

# Cultura dos citros



## Volume 1

Almir Pinto da Cunha Sobrinho  
Antônia Fonseca de Jesus Magalhães  
Antônio da Silva Souza  
Orlando Sampaio Passos  
Walter dos Santos Soares Filho

Editores Técnicos

**Embrapa** 

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Mandioca e Fruticultura  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

# Cultura dos citros

Volume 1

*Almir Pinto da Cunha Sobrinho  
Antônia Fonseca de Jesus Magalhães  
Antônio da Silva Souza  
Orlando Sampaio Passos  
Walter dos Santos Soares Filho*

Editores Técnicos

**Embrapa**  
**Brasília, DF**  
**2013**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Mandioca e Fruticultura**

Rua Embrapa, s/n°  
Caixa Postal 007  
CEP 44380-000 Cruz das Almas, BA  
Fone: (75) 3312-8048  
Fax: (75) 3312-8097  
www.cnpmf.embrapa.br  
cnpmf.sac@embrapa.br

**Unidade responsável pelo conteúdo**

Embrapa Mandioca e Fruticultura

**Comitê de Publicações da  
Embrapa Mandioca e Fruticultura**

Presidente

*Aldo Vilar Trindade*

Secretária-executiva

*Maria da Conceição Pereira Borba dos Santos*

Membros

*Cláudia Fortes Ferreira*

*Eduardo Augusto Girardi*

*Fernando Haddad*

*Hermínio Souza Rocha*

*Márcio Eduardo Canto Pereira*

*Paulo Ernesto Meissner Filho*

*Augusto César Moura da Silva*

Supervisor editorial dos originais

*Ana Lúcia Borges*

Revisores de texto dos originais

*Antônio da Silva Souza*

*Walter dos Santos Soares Filho*

**Embrapa Informação Tecnológica**

Parque Estação Biológica (PqEB)  
Av. W3 Norte (final)  
CEP 70770-901 Brasília, DF  
Fone: (61) 3448-4236  
Fax: (61) 3448-2494  
www.embrapa.br/livraria  
livraria@embrapa.br

**Unidade responsável pela edição**

Embrapa Informação Tecnológica

Coordenação editorial

*Selma Lúcia Lira Beltrão*

*Lucilene Maria de Andrade*

*Nilda Maria da Cunha Sette*

Supervisão editorial

*Juliana Meireles Fortaleza*

Revisão de texto

*Maria Cristina Ramos Jubé*

Normalização bibliográfica

*Iara Del Fiaco Rocha*

Projeto gráfico

*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Capa

*Anapaula Lopes*

Foto da capa

*Imagem: Nasa*

*Laranja: Orlando Sampaio Passos*

**1ª edição**

1ª impressão (2013): 700 exemplares

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

Embrapa Informação Tecnológica

Cultura dos citros / Almir Pinto da Cunha Sobrinho [et al.], editores técnicos. – Brasília, DF : Embrapa, 2013.

2 v. ; il. color. ; 18,5 cm x 25,5 cm.

v. 1 (399 p.)

ISBN 978-85-7035-251-4 v. 1

1. Citricultura. 2. Citogenética vegetal. 3. Melhoramento vegetal. 4. Fisiologia vegetal. I. Cunha Sobrinho, Almir Pinto da. II. Magalhães, Antônia Fonseca de Jesus. III. Souza, Antônio da Silva. IV. Passos, Orlando Sampaio. V. Soares Filho, Walter dos Santos. VI. Embrapa Mandioca e Fruticultura.

CDD 634.3

© Embrapa 2013

# Editores técnicos

## **Almir Pinto da Cunha Sobrinho**

Engenheiro-Agrônomo, mestre em Fitotecnia, pesquisador aposentado da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA  
apcsob@hotmail.com

## **Antônia Fonseca de Jesus Magalhães**

Engenheira-Agrônoma, pesquisadora aposentada da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA  
antoniafmagalhaes@yahoo.com.br

## **Antônio da Silva Souza**

Engenheiro-Agrônomo, doutor em Biotecnologia Vegetal, pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA  
antonio.silva-souza@embrapa.br

## **Orlando Sampaio Passos**

Engenheiro-Agrônomo, pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA  
orlando.passos@embrapa.br

## **Walter dos Santos Soares Filho**

Engenheiro-Agrônomo, doutor em Melhoramento Genético, pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA  
walter.soares@embrapa.br



# Autores

## **Adilson Kenji Kobayashi**

Biólogo, Ph.D. em Biotecnologia Vegetal, pesquisador da Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI  
adilson.kobayashi@embrapa.br

## **Almir Pinto da Cunha Sobrinho**

Engenheiro-Agrônomo, mestre em Fitotecnia, pesquisador aposentado da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA  
apcsob@hotmail.com

## **Antônio da Silva Souza**

Engenheiro-Agrônomo, doutor em Biotecnologia Vegetal, pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA  
antonio.silva-souza@embrapa.br

## **Beatriz Madalena Januzzi Mendes**

Engenheira-Agrônoma, doutor em Agronomia (Fitopatologia), pesquisadora do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP  
bmendes@cena.usp.br

## **Carlos Alberto da Silva Ledo**

Engenheiro-Agrônomo, doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA  
carlos.ledo@embrapa.br

## **Clóvis Oliveira de Almeida**

Engenheiro-Agrônomo, doutor em Ciências (Economia Aplicada), pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA  
clovis.almeida@embrapa.br

## **Eduardo Augusto Girardi**

Engenheiro-Agrônomo, doutor em Fitotecnia, pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA  
eduardo.girardi@embrapa.br

**Fernando César Akira Urbano Matsuura**

Engenheiro-Agrônomo, doutor em Tecnologia de Alimentos, pesquisador da Embrapa Transferência de Tecnologia/Escritório de Negócios de Campinas, Campinas, SP  
fernando.matsuura@embrapa.br

**Francisco de Assis Alves Mourão Filho**

Engenheiro-Agrônomo, Ph.D. em Ciências Hortícolas, professor do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP  
famourao@carpa.ciagri.usp.br

**Francisco Ricardo Ferreira**

Engenheiro-Agrônomo, doutor em Agronomia (Produção Vegetal), pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF  
francisco.ferreira@embrapa.br

**Hermes Peixoto Santos Filho**

Engenheiro-Agrônomo, mestre em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA  
hermes.santos@embrapa.br

**Izulmé Rita Imaculada Santos**

Bióloga, Ph.D. em Fisiologia do Estresse Vegetal, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF  
izulme.santos@embrapa.br

**Lucymeire Souza Morais Lino**

Engenheira-Agrônoma, doutor em Biotecnologia, Cruz das Almas, BA  
lsmorais@yahoo.com.br

**Manoel Teixeira de Castro Neto**

Engenheiro-Agrônomo, Ph.D. em Agronomia e Genética de Plantas, professor do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo Baiano, Cruz das Almas, BA  
manoeltc@ufrb.edu.br

**Marcelo Guerra**

Biólogo, Ph.D. em Botânica, professor do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE  
mguerra@npd.ufpe.br

**Marcos Pozzan**

Engenheiro-Agrônomo, especialista do Departamento de Desenvolvimento Técnico de Mercado na Área de Marketing da Syngenta Proteção de Cultivos, Indaiatuba, SP  
marcos.pozzan@syngenta.com

**Marília Ieda da Silveira Folegatti Matsuura**

Zootecnista, doutora em Tecnologia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP  
marilia.folegatti@embrapa.br

**Orlando Sampaio Passos**

Engenheiro-Agrônomo, pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA  
orlando.passos@embrapa.br

**Ranulfo Corrêa Caldas**

Engenheiro-Agrônomo, mestre em Agronomia (Estatística e Experimentação Agronômica), pesquisador aposentado da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA  
caldasranulfo@yahoo.com.br

**Roberto Pedroso de Oliveira**

Engenheiro-Agrônomo, doutor em Ciências, pesquisador da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS  
roberto.pedroso@embrapa.br

**Walter dos Santos Soares Filho**

Engenheiro-Agrônomo, doutor em Melhoramento Genético, pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA  
walter.soares@embrapa.br



# Apresentação

A história dos citros, no Brasil, teve início na Bahia e em São Paulo, onde jesuítas portugueses introduziram as primeiras sementes de laranja doce. Quatro séculos se passaram até que o País assumisse a liderança mundial na produção de citros. O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) revela que o valor total da produção brasileira de citros, compreendendo laranjas doces, tangerinas, limas ácidas e limões verdadeiros, atingiu, em 2010, a expressiva marca de R\$ 7,1 bilhões, ocupando o quinto lugar entre as principais cadeias produtivas do agronegócio brasileiro.

A sustentabilidade do agronegócio de citros depende, em grande parte, da adoção de tecnologias adequadas a essa finalidade, desenvolvidas à luz das reais necessidades nacionais, as quais apresentam forte relação com as particularidades de distintos ambientes de cultivo, distribuídos em todo o território nacional, compreendendo expressivas variações de condições de clima e solo.

É nesse contexto que a Embrapa Mandioca e Fruticultura oferece este livro, que reúne a experiência acumulada ao longo de décadas de estudos, conduzidos não só por pesquisadores da Embrapa, mas também por cientistas de outras instituições de pesquisa e ensino, contando, ainda, com a importante participação do setor privado.

A obra é dividida em dois volumes. O primeiro aborda aspectos básicos da cultura dos citros, que vão de sua origem, classificação botânica e distribuição geográfica, àqueles relacionados aos recursos e melhoramento genéticos, biotecnologia, fisiologia, propagação, processamento, experimentação agrícola, mercado e suas perspectivas. O segundo, a ser publicado, abordará temas de natureza prática, tais como planejamento de um pomar, manejo de solos e de pragas, nutrição e adubação, irrigação, indexação de doenças em mudas e produção integrada.

*Domingo Haroldo R. C. Reinhardt*

Chefe-Geral da Embrapa Mandioca e Fruticultura



# Sumário

Introdução .....	13
Capítulo 1 – Origem, classificação botânica e distribuição geográfica .....	15
Capítulo 2 – A citogenética de <i>Citrus</i> e gêneros próximos.....	25
Capítulo 3 – Recursos genéticos.....	47
Capítulo 4 – Melhoramento genético.....	61
Capítulo 5 – Cultura de tecidos .....	103
Capítulo 6 – Biologia molecular .....	161
Capítulo 7 – Fisiologia.....	173
Capítulo 8 – Fisiologia dos frutos e tratamento pós-colheita .....	195
Capítulo 9 – Cultivares porta-enxerto.....	233
Capítulo 10 – Cultivares copa .....	293
Capítulo 11 – Propagação .....	321
Capítulo 12 – Processamento .....	347
Capítulo 13 – Experimentação agrícola .....	371
Capítulo 14 – A citricultura brasileira: produção, mercado e perspectivas .....	391



# Introdução

As espécies de *Citrus* originaram-se em regiões tropicais e subtropicais da Ásia e do arquipélago Malaio ou Insulíndia, daí dispersando-se para outras partes do mundo, chegando às Américas no final do século 15.

A partir de seus centros de origem, os citros difundiram-se, passando a ser cultivados em todas as áreas tropicais e subtropicais favoráveis à cultura, numa ampla faixa geográfica compreendida entre as latitudes 40° nos hemisférios Norte e Sul. Em sua expansão por todos os continentes, à exceção da Antártida, a citricultura fomentou uma portentosa agroindústria, implantada em mais de sete milhões de hectares, distribuídos em uma centena de países.

Apesar da ampla capacidade de adaptação dos citros, as principais áreas produtoras localizam-se em regiões subtropicais, em latitudes superiores a 20°N e 20°S. Essa assertiva é corroborada com o que se observa no Brasil, onde mais de 80% da produção encontra-se acima da latitude 20° Sul.

A demanda mundial de suco de laranja, as condições ecológicas adequadas, da Amazônia ao Rio Grande do Sul, e a grande disponibilidade de área, muito superior à atualmente ocupada pela citricultura (próxima de 900 mil ha), foram determinantes para que o Brasil, a partir da década de 1980, assumisse a liderança mundial na produção de citros e exportação de suco de laranja.

Diferentemente do passado, em que a produção brasileira concentrou-se no Sudeste, a citricultura expandiu-se para outras regiões, como o Nordeste, Norte e Sul, tendo como base principal a agricultura familiar. Essa expansão parece ser estratégica neste momento, tendo em vista as ameaças de natureza fitossanitária por que vem passando a citricultura nacional, especialmente na região Sudeste. Nesse novo cenário, a atenção tem sido dirigida ao mercado interno, apesar da qualidade dos frutos in natura ainda deixar a desejar, especialmente no tocante à sua aparência externa nas regiões Norte e Nordeste. O Nordeste, com características tipicamente tropicais, assumiu uma honrosa segunda posição na produção brasileira de citros, com tendência de crescimento notadamente das espécies *C. latifolia* (limeira ácida 'Tahiti'), *C. limon* (limoeiro verdadeiro) e *C. paradisi* (pomeleiro), por ajustarem-se melhor às características climáticas dessa região, que, na realidade, são bastante diferenciadas, compreendendo condições úmidas a subúmidas, em áreas de Mata Atlântica, semiáridas, no sertão nordestino, além de locais de maior altitude, como na Chapada Diamantina, Estado da Bahia, onde o clima, ao contrário do que ocorre em zonas tipicamente tropicais, favorece o desenvolvimento de frutas cítricas de melhor qualidade, com ênfase naquelas tipo tangerina.

Este livro, que a Embrapa se propôs trazer a público, contém conhecimentos úteis à sustentabilidade da citricultura brasileira, abordando um diversificado leque de informações, desde aquelas de natureza básica, como as apresentadas em capítulos que versam sobre a citogenética, o melho-

ramento genético, a fisiologia, entre outros, até aquelas de cunho mais pragmático, a exemplo do conteúdo sobre propagação e variedades, copas e porta-enxertos. Independentemente do caráter dos capítulos, se mais relacionados a conhecimentos básicos ou aplicados, os autores convidados relataram suas experiências, alicerçadas por fontes correlatas de informações, e desenvolvidas ao longo de anos de pesquisa e observações.

# Origem, classificação botânica e distribuição geográfica

Orlando Sampaio Passos  
Walter dos Santos Soares Filho  
Almir Pinto da Cunha Sobrinho

## Introdução

A identificação e domesticação das espécies vegetais foi um dos primeiros passos do homem no seu processo de socialização. A curiosidade e a própria sobrevivência impunham-lhe a necessidade de buscar recursos fitogenéticos na natureza, sob a forma de grãos ou de frutos. Entre as espécies frutíferas, as plantas cítricas sobressaíram-se das demais pela imponência do porte, da fragrância das flores e do colorido dos frutos. A história da citricultura, mais do que a de outras fruteiras, é repleta de fatos e mitos. O mais famoso, envolvendo as espécies cítricas, foi provavelmente relacionado com Hércules, herói da mitologia clássica. Os gregos associaram as maçãs ou pomos de ouro, referindo-se à cidreira (*Citrus medica* L.), a um dos 12 trabalhos que ele teria de cumprir para ganhar a imortalidade (COOPER, 1982). A história conta que havia dois irmãos chamados Hésperus e Atlas, possuidores de bens na África Ocidental. Hésperus teve uma filha chamada Hésperis que se casou com o seu tio Atlas, e dessa união nasceram três filhas chamadas Hespérides, cujos nomes eram Aegle, Aretusa e Hesperetusa. As irmãs possuíam um jardim formoso conhecido como Jardim das Hespérides, que era ferozmente guardado por um dragão. A Hércules foi dada a difícil missão de sacrificar o dragão e conseguir as maçãs de ouro, cumprindo uma das 12 etapas para a sua imortalização. As cidras eram consideradas alimentos dos deuses, batizadas por maçãs em virtude da excelência da qualidade dos seus frutos. Há até os que a confundem com a “fruta de Eva” ou “a árvore da ciência do bem e do mal” (Gên. 2, 9.17), o que não condiz com a realidade, uma vez que ambas as espécies não existiam naquela época (ZARAGOZA, 1991).

Embora alguns autores não concordem, admite-se que a cidra esteja presente na Bíblia sob o nome de hadar. Moisés referiu-se à cidra quando assim se expressou: “No primeiro dia tomareis frutos da árvore ‘hadar’, folhas de palmeiras, ramos de árvores frondosas e de salgueiros da torrente; e alegrar-vos-ei diante do Vosso Deus” (Lev. 23, 40). Como os judeus costumam levar murta, salgueiro e ramos de palmeiras envolvendo frutos de cidra na Festa do Tabernáculo, é possível traduzir-se hadar por cidra. Essa foi, sem dúvida, a primeira espécie cítrica conhecida na Europa, no ano 300 a.C.,

de acordo com o filósofo grego Theophrastus (WEBBER et al., 1967). Esse, porém, não foi o primeiro contato dos gregos com essa espécie. Cinquenta anos antes, frutos foram importados da Pérsia (atual Irã) para Atenas, sendo conhecidos primeiramente como maçã do Irã. O termo *citrus* foi originado do grego *kedros*, traduzido inicialmente para cedrus (proveniente de cedro), que foi substituído por cidra, em razão da excelência dos seus frutos (ZIEGLER; WOLFE, 1961).

Os registros mais antigos sobre os citros procedem da China, onde parece existir o maior repositório genético de rutáceas em nível mundial. Os primórdios da citricultura estão nas regiões vizinhas ao rio Yangtze, ao Norte da China, consideradas como berço da civilização chinesa. Daí originaram-se as dinastias, cujos reis eram considerados como filhos do céu. A dinastia de Shang prevaleceu entre os séculos 16 e 11 a.C., sendo sucedida pela dinastia de Chou, que foi responsável pelo desenvolvimento da filosofia confucionista. De acordo com os próprios escritos de Confúcio, houve anteriormente a dinastia de Hsia (século 23 a.C.), sob o comando do primeiro imperador, Yu. O imperador dividiu o seu reinado em nove províncias, todas circundadas pelo rio Yangtze e ordenou que cada província instituisse peças de bronze decorativas mais representativas dos produtos regionais para exposição no Império. A Figura 1 retrata, na linguagem simbólica de Confúcio, a história do Tributo de Yu em relação à primeira descrição dos frutos chineses: Chu (tangerina) e Yu (toranja).

Estudos modernos confirmaram que o capítulo Tributo de Yu foi escrito por Confúcio na primeira metade do século 50 a.C. A época exata da ocorrência desses fatos é discutível, admitindo-se até que tudo não passou de lenda ou criação fantasiosa (COOPER, 1990).

A mais antiga região de cultivo do gênero *Citrus* L. é compreendida pelo Sudeste da China, Sul da Península Malaia e Oeste de Myanma, antiga Birmânia, havendo evidências de sua exploração no Sul da China há mais de 4.000 anos, daí dispersando-se em direção ao Sudeste, pelas Filipinas e numerosos grupos de ilhas do Pacífico (SPURLING, 1969). A origem das



Figura 1. Tributo de Yu.  
Fonte: Cooper (1990).

espécies cítricas está nas regiões subtropicais e tropicais da Ásia e do Arquipélago Malaio, tendo daí se dispersado para outras partes do mundo de tal forma que a sua “história seja lida como um romance” (WEBBER et al., 1967, p. 1). As espécies com frutos doces seriam originárias do Sudeste da China, enquanto as de frutos ácidos do Sul da Índia (ORIGIN..., 1988). Desconhecem-se, no entanto, com exatidão, os centros de origem desse gênero, dada à amplitude das áreas prováveis de suas ocorrências, que poderiam, a grosso modo, ter forma circular entre as latitudes de 10°S e 30°N e entre as longitudes de 80° e 130° a Leste de Greenwich, iniciando no Nordeste da Índia, indo ao Norte da China, passando pelas bordas do Himalaia e daí para Indonésia no sul e Filipinas no leste, incluindo nessa imensa área o Arquipélago Malaio, a Tailândia e Myanma (CHAPOT, 1975) (Figura 2), apresentando relações filogenéticas que se estendem pelas Índias Orientais, Austrália, Centro da China, Japão e mesmo África (SOOST; CAMERON, 1975; SOOST; ROOSE, 1996).



Figura 2. Centros de origem dos cítricos.  
Ilustração: Maria da Conceição Pereira Borba dos Santos

A existência de laranjeiras e tangerineiras silvestres (nativas) no Leste da Índia ensejou a teoria de que esse local poderia ser o centro de origem de muitas espécies cítricas (SINGH; CHADHA, 1993), o que corrobora com Tanaka (1954), que reconheceu a região, incluindo os vales do Himalaia, como detentora dos mais ricos centros de origem do subgênero *Archicitrus* e sugeriu uma linha separando o Leste Asiático da zona indu-malaia. A laranjeira doce, segundo o

seu próprio nome, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, presume-se ser originária da China (sul) e Indochina (península do Sudeste Asiático, composta por Myanma, Tailândia, Malásia peninsular, Laos, Camboja e Vietnã). A tangerineira (*C. reticulata* Blanco) teria tido a mesma origem, tendo posteriormente se dispersado para o Leste da Índia. A limeira ácida [*C. aurantiifolia* (Christm.) Swingle] e a toranjeira [*C. maxima* (Burm.) Merr.] seriam oriundas do Arquipélago Leste Indiano, tendo sido levadas para a Índia em épocas remotas. O limoeiro [*C. limon* (L.) Burm. f.] e o pomeleiro (*C. paradisi* Macfad.) têm os seus centros de origem indefinidos, e a cidreira, espécie cuja primeira menção data de 4.000 a.C., seria provavelmente originária do Sul da China e Índia (CHAPOT, 1975). Acredita-se que a ‘Satsuma’ (*C. unshiu* Marcow.), entre outros tipos de tangerineiras, tenha surgido nessa região. *Poncirus* (Rafinesque) e *Fortunella* (Swingle), gêneros estreitamente relacionados ao *Citrus*, são encontrados em uma terceira linha de progressão, que cruza o sul do centro da China, em direção leste-oeste (SOOST; CAMERON, 1975; SOOST; ROOSE, 1996). Reportando-se a outros gêneros filogeneticamente também próximos de *Citrus*, tem-se que *Eremocitrus* (Swingle) e *Microcitrus* (Swingle) são encontrados sob forma selvagem quase que exclusivamente na Austrália, enquanto que *Clymenia* (Swingle) ocorre no Norte de Nova Irlanda, Arquipélago de Bismark, Nordeste de Nova Guiné, representado por uma única espécie conhecida como ‘Namatanai’ [*Clymenia polyandra* (Tan.) Swingle], conforme Swingle (1967).

