixe a heterozigosidade da espécie gerada por hibridação e por mutação da reprodução vegetativa, como importante meio de adaptação ao ambiente, e, por outro lado, permite a formação de indivíduos híbridos para ampliar a variabilidade genética.

Como desvantagem, a apomixia favorece o acúmulo de genes mutantes recessivos e deletérios para várias características, o que diminui as chances de sucesso dos programas de melhoramento por hibridação, especialmente nos casos de autopolinização.

Ploidia

Embora a diploidia seja predominante em citros, outros níveis de ploidia são verificados na natureza, tais como: monoploidia, triploidia, tetraploidia, pentaploidia e octaploidia.

Os poliploides podem ter origem somática ou sexual (MACHADO et al., 2005). Os autopoliploides de origem somática podem surgir naturalmente, por mutação

de gema ou por embriogênese nucelar e, artificialmente, pelo uso de colchicina ou cultura in vitro de tecidos (SPIEGEL-ROY; GOLDSCHMIDT, 2008). Artificialmente, alotetraploides podem ser obtidos por meio de hibridação somática via fusão de protoplastos, neste caso sendo tetraploides heterozigóticos (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990), ou, também, podem ser induzidos pelo tratamento com colchicina, sendo autotetraploides (SPIEGEL-ROY; GOLDSCHMIDT, 2008).

Spiegel-Roy e Goldschmidt (2008) comentam que os triploides e, principalmente, os tetraploides originados sob forma espontânea são os tipos poliploides mais frequentes na natureza, além, evidentemente, dos diploides.

A frequência de tetraploides naturais é da ordem de 1% a 7% (SALEH et al., 2008).

Em geral, comparativamente aos diploides, as plantas tetraploides são menores, tendo hábito lento e compacto de crescimento. A juvenildade é maior, as folhas são verdes bem escuras, mais espessas e mais largas. Os frutos têm casca mais grossa, poucas sementes e menor teor de suco. As glândulas de óleo são maiores, a fertilidade é inferior, e a produção de frutos é menor (CAMERON; FROST, 1968).

Normalmente, os tetraploides não apresentam valor comercial como cultivares, embora, em função do menor vigor, tenham potencial para ser utilizados como porta-enxertos ananizantes, em que a menor produção por planta é compensada pelo maior adensamento (OLLITRAULT; MICHAUX-FERRIERE, 1992; SALEH et al., 2008). A maior importância dos tetraploides consiste no uso como parentais em programas de melhoramento genético, objetivando a produção de triploides (SPIEGEL-ROY; GOLDSCHMIDT, 2008).

Os triploides por sua vez podem ser obtidos por cruzamentos controlados entre tetraploides e diploides (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990), espontaneamente de hibridações convencionais entre

diploides monoembriônicos e pelo cultivo in vitro de endosperma (MACHADO et al., 2005).

Em geral, existe tendência de os frutos dos triploides serem partenocárpicos. Por isso, são de grande interesse em programas de melhoramento genético de citros de mesa, em que se desejam obter cultivares apirênicas (frutos sem sementes). Normalmente, em função da dificuldade de resgatar os embriões triploides por problemas genéticos em seu desenvolvimento e/ou por endosperma pobre e/ou malformado, recomenda-se o cultivo in vitro dos embriões (OLIVEIRA, 2013).

Segundo Soost e Roose (1996), as sementes triploides de citros são geralmente menores que as diploides obtidas no mesmo cruzamento, sendo, por isso, facilmente selecionadas.

Ainda morfológicamente, os triploides possuem folhas grossas, de formato intermediário entre os diploides e os tetraploides.

Quanto a exemplos de cultivares triploides, têm-se a limeira-ácida ‘Tahiti’, provavelmente originária de cruzamento espontâneo entre diploides (CAMERON; FROST, 1968), e os pomeleiros ‘Oroblanco’ e ‘Melogold’, que foram obtidos de cruzamento controlado entre tetraploides e diploides (SOOST; ROOSE, 1996).

Vale salientar que Espanha, Estados Unidos e França estão, há anos, aplicando substanciais esforços na geração de cultivares triploides, produtoras, particularmente, de frutos tipo tangerina, com características de alta qualidade, sendo, produzidos, anualmente, milhares de novos híbridos, para serem avaliados em campo.

Partenocarpia, incompatibilidade e esterilidade

A partenocarpia consiste na produção de frutos mesmo sem o estímulo à reprodução sexual (CAMERON; FROST, 1968). Em citros, o nível de partenocarpia varia em função da espécie. O pomeleiro ‘Redblush’, por exemplo, é uma cultivar fortemente partenocárpica, pois estimula

a formação de grande quantidade de frutos sem o processo sexual e, por isso, a presença de sementes em seus frutos é muito rara. Já a limeira-ácida ‘Tahiti’ consiste em outro exemplo bastante conhecido de partenocarpia em citros (OLIVEIRA et al., 2004).