Estudos relativamente recentes, realizados por Gmitter Junior e Hu (1990), apontam a província chinesa de Yunnan e áreas adjacentes do Sul da China e Norte da Indochina como parte do centro de origem de diversas espécies de *Citrus*, incluindo *C. grandis* Osbeck, *C. medica*, *C. reticulata*, *C. sinensis*, *C. limonia* Osbeck, *C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka, *C. ichangensis* Swingle, *C. hystrix* DC., *C. junos* Siebold ex Tanaka, *C. hongheensis* Y. M. Ye et al., bem como uma nova espécie de *Poncirus*, denominada *P. polyandra* S. Q. Ding et al. Os referidos autores destacam que Yunnan é reconhecida por compreender mais da metade do número de espécies de plantas superiores nativas da China, sendo privilegiada pela presença de numerosos rios, que devem ter atuado como importantes mecanismos naturais de dispersão de plantas cultivadas.

## Classificação botânica

O gênero *Citrus* (Linnaeus) pertence à divisão Magnoliophyta, subdivisão Magnoliophytina, classe Magnoliopsida, subclasse Rosidae, ordem Sapindales (CRONQUIST, 1988), subordem Geranineeae, família Rutaceae, subfamília Aurantioideae, tribo Citreae, subtribo Citrineae, sendo estreitamente relacionado aos demais gêneros de sua subtribo, a saber: *Severinia* Ten. ex Endl., *Pleiospermium* [(Engl.) Swingle], *Burkillanthus* (Swingle), *Limnocitrus* (Swingle) e *Hesperetusa* (Roem.), que são mais primitivos; *Citropsis* [(Engl.) Swingle & M. Kell.] e *Atalantia* (Corrêa), mais evoluídos do que os anteriores; *Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus*, *Eremocitrus* e *Clymenia*, constituindo estes últimos, juntamente com *Citrus*, o grupo dos cítricos verdadeiros, por produzirem frutos semelhantes à laranja ou ao limão (ORTIZ MARCIDE, 1985; SWINGLE, 1967).

A classificação das espécies de *Citrus* é muito controversa. Dentre os sistemas taxonômicos utilizados, dois destacam-se como principais: o de Walter Tennyson Swingle, publicado em 1943, e o de Tyôzaburô Tanaka, editado em 1954 e ampliado em 1969 e em 1977. O primeiro considera 16 espécies, enquanto o último propõe um total de 162 (GIACOMETTI, 1973; SOOST; ROOSE, 1996).

O sistema de Swingle constitui uma tentativa de classificação voltada para o conceito biológico de espécies, fundamentando-se na análise de inúmeras variações observadas em híbridos, o que levou o autor à rejeição de diversas espécies estabelecidas antes de seu sistema, por considerá-las como híbridos. A classificação apresentada por Tanaka, a seu turno, baseia-se em características morfológicas, com ênfase naquelas relativas ao cálice, vesículas da polpa, sementes e células da casca das frutas (GIACOMETTI, 1973). Reece (1969) defende a posição de Swingle, afirmando que a existência de formas distintas, ou de fácil reconhecimento, não deve ser entendida como uma razão adequada na indicação de espécies, lembrando que a situação encontrada em *Citrus* é, de certo modo, semelhante ao que se verifica com o cão (*Canis domesticus*), reportando-se a comentários feitos por Dobzanski, que diz que quanto maior o período de domesticação de uma espécie, mais numerosas e diversificadas serão suas formas ou raças

Hodgson (1961), por sua vez, propôs um sistema de classificação taxonômica intermediário, no qual aceita as 16 espécies admitidas por Swingle, acrescidas de 20 espécies dentre aquelas consideradas por Tanaka. Cabe acrescentar que estudos taxonômicos realizados entre meados da década de 1970 e meados da década de 1980 indicam como espécies biológicas básicas *C. medica*, *C. reticulata* e *C. grandis* (SOOST; ROOSE, 1996).

Stebbins (1969) cita que a possibilidade de produção de híbridos, parcial ou totalmente férteis, entre populações com notáveis diferenças quanto à sua aparência externa, a exemplo do que se observa com os gêneros *Citrus*, *Poncirus* e *Fortunella*, bem como a habilidade apresentada por certas espécies e por muitos híbridos estéreis de se propagarem assexuadamente por sementes (embrionia nucelar), dificulta sobremodo a classificação das espécies de *Citrus*. Além disso, esse gênero apresenta um espectro de relações ecológicas e espaciais visto somente entre os mais antigos e difundidos grupos de plantas cultivadas, pela existência simultânea de formas selvagens, indivíduos semicultivados e de clones que sofreram um intenso processo de seleção.

No Sudeste da Ásia, região em que o *Citrus* é nativo, séculos de cultivo implicaram, provavelmente, na completa destruição dos habitats ocupados por determinadas espécies ancestrais, determinando somente a sobrevivência de genótipos adaptados a habitats fortemente modificados. Fica evidente, portanto, que a avaliação dos efeitos combinados da hibridação, a reprodução assexuada, o cultivo e as perturbações de habitats exigem um grande esforço no tocante à compreensão do padrão de variação evolutivo, genético e morfológico do gênero *Citrus*.

## Distribuição geográfica

Dada à sua adaptação a condições tropicais e subtropicais, a cultura das espécies cítricas espalhou-se pelo mundo, constituindo uma das atividades agrícolas de maior relevância, destacando-se, entre as espécies frutíferas, como as mais importantes, somente superadas pela cultura da banana, também considerando os plátanos, variedades que são consumidas fritas, cozidas ou assadas (FAO, 2010). A dispersão dos citros, a partir de seus centros de origem, deu-se de forma lenta e gradual.

A cidra foi a primeira fruta cítrica a ganhar maior evidência em termos de distribuição geográfica. Na Pérsia, atual Irã, há relatos de que cientistas que acompanhavam Alexandre, o Grande, em sua conquista da Ásia (cerca de 330 a.C.) já se utilizavam dessa espécie (CHAPOT, 1975), sendo seu cultivo descrito pelo escritor grego Theophrastus em torno de 300 a.C. (WEBBER et al., 1967), conforme já mencionado. Estudiosos admitem que os judeus conheceram a cidra durante os anos de escravidão na Babilônia (586–539 a.C.), supondo-se que seu estabelecimento na Mesopotâmia, situada no Oriente Médio, Península Arábica, em área entre os rios Tigre e Eufrates, hoje pertencente ao Iraque e à Arábia Saudita, tenha ocorrido em época posterior a esse período (CHAPOT, 1975). Introduzida na Bacia do Mediterrâneo em torno de 300 a.C., estendeu-se por toda essa região durante o Império Romano (GONZALEZ-SICILIA, 1969).

Dos centros de origem no continente asiático até o Novo Mundo, os citros descrevem uma rota repleta de memoráveis acontecimentos desde o Império Chinês a uma atividade agroindustrial implantada em área superior a 5 milhões de hectares, orientada por tecnologias geradas no século 20 e constituindo um dos negócios agrícolas mais expressivos. Fora do habitat original, as plantas cítricas encontraram condições mais favoráveis na faixa subtropical, mas é na faixa tropical que se verifica a maior evolução da cultura. A laranja doce, originada no Sudeste Asiático, foi introduzida na Índia no início da Era Cristã. As primeiras referências sobre a laranja doce procedem da China, sendo a mais antiga contida no livro *Yu Kung*, alusivo ao imperador Ta Yu, que reinou entre 2205 e 2197 a.C. Da China para a Índia, a laranja doce foi provavelmente transportada pelo Arquipélago Malaio, principal rota entre esses países. Com as invasões bárbaras, entre 350 e 400 d.C., registrando-se o fim do Império Romano, a difusão dos citros passou a ser influenciada pelos árabes (WEBBER et al., 1967), que no século 10 introduziram a laranja 'Azeda' (*C. aurantium* L.) no Leste do Mediterrâneo, e, mais tarde, na África e no Sul da Europa, havendo evidências de que o limoeiro verdadeiro (*C. limon*), a limeira e a toranja foram dispersadas de forma semelhante durante a primeira metade do século 12 (SOOST; CAMERON, 1975; SOOST; ROOSE, 1996).

Após o domínio árabe, a distribuição das frutas cítricas, pelo continente europeu, contou com a ação das Cruzadas, cujo início remonta a princípios do século 11 (WEBBER et al., 1967). Os árabes introduziram a laranja 'Azeda', o limoeiro verdadeiro e, provavelmente, a laranja doce na Palestina, no Egito, no Sul da Europa e no litoral Leste da África entre os séculos 12 e 15. Há, porém, evidência sobre a existência da laranja doce na Itália e Espanha durante a Era Cristã (330 d.C.). A laranja

doce foi introduzida da Índia para Omar (Arábia) e de lá para o Iraque, Síria e, pelo Golfo Pérsico, para o Norte da África e Espanha. Embora seja reconhecida uma introdução na Europa feita por marinheiros genoveses, em torno de 1425 d.C., aos portugueses é creditada a introdução das melhores variedades de laranja doce da China, em 1520. Esse foi o primeiro passo daquela que se tornou a mais importante e mais difundida cultura frutífera em todo o mundo. Sua história está envolvida em muitos importantes acontecimentos das civilizações oriental e europeia. Esteve associada com mudanças históricas ocorridas na região do Mediterrâneo, no Oeste da Ásia, no Vale do Rio Nilo e na Europa. As primeiras comunicações entre China e Índia, as expedições de Alexandre, o Grande, os primeiros dias de Pompeia, as Cruzadas, famosas pinturas italianas e páginas literárias de Portugal, foram capítulos da história antiga nos quais os citros estiveram relacionados (WEBBER et al., 1967).

Na África do Sul, plantas cítricas foram introduzidas em 1654, na Cidade do Cabo, a partir da Ilha de Santa Helena, ponto de parada de navegadores em deslocamentos entre a Europa e a Índia, de onde essas primeiras plantas cítricas devem ter sido obtidas. Relativamente à Austrália, as primeiras introduções ocorreram em 1788, graças à iniciativa de colonos ingleses que se deslocavam para New South Wales, os quais, em passagem pelo Rio de Janeiro, obtiveram sementes de laranja, lima e limão (WEBBER et al., 1967). Nas Américas, os citros eram desconhecidos até a chegada de Colombo, que por ocasião de sua segunda viagem ao Novo Mundo, em 1493, trouxe para o Haiti sementes de laranjas doces, limões e cidras provenientes da Ilha de Gomera, pertencente ao grupo das Canárias. Introduções posteriores foram realizadas por portugueses e espanhóis em princípios do século 16, atingindo o continente americano possivelmente a partir do Panamá, em 1509, e posteriormente o México, em 1518 (CHAPOT, 1975; SOOST; CAMERON, 1975; SOOST; ROOSE, 1996; WEBBER et al., 1967). Os portugueses introduziram a laranja doce nas ilhas da Madeira e Canárias e outras colônias do Atlântico Leste. Cristovão Colombo, em 1493, trouxe sementes das Ilhas Canárias para o Haiti, e, mais tarde, em 1518, a laranja doce foi difundida na América Central e América do Norte (WEBBER et al., 1967). Essa foi a primeira introdução dessa espécie no Novo Mundo. Na América do Sul, especificamente no Brasil, a laranja doce foi introduzida pelos portugueses por volta de 1530, havendo relatos da existência de espécies cítricas na Ilha de Cananeia, em São Paulo (HASSE, 1987) e na Bahia, em 1549 (ANDRADE, 1933) (Figura 3).

Atualmente, os citros são cultivados de forma generalizada em todas as áreas tropicais e subtropicais favoráveis à cultura, ocupando uma ampla faixa geográfica, sendo que no Mediterrâneo, em virtude das condições climáticas excepcionais, sua exploração dá-se em locais com até 42°N (SOOST; CAMERON, 1975; SOOST; ROOSE, 1996). As principais áreas comerciais, entretanto, encontram-se em regiões subtropicais, em latitudes superiores a 20°N e 20°S (SOOST; CAMERON, 1975; SOOST; ROOSE, 1996). Na trajetória dos citros, desde o continente asiático até o continente americano, criou-se uma atividade agroindustrial expressiva, com produção de mais de 111 milhões de toneladas em área superior a 7 milhões de hectares, em mais de 100 países (FAO, 2010), distribuídos na faixa compreendida entre as latitudes 40° nos hemisférios Norte e Sul em todos os continentes, conforme mapa apresentado a seguir (Figura 4).



Figura 3. Centros de origem dos citros e prováveis rotas de dispersão.  
Ilustração: Maria da Conceição Pereira Borba dos Santos.

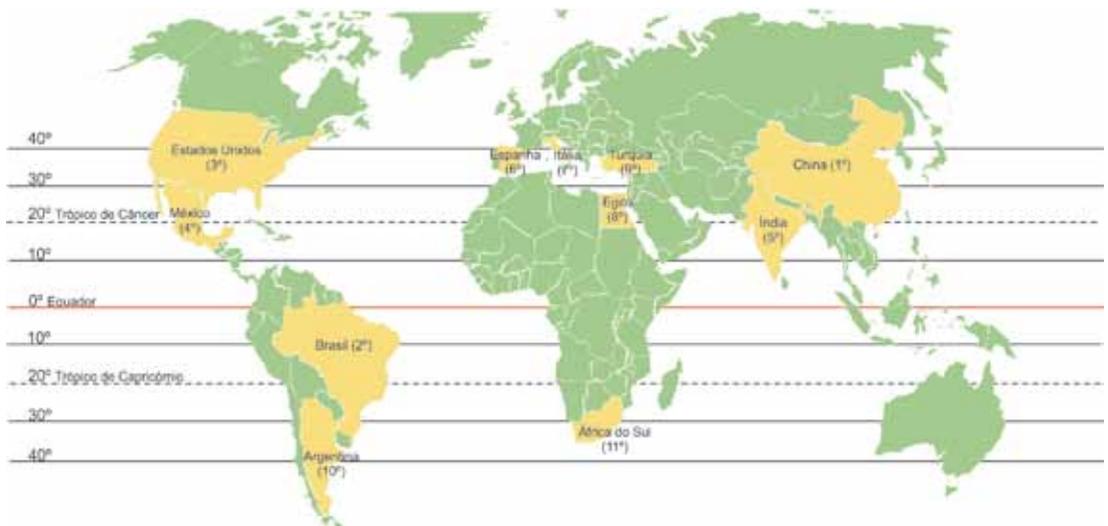


Figura 4. Distribuição de citros no mundo – principais países produtores.  
Ilustração: Maria da Conceição Pereira Borba dos Santos

# Referências

- ANDRADE, E. N. **Manual de citricultura**: cultura e estatística. São Paulo: Chácaras e Quintais, 1933. 198 p.
- CHAPOT, H. The citrus plant. In: HÄFLIGER, E. (Ed.). **Citrus**. Basle: Ciba-Geigy, 1975. p. 6-13.
- COOPER, W. C. **In search of the golden apple**: na adventure in Citrus science and travel. New York: Vantage, 1982. 291 p.
- COOPER, W. C. **Odyssey of the orange in China**: natural history of the *Citrus* fruits in China. Lake Alfred: E. O. Painter, 1990. 122 p.
- CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. New York: The New York Botanical Garden Press, 1988. 556 p.
- FAO. Food and Agriculture Organization. **Faostat**. 2010. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>>. Acesso em: 4 maio 2012.
- GIACOMETTI, D. C. Sistema taxonômico dos *Citrus* de Tanaka. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2., 1973, Viçosa. **Anais...** Viçosa: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1973. v. 2, p. 585-599.
- GMITTER JUNIOR, F. G.; HU, X. The possible role of Yunnan, China, in the origin of contemporary *Citrus* species (Rutaceae). **Economy Botany**, New York, v. 44, n. 2, p. 267-277, 1990.
- GONZALEZ-SICILIA, E. Citrus in the Mediterranean basin. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1968, Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1969. v. 1, p. 121-134.
- HASSE, G. **A laranja no Brasil 1500-1987**. São Paulo: Duprat & Iobe Propaganda, 1987. 295 p.
- HODGSON, R. W. Taxonomy and nomenclature in citrus. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 2., 1960, Lake Alfred. **Proceedings...** Gainesville: University of Florida, 1961. p. 1-7.
- ORIGIN of Citrus. Nelspruit: Institute for Tropical and Subtropical Crops, 1988.
- ORTIZ MARCIDE, J. M. Nomenclatura botánica de los cítricos. **Levante Agrícola**, Valencia, n. 71, p. 259-260, 1985.
- REECE, P. C. Classification of *Citrus*. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1968, Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1969. v. 1, p. 429-434.
- SINGH, H. P.; CHADHA, K. L. Genetic resources of *Citrus*. In: CHADHA, K. L.; PAREEK, O. P. (Ed.). **Advances in horticulture**. New Delhi, IN: Malhotra, 1993. p. 110-121.
- SOOST, R. K.; CAMERON, J. W. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J. N. (Ed.). **Advances in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1975. p. 507-540.
- SOOST, R. K.; ROOSE, M. L. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J. N. (Ed.). **Fruit breeding: tree and tropical fruits**. New York: John Wiley, 1996. v. 1, p. 257-323.
- SPURLING, M. B. Citrus in the Pacific area. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1968, Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1969. v. 1, p. 93-101.
- STEBBINS, G. L. The effect of asexual reproduction on higher plant genera with special reference to *Citrus*. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1968, Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1969. v. 1, p. 455-458.
- SWINGLE, W. T. The botany of *Citrus* and its relatives. In: REUTHER, W.; WEBBER, H. J.; BATCHELOR, L. D. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1967. v. 1, p. 190-430.
- TANAKA, T. **Species problems in Citrus**. Tokyo, JP: Japanese Society for the Promotion of Science, 1954. 152 p.
- WEBBER, H. J.; REUTHER, W.; LAWTON, H. W. History and development of the citrus industry. In: REUTHER, W.; WEBBER, H. J.; BATCHELOR, L. D. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1967. v. 1, p. 1-39.
- ZARAGOZA, S. Historia de la naranja: antecedentes históricos 21-40. In: ABAD, V.; CORTÉS, J. M.; ZARAGOZA, S. (Ed.). **Historia de la naranja**. Valencia: Prensa Valenciana, 1991. p. 20-40.
- ZIEGLER, L. W.; WOLFE, H. S. **Citrus growing in Florida**. Gainesville: University of Florida Press, 1961. 248 p.



# A citogenética de *Citrus* e gêneros próximos

Marcelo Guerra

## Introdução

Nos últimos 30 anos tem sido feito um grande esforço para caracterizar os germoplasmas de plantas cultivadas e de seus parentes silvestres por meio de marcadores genéticos, isto é, com base em características genéticas que possam ser rapidamente reconhecidas em plantas muito jovens e em híbridos interespecíficos. Vários tipos de marcadores foram desenvolvidos, destacando-se os marcadores isoenzimáticos e moleculares, ambos amplamente utilizados em *Citrus* L. (MOORE, 2001). O objetivo, nesses casos, é estabelecer um tipo de etiqueta genética que permita reconhecer inconfundivelmente cada germoplasma. Para isso, os marcadores moleculares apresentam a vantagem de possibilitar a obtenção de um grande número de marcas para cada genótipo, além de serem características que independem da idade ou das condições ambientais do indivíduo analisado.

Outro tipo de caracterização genética para distinguir cultivares e espécies próximas são os marcadores cromossômicos. Esse tipo de marcador tem sido mais empregado em algumas gramíneas, como milho (*Zea mays* L.) e trigo (*Triticum aestivum* L.), embora seu uso tenha se expandido para diversas espécies (PUERTAS; NARANJO, 2005). Uma das vantagens dos marcadores cromossômicos é que, à semelhança dos marcadores moleculares, as características citogenéticas dizem respeito ao próprio material genético e não dependem da expressão do genoma, como ocorre com os marcadores morfológicos e isoenzimáticos. Além disso, a análise do conjunto cromossômico oferece uma visão global do genoma ao nível citológico, isto é, não investiga apenas um determinado conjunto de genes ou de fragmentos de DNA, mas, de uma maneira mais macroscópica, todo o material genético contido no núcleo. Dessa forma, a análise cromossômica produz informações sobre o genoma que não podem ser percebidas por outras técnicas, como, por exemplo, o comportamento meiótico, que se reflete diretamente na fertilidade, e as alterações cromossômicas numéricas ou estruturais, especialmente frequentes em híbridos e em plantas obtidas via cultura de tecidos ou fusão de protoplastos (FLUMINHAN et al., 1996; IWAMASA; NITO, 1988). Por outro lado, essa visão macroscópica do genoma dificulta ou impede que pequenas alterações no filamento de DNA sejam detectadas. Com a introdução de técnicas citogenéticas mais refinadas, a observação cromossômica tornou-se muito mais detalhada, aproximando a citogenética clássica da genômica.

Entre as plantas cultivadas no Brasil, destacam-se algumas espécies estudadas por nosso grupo, como as diversas espécies de mandioca (*Manihot* Mill.) (CARVALHO; GUERRA, 2002), maracujá (*Passiflora* L.) (MELO; GUERRA, 2003), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) e espécies relacionadas (BRASILEIRO-VIDAL et al., 2009), cacau (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçu [*T. grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum.] (DANTAS; GUERRA, 2010), as forrageiras do gênero *Paspalum* L. (VAIO et al., 2005), as espécies de feijão [*Vigna unguiculata* (L.) Walp., *Phaseolus coccineus* L., *P. vulgaris* L.], (FONSÊCA et al., 2010; GUERRA et al., 1996; PEDROSA-HARAND et al., 2006) e os citros. A contribuição da citogenética em diversos outros grupos de plantas cultivadas encontra-se revisada em Gupta e Tsuchiya (1991), Puertas e Naranjo (2005, 2008), Sybenga (1993) e Tsuchiya e Gupta (1991).

## Caracterização citogenética de plantas

Todas as espécies são inicialmente caracterizadas pelo número de cromossomos, acrescentando-se às vezes dados sobre tamanho e morfologia dos cromossomos. Essas análises são geralmente baseadas em dados obtidos com técnicas mais simples, chamadas de técnicas de coloração convencional, que coram os cromossomos uniformemente (CARVALHO; GUERRA, 2002; GUERRA et al., 1997).

Duas outras técnicas foram fundamentais para a caracterização cromossômica de espécies próximas ou cultivares: o bandeamento cromossômico e a hibridização in situ. As técnicas de bandeamento permitem corar diferencialmente regiões cromossômicas formadas por segmentos de DNA repetidos centenas ou milhares de vezes em tandem (um em seguida ao outro), constituindo os chamados blocos ou bandas de heterocromatina. A observação das bandas é feita geralmente por meio de duas técnicas principais: o bandeamento C, que revela geralmente toda a heterocromatina do genoma, e a coloração com determinados fluorocromos que se ligam preferencialmente a regiões do cromossomo ricas em citosina e guanina (GC) ou adenina e timina (AT). Entre esses fluorocromos, os mais extensamente utilizados são a cromomicina A<sub>3</sub> (CMA), que revela regiões ricas em GC, e o 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI), para regiões ricas em AT (GUERRA, 2000). A coloração com CMA é particularmente útil na análise de bandas heterocromáticas em espécies cítricas, cuja heterocromatina é, principalmente, rica em GC.