A incompatibilidade relaciona-se com a esterilidade, que é classificada em função do estágio em que ocorre, podendo ser gamética, de natureza relativa ou absoluta, ou zigótica (FROST; SOOST, 1968). A autoincompatibilidade, por sua vez, consiste na inabilidade de formação de frutos por autopolinização, mesmo sendo férteis os grãos de pólen e as células-ovo de uma mesma espécie.

A esterilidade gamética relativa normalmente ocorre por autoincompatibilidade, não havendo a formação de embriões após a autopolinização, embora as células gaméticas sejam funcionais. Esse tipo de esterilidade ocorre em tangerinas do grupo Clementinas e nos tangeleiros ‘Orlando’, ‘Lee’ e ‘Nova’. Em outros casos, como o da laranjeira ‘Shamouti’ (*C. sinensis*), não existe incompatibilidade entre os gametas, porém a fecundação não ocorre, em função de os óvulos apresentarem maturação posterior à dos grãos de pólen (OLIVEIRA et al., 2004).

A esterilidade gamética absoluta, por outro lado, decorre de problemas de viabilidade dos grãos de pólen, sendo verificada nas laranjeiras doces de umbigo ‘Bahia’, ‘Lane Late’, ‘Navelina’ e ‘Navelate’, e na limeira-ácida ‘Tahiti’. As cultivares de tangerineira do grupo das Satsumas (*C. unshiu* Marcow.) também são consideradas macho-estéreis, embora produzam uma pequena porcentagem de pólen viável (FROST; SOOST, 1968).

A esterilidade gamética feminina por defeito na formação do saco embrionário é relatada em cultivares de tangerineira do grupo das Satsumas e nas laranjeiras do grupo ‘Umbigo’. No entanto, não é uma esterilidade absoluta, pois alguns sacos embrionários podem completar o seu desenvolvimento, estando aptos à

fecundação. Na limeira-ácida ‘Tahiti’, um número pequeno de óvulos funcionais desenvolve-se, podendo, ocasionalmente, haver a formação de sementes (OLIVEIRA, 2013).

Por fim, a esterilidade zigótica ocorre quando não são produzidos embriões capazes de germinar, embora tenha ocorrido a fertilização. Desenvolvendo ou não o embrião zigótico, várias cultivares de citros podem produzir embriões nucleares assexuadamente (FROST; SOOST, 1968).

Juvenilidade

A juvenilidade refere-se à incapacidade de florescimento durante o período de desenvolvimento inicial da planta originada por semente. Segundo Machado et al. (2005), a duração do período juvenil varia de dois a 13 anos, em função da espécie de citros, das condições ambientais e do sistema de cultivo adotado. Nesse período, as plantas normalmente apresentam maior vigor vegetativo, crescimento vertical, ramos em formato angular e presença de espinhos.

Longos períodos juvenis atrasam o melhoramento genético dos citros, pois não há produção de frutos e, quando estes são produzidos, apresentam, nas safras iniciais, características distintas das plantas com completo amadurecimento fisiológico, tais como: frutos mais alongados, casca mais enrugada, albedo mais espesso, e suco com alterações na porcentagem e no teor de açúcares (SPIEGEL-ROY; GOLDSCHMIDT, 2008).

ESTRATÉGIAS DE MELHORAMENTO GENÉTICO

As principais estratégias clássicas existentes para o melhoramento genético de citros consistem na hibridação sexual controlada e na seleção de mutantes espontâneos ou induzidos e de híbridos naturais. Enquanto as estratégias com uso de ferramentas de biotecnologia referem-se à hibridação somática via fusão de protoplastos, sequenciamento de genoma, mapeamento genético e transformação genética.

Hibridação sexual controlada

A hibridação sexual controlada é passível de ser realizada, em função de as espécies de *Citrus* e de gêneros afins serem, geralmente, compatíveis sexualmente. A técnica é descrita em detalhes por Bordignon, Medina Filho e Ballvé (1990). Além de ser importante na geração de variabilidade, essa técnica possibilita o uso de fontes de adaptação ao convívio com estresses bióticos (causados por pragas) e abióticos (relacionados com o clima e o solo) e de genes relacionados com as características hortícolas interessantes existentes nos citros.