A técnica de hibridização in situ permite localizar um determinado gene ou fragmento de DNA no complemento cromossômico. Para isso, é necessário, primeiramente, isolar esse fragmento de DNA e marcá-lo com uma molécula de fácil detecção, como a biotina, por exemplo. O fragmento marcado, chamado de sonda, pode ser hibridizado in situ, isto é, no sítio ou local do cromossomo onde essa sequência encontra-se presente. Com o uso de anticorpos ligados a corantes fluorescentes, como a antibiotina ligada à rodamina, é possível visualizar em qual ou quais cromossomos localiza-se o DNA hibridizado. Um ponto crítico nessa análise é a extensão da sequência de DNA que se quer localizar no cromossomo – quanto maior a sequência mais fácil será sua localização. Para uma descrição detalhada dessa técnica, ver Guerra (2004).

Tanto os blocos de heterocromatina quanto os sítios visualizados por hibridização *in situ* permitem revelar parte da estrutura dos cromossomos, possibilitando caracterizar mais precisamente cada genoma. A técnica de hibridização *in situ* permite, também, analisar híbridos interespecíficos, corando diferencialmente os genomas das espécies envolvidas em sua formação. Nesse caso, a técnica é denominada de *Genomic In Situ Hybridization* (GISH). Com isso, pode-se visualizar, por exemplo, nos experimentos que envolvem vários retrocruzamentos em espécies distintas, quais os cromossomos ou fragmentos de cromossomos de cada espécie presentes no híbrido (BRASILEIRO-VIDAL; GUERRA, 2002). Todas essas técnicas serão discutidas mais adiante particularmente em relação a *Citrus*.

## A citogenética de *Citrus*

### Número e morfologia dos cromossomos

A análise cromossômica das espécies de *Citrus* foi inicialmente desestimulada em razão do pequeno tamanho dos cromossomos e da similaridade cromossômica dentro de cada cariótipo e entre cariótipos de espécies diferentes. O tamanho do genoma de laranja doce [*C. sinensis* (L.) Osbeck] foi inicialmente estimado em 0,62 pg de DNA por núcleo haploide, utilizando-se citodensitometria com coloração Feulgen (GUERRA, 1984). Isso significa que esse genoma é quase 30 vezes menor que o de trigo ou cebola (*Allium cepa* L.). Valores semelhantes foram encontrados em espécies de outros gêneros próximos a *Citrus*, como *Murraya paniculata* (L.) Jack, com  $1C = 0,5$  pg (GUERRA, 1984), *M. koenigii* (L.) Spreng. e *Atalantia monophylla* (L.) DC., com  $1C = 0,65$  e  $0,58$  pg, respectivamente (OHRI; KUMAR, 1986). Ollitrault e Michaux-Ferrière (1994), contudo, analisaram várias espécies de *Citrus* por citometria de fluxo e encontraram valores mais altos ( $1C = 0,8 - 1,0$  pg), o que provavelmente se deve às diferentes técnicas empregadas.

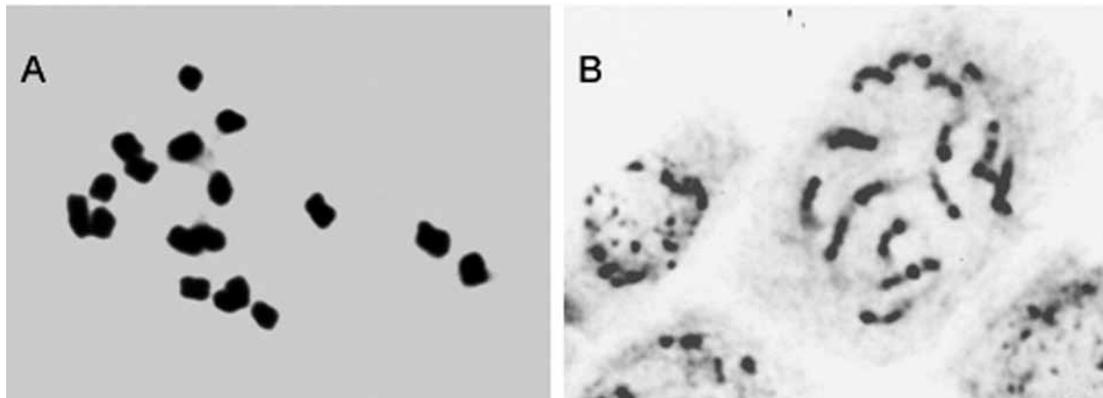
Os primeiros relatos sobre o número cromossômico de espécies de *Citrus*, realizados no início do século passado, registraram  $n = 8$  e  $2n = 14$  ou  $16$  (FROST, 1925a). Numerosos trabalhos posteriores, no entanto, demonstraram que o número cromossômico em todas as espécies do gênero é  $n = 9$ , em meiose, ou  $2n = 18$ , em células somáticas (STACE et al., 1993). Outros números cromossômicos (haploides, aneuploides e poliploides) têm sido observados exclusivamente em condições de cultivo (BACCHI; KRUG, 1943; BARRETT; HUTCHINSON, 1978; IWAMASA; NITO, 1988; MIRANDA et al., 1997b). Frost (1925b), que primeiro contou corretamente os cromossomos de algumas espécies de *Citrus*, atribuiu o erro dos trabalhos iniciais ao pequeno tamanho dos cromossomos e à técnica de coloração utilizada. Igualmente, a grande variação no número de cromossomos de cada espécie, reportada por Sharma e Bal (1957), deve-se certamente à inadequação da técnica citológica empregada.

A morfologia dos cromossomos das espécies de *Citrus* é ligeiramente variável, com a maioria dos cromossomos sendo metacêntricos ou submetacêntricos e uns poucos acrocêntri-

cos (Figura 1A). Agarwal (1987a), por exemplo, observou que os cromossomos de *C. tamurana* hort. ex Tanaka eram todos meta a submetacêntricos e variavam de 1,88  $\mu$ m a 2,73  $\mu$ m de comprimento. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores para outras espécies e gêneros relacionados a *Citrus* (BEFU et al., 2001; GUERRA, 1993; MIRANDA et al., 1997a; SHARMA; BAL, 1957), muitos dos quais apresentaram idiogramas representando a morfologia dos cromossomos dessas espécies. Em razão da similaridade de forma e da variação causada pelo grau de condensação dos cromossomos, não é possível, entretanto, caracterizar citologicamente as espécies de *Citrus* utilizando apenas esses parâmetros.

A presença de blocos de heterocromatina terminais, fortemente condensados e relativamente grandes, pode causar a impressão de que existem numerosas constrições primárias e secundárias em cromossomos profásicos – o que explica o grande número de constrições secundárias registrado por Sharma e Bal (1957) em várias espécies de *Citrus* (GUERRA, 1985). A Figura 1B mostra cromossomos profásicos característicos das espécies de *Citrus*, corados convencionalmente com Giemsa. Observa-se que, além da região proximal, que geralmente condensa precocemente na prófase, ocorrem diversos blocos heteropicnóticos terminais.

Fotos: Marcelo Guerra



**Figura 1.** Cromossomos de espécies de *Citrus* corados convencionalmente com Giemsa. A) Metáfase de *C. depressa* Hayata mostrando a pequena variação de tamanho e morfologia cromossômica; B) prófase de *C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., destacando-se a presença de diversos blocos heteropicnóticos.

A estabilidade do cariótipo convencional foi demonstrada em um estudo comparado de 51 acessos do banco ativo de germoplasma de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, incluindo 20 espécies de *Citrus*, além de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. e sete híbridos artificiais (GUERRA et al., 1997). Nesse trabalho, não foi encontrada nenhuma variação cariotípica numérica ou morfológica evidente, exceto no número e na posição das constrições secundárias. Cada acesso apresentou um a três cromossomos com constrições secundárias na posição proximal ou terminal-subterminal.

Entre os acessos investigados, *C. sinensis*, *C. depressa* Hayata e *C. longispina* Wester, destacaram-se como as únicas espécies com três constrições secundárias proximais. Análise detalhada de 252 células de *C. sinensis* (PEDROSA et al., 1997) confirmou a ocorrência de apenas três constrições nessa espécie, sendo que na maioria das células apenas duas constrições foram ativadas (uma proximal, localizada em um cromossomo maior, e uma subterminal, localizada em um cromossomo menor). A terceira constrição (também proximal) teve sua ativação fortemente restrita pela ativação de sua homóloga.

## Análise meiótica

Diversos autores têm reportado várias alterações cromossômicas, principalmente pontes anafásicas e univalentes, em células meióticas de anteras de *Citrus* (MOSCOSO; SHAMBULINGAPPA, 1972; NAITHANI; RAGHUVANSHI, 1958a, 1958b, 1963; RAGHUVANSHI, 1962a, 1962b; SELLITO-BOAVENTURA; PIO, 1989). Essas alterações foram atribuídas à heterozigosidade estrutural cromossômica para inversões e translocações, que poderia estar relacionada à aparente origem híbrida de algumas espécies de *Citrus* (BARRETT; RHODES, 1976). Em outras análises a meiose, contudo, parece normal ou com alterações esporádicas e não significativas (BANERJI, 1954; CORNÉLIO, 1994; OPPENHEIM; FRANKEL, 1929). Agarwal (1987b, 1987c) analisou a meiose de três espécies (*C. jambhiri* Lush., *C. limonia* Osbeck e *C. karna* Raf.), um híbrido artificial (*C. paradisi* Macfad. x *C. sinensis*) e três híbridos intergenéricos com *P. trifoliata*, e encontrou alterações meióticas apenas em *C. limonia*. Cavalcante et al. (2000) analisaram o comportamento meiótico de 70 plantas de tangerineira 'Lee' (um híbrido de *C. clementina* hort. ex Tanaka com *C. paradisi* x *C. tangerina* hort. ex Tanaka) e concluíram que apenas 11 dessas tinham alguma alteração meiótica.

Raghuvanshi (1962b), baseado na análise de 25 cultivares e espécies, a maioria das quais apresentando alterações meióticas, concluiu que a evolução do gênero *Citrus* teria se dado basicamente por alterações estruturais cromossômicas associadas a hibridizações interespecíficas. Contudo, nem sempre alterações meióticas são em virtude de mudanças estruturais, podem também ser promovidas por genes que controlam o curso normal da meiose (MERCIER; GRELON, 2008). Por exemplo, a ocorrência de univalentes em uma variedade sem sementes de *C. reticulata* Blanco pareceu ser devida à presença de alelos recessivos em um único gene, que controla o pareamento entre cromossomos homólogos (VARDI; SPIEGEL-ROY, 1981). Por outro lado, Cornélio (1994) mostrou que cromossomos com padrões de bandas bem diferentes podem parear regularmente (GUERRA, 2009).

## Poliploidia e haploidia

Frost (1925a) foi o primeiro a demonstrar a ocorrência espontânea de *seedlings* poliploides em frequência relativamente alta em cultivo (cerca de 2,5%), posteriormente confirmada por diversos autores. Apesar de a maioria das espécies de plantas cultivadas ser poliploide, os *Citrus* poliploides

raramente são mais produtivos que os diploides, embora tenham a vantagem de apresentar baixa produção de sementes (CAMERON; BURNETT, 1978). O poliploide mais conhecido é a limeira ácida ‘Tahiti’ [*C. latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka], um triploide surgido espontaneamente no qual a meiose é quase completamente suprimida resultando em raríssimas sementes (BACCHI; KRUG, 1943). Embora tenha sido tratada como uma espécie por Tanaka, essa cultivar é incapaz de se reproduzir eficientemente na natureza.

Em *Citrus*, são também conhecidos alguns haploides (YAMAMOTO; TOMINAGA, 2004a). Plantas haploides podem surgir espontaneamente ou podem ser produzidas por meio de cultura de anteras, de micrósporos ou por polinização com pólen triploide (SYBENGA, 1993). Os haploides são muito importantes para a obtenção de linhagens monossômicas (por cruzamento com plantas diploides), visando ao mapeamento gênico, à construção de bibliotecas específicas de determinados cromossomos, à análise da expressão gênica, etc. (CHANG; JONG, 2005). Podem também ser utilizados para obter plantas inteiramente homocigotas por meio da duplicação de seu complemento cromossômico e produção de indivíduos duplo-haploides (YAMAMOTO; TOMINAGA, 2004b). Análises dos padrões de bandas heterocromáticas de plantas haploides, duplo-haploides, triploides e tetraploides de *Citrus* foram realizadas por Yamamoto e Tominaga (2004a, 2004b) e Yang et al. (2002). Todos os poliploides mostraram padrões de bandas complexos e muito variáveis. O único haploide analisado (*C. clementina*) apresentou um padrão de bandas (1B + 1C + 4D + 3F) compatível com uma metade do complemento diploide dessa espécie (1B + 1C + 11D + 5F) (CORNÉLIO et al., 2003).

## Origem dos poliploides

Em *Citrus*, sementes poliploides podem surgir devido à formação de gametas femininos não reduzidos, gerando embriões zigóticos poliploides (ESEN; SOOST, 1971), ou por duplicações espontâneas do conjunto cromossômico de células somáticas, resultando na formação de embriões nucelares e zigóticos poliploides (BARRETT; HUTCHINSON, 1978). Em toranjeira [*C. maxima* (Burm.) Merr.], foi possível demonstrar, por meio de bandeamento cromossômico, que o gameta não reduzido que gera o poliploide pode vir tanto do microgametófito quanto do megagametófito (YANG et al., 2002).

A frequência com que embriões poliploides surgem espontaneamente é variável e parece depender tanto das características genéticas da cultivar investigada quanto de fatores externos. No orangelo (*C. paradisi* x *C. sinensis*) ‘Sukega’, por exemplo, fatores genéticos levam a uma produção excepcionalmente alta de triploides, resultante da formação espontânea de 20% a 25% de megagametófitos diploides. Isso provavelmente se deve a uma alteração na meiose feminina ou a uma duplicação do número cromossômico no megásporo funcional (ESEN et al., 1979). Por outro lado, Barrett e Hutchinson (1978) observaram, em diferentes cultivares, que a produção de *seedlings* poliploides de um mesmo clone pode ser quase 100% maior de um ano para outro e variar em até

200%, quando cultivados em diferentes localidades. A origem dos poliploides conhecidos em *Citrus* e seu potencial agrônomo foram revisados por Lee (1988).

A formação de poliploides pode também ser artificialmente induzida. Plantas tetraploides podem ser obtidas por tratamento com colchicina (BARRETT, 1974), por cultura de endosperma (GMITTER JUNIOR et al., 1990) ou por fusão de protoplastos (WU et al., 2005). Plantas tetraploides são muito utilizadas na obtenção de triploides sem sementes. Para isso, os tetraploides são fecundados com pólen haploides normais, formando embriões zigóticos triploides (CAMERON; BURNETT, 1978). O cruzamento inverso, isto é, plantas diploides polinizadas por pólen diploide proveniente de um tetraploide, é menos utilizado, mas também resulta na formação de triploides (OYAMA et al., 1981). Os triploides 'Oroblanco' e 'Melogold', híbridos de toranja com pomeleiro, por exemplo, foram obtidos dessa última maneira (SOOST; CAMERON, 1980, 1985).

Cameron e Soost (1969) observaram que, quando um indivíduo diploide é polinizado com o pólen diploide de uma planta tetraploide, formam-se os esperados embriões zigóticos triploides, mas formam-se também embriões tetraploides, supostamente em razão da duplicação do complemento cromossômico da oosfera na presença de pólen diploide (ESEN et al., 1979). Esses embriões geralmente são abortados, aparentemente por causa do desbalanceamento genético na proporção de genomas por célula entre os tecidos do embrião e os do endosperma (ESEN; SOOST, 1973; WAKANA et al., 1981). Contudo, se os embriões forem excisados e cultivados *in vitro*, a eficiência na obtenção de embriões zigóticos triploides é aumentada. Sarrantino e Recupero (1981), utilizando esse procedimento com diferentes espécies e variedades monoembriônicas de *Citrus*, obtiveram 300 *seedlings*, dos quais pelo menos 211 eram triploides.

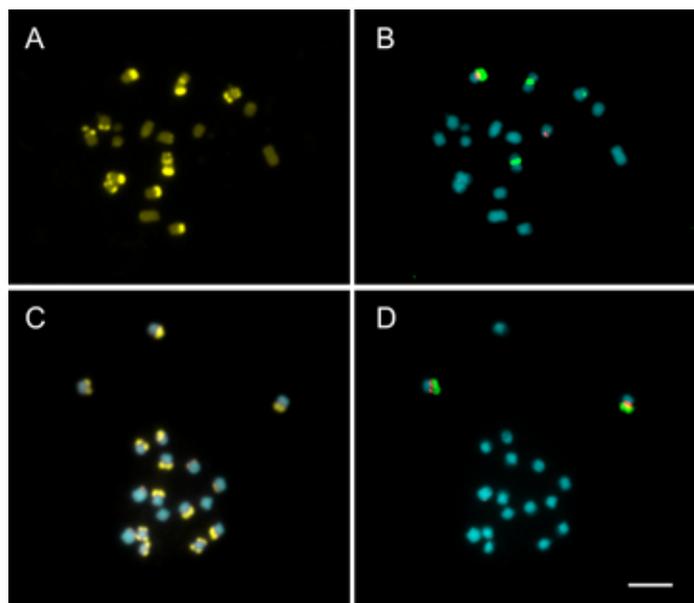
## Bandeamento cromossômico

Em virtude da similaridade morfológica dos cromossomos de *Citrus*, é necessário utilizar outras formas de diferenciação cromossômica para caracterizar cada cariótipo. O padrão de condensação dos cromossomos profásicos das espécies de *Citrus* revela a presença de numerosos blocos heteropicnóticos na maioria dos cromossomos (Figura 1B). A visualização desses blocos em cromossomos corados com técnicas convencionais, entretanto, depende muito do grau de condensação dos cromossomos (GUERRA, 1985). A técnica de bandeamento C permite localizar numerosas bandas heterocromáticas em cromossomos profásicos ou metafásicos de *Citrus* e gêneros relacionados, possibilitando distinguir diversos padrões de bandas (GUERRA, 1985; LIANG, 1988; WEI et al., 1988). Essas bandas distribuem-se principalmente na região terminal dos braços longos, embora, mais raramente, ocorram também nos braços curtos e na região proximal do cromossomo. Ito et al. (1993), utilizando a técnica de bandeamento HKG, encontraram apenas bandas proximais na maioria dos cromossomos da laranja 'Trovita' (*C. sinensis*), mas não descreveram detalhes da técnica.

Um padrão de bandas muito semelhante ao gerado pelo bandeamento C pode ser observado com o fluorocromo CMA, que cora fortemente a heterocromatina dos citros. Este fluorocromo é geralmente utilizado em combinação com o DAPI, que funciona como um contracorante, reforçando o contraste entre a heterocromatina e a eucromatina. Apenas a coloração com DAPI não produz nenhuma diferenciação longitudinal consistente (GUERRA, 1993; ITO et al., 1993). A coloração com o CMA tem a vantagem de ser tecnicamente muito mais simples e mais reproduzível que o bandeamento C e de não alterar a morfologia cromossômica, como frequentemente ocorre com o bandeamento C. Por essa razão, esse tipo de coloração vem sendo amplamente utilizado em *Citrus* e gêneros próximos (BRASILEIRO-VIDAL et al., 2007; GUERRA et al., 2000; MIRANDA et al., 1997a). As Figuras 2A e 3A mostram metáfases coradas apenas com CMA, e as Figuras 2C e 3C mostram a coloração CMA sobreposta com a coloração DAPI. Essas células podem ser descoradas e utilizadas em outras técnicas, como nas Figuras 2B, 2D, 3B e 3D.

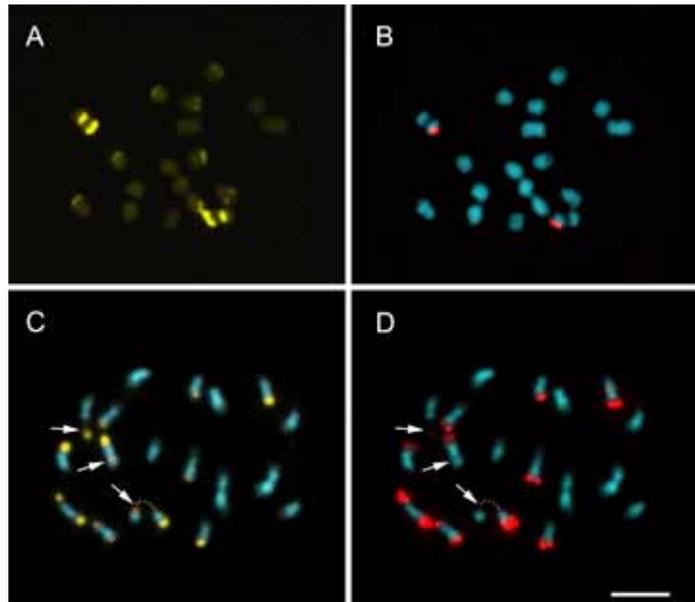
Quando corados com o fluorocromo CMA, os cromossomos das espécies de *Citrus* e de gêneros proximamente relacionados revelam padrões de distribuição de bandas característicos, formados por um número variável de cinco tipos cromossômicos principais (A, B, C, D, F), além de alguns tipos menos frequentes (Figura 4). Os cromossomos dos tipos A, B e C são os mais usados como cromossomos marcadores (tipos cromossômicos que ocorrem em pequeno número e em combinação variável dentro de cada espécie). Cada uma das espécies investigadas até o momento distinguiu-se por uma fórmula cariotípica (combinação de tipos cromossômicos) distinta, como demonstrado, por exemplo, para tangerineiras (CORNÉLIO et al., 2003) e pomeleiros (MORAES et al., 2007b).

**Figura 2.** Localização de bandas CMA e sítios de DNAr 5S e 45S em metáfases de *Citrus paradisi* Macfad. cv. Foster e *Murraya paniculata* (L.) Jack. Em A observa-se apenas a coloração com CMA, enquanto em C a imagem obtida com o CMA (amarela) foi sobreposta à imagem obtida com DAPI (azul). B e D mostram a localização dos sítios de DNAr 5S (vermelho) e 45S (verde). Nota-se que, em *C. paradisi* (B), um sítio de DNAr 5S encontra-se em um cromossomo D adjacente a um sítio de DNAr 45S, enquanto o outro sítio de DNAr 5S encontra-se em um cromossomo F (tipo F/5S). Em *M. paniculata* (C, D), observa-se homozigose para as bandas e sítios de DNAr. Barra em D equivale a 5 µm.

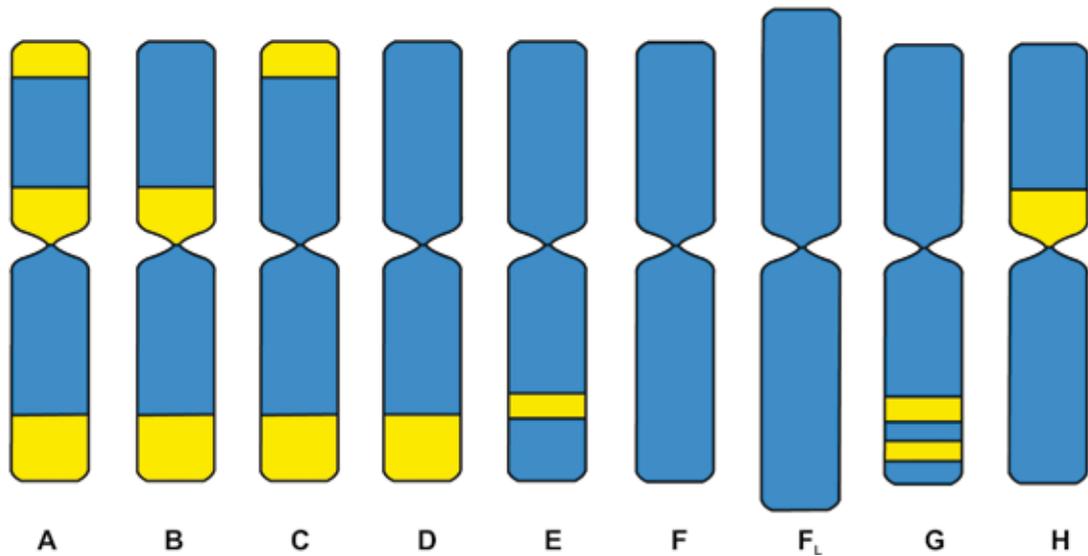


Fotos: Ana Paula de Moraes (A e B); Ana Emilia Barros e Silva (C e D)

**Figura 3.** Localização de um BAC (27P9) com DNA de cópia única de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. em *Citrus medica* L. (A, B) e do DNA satélite principal de *C. sinensis* (L.) Osbeck (satCs) em *C. sinensis* (C, D). Barra em D equivale a 5 µm.



Fotos: Sandra Mendes (A e B); Ana Emilia Barros e Silva (C e D)



**Figura 4.** Tipos cromossômicos encontrados nos kariótipos de espécies cítricas após coloração com os fluorocromos CMA e DAPI.

Fonte: baseado em Carvalho et al. (2005).

Os padrões de bandas CMA têm sido utilizados para caracterizar germoplasmas, identificar a formação de duplo-haploides, distinguir embriões nucleares dos zigóticos, identificar acessos de origem híbrida, caracterizar alterações estruturais e numéricas, bem como híbridos somáticos interespecíficos (CARVALHO et al., 2005; CORNÉLIO et al., 2003; MIRANDA et al., 1997b; MORAES

et al., 2007a, 2007b; YAMAMOTO; TOMINAGA, 2003, 2004b; YAMAMOTO et al., 2007). Alguns autores consideram que é possível identificar cada um dos cromossomos de cada espécie apenas com o padrão de distribuição das bandas CMA, o brilho e tamanho das bandas e o tamanho dos cromossomos (BEFU et al., 2000, 2002; YAMAMOTO; TOMINAGA, 2004a). Contudo, geralmente é necessário utilizar marcas adicionais, como a posição dos sítios de DNAr, BACs (*bacterial artificial chromosomes*) de cópia única, etc. As Figuras 2 e 3 ilustram a importância dessas marcas para o reconhecimento de determinados cromossomos.

## Padrão de bandas CMA entre cultivares

A primeira análise de cromossomos de *Citrus* com bandas CMA (GUERRA, 1993) revelou heterozigosidade cromossômica em todos os acessos investigados. Posteriormente, foi demonstrado que poucas espécies de *Citrus* são citologicamente homozigotas, incluindo algumas das supostas espécies puras (BEFU et al., 2001; CARVALHO et al., 2005; CORNÉLIO et al., 2003; MENDES et al., 2011; MORAES et al., 2007a, 2007b). Em algumas espécies, os padrões de heterozigose para bandas CMA são muito bem conservados em diferentes cultivares. Por exemplo, o mesmo padrão de bandas CMA descrito inicialmente para um indivíduo de *C. sinensis* (GUERRA, 1993) foi posteriormente confirmado em 13 cultivares dessa espécie (BEFU et al., 2000; CORNÉLIO et al., 2003; MATSUYAMA et al., 1996; MIRANDA et al., 1997a; PEDROSA et al., 2000). Da mesma maneira, em quatro cultivares de limoeiro verdadeiro [*C. limon* (L.) Burm. f.], foram observados o mesmo padrão de bandas e os mesmos heteromorfismos (CARVALHO et al., 2005).

Por outro lado, entre as tangerineiras, o grupo de *Citrus* com taxonomia mais confusa, a análise de cerca de 30 cultivares diferentes com bandeamento CMA revelou que praticamente não existem duas cultivares citogeneticamente iguais (CORNÉLIO et al., 2003; MORAES et al., 2007a; YAMAMOTO; TOMINAGA, 2003). Igualmente, entre cultivares de toranja tem sido encontrada muita variação de tipos cromossômicos (BEFU et al., 2001; YANG et al., 2002). Um caso particularmente curioso é o das cultivares de pomeleiros (*C. paradisi*), que aparentavam ser descendentes de um único cruzamento espontâneo ou de uma única introdução recente em cultivo (GMITTER JUNIOR, 1995), e, na análise com bandas CMA, revelou pelo menos dois citótipos distintos (MORAES et al., 2007b). É importante ressaltar que o alto nível de heterozigosidade citogenética nas cultivares de *Citrus* não interfere necessariamente na fertilidade, aparentemente porque o heteromorfismo das bandas CMA não influi no pareamento dos homólogos na meiose (CORNÉLIO, 1994; GUERRA, 2009). Isso explica o fato de que muitos híbridos não apresentam problemas de pareamento meiótico nem de fertilidade (CAVALCANTE et al., 2000; IWAMASA; NITO, 1988).

Os dados existentes atualmente sobre bandeamento CMA em cerca de 100 cultivares de *Citrus* mostram que, ao lado da estabilidade de número cromossômico do gênero, há uma intensa variabilidade estrutural e heteromorfismos de bandas CMA em quase todas as cultivares, provavel-

mente como consequência da natureza híbrida da maioria dos acessos de *Citrus* (CARVALHO et al., 2005; CORNÉLIO et al., 2003; MORAES et al., 2007b; YAMAMOTO et al., 2005, 2007).

## Hibridização *in situ* fluorescente

Atualmente, o bandeamento com CMA tem sido utilizado em combinação com a técnica de hibridização *in situ*, visando obter uma maior diferenciação dos cromossomos de *Citrus* e localizar a posição de genes e de outras sequências de DNA no cromossomo. Matsuyama et al. (1996) foram os primeiros a mostrar a distribuição do DNA telomérico e a presença de apenas três sítios de DNAr 26S em cromossomos de *C. sinensis*. Resultados semelhantes foram observados por Pedrosa et al. (1997), que constataram a existência de apenas três constrições secundárias (os sítios onde se encontra o DNAr 45S).

Pedrosa et al. (2000) analisaram o padrão de bandas CMA em dez cultivares de *C. sinensis* e a localização dos sítios DNAr 5S e 45S em três dessas cultivares. Neste trabalho, foi demonstrado que todos os acessos de *C. sinensis* tinham não apenas o mesmo padrão de bandas e os mesmos heteromorfismos, mas também a mesma distribuição de sítios do DNAr 5S e 45S. O alto heteromorfismo cromossômico encontrado reforça a conclusão de Barrett e Rhodes (1976) de que *C. sinensis* não é uma espécie verdadeira, mas sim um híbrido interespecífico. Além disso, a extrema similaridade entre todos esses acessos sugere que as cultivares atuais de laranja doce conservam o genoma do híbrido original, mantido por multiplicação vegetativa, com pequenas mutações gênicas que diferenciam as cultivares.

A distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S foi também investigada por Carvalho et al. (2005) em dez acessos de limeiras, limoeiros e cidreira (*C. medica* L.), entre os quais apenas a cidreira revelou-se homocigota para o padrão de bandas CMA e sítios de DNAr (YAMAMOTO et al., 2007). Essa análise permitiu identificar um complemento cromossômico haploide de cidra em todos os acessos de limeiras e limoeiros examinados, confirmando a indicação de diversos autores de que cidreira seria uma das espécies puras do grupo e um dos ancestrais das limeiras e limoeiros (MOORE, 2001).

Em *C. maxima*, foi observada completa homocigose nas cultivares Pink e Israel, tanto para bandas CMA quanto para sítios de DNAr 5S e 45S. Novamente, chama a atenção o fato de que esta é uma das espécies reconhecidas como puras por diferentes abordagens (BARRETT; RHODES, 1976; MOORE, 2001; NICOLSI, 2007). Um aspecto importante dessa análise é que essa espécie foi a única das supostas espécies puras que apresentou o sítio de DNAr 5S no meio do braço longo de um cromossomo sem banda CMA (tipo F/5S). Significativamente, um cromossomo F/5S em heterocigose foi encontrado nos pomeleiros, no tangelo 'Orlando' [pomeleiro 'Duncan' x tangerineira 'Dancy' (*C. tangerina* hort. ex Tanaka)] e na laranja doce, todos supostamente derivados de *C. maxima* (MORAES et al., 2007b).

Kang et al. (2008) hibridizaram in situ sondas de DNAr 45S em 13 espécies de citros, incluindo diversas tangerineiras, laranjeiras azedas e pomeleiros. Entretanto esses autores não utilizaram alguma técnica de bandeamento cromossômico que permitisse localizar quais os cromossomos portadores desses sítios. Nesse caso, um cromossomo A/45S, característico de um grupo restrito de acessos, não pode ser distinguido de um cromossomo B/45S que ocorre em outros grupos. Ainda assim, foi possível demonstrar que o número e a posição desses sítios variam bastante entre espécies. Para caracterizar os cromossomos de *Citrus* e gêneros relacionados, é recomendado ao menos detectar os sítios de DNAr 5S e 45S em cromossomos previamente corados com CMA. A combinação de dados sobre tamanho e posição dos sítios e bandas CMA permite distinguir vários tipos e subtipos cromossômicos, bem como caracterizar a maioria dos acessos (GUERRA, 2009).

Yamamoto et al. (2009) observaram a localização dos sítios de DNAr 5S em *C. reshni* hort. ex Tanaka e em representantes de cinco outros gêneros da subfamília Aurantioideae, utilizando coloração com iodeto de propídeo (fluorocromo que cora mais intensamente os blocos de heterocromatina dessas espécies). Nesse caso, foi possível localizar quais os tipos cromossômicos portadores desses sítios e demonstrar que o número e a posição dos sítios de DNAr 5S variam muito pouco entre as espécies analisadas. Essa variação muito limitada dos sítios de DNAr 5S foi também encontrada em diversas outras espécies de *Citrus* e gêneros próximos (BARROS E SILVA, 2007; MORAES et al., 2007a, 2007b).

A análise do DNA repetitivo de *Citrus*, por clonagem e sequenciamento, revelou que este é constituído principalmente por uma sequência satélite rica em GC (FANN et al., 2001). A coloração cromossômica sequencial de bandas CMA e hibridização in situ desse DNA satélite confirmou que essa é a principal sequência repetitiva presente nas bandas CMA das espécies de *Citrus* e em *P. trifoliata* (BARROS E SILVA et al., 2010). Em *Fortunella X obovata* hort. ex Tanaka, contudo, apenas quatro dos nove pares cromossômicos com bandas CMA não hibridizaram com a sequência satélite principal das espécies de *Citrus*, enquanto em espécies de quatro gêneros mais afastados [*Atalantia* (Corrêa), *Severinia* (Tenore), *Murraya* (J. Koenig) e *Triphasia* (Lour.)] não foi detectado nenhum sinal de hibridização in situ utilizando essa mesma sequência como sonda (BARROS E SILVA et al., 2010).

Duas outras sequências satélites foram hibridizadas in situ nos cromossomos de *C. sinensis* por Matsuyama et al. (1999). Esses autores observaram que a sequência do DNA telomérico de *Arabidopsis* encontrava-se presente em todos os terminais cromossômicos de *C. sinensis*, enquanto o minissatélite 'iki6k' estava disperso na eucromatina de todos os cromossomos. Outras sequências de DNA repetitivo disperso foram detectadas por hibridização de BACs contendo sequências repetitivas não identificadas (MORAES et al., 2008).

## Citogenética dos gêneros próximos a *Citrus*

O gênero *Citrus* pertence à subfamília Aurantioideae, considerada como a que apresenta maior número de características derivadas, ou seja, mais inovações genéticas, dentro da família Rutaceae (SILVA et al., 1988). Essa subfamília divide-se em duas tribos, Clauseneae e Citreae, reunindo 33 gêneros e cerca de 200 espécies (SAMUEL et al., 2001; SWINGLE, 1967). Cada uma dessas tribos foi dividida em três subtribos no sistema adotado por Swingle, baseado em Engler (1931). Entretanto, segundo análises filogenéticas realizadas por diversos autores (ARAÚJO et al., 2003; MORTON, 2009; SAMUEL et al., 2001), essas subtribos parecem claramente artificiais.

De uma maneira geral, a diversidade cariotípica dos demais gêneros de Aurantioideae é muito parecida com a do gênero *Citrus*. A estrutura do núcleo interfásico observada nas espécies de *Citrus*, caracterizada pela presença de cromocentros bem delineados em uma rede de cromatina difusa e fracamente corada, é igualmente observada nos demais gêneros da subfamília e é raramente encontrada em outras espécies da família Rutaceae (GUERRA, 1987). O número cromossômico  $2n = 18$  ocorre em quase todas as espécies da subfamília, exceto em *Paramignya monophylla* Wight, *Atalantia ceylanica* (Arn.) Oliv., *Clausena excavata* Burm. f. e *C. willdenowii* [= *C. dentata* (Willd.) M. Roem.], que são tetraploides ( $2n = 36$ ), e *Glycosmis citrifolia* Lindl. e *G. pentaphylla* (Retz.) DC., que são hexaploides ( $2n = 54$ ) (GUERRA et al., 2000; STACE et al., 1993). *Fortunella hindsii* (Champ. ex Benth.) Swingle apresenta formas naturais diploides e tetraploides (LONGLEY, 1925; MIRANDA et al., 1997c).

A morfologia e o tamanho cromossômico dessas espécies também são semelhantes aos de *Citrus*, com cromossomos meta a submetacêntricos, variando de 1  $\mu\text{m}$  a 4  $\mu\text{m}$  de comprimento (AGARWAL, 1988; GHOSH, 1966; GUERRA et al., 2000; MIRANDA et al., 1997a). Alterações meióticas são conhecidas em diversos híbridos intergenéricos (AGARWAL, 1987c), mas não em espécies naturais, como por exemplo em *Aegle marmelos* (L.) Corrêa (BANERJI; PAL, 1957) e *M. paniculata* (dados não publicados), o que provavelmente se relaciona à menor incidência de híbridos nesses outros gêneros.

As bandas CMA e os diferentes tipos cromossômicos observados nas espécies de *Citrus* repetem-se de forma semelhante em *Poncirus* (Rafinesque) e *Fortunella* (Swingle) e vários outros gêneros (BEFU et al., 2000; BRASILEIRO-VIDAL et al., 2007; MIRANDA et al., 1997a, 1997c; ROOSE et al., 1998; YAMAMOTO et al., 2008). Uma análise do padrão de bandas CMA em 14 gêneros da subfamília Aurantioideae, incluindo representantes de cinco das seis subtribos de Engler (1931), revelou que os gêneros mais próximos a *Citrus* [*Poncirus*, *Fortunella*, *Eremocitrus* (Swingle) e *Microcitrus* (Swingle)] possuem cariótipos bastante semelhantes, apresentando bandas CMA na maioria dos cromossomos (GUERRA et al., 2000).

Curiosamente, tanto os gêneros *Severinia* e *Atalantia*, tidos como primitivos na subtribo Citrinae, quanto os gêneros mais primitivos de outras subtribos, como *Glycosmis* (Corrêa), *Clausena* (Burm. f.) e *Swinglea* (Merr.), apresentam pouca heterocromatina. Por outro lado, gêneros taxonomi-

camente distantes de *Citrus*, mas também com características morfológicas derivadas, como *Murraya paniculata* e *Merrillia caloxylon* (Ridl.) Swingle, possuem padrões de bandas mais semelhantes aos observados em *Citrus*. Esses dados sugerem a ocorrência de uma evolução cromossômica paralela em diferentes linhagens evolutivas de Aurantioideae (GUERRA et al., 2000). O fato de que a sequência de DNA satélite principal de *C. sinensis* hibridiza apenas com as bandas CMA de *Citrus* e gêneros mais próximos (BARROS E SILVA et al., 2010) sugere que sequências satélites distintas foram amplificadas em diferentes ramos da subfamília, ou que o DNA satélite principal divergiu lentamente durante a evolução das Aurantioideae, sempre conservando-se predominantemente nas regiões terminais dos braços longos.

A diferença entre espécies e gêneros no número de cromossomos bandeados ou na presença de cromossomos marcadores pode também ser útil na identificação de híbridos diploides e alopoliploides (MIRANDA et al., 1997b). Por exemplo, no caso do híbrido diploide entre *C. sunki* [(Hayata) hort. ex Tanaka] (com oito pares cromossômicos com bandas) e *Severinia buxifolia* (Poir.) Ten. (com apenas três ou quatro pares cromossômicos com bandas), obtido por Medina-Filho et al. (1998), a confirmação da condição híbrida pode ser feita pelo número intermediário de cromossomos com bandas. Os híbridos tetraploides entre *C. sunki* e *P. trifoliata* (sete pares cromossômicos com bandas, incluindo dois pares do tipo B, ausentes em *C. sunki*), obtidos por Cristofani et al. (1999), podem ser caracterizados na F1 e F2 pelo número de cromossomos com bandas e principalmente pela presença de cromossomos com duas bandas (comparar os idiogramas de Cornélio et al. (2003) e Guerra et al. (2000). Recentemente, Yasuda et al. (2010) utilizaram uma análise combinada de bandas CMA e GISH para demonstrar que o híbrido diploide de *Citropsis schweinfurthii* (Engl.) Swingle & M. Kellerm. com o tangor 'Nanpu' [tangor 'Kiyomi' (*Citrus unshiu* Marcow. × *C. sinensis*) surgiu da fertilização de um gameta feminino de *C. schweinfurthii*, com fórmula cariotípica 7D + 2E, por um gameta masculino com fórmula de 1A + 1C + 4D + 3E, proveniente do tangor. Esses marcadores são particularmente úteis para caracterizar os diferentes híbridos assimétricos e os aneuploides gerados por fusão de protoplastos irradiados e por variação somaclonal (HAO; DENG, 2003; LIU; DENG, 1999; MIRANDA et al., 1997b).

Similarmente, a localização dos sítios de DNA ribossomal 5S e 45S, junto com as bandas CMA, tem contribuído para refinar a caracterização das espécies de vários gêneros. A Figura 2C e D ilustra o padrão de bandas CMA e a localização dos sítios de DNAr em *M. paniculata*. Observa-se que nessa espécie os sítios encontram-se adjacentes e em homozigose, refletindo um padrão comum à maioria das espécies da subfamília (BARROS E SILVA, 2007).

## Novas abordagens

Recentemente, Fu et al. (2004) analisaram por GISH um híbrido somático de *C. aurantium* L. e *P. trifoliata* e demonstraram que é possível marcar diferencialmente todos os cromossomos de *Citrus* nesse híbrido. Com essa técnica, foi possível detectar a ocorrência de uma translocação

cromossômica intergenômica nesse híbrido. Igualmente, Yasuda et al. (2010) conseguiram marcar por GISH os cromossomos de *Citropsis schweinfurthii* contidos em um híbrido entre essa espécie e o tangor 'Nanpu'. Esses trabalhos revelaram que existem sequências de DNA repetitivo disperso espalhadas pelo genoma de *Citrus* que diferem substancialmente das sequências dispersas em *Poncirus* e *Citropsis*. Diferenciação entre genomas de híbridos de *Citrus* foi também reportada por Kitajima et al. (2007) e Preedasuttijit et al. (2007), mas com resultados não muito claros.

Outra abordagem inovadora foi apresentada por Huang et al. (2004a, 2004b). Esses autores microdissecaram o maior cromossomo de uma cultivar de *C. maxima*, amplificaram o seu DNA por PCR e construíram uma biblioteca de DNA cromossomo-específica. Com essa metodologia foi possível clonar e sequenciar análogos de genes de resistência em seis cromossomos dessa espécie. Entretanto, como esses cromossomos não foram caracterizados por bandeamento ou FISH, não foi possível associar essas marcas a um tipo cromossômico particular. Bibliotecas desse tipo têm também sido usadas em outros organismos para selecionar sondas que permitam corar diferencialmente um único par cromossômico e detectar translocações dentro de um genoma (GUERRA, 2004). O uso de bibliotecas cromossomo-específicas, aliado à identificação precisa dos cromossomos e à construção de mapas genéticos detalhados, são metodologias importantes para o sequenciamento genômico dos *Citrus*.

O primeiro mapa físico-citológico para espécies cítricas foi produzido por Moraes et al. (2008) utilizando como sonda sequências de DNA genômico clonadas em BACs. Essas sequências foram obtidas de uma biblioteca genômica de *P. trifoliata* e hibridizadas nos cromossomos dessa espécie por FISH. Foram mapeados 24 BACs e analisados em conjunto com as bandas CMA e os sítios de DNAr 5S e 45S, permitindo a identificação dos nove pares cromossômicos. Esse mapa físico, composto principalmente por sequências de DNA de cópia única, pode ser utilizado para comparar a posição dessas mesmas sequências em espécies de *Citrus* e verificar os rearranjos cromossômicos ocorridos durante sua evolução. Ademais, a posição da região cromossômica envolvida com o gene de resistência ao vírus-da-tristeza-dos-citros (*Citrus tristeza virus* – CTV) foi localizada no braço longo do menor cromossomo do tipo F. Esses mesmos BACs foram hibridizados em espécies puras de *Citrus* (Figura 3A, B), revelando tanto homeologias cromossômicas quanto rearranjos (inversões, translocações) que separam essas espécies (MENDES et al., 2011). Além disso, os mapas citogenéticos das espécies puras *C. reticulata* cv. Cravo e *C. maxima* cv. Pink foram concluídos, permitindo uma melhor compreensão dos processos envolvidos na evolução dos cariótipos das espécies até então estudadas, assim como de híbridos relacionados (SILVA, 2012). Marcas físicas desse tipo, combinadas com os mapas genéticos progressivamente mais densos que vêm sendo obtidos para *Citrus* e *Poncirus* (OLIVEIRA et al., 2007; TALON; GMITTER JUNIOR, 2008), poderão ser utilizadas para a reunião dos *contigs* no sequenciamento genômico dos *Citrus*, atualmente em andamento.