Vários fatores influenciam no sucesso da hibridação sexual controlada, tais como domínio da tecnologia, condições climáticas, especialmente temperatura e pluviosidade, ocorrência de doenças nas flores, com destaque para a podridão-floral dos citros, e características genéticas das espécies envolvidas no cruzamento, notadamente, conforme Soares Filho et al. (2013), o grau de poliembrião dos parentais femininos, que, quanto mais baixo, permite a formação de maior quantidade de híbridos. Esses fatores determinam a eficiência do cruzamento e, também, a proporção entre embriões zigóticos e nucleares existentes nas sementes.

As limitações dessa tecnologia relacionam-se com a existência de barreiras biológicas e genéticas para obtenção dos híbridos sexuais, muitas das quais podem ser superadas por ferramentas da biotecnologia, tais como resgate in vitro de embriões, seleção de indivíduos zigóticos, por meio de marcadores moleculares, e seleção assistida por marcadores (OLIVEIRA, 2013).

Em função da dificuldade de gerar populações híbridas e de selecionar indivíduos promissores, especialmente em razão da ocorrência de esterilidade e de depressão

genética, tem-se dado preferência ao uso de parentais femininos monoembriônicos nos cruzamentos (SPIEGEL-ROY; GOLDSCHMIDT, 2008). Assim, espécies monoembriônicas, como as cidreiras, torangeiras, Clementinas, dentre outras, que somente dão origem a embriões zigóticos, são as preferidas nos programas de melhoramento genético por hibridação sexual.

Quanto à obtenção de porta-enxertos híbridos, Soares Filho et al. (2013) chamam a atenção para o uso de parentais femininos com baixo grau de poliembrião, destacando, nesse sentido, o emprego da tangerineira ‘Sunki’. Isto, porque, além de seu grau de poliembrião ser pouco acentuado, em torno de 10%, a ‘Sunki’ apresenta elevado nível de heterozigosidade, permitindo alta previsibilidade nos resultados de seus cruzamentos, dando origem a expressivas quantidades de híbridos, com bom vigor e relativa uniformidade.

Alguns dos principais exemplos de cultivares-copa, obtidos por meio de cruzamentos controlados, são os híbridos tipo tangerineira ‘Orlando’, ‘Minneola’, ‘Sunshine’, ‘Page’, ‘Sunburst’, ‘Fallglo’, ‘Robinson’, ‘Lee’, ‘Osceola’, ‘Nova’ e ‘Encore’.

Mais recentemente, foram lançados pela Universidade da Califórnia, nos Estados Unidos, os híbridos ‘Tahoe Gold’, ‘Yosemite Gold’ e ‘Shasta Gold’, e, pelo Ivia, na Espanha, os híbridos ‘Garbi’ e ‘Safor’.

Deve-se, também, destacar o trabalho de melhoramento de cultivares-copa conduzido na Unité Expérimentale Citrus, vinculada ao Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement – Institut National de La Recherche Agronomique (CIRAD-INRA), San Giuliano, Córsega, França, onde foram gerados milhares de híbridos triploides de citros, os quais serão avaliados e selecionados em condições brasileiras de solo e clima, sob a coordenação da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Quanto às cultivares porta-enxerto híbridas, têm-se os tradicionais citrangeiros ‘Carrizo’ e ‘Troyer’, além do citrumeleiro ‘Swingle’ (*C. paradisi* x *P. trifoliata*), que se encontram entre os porta-enxertos mais utilizados no mundo, este último especialmente no Brasil, após o advento da morte-súbita dos citros, em relação à qual é resistente.

Mais recentemente, foram lançados pelo Ivia, os porta-enxertos ‘Forner-Alcaide nº 5’; ‘Forner-Alcaide nº 13’; ‘Forner-Alcaide nº 418’; e ‘Forner-Alcaide nº 517’, estando em fase de registro naquele País outros oito novos porta-enxertos obtidos por hibridação controlada (INSTITUTO VALECIANO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS, 2014).

No Brasil, a Embrapa Mandioca e Fruticultura vem conduzindo um programa de melhoramento genético de citros há 25 anos, tendo realizado milhares de cruzamentos entre os principais porta-enxertos utilizados comercialmente. Como resultado desse trabalho, em combinação com copas de laranjeira ‘Valência’ [*C. sinensis* (L.) Osb.], em ensaios conduzidos no norte do estado de São Paulo, têm-se destacado os híbridos⁷ HTR - 051; HTR - 069; HTR - 053; HTR - 116; LCR x TR - 001; LVK x LCR - 038; TSKC x (LCR x TR) - 059; TSKC x (LCR x TR) - 073; TSKC x CTSW - 033; TSKC x CTSW - 041; TSKC x TRFD - 003 e TSKC x TRFD - 006, dentre outros, os quais estão em fase final de avaliação em campo. Esses porta-enxertos caracterizam-se pela redução que determina o porte da mencionada cultivar-copa, associada à alta eficiência de produção de frutos e à alta qualidade destes (teores elevados de sólidos solúveis).