O isolamento e mapeamento físico de sequências satélite têm sido outra abordagem bastante utilizada na caracterização cromossômica e em estudos de citogenética evolutiva (FONSÊCA et al., 2010). Uma das primeiras sequências satélite isolada de *Citrus* possui 181 pb, com 63% de

pares de bases do tipo GC (BERIDZE et al., 1992). Fann et al. (2001) demonstraram que essa sequência faz parte de uma das maiores famílias de DNA satélite presentes em *Citrus* e *Poncirus*, com grau de similaridade entre as espécies de 93% a 70% e conteúdo de GC variando de 60% a 68%. A localização dessa sequência coincide perfeitamente bem com as bandas CMA terminais de *Citrus* e *Poncirus* (BARROS E SILVA et al., 2010). Felice et al. (2004, 2007) isolaram duas outras sequências satélite de *C. limon*, uma com 600 pb e outra com 300 pb e conteúdo de AT de 56% e 58%, respectivamente. Outra sequência satélite, isolada de *P. trifoliata*, possui 400 pb e 47% de conteúdo de AT (FELICE et al., 2006). Todas essas sequências hibridizaram em membrana com o DNA genômico de espécies de *Citrus* e gêneros mais próximos, mas não foram ainda localizadas nos cromossomos.

O maior desafio atual é avaliar a função estrutural e funcional dessas sequências e seu papel na evolução cromossômica das plantas cítricas. Recentemente, Felice et al. (2009) isolaram uma sequência repetitiva de *C. limon*, denominada CLCoy1, localizada in situ nas regiões teloméricas e subteloeméricas dos cromossomos dessa espécie. Portanto, a distribuição cromossômica de CLCoy1 se sobrepõe, ao menos parcialmente, com a distribuição do principal DNA satélite desse grupo (BARROS E SILVA et al., 2010). Essa nova sequência é similar ao retrotransposon Ty1-*copia* e foi encontrada também em outras espécies de *Citrus*, *Poncirus* e *Fortunela*. É importante destacar que os autores demonstraram que a sequência CLCoy1 foi transcrita em condições de estresse prolongado, sendo encontrada no citoplasma dos tecidos cultivados in vitro, em estresse salino e injúria física. Análises recentes dos retrotransposons e sequências de DNA satélite de diversas espécies têm revelado que eles podem desempenhar papéis muito importantes na organização do genoma (HOLMQUIST; ASHLEY, 2006).

## Referências

- AGARWAL, P. K. Cytogenetical investigations in *Rutaceae*: I. Meiotic studies in four *Citrus* species of hybrid origin. **Cytologia**, Tokyo, JP, v. 52, p. 753-756, 1987a.
- AGARWAL, P. K. Cytogenetical investigations in *Rutaceae*: II. Meiotic studies in three intergeneric hybrids of *Citrus*. **Cytologia**, Tokyo, JP, v. 52, p. 757-760, 1987b.
- AGARWAL, P. K. Cytology of *Atalantia ceylanica* (Arn.). **Current Science**, Bangalore, v. 57, p. 207-208, 1988.
- AGARWAL, P. K. Karyotype of *Citrus tamurana* (Tan.). **Chromosome Information Service**, Tokyo, JP, v. 42, p. 3-5, 1987c.
- ARAÚJO, E. F.; QUEIRÓZ, L. P.; MACHADO, M. A. What is *Citrus*? Taxonomic implications from a study of cp-DNA evolution in the tribe Citreae (*Rutaceae* subfamily Aurantioideae). **Organisms Diversity & Evolution**, Jena, v. 3, p. 55-62, 2003.
- BACCHI, O.; KRUG, C. A. Triploid varieties of *Citrus*. **Journal of Heredity**, Washington, DC, v. 34, p. 277-283, 1943.
- BANERJI, I. Morphological and cytological studies on *Citrus grandis* Osbeck. **Phytomorphology**, New Delhi, IN, v. 4, p. 390-396, 1954.
- BANERJI, I.; PAL, S. A note on the cytology and pollen of *Aegle marmelos*. **Corr. Phytomorphology**, Buenos Aires, AR, v. 8, p. 75-78, 1957.
- BARRETT, H. C. Colchicine-induced polyploidy in *Citrus*. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 135, p. 29-34, 1974.
- BARRETT, H. C.; HUTCHINSON, D. J. Spontaneous tetraploidy in apomictic seedlings of *Citrus*. **Economic Botany**, New York, v. 32, p. 27-45, 1978.

- BARRETT, H. C.; RHODES, A. M. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. **Taxon**, Vienna, AT, v. 1, p. 105-122, 1976.
- BARROS E SILVA, A. E. **Evolução do DNA satélite na subfamília Aurantioideae (Rutaceae)**. 2007. 165 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- BARROS E SILVA, A. E.; MARQUES, A.; SANTOS, K. G. B.; GUERRA, M. The evolution of CMA bands in *Citrus* and related genera. **Chromosome Research**, Oxford, v. 18, p. 503-514, 2010.
- BEFU, M.; KITAJIMA, A.; HASEGAWA, K. Classification of the citrus chromosomes with same types of chromomycin A banding patterns. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Chikusa, v. 71, p. 394-400, 2002.
- BEFU, M.; KITAJIMA, A.; LING, Y. X.; HASEGAWA, K. Chromosome composition of some citrus species and cultivars based on the chromomycin A3 (CMA) banding patterns. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Chikusa, v. 70, p. 83-88, 2001.
- BEFU, M.; KITAJIMA, A.; LING, Y. X.; HASEGAWA, K. Classification of 'Tosa-Buntan' pummelo (*Citrus grandis* [L.] Osb.), 'Washington' navel orange (*C. sinensis* [L.] Osb.) and trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* [L.] Raf.) chromosomes using young leaves. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Chikusa, v. 69, p. 22-28, 2000.
- BERIDZE, T.; TSIREKIDZE, N.; ROYTBURG, M. A. On the tertiary structure of satellite DNA. **Biochimie**, Paris, FR, v. 74, p. 187-194, 1992.
- BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; GUERRA, M. Citogenética molecular em cereais. In: BRAMMER, S. P.; IORCZESKI, E. J. (Org.). **Atualização de técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. p. 277-298.
- BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; MELO-OLIVEIRA, M. B.; CARVALHEIRA, G. M. G.; GUERRA, M. Different chromatin fractions of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and related species. **Micron**, Oxford, v. 40, p. 851-859, 2009.
- BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; SOARES FILHO, W. dos S.; GUERRA, M. A simple chromosomal marker can reliably distinguishes *Poncirus* from *Citrus* species. **Genética**, The Hague, v. 129, p. 273-279, 2007.
- CAMERON, J. W.; BURNETT, R. H. Use of sexual tetraploid seed parents for production of triploid *Citrus* hybrid. **HortScience**, Alexandria, v. 13, p. 167-169, 1978.
- CAMERON, J. W.; SOOST, R. K. Characters of new populations of *Citrus* polyploids, and the relation between tetraploidy in the pollen parent and hybrid tetraploid progeny. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1969, Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1969. v. 1, p. 199-205.
- CARVALHO, R.; GUERRA, M. Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. **Hereditas**, Lund, v. 136, p. 159-168, 2002.
- CARVALHO, R.; SOARES FILHO, W. dos S.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; GUERRA, M. The relationships among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 109, p. 276-282, 2005.
- CAVALCANTE, H. C.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DORNELLES, A. C. Meiotic behaviour and pollen fertility in an open-pollinated population of 'Lee' mandarin [*Citrus clementina* x (*C. paradisii* x *C. tangerina*)]. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, NL, v. 86, p. 103-114, 2000.
- CHANG, S. B.; JONG, H. de. Production of alien chromosome additions and their utility in plant genetics. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 109, p. 335-343, 2005.
- CORNÉLIO, M. T. M. N.; FIGUEIRÔA, A. R. S.; SANTOS, K. G. B.; SOARES FILHO, W. S.; GUERRA, M. Chromosomal relationships among cultivars of *Citrus reticulata* Blanco, its hybrids and related species. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, AT, v. 240, p. 149-161, 2003.
- CORNÉLIO, M. T. M. **Variabilidade cromossômica em cultivares poliembriônicos e monoembriônicos de Citrus**. 1994. 100 f. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A.; GRATTAPAGLIA, D. Genetic linkage maps of *Citrus sunki* Hort ex. Tan. and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. and mapping of citrus tristeza virus resistance gene. **Euphytica**, Wageningen, v. 109, p. 25-32, 1999.
- DANTAS, L.; GUERRA, M. Chromatin differentiation between *Theobroma cacao* L. and *T. grandiflorum* Schum. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 33, p. 94-98, 2010.
- ENGLER, A. Rutaceae. In: ENGLER, A.; PRANTL, K. (Ed.). **Die natürlichen pflanzenfamilien**. 2. ed. Leipzig: Engelmann, 1931. v. 19a, p. 187-359.

- ESEN, A.; SOOST, R. K. Seed development in *Citrus* with special reference to 2X x 4X crosses. **American Journal of Botany**, New York, v. 60, p. 448-462, 1973.
- ESEN, A.; SOOST, R. K. Unexpected triploids in *Citrus*: Their origin, identification, and possible use. **Journal of Heredity**, Washington, DC, v. 62, p. 329-333, 1971.
- ESEN, A.; SOOST, R. K.; GERACI, G. Genetic evidence for the origin of diploid megagametophytes in *Citrus*. **Journal of Heredity**, Washington, DC, v. 70, p. 5-8, 1979.
- FANN, J. Y.; KOVARIK, A.; HEMLEBEN, V.; TSIREKIDZE, N. I.; BERIDZE, T. G. Molecular and structural evolution of *Citrus* satellite DNA. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, DE, v. 103, p. 1068-1073, 2001.
- FELICE, B. de; CIARMIELLO, L.; WILSON, R. R.; CONICELLA, C. Molecular analysis of a novel tandemly organized repetitive DNA sequence in *Citrus limon* (L.). **Burm. Journal of Applied Genetics**, Poznań, v. 48, p. 233-239, 2007.
- FELICE, B. de; WILSON, R. R.; ARGENZIANO, C.; KAFANTARIS, I.; CONICELLA, C. A transcriptionally active *cop*ia-like retroelement in *Citrus limon*. **Cellular & Molecular Biology Letters**, Wroclaw, v. 14, p. 289-304, 2009.
- FELICE, B. de; WILSON, R. R.; CIARMIELLO, L.; CONICELLA, C. A novel repetitive DNA sequence in lemon [*Citrus limon* (L.) Burm.] and related species. **Journal of Applied Genetics**, Poznań, v. 35, p. 315-320, 2004.
- FELICE, B. de; WILSON, R. R.; CIARMIELLO, L.; SCARANO, M. T.; FERRANTE, S. Characterization of a novel satellite DNA sequence from flying dragon (*Poncirus trifoliata*). **Genetica**, The Hague, v. 127, p. 45-53, 2006.
- FLUMINHAN, A.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. de; SANTOS, J. A. dos. Evidence for heterochromatin involvement in chromosome breakage in maize callus culture. **Annals of Botany**, Oxford, v. 78, p. 73-81, 1996.
- FONSÉCA, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, T. R. B. dos; MOSIOLEK, M.; BELLUCCI, E.; KAMI, J.; GEPTS, P.; GEFFROY, V.; SCHWEIZER, D.; SANTOS, K. G. B. dos; PEDROSA-HARAND, A. Cytogenetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Chromosome Research**, Leincester, v. 18, p. 487-502, 2010.
- FROST, H. B. Tetraploidy in *Citrus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 11, p. 535-537, 1925b.
- FROST, H. B. The chromosomes of *Citrus*. **Journal of the Washington Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 15, p. 1-3, 1925a.
- FU, C. H.; CHEN, C. L.; GUO, W. W.; DENG, X. X. GISH, AFLP and PCR-RFLP analysis of an intergeneric somatic hybrid combining Goutou sour orange and *Poncirus trifoliata*. **Plant Cell Reports**, Berlin, DE, v. 23, p. 391-396, 2004.
- GHOSH, R. B. A contribution to the karyotypic study in *Glycosmis pentaphylla* Corr. **Beitrage zur Biologie der Pflanzen**, Breslau, v. 42, p. 139-143, 1966.
- GMITTER JUNIOR, F. G. Origin, evolution, and breeding of the grapefruit. In: JANICK, J. (Ed.). **Plant breeding reviews**. New York: John Wiley & Sons, 1995. v. 13, p. 345-363.
- GMITTER JUNIOR, F. G.; LING, X. B.; DENG, X. X. Induction of triploid *Citrus* plants from endosperm calli *in vitro*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, DE, v. 80, p. 785-790, 1990.
- GUERRA M.; KENTON, A.; BENNETT, M. D. rDNA sites in mitotic and polytene chromosomes of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. and *Phaseolus coccineus* L. revealed by *in situ* hybridization. **Annals of Botany**, Oxford, v. 78, p. 157-161, 1996.
- GUERRA, M. Chromosomal variability and the evolution of *Citrus* species. In: MAHONEY, C. L.; SPRINGER, D. A. (Ed.). **Genetic diversity**. New York: Nova Science Publishers, 2009. p. 51-68.
- GUERRA, M. Cytogenetics of Rutaceae: II. Nuclear DNA content. **Caryologia**, Firenze, v. 37, p. 219-226, 1984.
- GUERRA, M. Cytogenetics of Rutaceae: III. Heterochromatin patterns. **Caryologia**, Firenze, v. 38, p. 335-346, 1985.
- GUERRA, M. Cytogenetics of Rutaceae: IV. Structure and systematic significance of the interphase nuclei. **Cytologia**, Tokyo, JP, v. 52, p. 213-222, 1987.
- GUERRA, M. Cytogenetics of Rutaceae: V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. **Heredity**, Oxford, v. 71, p. 234-241, 1993.
- GUERRA, M. Hibridização *in situ*: princípios básicos. In: GUERRA, M. (Org.). **FISH: conceitos e aplicações na citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004. p. 1-32.
- GUERRA, M. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 4, p. 1029-1041, 2000.

- GUERRA, M.; PEDROSA, A.; BARROS E SILVA, A. E.; CORNÉLIO, M. T. M.; SANTOS, K.; SOARES FILHO, W. dos S. Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a citrus germplasm bank. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 20, p. 489-496, 1997.
- GUERRA, M.; SANTOS, K. G. B.; BARROS E SILVA, A. E.; EHRENDORFER, F. Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantioideae: A case of parallel chromosomal evolution. **American Journal of Botany**, New York, v. 5, p. 735-747, 2000.
- GUPTA, P. K.; TSUCHIYA, T. **Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution**. Amsterdam, NL: Elsevier, 1991. Part A, 639 p.
- HAO, Y.-J.; DENG, X.-X. Single-cell-derived sibling lines are established as an experimental system to assess chromosome number variations in embryogenic callus cultures of sweet orange. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 73, p. 275-280, 2003.
- HOLMQUIST, G. P.; ASHLEY, T. Chromosome organization and chromatin modification: influence on genome function and evolution. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 114, p. 96-125, 2006.
- HUANG, D.; WU, W.; LU, L. Microdissection and molecular manipulation of single chromosomes in woody fruit trees with small chromosomes using pummelo (*Citrus grandis*) as a model: II. Cloning of resistance gene analogs from single chromosomes. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, DE, v. 108, p. 1371-1377, 2004a.
- HUANG, D.; WU, W.; ZHOU, Y.; HU, Z.; LU, L. Microdissection and molecular manipulation of single chromosomes in woody fruit trees with small chromosomes using pomelo (*Citrus grandis*) as a model: I. Construction of single chromosomal DNA libraries. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, DE, v. 108, p. 1366-1370, 2004b.
- ITO, Y.; OMURA, M.; NESUME, H. Improvement of chromosome observation methods for Citrus. In: HAYASHI, T.; OMURA, M.; SCOTT, N. S. (Ed.). **Techniques on gene diagnosis and breeding**. Tsukuba: FTRS, 1993. p. 31-38.
- IWAMASA, M.; NITO, N. Cytogenetics and the evolution of modern cultivated *Citrus*. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 6., 1988, Weikersheim. **Proceedings...** Weikersheim: Margraf Scientific Books, 1988. p. 265-275.
- KANG, S. K.; LEE, D. H.; AN, H. Y.; PARK, J. H.; YUN, S. H.; MOON, Y. E.; BANG, J. W.; HUR, Y.; HOE KOO, D. H. Extensive chromosomal polymorphism revealed by ribosomal DNA and satellite DNA loci in 13 *Citrus* species. **Molecules and Cells**, Kangnam-ku, v. 26, p. 319-322, 2008.
- KITAJIMA, A.; YAMASAKI, A.; HABU, T.; PREEDASUTTIJIT, B.; HASEGAWA, K. Chromosome identification and karyotyping of Satsuma mandarin by genomic in situ hybridization. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Osaka, v. 132, p. 836-841, 2007.
- LEE, L. S. *Citrus* polyploid origin and potential for cultivar improvement. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 39, p. 735-747, 1988.
- LIANG, G. Studies on the Giemsa C-banding patterns of some *Citrus* and its related genera. **Acta Genetica Sinica**, Peking, CN, v. 15, p. 409-415, 1988.
- LIU, J.; DENG, X. Production of hybrid calluses via donor-recipient fusion between *Microcitrus papuana* and *Citrus sinensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 59, p. 81-87, 1999.
- LONGLEY, A. E. Polycarpy, polyspory and polyploidy in *Citrus* and *Citrus* relatives. **Journal of the Washington Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 15, p. 347-351, 1925.
- MATSUYAMA, T.; AKIHAMA, T.; ITO, Y.; OMURA, M.; FUKUI, K. Characterization of heterochromatic regions in 'Trovita' orange (*Citrus sinensis* Osbeck) chromosomes by the fluorescent staining and FISH method. **Genome**, Ottawa, CA, v. 39, p. 941-945, 1996.
- MATSUYAMA, T.; AKIHAMA, T.; ITO, Y.; OMURA, M.; FUKUI, K. Distribution of TGG repeat-related sequences in 'Trovita' orange (*Citrus sinensis* Osbeck) chromosomes. **Genome**, Ottawa, CA, v. 42, p. 1251-1254, 1999.
- MEDINA-FILHO, H. P.; BORDIGNON, R.; BALLVÉ, R. M. L. Sunkifolias and Buxisunkis: sexually obtained reciprocal hybrids of *Citrus sunki* x *Severinia buxifolia*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 21, p. 129-133, 1998.
- MELO, N. F.; GUERRA, M. Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. **Annals of Botany**, Oxford, v. 92, p. 309-316, 2003.
- MENDES, S.; MORAES, A. P.; MIRKOV, T. E.; PEDROSA-HARAND, A. Chromosome homeologies and high variation in heterochromatin distribution between *Citrus* L. and *Poncirus* Raf. as evidenced by comparative cytogenetic mapping. **Chromosome Research**, Oxford, v. 19, p. 521-530, 2011.

- MERCIER, R.; GRELON, M. Meiosis in plants: ten years of gene discovery. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 120, p. 281-290, 2008.
- MIRANDA, M.; IKEDA, F.; ENDO, T.; MORIGUCHI, T.; OMURA, M. Chromosome markers and alterations in mitotic cells from interspecific *Citrus* somatic hybrids analysed by fluorochrome staining. **Plant Cell Reports**, Berlin, DE, v. 16, p. 807-812, 1997b.
- MIRANDA, M.; IKEDA, F.; ENDO, T.; MORIGUCHI, T.; OMURA, M. Comparative analysis on the distribution of heterochromatin in *Citrus*, *Poncirus* and *Fortunella* chromosomes. **Chromosome Research**, Leicester, v. 5, p. 86-92, 1997a.
- MIRANDA, M.; IKEDA, F.; ENDO, T.; MORIGUCHI, T.; OMURA, M. rDNA sites and heterochromatin in meiwai kumquat (*Fortunella crassifolia* Swing.) chromosomes revealed by FISH and CMA/DAPI staining. **Caryologia**, Firenze, v. 50, p. 333-340, 1997c.
- MOORE, G. A. Oranges and lemons: clues to the taxonomy of *Citrus* from molecular markers. **Trends in Genetics**, Amsterdam, NL, v. 17, p. 536-540, 2001.
- MORAES, A. P.; LEMOS, R. R.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; SOARES-FILHO, W. dos S.; GUERRA, M. Chromosomal markers distinguish hybrids and non-hybrid accessions of mandarin. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 119, p. 275-281, 2007a.
- MORAES, A. P.; MIRKOV, T. E.; GUERRA, M. Mapping the chromosomes of *Poncirus trifoliata* Raf. by BAC-FISH. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 121, p. 277-281, 2008.
- MORAES, A. P.; SOARES-FILHO, W. S.; GUERRA, M. Karyotype diversity and the origin of grapefruit. **Chromosome Research**, Leicester, v. 15, p. 115-121, 2007b.
- MORTON, C. Phylogenetic relationships of the Aurantioideae (Rutaceae) based on the nuclear ribosomal DNA ITS region and three non coding chloroplast DNA regions, atpB-rbcl spacer, rps16, and trnL-trnF. **Organisms Diversity & Evolution**, Pittsburgh, v. 9, p. 52-68, 2009.
- MOSCOSO, C. G.; SHAMBULINGAPPA, K. G. Cytological studies on chironja. **Journal of Agriculture**, Melbourne, v. 56, p. 426-431, 1972.
- NAITHANI, S. P.; RAGHUVANSHI, S. S. A preliminary meiotic study in *Citrus assamensis* - a structural hybrid. **Naturwissenschaften**, Berlin, DE, v. 45, p. 95, 1958a.
- NAITHANI, S. P.; RAGHUVANSHI, S. S. Cytogenetical studies in *Citrus*: Parte I. **Genetica**, The Hague, v. 33, p. 301-312, 1963.
- NAITHANI, S. P.; RAGHUVANSHI, S. S. Cytogenetical studies in the genus *Citrus*. **Nature**, London, GB, v. 181, p. 1406-1407, 1958b.
- NICOLOSI, E. Origin and taxonomy. In: KHAN, I. A. (Ed.). **Citrus genetics, breeding and biotechnology**. Wallingford: CABI International, 2007. p. 19-44.
- OHRI, D.; KUMAR, A. Nuclear DNA amounts in some tropical hardwoods. **Caryologia**, Firenze, v. 39, p. 303-307, 1986.
- OIYAMA, I.; OKUDAI, N.; TAJAHARA, T. Ploidy levels of seedlings obtained from 2X x 4X crosses in *Citrus*. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, Tsukuba, v. 1, p. 32-34, 1981.
- OLIVEIRA, A. C. de; BASTIANEL, M.; CRISTOFANI-YALY, M.; AMARAL, A. M. do; MACHADO, M. A. Development of genetic maps of the citrus varieties 'Murcott' tangor and 'Pêra' sweet orange by using fluorescent AFLP markers. **Journal of Applied Genetics**, Poznań, v. 48, p. 219-231, 2007.
- OLLITRAULT, P.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. Application of flow cytometry for *Citrus* genetics and breeding. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE CONGRESS, 1., 1994, Catania. **Proceedings...** Catania: MSC Congress, 1994. p. 93-198.
- OPPENHEIM, J. D.; FRANKEL, O. H. Investigations into the fertilization of the "Jaffa-Orange". **Genetica**, The Hague, v. 11, p. 369-374, 1929.
- PEDROSA, A.; GUERRA, M.; SOARES FILHO, W. dos S. An hierarchy of activation of nucleolar organizer regions in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. **Cytobios**, Cambridge, v. 92, p. 43-51, 1997.
- PEDROSA, A.; SCHWEIZER, D.; GUERRA, M. Cytological heterozygosity and the hybrid origin of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, DE, v. 100, p. 361-367, 2000.
- PEDROSA-HARAND, A.; ALMEIDA, C. C. S.; MOSIOLECK, M.; BLAIR, M. W.; SCHWEIZER, D.; GUERRA, M. Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris*) evolution. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, DE, v. 112, p. 924-933, 2006.