Seleção de mutantes espontâneos ou induzidos e de híbridos naturais

A maioria das cultivares de citros existentes originou-se a partir de mutações espontâneas de gema com posterior sele-

⁷HTR - Híbrido trifoliado; LCR - Limoeiro ‘Cravo’; LVK - Limeiro ‘Volkameriano’ - *Citrus volkameriana* V. Ten. & Pasq.; TR - *Poncirus trifoliata*; TRFD - *P. trifoliata* seleção ‘Flying Dragon’; TSKC - Tangerineira ‘Sunki’ comum e CTSW - Citrumeleiro ‘Swingle’.

ção feita por melhoristas e/ou agricultores (SOOST; ROOSE, 1996).

A mutação somática envolve uma alteração no DNA, sendo relativamente comum em citros, podendo ser mantida pela propagação vegetativa e pela embrião nuclear. A taxa de mutação varia de acordo com a cultivar, o ambiente e as práticas culturais, sobretudo a poda (SPIEGEL-ROY; GOLDSCHMIDT, 2008).

As principais características envolvidas nessas mutações relacionam-se ao vigor, época de produção, coloração interna dos frutos, número de sementes, além de teor de açúcares e de ácidos orgânicos da polpa. Mutantes espontâneos, com características desfavoráveis, tais como frutos anormais e folhas com características atípicas, também têm surgido, sendo, contudo, descartados.

São inúmeros os exemplos de cultivares decorrentes de mutação espontânea de gema, como: laranja 'Pera', possível mutação de um tipo desconhecido de laranja doce; laranja 'Bahia', surgida a partir da laranja doce 'Seleta'; laranjeiras doces 'Baianinha', 'Cara Cara', 'Navelate', 'Lane Late' e 'Navelate', mutantes da 'Bahia'; laranja doce 'Shamouti', oriunda da 'Beledi'; laranja doce 'Salustiana', oriunda da 'Comuna', que é um tipo de laranja 'Caipira'; laranja 'Midnight', proveniente da 'Valência'; diversos mutantes de 'Clementina', como a tangerineira 'Clemenules', mutação da 'Clementina Fina', tangerineira 'Clemenpons', que é uma variação da 'Clemenules', tangerineira 'Marisol', mutante da 'Clementina Oroval' e tangerineira 'Lorentina', resultante da 'Marisol'; e pomeleiro Ruby, oriundo da 'Tompson' (BONO; SOLER; CÓRDOVA, 1996; SOOST; ROOSE, 1996; OLIVEIRA et al., 2011a).

Além de ser utilizada nos programas de melhoramento genético de citros, a seleção de mutantes espontâneos é uma prática comum em pequenas propriedades, sobretudo no Japão e na Espanha. Esse trabalho é coordenado por cooperativas ou executado individualmente por viveiristas e citricultores. Essa prática deve ser incentivada no Brasil,

onde são cultivadas centenas de milhões de plantas cítricas e, muito provavelmente, existam mutantes com características interessantes para ser selecionados.

A indução de mutações é outra estratégia utilizada com sucesso no melhoramento genético de citros, buscando-se a mutagênese genômica ou a mutação de genes.

Na mutagênese genômica, são utilizados mutagênicos químicos, como a colchicina, com o objetivo de alterar o número de cromossomos, ou seja, o nível de ploidia do genoma. Esta técnica é utilizada principalmente para a geração de autotetraploides, que, em seguida, serão empregados em cruzamentos com diploides para obtenção de triploides (OLIVEIRA, 2013).

Para a mutagênese de ponto, são utilizados mutagênicos físicos, como raios gama, raios-x, partículas nêutron, etc. Nesse caso, o gene é alterado pelo(s) processo(s) de deleção, adição e/ou substituição de nucleotídeos. Como apenas um dos alelos é alterado, a herança é quase sempre recessiva, o que gera a necessidade de que ocorra homozigose para que haja expressão do caráter mutado (MACHADO et al., 2005).

Como a mutação de ponto é um evento aleatório, há necessidade de condução de um processo de seleção dos genótipos gerados, buscando-se materiais com características de interesse (OLIVEIRA, 2013).

As principais características alteradas na mutação de ponto referem-se a variações no tamanho das árvores, época de maturação, número de sementes e cor dos frutos.