- PREEDASUTTIJIT, B.; KITAJIMA, A.; YAMASAKI, A.; OGATA, T.; HASEGAWA, K. Chromosome identification and characterization in trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) by CMA and PI/DAPI staining and GISH. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Kamikyoku, v. 76, p. 197-204, 2007.
- PUERTAS, M. J.; NARANJO, T. (Ed.). **Plant cytogenetics**. Basel: Karger, 2005. 408 p.
- PUERTAS, M. J.; NARANJO, T. (Ed.). **Plant cytogenetics**. Basel: Karger, 2008. 398 p.
- RAGHUVANSHI, S. S. Cytogenetical studies in genus *Citrus*: *Citrus assamensis*. **Caryologia**, Firenze, v. 15, p. 143-149, 1962a.
- RAGHUVANSHI, S. S. Cytogenetical studies in genus *Citrus*: IV. Evolution in genus *Citrus*. **Cytologia**, Tokyo, JP, v. 27, p. 172-188, 1962b.
- ROOSE, M. L.; SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, J. S. The chromosomes of *Citrus* and *Poncirus* species and hybrids: identification of characteristic chromosomes and physical mapping of rDNA loci using *in situ* hybridization and fluorochrome banding. **Journal of Heredity**, Washington, DC, v. 89, p. 83-86, 1998.
- SAMUEL, R.; EHRENDORFER, F.; CHASE, M. W.; GREGER, H. Phylogenetic analysis of Aurantioideae (Rutaceae) based on non-coding plastid DNA sequences and phytochemical features. **Plant Biology**, New York, v. 3, p. 77-87, 2001.
- SELLITO-BOAVENTURA, Y. M.; PIO, R. M. Análise citogenética em três cultivares de laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 12, p. 117-126, 1989.
- SHARMA, A. K.; BAL, A. K. Chromosome studies in *Citrus*. I. **Agronomia Lusitana**, Oeiras, v. 19, p. 101-126, 1957.
- SILVA, M. F. G. F. da; GOTTLIEB, O. R.; EHRENDORFER, F. Chemosystematics of the Rutaceae: suggestions for a more natural taxonomy and evolutionary interpretation of the family. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, AT, v. 161, p. 97-134, 1988.
- SILVA, S. C. **Homeologia e evolução dos cromossomos marcadores dos citros**. 2012. 180 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- SOOST, R. K.; CAMERON, J. W. 'Melogold', a triploid pummelo-grapefruit hybrid. **HortScience**, Alexandria, v. 20, p. 1134-1135, 1985.
- SOOST, R. K.; CAMERON, J. W. 'Oroblanco', a triploid pummelo-grapefruit hybrid. **HortScience**, Alexandria, v. 15, p. 667-669, 1980.
- STACE, H. M.; ARMSTRONG, J. A.; JAMES, S. H. Cytoevolutionary patterns in Rutaceae. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, AT, v. 187, p. 1-28, 1993.
- STARRANTINO, A.; RECUPERO, G. F. *Citrus* hybrids obtained in vitro from 2x females X 4x males. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, Tsukuba, v. 1, p. 31-32, 1981.
- SWINGLE, W. T. The botany of *Citrus* and its wild relatives. In: REUTHER, W.; WEBBER, H. J.; BATCHELOR, L. D. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1967. v. 1, p. 190-430.
- SYBENGA, J. **Cytogenetics in plant breeding**. Berlin, DE: Springer-Verlag, 1993. 469 p.
- TALON, M.; GMITTER JUNIOR, F. G. *Citrus* genomics. **International Journal of Plant Genomics**, v. 2008, p. 528-361, 2008.
- TSUCHIYA, T.; GUPTA, P. K. **Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution**. Amsterdam, NL: Elsevier, 1991. Part B, 639 p.
- VAIO, M.; SPERANZA, P.; VALLS, J. F.; GUERRA, M.; MAZZELLA, C. Localization of the 5S and 45S rDNA sites and cpDNA sequence analysis in species of the Quadrifaria group of *Paspalum* (Poaceae, Paniceae). **Annals of Botany**, Oxford, v. 96, p. 191-200, 2005.
- VARDI, A.; SPIEGEL-ROY, P. Gene-controlled meiosis in *Citrus reticulata*. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, Tsukuba, v. 1, p. 26-27, 1981.
- WAKANA, A.; IWAMASA, M.; UEMOTO, S. Seed development in relation to ploidy of zygotic embryo and endosperm in polyembryonic *Citrus*. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, Tsukuba, v. 1, p. 35-39, 1981.
- WEI, W.; CHENG, Y.; DUAN, Y. Studies on the evolution of *Citrus* based on karyotype and C-banding patterns. **Acta Horticulturae Sinica**, Beijing, CN, v. 15, p. 223-228, 1988.
- WU, J.; FERGUSON, A. R.; MOONEY, P. A. Allotetraploid hybrids produced by protoplast fusion for seedless triploid *Citrus* breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 41, p. 229-235, 2005.

YAMAMOTO, M.; ABKENAR, A. A.; MATSUMOTO, M.; KUBO, T.; TOMINAGA, S. CMA staining analysis of chromosomes in *Citrus* relatives, *Clymenia*, *Eremocitrus* and *Microcitrus*. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Chikusa, v. 77, p. 24-27, 2008.

YAMAMOTO, M.; ABKENAR, A. A.; MATSUMOTO, M.; KUBO, T.; TOMINAGA, S. Physical mapping of the 5S ribosomal RNA gene in Citreae of Aurantioideae species using fluorescence *in situ* hybridization. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Chikusa, v. 78, p. 294-299, 2009.

YAMAMOTO, M.; ABKENAR, A. A.; MATSUMOTO, M.; NESUMI, H.; YOSHIDA, T.; KUNIGA, T.; KUBO, T.; TOMINAGA, S. CMA banding patterns of chromosomes in major *Citrus* species. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Chikusa, v. 76, p. 36-40, 2007.

YAMAMOTO, M.; KUBO, T.; TOMINAGA, S. CMA Banding patterns of chromosome of mid- and late-maturing *Citrus* and acid *Citrus* grown in Japan. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Chikusa, v. 74, p. 476-478, 2005.

YAMAMOTO, M.; TOMINAGA, S. Chromosome identification in haploid clementine (*Citrus clementina* Hort. ex Tanaka) by fluorescent staining. **Science Horticulturae**, Amsterdam, NL, v. 101, p. 201-206, 2004a.

YAMAMOTO, M.; TOMINAGA, S. CMA banding pattern of chromosomes is useful for the identification of chromosome doubling in haploid citrus. **Breeding Science**, Tsukuba, v. 54, p. 351-354, 2004b.

YAMAMOTO, M.; TOMINAGA, S. High chromosomal variability of mandarins (*Citrus* ssp.) revealed by CMA banding. **Euphytica**, Wageningen, v. 129, p. 267-274, 2003.

YANG, X.; KITAJIMA, A.; HASEGAWA, K. Chromosome pairing set and the presence of unreduced gametes explain the possible origin of polyploid progenies from the diploids 'Tosa-Buntan' x 'Suisho-Buntan' pummelo. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Chikusa, v. 71, p. 538-543, 2002.

YASUDA, K.; YAHATA, M.; SHIGYO, M.; MATSUMOTO, R.; YABUYA, T.; KUNITAKE, H. Identification of parental chromosomes in sexual intergeneric hybrid progenies between *Citrus* cultivar 'Nanpu' tangor and *Citropsis schweinfurthii* in the subfamily Aurantioideae. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Chikusa, v. 79, p. 129-134, 2010.

# Recursos genéticos

Francisco Ricardo Ferreira  
Izumé Rita Imaculada Santos  
Walter dos Santos Soares Filho  
Almir Pinto da Cunha Sobrinho  
Orlando Sampaio Passos  
Antônio da Silva Souza

## Introdução

Os recursos genéticos dos citros incluem todas as espécies do gênero *Citrus* (Linnaeus), além de outros gêneros correlatos, tais como: *Severinia* (Tenore), *Pleiospermium* (Engl.) Swingle, *Burkillanthus* Swingle, *Limnocitrus* Swingle e *Hesperethusa* M. Roem., que são primitivos; *Citropsis* [(Engl.) Swingle & M. Kellerm.] e *Atlantia* (Corrêa) mais evoluídos que os anteriores; *Poncirus* (Rafinesque), *Fortunella* Swingle, *Microcitrus* Swingle, *Eremocitrus* Swingle e *Clymenia* Swingle, estes últimos, juntamente com *Citrus*, formam o grupo dos cítricos verdadeiros, por produzirem frutos semelhantes à laranja ou ao limão (ORTIZ MARCIDE, 1985; SWINGLE, 1967). Portanto, todos esses gêneros e essas espécies pertencem ao pool gênico de um banco de germoplasma de citros.

As espécies de *Citrus*, ao contrário do que se verifica no gênero *Poncirus*, que é decíduo, mantêm suas folhas durante todas as estações do ano, sendo extensivamente cultivadas tanto em regiões tropicais como subtropicais, ocupando, no mercado internacional, a segunda posição no ranking da exploração comercial de frutas. Estão envolvidos em sua produção, seu comércio e consumo de frutas frescas e suco processado 130 países. Nesse contexto, as laranjeiras doces [*C. sinensis* (L.) Osbeck] contribuem com, aproximadamente, 60% do volume total da produção, seguidas das tangerineiras (diversas espécies) com algo em torno de 21%, e limoeiros [*C. limon* (L.) Burm. f.], limeiras doces (*C. limettioides* Tanaka) e limeiras ácidas [*C. aurantiifolia* (Christm.) Swingle e *C. latifolia* (Yu. Tanaka)] com cerca de 12% (FAO, 2013).

O Brasil, que se destaca como segundo produtor mundial de citros, perdendo apenas para a China (FAO, 2013), apresenta pomares distribuídos por todo seu território, em áreas de clima tropical, subtropical e temperado. Mais de 75% de sua citricultura concentram-se no Estado de São Paulo, região Sudeste, seguido pelos estados da Bahia, de Minas Gerais e do Paraná. A Bahia e o Estado de Sergipe dividem a liderança de produção na região Nordeste do País (IBGE, 2013).

Apesar de sua pujança, a citricultura brasileira mostra-se muito vulnerável, em razão da estreita base genética de seus pomares, assentados sobre um número extremamente limitado de variedades, havendo um predomínio do emprego de copas de laranja 'Pera' (*C. sinensis*) e uma concentração ainda maior no tocante ao uso do limoeiro 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck), como porta-enxerto. Esse quadro indica uma urgente necessidade de novas variedades, particularmente de porta-enxertos adaptados a condições de estresse de natureza tanto biótica como abiótica.

## Variabilidade genética

As espécies cítricas são heterozigotas, podendo sua maioria ser propagada vegetativamente por meio de sementes, em virtude da ocorrência do fenômeno da poliembrionia associado à apomixia, particularmente à embrionia nucelar. Assim, plantas obtidas de sementes podem ser geneticamente idênticas ou distintas da planta-mãe, a depender de sua origem ser de natureza assexuada (nucelar) ou sexuada, respectivamente.

A poliembrionia, em conjunto com práticas de enxertia, comuns em citros, tem permitido a preservação de diversas formas cítricas, muitas de importância comercial, conforme salientado por Marin e Duran-Vila (1991). Deve-se atentar, porém, que, se por um lado a clonagem em citros permite a propagação de plantas de interesse comercial, em contrapartida o estímulo à uniformidade genética aumenta a vulnerabilidade da cultura, segundo já comentado. Desse modo, o manejo intencional da variabilidade genética disponível constitui importante ferramenta de sustentação da citricultura, à semelhança do que se verifica para as demais culturas, permitindo o desenvolvimento de novas variedades, sejam criadas com base em processos de hibridação, convencionais ou não, sejam obtidas mediante mutação, por vias naturais ou mesmo intencionais, bem como por intermédio de técnicas relacionadas à transgenia, entre outras associadas aos avanços da moderna biotecnologia.

A domesticação de plantas é uma clara manifestação da interferência humana relativamente ao manuseio dos recursos genéticos disponíveis no âmbito de uma dada espécie, grupo de espécies ou cultura. Ela depende diretamente da inteligência humana no que concerne ao direcionamento que se pretende dar a um dado processo de modificações genotípicas, visando à obtenção de indivíduos adequados à manifestação de características de interesse agrônomo, como alta produtividade e adaptação a ambientes perturbados por ações de natureza antrópica, ou seja, ambientes modificados pela ação do homem (FORD-LLOYD; JACKSON, 1986). O processo de domesticação de plantas cultivadas difere daquele concernente à evolução-seleção natural pelo fato de depender de sistemas reprodutivos desenvolvidos sob a interferência humana. Em passado remoto, a variabilidade genética foi explorada com base na simples intuição em relação a características fenotípicas de interesse, processando-se a seleção de indivíduos em conformidade com necessidades relacionadas à sobrevivência e ao desenvolvimento de comunidades humanas (WET; HARLAN, 1975). Referindo-se aos citros, notadamente às espécies do gênero *Citrus*, estas foram domesticadas há muitos

milênios. A diversidade genética desse grupo de plantas, entretanto, representada por variedades locais e parentes silvestres, vem desaparecendo rapidamente ao longo das décadas mais recentes.

O conjunto (*pool*) gênico associado a uma determinada cultura, incluindo todas as cultivares, parentes silvestres e espécies afins, podem ser dividido em três níveis (FAO, 1991; GIACOMETTI, 1991; HOYT, 1988, 1992):

- Conjunto gênico primário (CG-1): contém as formas domesticadas e formas silvestres da cultura, sendo seus indivíduos interférteis; a transferência de genes em hibridações dá-se sem dificuldades.
- Conjunto gênico secundário (CG-2): seus indivíduos podem ser cruzados com os de CG-1, porém muitos dos híbridos resultantes são estéreis; a transferência de genes para formas cultivadas é possível, contudo pode haver dificuldades.
- Conjunto gênico terciário (CG-3): constitui o limite extremo de alcance do potencial genético passível de ser explorado no melhoramento de uma dada cultura, sendo a transferência de genes para CG-1 possível somente mediante o emprego de técnicas não convencionais de melhoramento genético, como as de cultivo *in vitro* de embriões, fusão de protoplastos, duplicação do número cromossômico, transformação genética e utilização de espécies-ponte; os híbridos obtidos com CG-1 são estéreis.

Relativamente a algumas espécies e gêneros afins ao *Citrus*, Giacometti (1991), com base em estudos realizados por diversos autores, sugeriu, considerando um grupo limitado de espécies, os seguintes conjuntos gênicos:

- CG-1: *C. aurantiifolia*, *C. aurantium* L., *C. grandis* Osbeck, *C. jambhiri* Lush., *C. limettioides*, *C. limon*, *C. limonia*, *C. madurensis* Loureiro, *C. medica* L., *C. reticulata* Blanco, *C. reshni* hort. ex Tanaka, *C. sinensis*, *Fortunella* spp., *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.
- CG-2: *C. combara* Raf., *C. hystrix* DC., *C. ichangensis* Swingle, *C. latipes* (Swingle) Tanaka, *C. macroptera* Montrouz., *Microcitrus* spp.
- CG-3: *Atalantia* spp., *Citropsis* spp., *Clymenia* spp., *Eremocitrus* spp.

Chomchalow (1984) considera *Atalantia*, *Fortunella* e *Poncirus* os gêneros mais importantes dentre aqueles relacionados ao *Citrus*. Soares Filho et al. (1997, 2003) comentam que, entre os gêneros afins ao *Citrus*, merecem especial atenção *Poncirus*, *Microcitrus* e *Eremocitrus* em razão de seu potencial quanto ao desenvolvimento de novos porta-enxertos ananizantes e resistentes à gomose de *Phytophthora*; *Microcitrus* e *Eremocitrus*, além disso, podem possibilitar a criação de porta-enxertos adaptados a ambientes sujeitos a períodos prolongados de estresses hídricos.

## Coleções mundiais

Levantamento realizado pelo International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), apresentado no Diretório de Coleções de Germoplasma de Citros, informa que 60 países mantêm coleções de germoplasma de citros, as quais, em conjunto, conservam cerca de 23.500 acessos, incluindo duplicatas. As 40 maiores coleções localizam-se em 14 países e compreendem mais de 70% desse total de acessos (Tabela 1).

Apesar de as principais espécies de *Citrus* e de seus relativos serem nativos da Ásia (GIACOMETTI; FERREIRA, 1988), atualmente as principais fontes de introdução de germoplasma de citros encontram-se distribuídas por praticamente todas as áreas de clima tropical e subtropical, em diversos países, em razão da ampla dispersão da citricultura e das inúmeras coleções hoje existentes, conforme já relatado.

**Tabela 1.** Coleções de germoplasma de citros, em nível mundial, em 2002<sup>(1)</sup>.

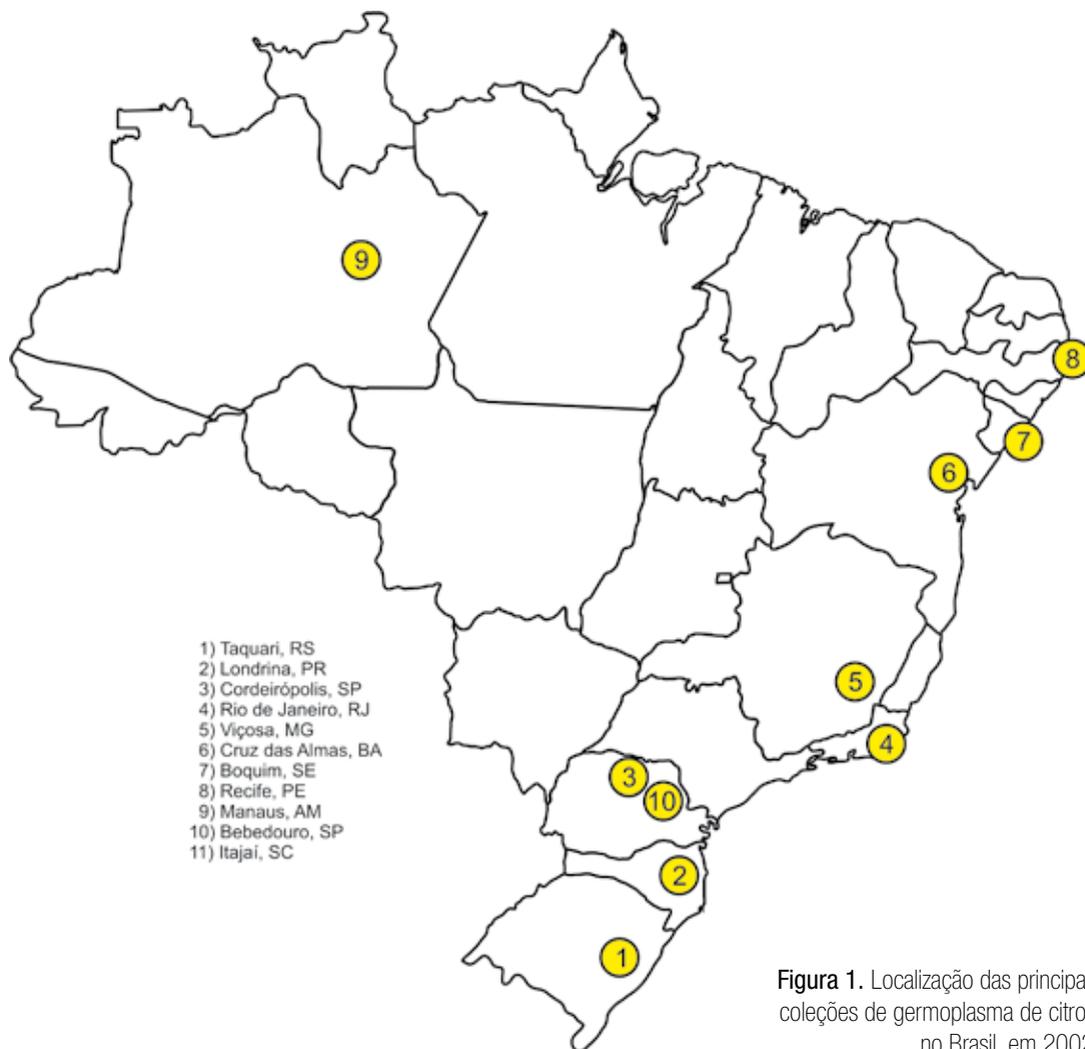
País	Número de coleções	Número de acessos
Brasil <sup>(2)</sup>	11	4.171
França	5	2.059
EUA	7	1.966
China	2	1.109
Japão	3	1.090
Turquia	2	1.071
África do Sul	1	1.005
Rússia	1	969
Argentina	1	925
Índia	4	801
Cuba	3	637
Tailândia	2	611
Marrocos	1	586
Austrália	2	566
Outros (46 países)	77	6.041
Total (60 países)	122	23.543

<sup>(1)</sup> Informação pessoal de Geo Coppens d'Eeckenbrugge; <sup>(2)</sup> Dados atualizados pelos autores.

## Coleções brasileiras

O Brasil possui diversas coleções de germoplasma de citros. A Figura 1 e a Tabela 2 permitem, respectivamente, uma visualização da distribuição geográfica e uma noção da variabilidade gené-

tica presente nelas, considerando aquelas mais representativas do País (FERREIRA, 1999; FERREIRA; SANTOS, 2002).