As principais cultivares obtidas até hoje por meio dessa tecnologia são: pomeleiro 'Star Ruby', a partir de irradiação com nêutrons de sementes de 'Hudson', e pomeleiro 'Rio Red', a partir da irradiação de gemas de 'Ruby Red' (HENSZ, 1985); 'Minneola' sem sementes, a partir do tangeleiro 'Minneola' (SPIEGEL-ROY; VARDI, 1989); mutantes de laranja 'Pera', com menor número de sementes por fruto, por meio da irradiação de borbulhas com raios gama (LATADO et al., 2001); tangerineira 'Moncalina', a partir da 'Mon-

cada'; 'Murta', obtida do tangoreiro 'Murcott'; tangerineiras 'Nulessín', 'Nero', 'Clemenverd' e 'Neufina', provenientes da 'Clemenules', por meio de irradiação (INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS, 2014); e 'Tango', obtido do híbrido 'Afourer'; 'DaisySL', oriunda da tangerineira 'Daisy'; 'KinnowLS', mutante da tangerineira 'Kinnow'; 'FairchildLS', proveniente de irradiação de tangerineira 'Fairchild'; 'EncoreLS', resultante de tangerineira 'Encore'; 'Nova Seedless' e 'Nova-sin', relacionadas com o híbrido 'Nova', todas essas por raios gama (UNIVERSITY OF CALIFORNIA, 2014).

Além disso, em função de a maioria das espécies de citros apresentar compatibilidade sexual, muitas cultivares surgiram sob a forma de *seedlings* híbridos naturais, os quais foram identificados e selecionados por melhoristas e/ou citricultores (SOOST; ROOSE, 1996). Como exemplos podem-se citar o limoeiro 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck, de origem Indiana); os tangoreiros 'Ortanique', 'Ellendale' e 'Murcott'; a tangerineira 'Okitsu', de origem nuclear de semente de 'Miyagawa'; a tangerineira 'Afourer' ('Nadorcott'), de *seedling* de 'Murcott', e a laranja 'Delta Seedless', de *seedling* de 'Valência' (SOOST; ROOSE, 1996; OLIVEIRA et al., 2011a).

Hibridação somática

A hibridação somática via fusão de protoplastos aplica-se tanto ao melhoramento de cultivares porta-enxerto quanto ao de cultivares-copa.

Em se tratando de porta-enxertos, as aplicações referem-se, principalmente, à obtenção de híbridos alotetraploides entre cultivares que exibam características complementares de interesse agrônomo.

Também pode ser utilizada com a finalidade de enriquecimento de germoplasma, por possibilitar o cruzamento entre espécies sexualmente incompatíveis. Os híbridos somáticos obtidos são alotetraploides, em função de o processo ser aditivo, não ocorrendo segregação meiótica. Por essa razão,

os genes deletérios recessivos acumulados nos parentais não se expressam e as características controladas por genes dominantes ou codominantes presentes em um ou outro parental podem-se expressar nos híbridos (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990).

Segundo Oliveira (2013), são exemplos dessas características a tolerância ao frio e à seca, assim como a resistência a pragas, dentre as quais a gomose de *Phytophthora*, o vírus-da-tristeza-dos-citros (*Citrus tristeza virus*, CTV) e o nematoide *Tylenchulus semipenetrans*.

Quanto ao uso da hibridação somática no melhoramento de cultivares-copa, os alotetraploides obtidos podem ser cruzados com plantas diploides, objetivando a geração de híbridos triploides, cujo especial interesse é o da produção de frutos sem sementes. Como desvantagens dessa técnica, pode-se obter uma única combinação por cruzamento, e os híbridos somáticos gerados podem apresentar problemas de fertilidade, impossibilitando seu uso em ciclos subsequentes de hibridação sexual (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990).

Alternativamente, modificações na metodologia podem ser introduzidas, visando à produção de híbridos assimétricos ou de cíbridos (VARDI; BLEICHMAN; AVIV, 1990), de forma que contornem essas limitações.

Os cíbridos são híbridos citoplasmáticos que, por sua vez, apresentam DNA nuclear de apenas um dos parentais. Já os híbridos assimétricos são híbridos somáticos resultantes da fusão de protoplastos de dois doadores. Desses, um não apresenta o conteúdo cromossômico completo, o que, normalmente, é conseguido por meio de tratamento com irradiação ou com mutagênico químico (OLIVEIRA, 2013).

Atualmente, a hibridação somática vem sendo utilizada como atividade de rotina em programas de melhoramento genético de citros conduzidos no Japão, Estados Unidos, França, Israel, Espanha e Brasil. Centenas de híbridos somáticos vêm sendo produzidos e avaliados em campo nesses países, para identificar seu potencial de uso

no sistema produtivo.

No Brasil, pesquisas que visem gerar híbridos somáticos resistentes a fatores bióticos e tolerantes a abióticos vêm sendo conduzidas principalmente na Universidade de São Paulo (USP), por meio da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (Esalq), no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (Cena) e, também, na Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Sequenciamento de genoma

O genoma consiste no conjunto de genes de um organismo. Nos últimos anos, grandes conquistas nessa área vêm sendo obtidas com o desenvolvimento da bioinformática e de métodos de sequenciamento automático de DNA cada vez mais eficientes.

Inicialmente, em função de o genoma dos citros ser de alta complexidade e de grande tamanho, a estratégia foi a de sequenciar os principais patógenos da cultura. Dessa forma, foram sequenciados os genomas das bactérias *Xylella fastidiosa*, agente causal da clorose variegada dos citros (CVC); da *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, causadora do cancro cítrico, e do vírus-da-leprose (*Citrus leprosis virus*, CiLV).

Posteriormente, iniciaram-se os trabalhos de sequenciamento do genoma de espécies de *Citrus* e de gêneros próximos, tais como: laranjeiras doces em vários países, ‘Clementinas’, na Espanha, tangerineira ‘Ponkan’, *Poncirus trifoliata* e limoeiro ‘Cravo’, no Brasil, toranjeira, nos Estados Unidos e Brasil, e citrangeiro ‘Carrizo’, nos Estados Unidos. Recentemente, cerca de 87% do genoma da laranjeira ‘Valência’, com base em duplo-haploide obtido por cultura de anteras, foi sequenciado, apresentando um tamanho de 367 megabases (Mb) (XU et al., 2013). Paralelamente, o Consórcio Internacional do Genoma Citros – International Citrus Genome Consortium (ICGC), que reúne grupos de pesquisa do Brasil, dos Estados Unidos, da França, da Espanha e da Itália, está sequenciando um genoma haploide de ‘Clementina’. Assim,

informações importantes para novas estratégias de melhoramento por transformação genética estão sendo geradas.

Mapeamento genético

Mapas genéticos de ligação saturados com marcadores moleculares são básicos em estudos avançados de genética, possibilitando a identificação e o isolamento de genes, entendimento da herança de características de interesse e de estudos da estrutura, expressão e função desses genes (OLIVEIRA, 2013).

As espécies de *Citrus* possuem particularidades bastante favoráveis à construção de mapas genéticos de ligação, dado que são diploides, apresentam número haploide de cromossomos relativamente pequeno ($n = 9$), são altamente polimórficas, e permitem a produção de híbridos interespecíficos e intergenéricos com facilidade (OLIVEIRA, 2013).

O desenvolvimento das técnicas de marcadores moleculares viabilizou o mapeamento genético em várias espécies, na medida em que inúmeros marcadores sem interferência ambiental puderam ser rapidamente produzidos.

No mapeamento de citros, vários tipos de marcadores moleculares vêm sendo utilizados, destacando-se o *restriction fragment length polymorphism* (RFLP); *random amplified polymorphic DNA* (RAPD); *amplified fragment length polymorphism* (AFLP); *simple sequence repeat* (SSR), e *single-nucleotide polymorphism* (SNP), os quais, geralmente, possibilitam a detecção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos diretamente em nível de DNA, de forma que represente todo o genoma (OLIVEIRA, 2013).

Dezenas de mapas de ligação foram gerados em citros, a partir dos quais se têm buscado genes e/ou caracteres de locos quantitativos de tolerância a sais e ao frio, reguladores da dormência, juvenildade, vigor, porte de plantas, acidez de frutos, resistência ao vírus-da-tristeza-dos-citros (*Citrus tristeza virus*, CTV), ao nematoide

Tylenchulus semipenetrans, à gomose causada por *Phytophthora*, dentre outros (OLIVEIRA, 2013). Para tanto, a população segregante e os parentais dos cruzamentos devem ser avaliados quanto à resposta à característica desejada. Quando os fenótipos observados segregam de acordo com as proporções esperadas pelas leis de Mendel, marcadores genéticos associados à característica em questão são localizados nos mapas de ligação. Uma vez identificados e isolados, esses genes podem ser clonados e transferidos para cultivares comerciais, por meio de transformação genética.

Transformação de plantas

As plantas transgênicas ou geneticamente modificadas são aquelas que expressam genes originados de outro organismo. Particularmente em citros, esta técnica apresenta grande potencial, por possibilitar a introdução de material genético em situações em que as espécies são sexualmente incompatíveis, por acelerar o processo de obtenção de cultivares melhoradas e por restringir a adição de genes indesejáveis, em função dos efeitos da heterozigiosidade decorrente dos cruzamentos sexuais (MACHADO et al., 2005).

A primeira transformação genética de células de citros foi realizada no final da década de 1980, tendo sido obtida a expressão e a integração de DNA exógeno em laranjeira doce utilizando-se sistema de protoplastos (KOBAYASHI; UCHIMIYA, 1989).