Conforme apresentado, as maiores coleções localizam-se em três condições ambientais distintas:

- Área tropical: região Nordeste, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, 12°40'S e 39°06'W, 226 m de altitude.
- Área subtropical: região Sudeste, Centro de Citricultura Sylvio Moreira (CCSM), atual Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros Sylvio Moreira – Centro Apta Citros Sylvio Moreira, vinculado ao Instituto Agrônomo (IAC), pertencente

à Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, Cordeirópolis, 22°32'S e 47°27'W, 639 m de altitude.

- Área subtropical a temperada: três coleções merecem destaque, a do Centro de Pesquisa de Fruticultura de Taquari (CPFT), vinculado à Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (Fepagro), Taquari, RS, 29°48'S e 51°49'W, 76 m de altitude, a da Estação Experimental de Itajaí, pertencente à Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A. (Epagri), Itajaí, 26°56'S e 48°45'W, 7 m de altitude, e a do Instituto Agrônômico do Paraná (Iapar), Londrina, 23°22'S e 51°10'W, 585 m de altitude.

A coleção do IAC – CCSM encontra-se geograficamente bem localizada, em ambiente de excelentes condições edafoclimáticas e com boa infraestrutura de pesquisa. Um contínuo programa de pesquisas fez desse centro de citricultura uma das instituições de maior conceito em estudos com citros em nível nacional e internacional. Uma das maiores e mais ricas coleções de citros do mundo contém ampla gama de cultivares, clones nucelares, espécies de *Citrus*, além de outros 12 gêneros afins a este. Laranjeiras doces e tangerineiras compõem mais de 50% do total de acessos (Tabela 2). Pode-se afirmar que essa coleção foi a mãe das demais coleções brasileiras de citros.

A Embrapa Mandioca e Fruticultura detém a maior coleção brasileira de citros sob condição tropical. Com um número de acessos superior a 700, tem servido de base ao desenvolvimento das

**Tabela 2.** Coleções de germoplasma de citros, no Brasil, em 2002.

Grupo de citros	Espécie	CNPMF <sup>(1)</sup>	CPFT <sup>(2)</sup>	Iapar <sup>(3)</sup>	CCSS <sup>(4)</sup>	Epagri <sup>(5)</sup>	Outra coleção
Laranja doce	<i>Citrus sinensis</i>	322	116	194	684	118	235
Laranja azeda	<i>C. aurantium</i>	10	3	2	48	3	-
Tangerina	<i>C. reticulata</i>	60	59	46	381	77	190
Lima ácida	<i>C. aurantifolia</i>	25	13	7	56	-	38
Limão verdadeiro	<i>C. limon</i>	16	52	9	145	20	2
Limão 'Cravo'	<i>C. limonia</i>	5	3	2	62	6	-
Limão 'Rugoso'	<i>C. jambhiri</i>	12	5	3	14	4	-
Pomelo	<i>C. paradisi</i>	44	8	8	66	2	31
Toranja	<i>C. grandis</i>	3	3	2	44	-	-
Trifoliata	<i>Poncirus trifoliata</i>	9	134	3	214	20	12
Diversos	± 30 espécies e diversos híbridos	210	-	93	169	20	29
Total	± 40 espécies	716	396	369	1.883	270	537

<sup>(1)</sup> Embrapa Mandioca e Fruticultura; <sup>(2)</sup> Centro de Pesquisa de Fruticultura de Taquari; <sup>(3)</sup> Instituto Agrônômico do Paraná; <sup>(4)</sup> Centro de Citricultura Sylvio Moreira, atual Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros Sylvio Moreira - Centro APTA Citros Sylvio Moreira, vinculado ao Instituto Agrônômico do Estado de São Paulo (IAC); <sup>(5)</sup> Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A.

Fonte: Ferreira (1999), Passos et al. (2000) e comunicações pessoais com Jorgino Pompeu Júnior, Almir Pinto da Cunha Sobrinho, Elizabeth L. S. Souza, Zuleide H. Tazima, Luiz Carlos Donadio e Osívino Leonardo Koller.

citriculturas do Nordeste e Norte do País. Referência nacional e internacional como coleção de variedades de *Citrus* e relativos deste em área tropical, nela destaca-se a presença de cerca de 100 clones de laranjeira 'Bahia' (*C. sinensis*), principal cultivar de mesa em nível mundial, explorada na região desde os idos de 1822. Nas últimas décadas, outras variedades têm tomado os espaços da laranja de 'Umbigo', como também é conhecida a 'Bahia', particularmente a laranjeira 'Pêra', ao lado de outras variedades de laranjeira doce, como 'Natal' e 'Valência', em razão de sua adequação à indústria de processamento de frutos, conforme se verifica pela boa qualidade e alta porcentagem de suco que apresentam em climas tropicais (GIACOMETTI, 1977).

As coleções do CPFT, da Epagri e do Iapar, localizadas na região Sul do Brasil, em condições climáticas de subtropicais a temperadas, contêm principalmente laranjeiras doces, tangerineiras, incluindo mexeriqueiras (*C. deliciosa* Ten.), e limoeiros (*C. limon*), além de diversas seleções de *P. trifoliata* e de híbridos dessa espécie. Segundo Passos et al. (2000), o Rio Grande do Sul é o único estado brasileiro onde a combinação *P. trifoliata* sob copa de laranjeira 'Valência' é extensivamente utilizada.

Outras seis coleções de menor expressão vêm sendo mantidas pelas seguintes instituições:

- Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro (EECB), com 283 acessos.
- Departamento de Desenvolvimento Agropecuário de Sergipe (Deagro), com 99 acessos.
- Universidade Federal de Viçosa (UFV), com 50 acessos.
- Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), com 44 acessos.
- Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio de Janeiro (Pesagro), com 32 acessos.
- Embrapa Amazônia Ocidental, com 29 acessos.

Essas coleções são mais especializadas em variedades comerciais, particularmente de laranjeiras doces e tangerineiras. Embora essas instituições, à exceção da EECB, não possuam equipes de pesquisadores com dedicação principal aos citros, deve-se mencionar o importante papel que desempenham na citricultura das regiões em que se localizam (PASSOS et al., 2000).

## Intercâmbio de germoplasma

Uma descrição da legislação brasileira que regulamenta a introdução de plantas e ações de quarentena, considerando o período de 1934 até os dias atuais, pode ser encontrada em Ferreira et al. (2001). Exige-se, para a introdução de plantas ou partes de plantas no País, a emissão de uma autorização específica pelo Departamento Nacional de Defesa Fitossanitária, pertencente ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa). Essa autorização compreende o preenchimento de um formulário apropriado a essa finalidade, acompanhado de uma justificativa técnica elaborada pelo curador da espécie envolvida no processo de intercâmbio de germoplasma. Além disso, também é requerida uma análise de riscos relativos à introdução de pragas exóticas,

associadas ao germoplasma em questão (BATISTA et al., 1999; MARQUES et al., 1995). Segundo delegação do Mapa, emitida em 1977 (NÓBREGA, 1987), a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia é autorizada a introduzir e efetuar procedimentos de quarentena, relativamente a qualquer material vegetal, no tocante a propósitos de pesquisa.

Quando solicitam a introdução de germoplasma na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, o curador responsável verifica se o material de interesse encontra-se disponível em algum banco ativo de germoplasma do País. Nas situações de indisponibilidade, o curador indica uma ou mais fontes estrangeiras de fornecimento do germoplasma de interesse, dando-se início ao processo de importação, que inclui o preenchimento de um formulário específico para autorização dessa operação, que deve ser fundamentada em uma justificativa técnica preparada pelo curador. Após a conclusão da autorização, o técnico responsável pelo intercâmbio de materiais vegetais emite a etiqueta de permissão de importação e a carta de solicitação de germoplasma.

Além da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, outras instituições podem ser credenciadas pelo Mapa no sentido de efetuar a importação e quarentena de germoplasma vegetal. Atualmente, também estão credenciados o Instituto Agrônomo do Estado de São Paulo (IAC), o Instituto Biológico do Estado de São Paulo (IB) e a Copersucar União, dentre outras instituições.

O intercâmbio de germoplasma de citros, via de regra, ocorre sob a forma vegetativa, compreendendo particularmente borbulhas para enxertia, sendo estas altamente perecíveis. Desse modo, a pronta enxertia das borbulhas dos acessos que se está introduzindo é uma prática de extrema importância. Inicialmente, os ramos contendo as borbulhas são inspecionados quanto à presença de pragas, principalmente insetos, ácaros e fungos. Após essa operação, o material propagativo é enxertado sob condições controladas, em casa de vegetação. As partes remanescentes dos ramos utilizados, dos quais as borbulhas foram retiradas, são encaminhadas a uma inspeção dirigida à identificação de nematoides. Esse procedimento é realizado mediante a submersão dos ramos em água destilada, por duas horas, seguida de análise líquida. Posteriormente, as plantas enxertadas, mantidas no quarentenário, passam por testes visando à detecção de doenças causadas por bactérias, micoplasmas, vírus e/ou viroides, e, caso seja necessário, são tratadas por calor ou quimicamente para eliminação de eventuais agentes patogênicos.

O porta-enxerto utilizado nos procedimentos de introdução de germoplasma de citros é o limoeiro 'Cravo', em razão de induzir um rápido desenvolvimento às borbulhas enxertadas, relativamente à maioria das variedades conhecidas.

O germoplasma de citros também pode ser introduzido por intermédio de sementes ou de culturas in vitro, obedecendo-se às restrições de controle previstas na legislação brasileira. O intercâmbio de germoplasma in vitro constitui uma das formas mais seguras de introdução de variedades. Cabe mencionar que a técnica de cultura de tecidos, associada à termoterapia, tem sido utilizada no tratamento de limpeza de acessos, sob inspeção de quarentena, contaminados por patógenos (vírus, bactérias e nematoides). Os laboratórios de quarentena responsabilizam-se por

atividades que incluem: inspeção fitossanitária, erradicação de pragas e liberação de materiais de propagação livres de pragas.

O Sistema Brasileiro de Informações de Recursos Genéticos (Sibrargen) funciona como elemento de ligação entre a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e outras unidades do sistema Embrapa e/ou instituições de pesquisa agropecuária. Responsabiliza-se pelo armazenamento e processamento de dados de recursos genéticos. O curador de germoplasma confere aos acessos introduzidos uma numeração identificadora do material (BRA), que é registrada na base de dados do Sibrargen.

Ao longo dos últimos 10 anos, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia introduziu no Brasil mais de 430 acessos de citros, provenientes de vários países, particularmente da Europa e dos Estados Unidos da América. Cabe a essa unidade da Embrapa, conforme já indicado, a responsabilidade pelas operações de intercâmbio, quarentena e distribuição de germoplasma livre de pragas.

Ferreira et al. (2001) enfatizam que a movimentação segura de germoplasma de citros deve ser de responsabilidade tanto das agências de introdução e quarentena como dos melhoristas de planta, coletores de germoplasma e importadores comerciais, entre outros agentes relacionados a atividades dessa natureza, dentro e fora do País. Cabe acrescentar que é dever de todo pesquisador ligado à agropecuária notificar as agências de quarentena relativamente às atividades de importação de germoplasma, obedecendo às orientações da legislação vigente acerca do assunto.

## Conservação de germoplasma

A conservação de germoplasma de variedades comerciais, copas e porta-enxertos, bem como de relativos selvagens de *Citrus*, incluindo gêneros afins a este, é essencial, porque as coleções resultantes dessa ação constituem as bases de estudos genéticos e de programas de melhoramento genético, sejam convencionais ou apoiados em métodos relacionados à moderna biotecnologia.

## Conservação em campo

Tradicionalmente, o germoplasma de citros tem sido preservado sob a forma de plantas cultivadas tanto em campo como em casas de vegetação. A conservação em campo de culturas arbóreas, a exemplo dos citros, implica em algumas vantagens, tais como a manutenção de material botânico disponível a avaliações agronômicas e utilização em programas de melhoramento genético, facilitando os trabalhos de avaliação e caracterização de germoplasma. Essas coleções, por outro lado, são constantemente expostas à ação de pragas (insetos e doenças), além de estresses abióticos, que podem levar a perdas de vigor e, eventualmente, à morte de plantas, ou à necessidade de eliminação de acessos do banco ativo de germoplasma. Para complicar esse cenário, a expansão das

fronteiras agrícola e urbana, associada aos altos custos de manutenção dessas coleções, constituem riscos que não podem ser desconsiderados (DURAN-VILA, 1995).

Em geral, a conservação de germoplasma em campo baseia-se na clonagem dos acessos, destacando-se, no Brasil, o limoeiro ‘Cravo’ como o porta-enxerto mais utilizado.

## Conservação por meio de sementes e in vitro

A conservação de sementes no estado dessecado, a temperaturas abaixo de 0 °C, é o modo tradicional de preservação de germoplasma vegetal. Sementes que apresentam adequação a esse tipo de conservação são denominadas ortodoxas (ROBERTS, 1973). Para muitas espécies de *Citrus*, a conservação de sementes não é uma opção viável, por diversas razões: a) o sistema usual de propagação clonal de citros é incompatível com a propagação por sementes; b) algumas variedades não produzem sementes; e c) as sementes de muitas espécies de *Citrus* são classificadas como intermediárias, entre ortodoxas e recalcitrantes (ELLIS et al., 1990, 1991). As sementes intermediárias são sensíveis à dessecação e a baixas temperaturas, apresentando expressivas perdas de viabilidade no decorrer do tempo de armazenamento (HONG; ELLIS, 1995). Assim, métodos alternativos de preservação a longo prazo de acessos de citros de interesse, sob condições ambientais controladas, a baixos custos e com garantia de alta estabilidade genética, necessitam ser desenvolvidos.

A possibilidade de obtenção de plantas inteiras a partir de células isoladas, tecidos e órgãos, mediante a aplicação de técnicas de cultura de tecidos, levou ao estabelecimento de bancos de germoplasma in vitro, relativamente a muitas espécies cultivadas. Essa técnica constitui alternativa segura para a conservação de espécies que possuem sementes recalcitrantes, bem como daquelas de propagação vegetativa, como árvores frutíferas e culturas do grupo de raízes e tubérculos, comumente mantidas em bancos ativos de germoplasma, em campo (ENGELMANN, 1991).

Entre as vantagens da conservação de recursos genéticos in vitro, tem-se: a) o material botânico indexado pode ser manuseado sob condições assépticas; b) o intercâmbio de germoplasma, em nível nacional e internacional, é facilitado; e c) a necessidade de espaços para o armazenamento do germoplasma em conservação é grandemente reduzida. Métodos de conservação baseados em cultura de tecidos têm sido desenvolvidos para muitas espécies e variedades de citros (MARIN; DURAN-VILA, 1991).

Deve-se atentar, porém, para o fato de que a necessidade de frequentes subcultivos traz desvantagens à conservação de germoplasma in vitro, como: a) contaminações por microrganismos decorrentes do manuseio frequente das culturas; b) longo período de tempo necessário à obtenção de plantas maduras, em idade de reprodução; c) aumento dos custos de manutenção do germoplasma; e d) possibilidade de ocorrência de variações somaclonais, em razão da falta de controle da variabilidade genética ou epigenética que surge em processos de regeneração in vitro de plantas obtidas, de modo adventício, a partir de sistemas desorganizados, a exemplo de culturas de células e

de calos (LARKIN; SCOWCROFT, 1981). As variações somaclonais podem ser evitadas, contudo, desde que órgãos organizados de plantas sejam utilizados, tais como sementes íntegras, eixos de embriões, gemas axilares, meristemas e ápices caulinares. Sob condições adequadas, esses explantes podem permitir a recuperação de plantas completas, com riscos mínimos de manifestação de variações somaclonais.

Em resumo, apesar de suas vantagens, os métodos de armazenamento de germoplasma in vitro, sob condições lentas de crescimento, não constituem um procedimento viável de conservação a longo prazo, somente podendo assegurar a possibilidade de conservação de germoplasma a curto ou médio prazos, ou seja, durante 6 a 12 meses, a depender do método empregado e da espécie de planta considerada.

Períodos longos de armazenamento de germoplasma são altamente desejáveis, pois reduzem os custos de mão de obra, os riscos de perdas por contaminações e de erros resultantes de um manuseio frequente dos cultivos, além dos riscos de ocorrência de variações somaclonais. Assim, o desenvolvimento de métodos satisfatórios de armazenamento a longo prazo, adequados a estruturas organizadas, particularmente meristemas, representa objetivo de especial interesse em citros. Em anos recentes, tem sido crescente o esforço pelo desenvolvimento de técnicas de conservação criogênica.

## Criopreservação

As técnicas de criopreservação constituem a alternativa mais promissora à preservação de coleções vivas (SANTOS, 2000). Referem-se ao armazenamento de material biológico no vapor ou na fase líquida do nitrogênio, nas ultrabaixas temperaturas de  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente (SANTOS, 2001). A essas temperaturas, as funções metabólicas das células vivas são grandemente reduzidas ou completamente paralisadas, possibilitando a preservação de organismos nesse estado durante longos períodos de tempo, com garantia de estabilidade genética e viabilidade, associada a espaços mínimos de armazenamento e a baixos custos de manutenção. Pesquisas relativas à aplicação de técnicas de criopreservação ainda restringem-se a poucas iniciativas em *Citrus*, realizadas com base no emprego de sementes inteiras, sementes sem os integumentos, óvulos, embriões somáticos ou células nucelares.

Estudos dirigidos a avaliações da tolerância à dessecação e ao congelamento de eixos de embriões e gemas laterais de espécies de *Citrus* têm sido realizados pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. O principal objetivo dessas ações é o de desenvolvimento de protocolos de criopreservação para germoplasma de citros. Eixos de embriões de *C. sinensis* foram criopreservados com sucesso, mediante o uso de diferentes métodos. Obteve-se entre 60% e 80% de sobrevivência na criopreservação de eixos de embriões em nitrogênio líquido, dependendo do pré-tratamento

empregado. Pesquisas vêm sendo conduzidas no sentido de desenvolver protocolos para outras espécies de *Citrus* e para outros tecidos vegetativos.

## Considerações finais

As frutas cítricas, particularmente as laranjeiras doces, tangerineiras e limoeiros, estão entre os mais importantes produtos do agronegócio em nível mundial, destacando-se o Brasil com principal produtor. Incontestavelmente, a sustentação da indústria dos citros depende de programas bem estruturados de melhoramento genético, os quais têm como base a disponibilidade da variabilidade genética necessária ao alcance dos objetivos pretendidos por eles, variabilidade esta que deve ser organizada e explorada mediante a constituição de coleções de germoplasma. Diversas instituições brasileiras (Figura 1, Tabela 2) vêm mantendo, em campo, bancos ativos de germoplasma de citros, o que é estratégico para que o Brasil sustente sua posição de líder mundial.

Ao contrário do que se verifica em outras culturas, cujas sementes são de natureza ortodoxa, a exemplo de muitas graníferas, em citros a conservação de germoplasma via sementes não é viável, em razão do fato de que estas não mantêm sua viabilidade por períodos prolongados de tempo. Pesquisas dirigidas à criopreservação em nitrogênio líquido vêm sendo realizadas, visando desenvolver técnicas de preservação de germoplasma de citros a longo prazo.

Relativamente ao intercâmbio de germoplasma, este deve ser conduzido em conformidade com as leis nacionais e internacionais que regulamentam essa atividade.

## Referências

- BATISTA, M. F.; FONSECA, J. N. L.; MENDES, M. A. S.; URBEN, A. F.; MANSO, E. S. B. G. C.; TENENTE, R. V.; VILARINHO, M. R. O.; GUIMARÃES, P. M.; FREITAS, R. D. F.; MARQUES, A. S. dos A. Intercâmbio e quarentena de germoplasma vegetal no Brasil. In: FERREIRA, F. R. (Org.). **Recursos genéticos de espécies frutíferas no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. p. 28-33.
- CHOMCHALOW, N. Citrus germplasm in Southeast Asia. **IBPGR Regional Committee for Southeast Asia Newsletter**, Bangkok, TH, v. 8, n. 3, p. 1-30, 1984.
- CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. New York: The New York Botanical Garden, 1988. 555 p.
- DURAN-VILA, N. Cryoconservation of germplasm of *Citrus*. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry: cryopreservation of plant germplasm I**. Berlin, DE: Springer-Verlag, 1995. v. 32, p. 70-86.
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 230, p. 1167-1174, 1990.
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? II. Effects of provenance, immaturity, and imbibition on desiccation-tolerance in coffee. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 42, n. 238, p. 653-657, 1991.
- ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm: a review. **Euphytica**, Dordrecht, v. 57, p. 227-243, 1991.
- FAO. Food and Agriculture Organization. **Conservación in situ de recursos genéticos**. Santiago, CL: Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe, 1991. 52 p.

FAO. Food and Agriculture Organization. **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://apps1.fao.org/servelet>>. Acesso em: 22 jun. 2002.

FAO. Food and Agriculture Organization. **Production**: 2011. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>>. Acesso em: 3 jun. 2013.

FERREIRA, F. R. Recursos genéticos de fruteiras tropicais e subtropicais. In: FERREIRA, F. R. (Org.). **Recursos genéticos de espécies frutíferas no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. p. 9-27.

FERREIRA, F. R.; BATISTA, M. F.; MARINHO, V. L. A. Importation and quarantine of citrus germplasm in Brazil. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF CITRUS NURSERYMEN, 6., 2001, Ribeirão Preto. **Proceedings...** Bebedouro: International Society of Citrus Nurserymen, 2001. p. 175-178.

FERREIRA, F. R.; SANTOS, I. R. I. Recursos genéticos de citros no Brasil. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS: MELHORAMENTO, 7., 2002, Bebedouro. **Anais...** Bebedouro: Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro, 2002. p. 17-25.

FORD-LLOYD, B.; JACKSON, M. **Plant genetic resources: an introduction on their conservation and use**. Baltimore: Edward Arnold, 1986. 146 p.

GIACOMETTI, D. C. Present situation of citrus germplasm in Brazil. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 2., 1977, Orlando. **Proceedings...** Orlando: International Society of Citriculture, 1977. v. 2, p. 604-606.

GIACOMETTI, D. C. Taxonomia das espécies cultivadas de citros baseada em filogenética. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A. A. (Ed.). **Citricultura brasileira**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v. 1, p. 99-115.

GIACOMETTI, D. C.; FERREIRA, F. R. Organização e uso de bancos de germoplasma de frutíferas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9., 1988, Campinas. **Anais...** Campinas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1988. v. 1, p. 11-17.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. Interspecific variation in seed storage behaviour within two genera - *Coffea* and *Citrus*. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 23, p. 165-181, 1995.

HOYT, E. **Conservação dos parentes silvestres das plantas cultivadas**. Roma, IT: IBPGR, 1992. 52 p.