Atualmente, a transformação genética de citros vem sendo realizada em vários laboratórios distribuídos pelo mundo, sendo o cocultivo com *Agrobacterium tumefaciens* o método mais empregado (OLIVEIRA, 2013), embora o bombardeamento de partículas, a eletroporação, o cocultivo com *A. rhizogenes* e o RNA de interferência também estejam sendo utilizados (DONMEZ et al., 2013).

As principais vantagens do cocultivo com *A. tumefaciens* referem-se a fácil manipulação, integração de poucas cópias do fragmento de DNA a ser transferido para a planta, baixo rearranjo no genoma, maior probabilidade de integração em região de

transcrição ativa do cromossomo e alta fertilidade das plantas transgênicas obtidas (MACHADO et al., 2005). Por outro lado, as maiores limitações relacionam-se à baixa eficiência dos protocolos existentes para a regeneração de plantas de muitas cultivares (DONMEZ et al., 2013).

Em se tratando da introdução de genes de importância agrônômica em citros, já existem trabalhos relacionados com resistência ao vírus-da-tristeza-dos-citros (*Citrus tristeza virus*, CTV) utilizando gene da capa proteica em laranjeiras doce e 'Azeda'; limoeiro 'Galego' (*C. aurantifolia*) e pomeleiro; resistência a fungos; resistência a solos salinos por meio do gene HAL2, e produção de frutos com menor número de sementes e precocidade de produção com os genes LEAFY e APETALA1.

No Brasil, o gene que codifica a toxina sarcotoxina IA, de reconhecida ação antibacteriana, foi introduzido em laranjeira 'Pera', na laranjeira 'Pineapple', foi introduzido o gene que codifica a proteína PR-5 de tomate visando resistência a *Phytophthora citrophthora*. As laranjeiras doces 'Hamlin', 'Valência' e 'Pera' foram transformadas com os genes Xa21 e attA com atividade antibacteriana, visando resistência a *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e *Xylella fastidiosa* (OLIVEIRA, 2013). Além disso, a laranjeira 'Hamlin' foi transformada com o gene hrpN de *Erwinia amylovora*, visando resistência a cancro cítrico (BARBOSA-MENDES et al., 2009).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora existam poucos programas de melhoramento genético de citros no mundo, dois dos quais no Brasil, um na Embrapa e outro no Centro APTA Citros Sylvio Moreira, centenas de outros grupos de pesquisa vêm trazendo contribuições significativas à cultura, notadamente na área de Biotecnologia. Por isso, o número de cultivares lançadas tem aumentado nos últimos anos, tanto as decorrentes de hibridação sexual, quanto aquelas obtidas por meio da seleção de mutantes espontâneos ou induzidos e de híbridos naturais.

No tocante ao uso da hibridação somática via fusão de protoplastos e da transformação genética, subsidiadas por estudos de sequenciamento de genoma e de mapeamento genético, centenas de genótipos candidatos a cultivares porta-enxerto e a cultivares-copa foram obtidos nos últimos anos e estão sendo avaliados em estufas e em campo, devendo ser brevemente liberados para cultivo.

O avanço tecnológico abriu um universo de possibilidades no melhoramento genético de citros, permitindo a superação das barreiras genéticas e biológicas existentes. Dessa forma, nos próximos anos, esperam-se respostas tecnológicas eficientes aos desafios bióticos e abióticos da cultura e às demandas dos citricultores e dos consumidores.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA-MENDES, J.M. et al. Genetic transformation of *Citrus sinensis* cv. Hamlin with hrpN gene from *Erwinia amylovora* and evaluation of the transgenic lines for resistance to citrus canker. **Scientia Horticulturae**, v.122, n.1, p.109-115, Sept. 2009.
- BONO, R.; SOLER, J.; FERNÁNDEZ DE CÓRDOVA, L. 'Clemenpons' and 'Loretina', two early clementine mandarin mutations of potential interest. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 8., 1996, Sun City, África do Sul. **Proceedings...** Sun City, África do Sul: International Society of Citriculture, 1996. v.1, p.174-176.
- BORDIGNON, H.; MEDINA FILHO, H.P.; BALLVÉ, R.M.L. Melhoramento genético de citros no Instituto Agronômico. **Laranja**, Cordeirópolis, v.1, n.11, p.167-173, 1990.
- CAMERON, J.W.; FROST, H.B. Genetics, breeding and nucellar embryony. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1968. v.2, p.325-370.
- DONMEZ, D. et al. Genetic transformation in *Citrus*. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p.1-8, 2013.
- FROST, H.B.; SOOST, R.K. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1968. v.2, p.290-324.

- GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G. Somatic hybridization of *Citrus* with wild relatives for germplasm enhancement and cultivar development. **HortScience**, v.25, n.2, p.147-151, Feb. 1990.
- HENSZ, R.A. 'Rio Red' a new grapefruit with a deep-red color. **Journal of the Rio Grande Valley Horticultural Society**, v.38, p.75-78, 1985.
- INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS. **Varietades IVIA**. Valencia, Espanha, [2014]. Disponível em: <<http://www.ivia.es/nuevaweb/nivel2/variedades.php>>. Acesso em: 19 fev. 2014.
- KOBAYASHI, S.; UCHIMIYA, H. Expression and integration of a foreign gene in orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts by direct DNA transfer. **Japanese Journal of Genetics**, v.64, n.2, p.91-97, 1989.
- LATADO, R.R. et al. Mutantes de laranja 'Pêra' com número reduzido de sementes, obtidos através de mutações induzidas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.2, p.339-344, ago. 2001.
- MACHADO, M.A. et al. Genética, melhoria e biotecnologia de citros. In: MATOS JUNIOR, D. de et al. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC: FUNDAG, 2005. p. 221-277.
- NICOLOSI, E. et al. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.100, n. 8, p.1155-1166, June 2000.
- OLIVEIRA, R.P. de. Biologia molecular. In: CUNHA SOBRINHO, A.P. da et al. (Ed.). **Cultura dos citros**. Brasília: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2013. v.1, cap. 6, p.161-172.
- OLIVEIRA, R.P. de et al. Cultivares-copa. In: OLIVEIRA, R.P. de; SCIVITTARO, W.B. (Ed.). **Cultivo de citros sem sementes**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2011a. p.65-108. (Embrapa Clima Temperado. Sistema de Produção, 21).
- OLIVEIRA, R.P. de et al. **Fisiologia da formação de sementes em citros**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. 27p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 119).
- OLIVEIRA, R.P. de et al. Porta-enxertos. In: OLIVEIRA, R.P. de; SCIVITTARO, W.B. (Ed.). **Cultivo de citros sem sementes**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2011b. p.51-63. (Embrapa Clima Temperado. Sistema de Produção, 21).
- OLLITRAULT, P.; MICHAUX-FERRIERE, N. Application of flow cytometry for citrus genetic and breeding. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 7., 1992, Acirealy, Itália. **Proceedings...** Acirealy, Itália: International Society of Citriculture, 1992. v.1, p.193-198.
- SALEH, B. et al. Tetraploid citrus rootstocks are more tolerant to salt stress than diploid. **Comptes Rendus Biologies**, v.331, n.9, p.703-710, Sept. 2008.
- SOARES FILHO, W. dos S. et al. Melhoramento genético. In: CUNHA SOBRINHO, A.P. da et al. (Ed.). **Cultura dos citros**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2013. p.61-102.
- SOOST, R.K.; ROOSE, M.L. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Ed.). **Fruit breeding: tree and tropical fruits**. New York: J. Wiley, 1996. v.1, p.257-323.
- SPIEGEL-ROY, P.; GOLDSCHMIDT, E.E. **Biology of citrus**. 2.ed. Cambridge: Cambridge University, 2008. 230p.
- SPIEGEL-ROY, P.; VARDI, A. Induced mutations in *Citrus*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF SABRAO, 6., 1989, Tokyo. **Proceedings...** Tokyo: International Society of Citriculture, 1989. v.1, p.773-776.
- SWINGLE, W.T. The botany of citrus and its wild relatives. In: REUTHER, W.; BATCHLOR, L.D.; WEBBER, H.J. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California Press, 1967. v.1, p.190-430.
- TANAKA, T. **Citrologia semi centennial commemoration papers on citrus studies**. Osaka: Citrologia Supporting Foundation, 1961. 114p.
- UEDA, T. et al. Evaluation of a CAPS method based on ESTs in *Citrus*. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 9., 2000, Orlando. **Proceedings...** Orlando: International Society of Citriculture, 2000. v.1, p.116-117.
- UNIVERSITY OF CALIFORNIA. **Citrus variety collection**. Riverside, [2014]. Disponível em: <<http://www.citrusvariety.ucr.edu>>. Acesso em: 19 fev. 2014.
- VARDI, A.; BLEICHMAN, S.; AVIV, D. Genetic transformation of citrus protoplasts and regeneration of transgenic plants. **Plant Science**, v.69, n. 2, p.199-206, 1990.
- XU, Q. et al. The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). **Nature Genetics**, v.45, n. 1, p.59-66, Jan. 2013.

58 x 240 mm