HOYT, E. **Conserving the wild relatives crops**. Rome, IT: IBPGR: IUCN: WWF, 1988. 45 p.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas. **Sistema IBGE de Recuperação Automática**: SIDRA. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=1613&z=t&o=11>>. Acesso em: 3 jun. 2013.

LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, DE, v. 60, p. 197-214, 1981.

MARIN, M. L.; DURAN-VILA, N. Conservation of citrus germplasm *in vitro*. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 116, n. 4, p. 740-746, 1991.

MARQUES, A. S. A.; PARENTE, P. M. G.; MARINHO, V. L. A.; BUSO, G. S. C. A quarentena e o intercâmbio de germoplasma vegetal no Brasil: a atuação do Cenargen. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 30, n. 2, p. 143-154, 1995.

NÓBREGA, H. B. **Manual de inspeção fitossanitária do trânsito internacional e interestadual**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura - Delegacia Federal de Agricultura, 1987. 346 p.

ORTIZ MARCIDE, J. M. Nomenclatura botânica de los cítricos. **Levante Agrícola**, Valencia, n. 71, p. 259-260, 1985.

PASSOS, O. S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; SOARES FILHO, W. dos S. **El germoplasma de cítricos en Brasil**. Habana, CU: Rede Interamericana de Cítricos, 2000. p. 14-41. (RIAC. Carta Circular, 16).

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 1, p. 499-514, 1973.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, n. 20, p. 60-65, 2001.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, v. 12, p. 70-84, 2000.

SOARES FILHO, W. dos S.; VILARINHOS, A. D.; ALVES, A. A. C.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; OLIVEIRA, A. A. R.; SOUZA, A. da S.; LEDO, C. A. da S.; CRUZ, J. L.; SOUZA, L. D.; CASTRO NETO, M. T. de; GUERRA FILHO, M. dos S.; PASSOS, O. S.; MEISSNER FILHO, P. E. **Programa de melhoramento genético de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura**: obtenção de híbridos. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. 35 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Documentos, 106).

SOARES FILHO, W. dos S.; VILARINHOS, A. D.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; OLIVEIRA, A. A. R.; SOUZA, A. da S.; CRUZ, J. L.; MORAIS, L. S.; CASTRO NETO, M. T. de; GUERRA FILHO, M. dos S.; CUNHA, M. A. P. da; PASSOS, O. S.; MEISSNER FILHO, P. E.;

OLIVEIRA, R. P. de. **Programa de melhoramento genético de citros da Embrapa-CNPMPF**: obtenção de híbridos. Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMPF, 1997. 17 p. (EMBRAPA-CNPMPF. Documentos, 74).

SWINGLE, W. T. The botany of *Citrus* and its relatives. In: REUTHER, W.; WEBBER, H. J.; BATCHELOR, L. D. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1967. v. 1, p. 190-430.

WET, J. M. J.; HARLAN, J. R. Weeds and domesticates: evolution in the man made habitat. **Economy Botanic**, New York, v. 29, p. 99-107, 1975.

# Melhoramento genético

Walter dos Santos Soares Filho

Almir Pinto da Cunha Sobrinho

Orlando Sampaio Passos

Antônio da Silva Souza

## Introdução

O melhoramento genético dos citros possui particularidades que o distinguem da maioria daqueles outros dirigidos a espécies cultivadas. Dentre essas peculiaridades, tem-se:

- Inexistência de barreiras reprodutivas entre distintas espécies de *Citrus* (Linnaeus) e entre estas e gêneros afins, como *Poncirus* (Rafinesque) e *Fortunella* (Swingle).
- Alta heterozigiosidade, decorrente de mutações gênicas e de hibridações naturais entre diversas formas de citros ao longo de milênios, notadamente nos centros de origem e de dispersão desse importante grupo de plantas, dando formação a inúmeros tipos singulares, muitos dos quais impropriamente classificados como espécies, sob o ponto de vista biológico.
- Ocorrência da poliembrionia, possibilitando a produção, a partir da própria semente, de indivíduos geneticamente idênticos à planta-mãe, como resultado da embrião nucelar, que, se por um lado preserva naturalmente inúmeros genótipos, contribuindo para a fixação de variadas formas mutantes e híbridas, dificulta, em contrapartida, a identificação de indivíduos de origem zigótica em cruzamentos controlados, especialmente aqueles entre genótipos estreitamente aparentados.
- Longo período pré-reprodutivo apresentado por plantas oriundas de sementes (pés-francos ou *seedlings*), que não raramente demandam sete ou mais anos para atingir a maturidade.

Esses desafios, entre outras particularidades, tornam o melhoramento genético dos citros extremamente difícil, complexo e, ao mesmo tempo, instigante.

Ao longo deste capítulo, serão realizadas considerações relacionadas a esses temas, esperando-se oferecer ao leitor não um completo conhecimento a seu respeito, porém uma visão geral de situações importantes, com as quais o melhorista dedicado a essa cultura terá de interagir.

## Registros históricos

Programas sistemáticos de melhoramento genético de citros têm sido conduzidos por um restrito número de instituições, em nível mundial. Soost e Roose (1996) realizaram um rico levantamento de informações relacionadas ao desenvolvimento de programas de melhoramento genético de citros nos Estados Unidos da América (EUA). Segundo esses autores, o primeiro programa organizado teve início no Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (*United States Department of Agriculture – Usda*), Flórida, em 1893, sob a direção de Walter Tennyson Swingle e Herbert John Webber. Seu objetivo principal relacionava-se ao controle de doenças. A ocorrência de um inverno severo no período de 1894 a 1895, todavia, eliminou a maioria dos *seedlings* híbridos obtidos pelo então emergente programa de melhoramento genético. Impressionado com o acontecido, Swingle propôs o emprego da tolerância ao frio, presente em *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., na criação de variedades copa que associassem essa característica à produção de frutos com boa qualidade. Cruzamentos dessa espécie afim ao *Citrus* com laranjeiras doces [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], como a ‘Bahia’ ou laranja ‘de Umbigo’, nos EUA conhecida como ‘Washington Navel’, deram origem a muitos *seedlings* nucelares e a alguns híbridos, estes extremamente variáveis. Os híbridos que alcançaram a maturidade produziram frutos com sabor relativamente amargo e apresentavam na casca um óleo desagradável, característicos de *P. trifoliata*, além de um aroma não atrativo. Muitas particularidades importantes ao melhoramento genético dos citros, entretanto, foram descobertas no decurso desses trabalhos, especialmente a ampla interfertilidade em cruzamentos envolvendo indivíduos pertencentes a diferentes espécies e gêneros botânicos. Híbridos passíveis de serem empregados como porta-enxertos foram produzidos, incluindo os citranges (*C. sinensis* x *P. trifoliata*) ‘Rusk’, ‘Willits’, ‘Morton’, ‘Savage’ e ‘Cunningham’, destacando-se, por sua maior importância comercial, os citranges ‘Carrizo’ e ‘Troyer’ e o citrumelo (*C. paradisi* Macfad. x *P. trifoliata*) ‘Swingle’, estes últimos de obtenção posterior à dos primeiros.

Um programa dirigido à criação de novas variedades copa produtoras de frutos com casca solta, tipo tangerina, teve início em 1896. Dois tangelos [designação genérica dada a híbridos de tangerineira (diversas espécies, incluindo a mexeriqueira *C. deliciosa* Ten.) com pomeleiro (*C. paradisi*)], ‘Sampson’, híbrido de pomeleiro com tangerineira ‘Dancy’ (*C. tangerina* hort. ex Tanaka), e ‘Thornton’, também possivelmente oriundo da referida hibridação], apesar de não terem alcançado expressão econômica, indicaram que esse tipo de cruzamento é promissor para a finalidade em questão, haja vista a obtenção, posterior, dos tangelos ‘Orlando’ e ‘Minneola’<sup>1</sup>, introduzidos em pomares comerciais, ambos resultantes de hibridações entre o pomeleiro ‘Duncan’ e a tangerineira ‘Dancy’. Em virtude do vigor, resistência à gomose ou podridão-de-*Phytophthora* e alto grau de embrionia nucelar, cabe acrescentar que o tangelo ‘Sampson’ também pode ser avaliado como porta-enxerto.

<sup>1</sup> Tribo indígena da Flórida, EUA.

Espécies de *Fortunella*, vulgarmente conhecidas como *kumquat*, foram igualmente exploradas em hibridações, em virtude da sua excepcional tolerância ao frio. Híbridos entre *kumquat* e *P. trifoliata* não se mostraram promissores, porém cruzamentos com citranges (citranguquats) manifestaram melhores possibilidades de êxito, o mesmo se dando em relação às limequats, que compreendem cruzamentos entre *Fortunella* e limeiras, doces (*C. limettioides* Tanaka; *C. limetta* Risso) e ácidas [*C. aurantiifolia* (Christm.) Swingle].

Em 1942, outra extensiva série de cruzamentos foi realizada em Orlando, Flórida. A progênie de um cruzamento em particular, tangerineira 'Clementina' (*C. clementina* hort. ex Tanaka) x tangelo 'Orlando', produziu diversos híbridos promissores. Destes, 'Robinson', 'Lee' e 'Osceola' foram liberados para exploração comercial a partir de 1959. O primeiro, cultivar de maturação muito precoce, foi amplamente plantado na Flórida. Um quarto híbrido proveniente desse mesmo cruzamento, 'Nova', foi introduzido em 1964. 'Page', híbrido entre a tangerineira 'Clementina' e o tangelo 'Minneola', foi lançado como cultivar em 1963.

Em 1948, o Usda promoveu outra sucessão de cruzamentos controlados, produzindo milhares de *seedlings* híbridos nas estações experimentais de Orlando e de Indio, esta na Califórnia. Os principais parentais femininos utilizados foram a tangerineira 'Clementina' e o tangor (denominação generalizada de híbridos de tangerineira com laranja doce) 'Temple', híbrido natural de origem presumivelmente jamaicana. A escolha desses parentais deveu-se às suas boas características hortícolas e ao fato de somente darem formação a *seedlings* zigóticos, em razão da condição monoembriônica de suas sementes. Como parentais masculinos, foram empregados tangerineiras ou tangelos. A partir desses cruzamentos, três outras variedades foram selecionadas e liberadas em 1964: Fairchild, Fremont e Fortune, híbridos de 'Clementina' com tangelo 'Orlando', tangerineira 'Ponkan' (*C. reticulata* Blanco) e tangerineira 'Dancy', respectivamente.

Em 1987, o programa de Orlando liberou dois híbridos tipo tangerina, 'Sunburst' e 'Fallglo', o primeiro resultante de cruzamento entre 'Robinson' e 'Osceola', e o segundo de cruzamento entre 'Bower' (*C. reticulata* x tangelo 'Orlando') e 'Temple'. Três seleções de laranjeiras doces, 'Gardner', 'Midsweet' e 'Sunstar', provenientes de sementes obtidas de polinizações abertas das variedades Sanford Mediterranean, Homosassa e Berna, respectivamente, também foram liberadas nesse ano, além de um pomeleiro com frutos de polpa vermelha, denominado 'Flame', oriundo de semente obtida de polinização livre do pomeleiro 'Ruby Red'; ao que tudo indica, essas variedades tratam-se de mutantes naturais, de origem nucelar.

Referindo-se, ainda, ao programa de melhoramento genético de citros executado pelo Usda, extensivos trabalhos foram realizados objetivando a tolerância ao cloro e a resistência à gomose-de-*Phytophthora*, além de ações dirigidas à tolerância ao frio, envolvendo como fontes de tolerância-resistência os gêneros *Eremocitrus* (Swingle), *Fortunella* e *Poncirus*. A resistência-tolerância ao vírus-da-tristeza-dos-citros (*Citrus tristeza virus* – CTV) e a resistência a nematoides, como o cavernícola [*Radopholus similis* (Cobb) Thorne], também têm sido visadas.

A Estação Experimental de Citros da Universidade da Flórida (*University of Florida Citrus Experimental Station*) iniciou um pequeno programa de melhoramento genético em 1924, enfatizando a obtenção de cultivares com frutos ácidos. Esse programa foi interrompido, surgindo, em 1956, uma nova linha de trabalho, baseada na seleção de clones nucelares, passando-se, posteriormente, à realização de hibridações envolvendo pomeleiros, laranjeiras doces e tangerineiras, além de estudos básicos sobre métodos de identificação de espécies e híbridos. A partir de 1951, extensivos trabalhos de seleção de porta-enxertos resistentes-tolerantes ao nematoide cavernícola foram efetuados, sendo esse programa expandido em 1956, com a cooperação do Usda. Duas cultivares resistentes, laranjeira doce, Ridge Pineapple e limoeiro rugoso (*C. jambhiri* Lush.) Milan, e uma tolerante, limoeiro rugoso Estes, foram liberadas em 1964. Além do reconhecimento de que o citrange 'Carrizo' apresenta reação desfavorável ao desenvolvimento do nematoide cavernícola, híbridos obtidos dos cruzamentos 'Ridge Pineapple' x 'Milan' e 'Milan' x *P. trifoliata* mostraram-se resistentes a esse nematoide, superando, quanto a essa característica, os parentais 'Milan' e 'Ridge Pineapple'.

Na década de 1980, sob a coordenação de Jude William Grosser, um novo e promissor programa de melhoramento genético, baseado em hibridações somáticas, foi implementado na Universidade da Flórida, incorporando-se a ele, posteriormente, um programa complementar, incluindo hibridações convencionais, indução de mutações e avaliações de germoplasma. Atualmente, o pesquisador Jude Grosser também vem desenvolvendo ações dirigidas à obtenção de variedades transgênicas de citros, focalizando, entre outros objetivos, a resistência-tolerância à tristeza e ao cancro-cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri*).

No Centro de Pesquisas de Citros da Universidade da Califórnia (*University of California Citrus Research Center*), Riverside, teve início, em 1914, um programa de melhoramento genético, sob a responsabilidade principal de Howard Brett Frost. As primeiras hibridações empregaram como parentais as tangerineiras 'King' (*C. nobilis* Lour.), 'Satsuma' (*C. unshiu* Marcow.), 'Dancy' e a mexeriqueira 'Willowleaf', o pomeleiro 'Imperial', os limoeiros verdadeiros [*C. limon* (L.) Burm. f.] 'Eureka' e 'Lisboa' e as laranjeiras doces 'Ruby', 'Valência' e 'Maltese'. A tangerineira 'King' destacou-se como excelente parental, sendo três de seus híbridos, 'Kara' ('Satsuma' x 'King'), 'Kinnow' ('King' x 'Willowleaf') e 'Wilking' ('Willowleaf' x 'King'), introduzidos comercialmente em 1935. Nas décadas de 1930 e 1940, outras séries de cruzamentos foram realizadas, considerando três grupos de parentais: (1) tangerineiras e híbridos do tipo tangerineira; (2) cruzamentos de tetraploides com diploides, visando à obtenção de variedades triploides, com frutos sem sementes; (3) cruzamentos de toranjeiras [*C. maxima* (Burm.) Merr.<sup>2</sup>] com tangerineiras, pomeleiros e outras toranjeiras. Dentro do primeiro grupo, as tangerineiras 'King', 'Dancy', 'Clementina' e 'Willowleaf', bem como os híbridos 'Wilking', 'Dweet' (laranjeira doce 'Mediterrânea' x tangerineira 'Dancy'), 'Mency' ('Dancy' x 'Mediterrânea') e 'Honey' ('King' x 'Willowleaf'), distinguiram-se como bons parentais, produzindo híbridos cujos frutos apresentaram sabor e aroma agradáveis. Dessa série de hibridações surgiram as variedades Encore ('King' x 'Willowleaf') e Pixie

<sup>2</sup> Nesta publicação, adotou-se a classificação de espécies botânicas aceita pelo *Germplasm Resources Information Network* (Grin), pertencente ao *United States Department of Agriculture* (Usda). Assim, a designação de espécie *Citrus maxima* (Burm.) Merr. foi preferida em relação a *C. grandis* Osbeck.

(*seedling* obtido de polinização aberta de 'Kincy', este um híbrido de 'King' com 'Dancy'), introduzidas em pomares comerciais a partir de 1965. Ambas são de maturação muito tardia, sendo 'Pixie' quase sem sementes. No segundo grupo, triploides foram produzidos utilizando como parentais femininos variedades tetraploides, estas compreendendo um tipo de pomeleiro e uma forma tetraploide do limoeiro 'Lisboa', tendo como parentais masculinos as tangerineiras 'Kinnow' e 'Dancy' e alguns híbridos de limoeiro verdadeiro. Quanto ao terceiro grupo, vários híbridos de toranjeira apresentaram frutos com elevado número de sementes, e muitos produziram frutos amargos ou com sabor e aroma inexpressivos. Destaca-se, aqui, a liberação, em 1961, do híbrido 'Chandler', cujos frutos são do tipo toranja, obtido de cruzamento entre toranjeiras: 'Siamese Sweet' x 'Siamese Pink'.

O programa de melhoramento genético de citros da Universidade da Califórnia sofreu uma expansão em 1947, enfatizando-se cruzamentos objetivando a produção de triploides. Os híbridos triploides, de toranjeira com pomeleiro, 'Oroblanco' e 'Melogold' foram liberados em 1980 e 1985, respectivamente (SOOST; ROOSE, 1996). Atualmente, conforme Williams (2010a, 2010b), o referido programa, em seu campus de Riverside, tem dado ênfase ao desenvolvimento de variedades produtoras de frutos tipo tangerina que atendam às exigências do mercado internacional de frutas frescas, quais sejam: frutos com ausência ou reduzido número de sementes (média de < 1 por fruto), cascas de fácil remoção e com coloração escura (vermelho-alaranjado-intenso), polpa laranja-intenso, brix elevado associado à acidez equilibrada. Diversas variedades têm sido patenteadas e liberadas para exploração comercial, compreendendo:

- Gold Nugget, híbrido diploide proveniente de cruzamento entre 'Wilking' e 'Kincy', produtor de frutos sem sementes, liberado em 1999.
- Shasta Gold, Tahoe Gold e Yosemite Gold, com frutos praticamente sem sementes (< 1 semente por fruto, em média), triploides, resultantes de cruzamento entre 'Encore', cujas sementes são monoembriônicas, e híbrido tetraploide oriundo do cruzamento tangor 'Temple' x tangerineira 'Dancy' tetraploide, liberadas em 2002.
- Usda 88-2, híbrido diploide obtido do cruzamento 'Lee' x 'Nova', com frutos sem sementes, liberado em 2007.
- Variedades obtidas mediante o emprego de irradiação gama, aplicada em gemas, embriões ou calos, todas com frutos sem sementes, incluindo Tango (liberada em 2006, seleção irradiada de 'W. Murcott Afourer', esta um tangor de origem desconhecida, identificado sob a forma de *seedling* em Marrocos, onde foi denominado Nadorcott, em alusão a seu descobridor, Sr. El Bachir Nadori), DaisySL (liberada em 2009, seleção irradiada da tangerineira 'Daisy', esta proveniente de cruzamento entre 'Fortune' e 'Fremont'), KinnowLS (seleção irradiada da tangerineira 'Kinnow', liberada em 2010), FairchildLS (seleção irradiada da tangerineira 'Fairchild', liberada em 2010), EncoreLS (seleção irradiada da tangerineira 'Encore', liberada em 2011), Nova Seedless (seleção irradiada da tangerineira 'Nova', liberada em 2011) e Nova-sin (seleção irradiada da tangerineira 'Nova', com liberação pre-

vista para 2012) (WILLIAMS, 2010a, 2010b). Ainda no tocante à obtenção de variedades produtoras de frutos tipo tangerina, a Universidade da Flórida liberou o híbrido Sugar Belle, proveniente de cruzamento entre a tangerineira ‘Clementina’ e o tangelo ‘Minneola’ (WILLIAMS, 2010b).

Os estudos de clones nucleares originalmente conduzidos por Howard Brett Frost, na Universidade da Califórnia, tiveram continuidade, resultando na seleção de diversos *seedlings* nucleares. O melhoramento genético dirigido ao desenvolvimento de variedades porta-enxerto foi iniciado, possibilitando a liberação de dois novos citranges: C-32 e C-35 (SOOST; ROOSE, 1996). Além desses citranges, segundo Williams (2010a), a Universidade da Califórnia liberou os citrandarins, híbridos de tangerineira ‘Sunki’ [*C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka] com *P. trifoliata*, ‘Bitters’ (C22, tolerante ao CTV, resistente à gomose-de-*Phytophthora* e tolerante a solos salinos e calcários; apresenta bom comportamento em combinação com copas de pomeleiros, segundo ensaios realizados no Estado do Texas, EUA, igualmente combinando-se bem com tangerineiras e laranjeiras doces, conforme observações realizadas no Estado da Califórnia, EUA), ‘Carpenter’ (C54, tolerante ao CTV e a nematoides; excelente combinação com copas de pomeleiros e laranjeiras doces, consoante avaliações efetuadas na Flórida e na Califórnia, respectivamente), e ‘Furr’ (C57, tolerante ao CTV, resistente à gomose-de-*Phytophthora*, tolerante a nematoides e boa adaptação a solos calcários; comporta-se bem sob copas de laranjeiras ‘de Umbigo’, às quais induz maturação de frutos tardia).

Reportando-se a outros programas de melhoramento genético, executados fora dos Estados Unidos da América, Soost e Roose (1996) comentam que em Java, por volta de 1920, H. J. Toxopeus deu início a hibridações visando ao desenvolvimento de porta-enxertos resistentes à gomose-de-*Phytophthora*. Nessa época, J. P. Torres, nas Ilhas Filipinas, começou um projeto de melhoramento genético dirigido à produção de variedades copa. Cruzamentos em larga escala também foram realizados na região Transcaucasiana, Rússia, durante a década de 1930, tendo como objetivo principal a produção de variedades tolerantes ao frio e produtoras de frutos de maturação precoce. Com o advento da Segunda Grande Guerra Mundial, os projetos de Java e das Filipinas foram interrompidos. Quanto ao programa russo, há informações de que, entre os principais parentais utilizados, destacam-se seleções de ‘Satsuma’ e de limoeiros verdadeiros.

No Japão, Soost e Roose (1996) mencionam que trabalhos voltados à seleção de variações somáticas de tangerineira ‘Satsuma’ vêm sendo realizados há longo tempo; muitas cultivares, com diferentes épocas de maturação de frutos e com outras características particulares de interesse agrônomo, foram identificadas. Além disso, o melhoramento genético visando à geração de cultivares com maturação precoce e tolerância ao frio tem sido enfatizado por muitos anos nesse país, cabendo destacar a liberação das variedades Kiyomi (‘Satsuma Miyagawa’ x laranjeira doce de umbigo ‘Trovia’) e Sweet Spring (‘Satsuma Ueda’ x ‘Hassaku’, esta última um provável híbrido natural de toranjeira com tangerineira, encontrando-se, outrossim, sua classificação botânica como *C. hassaku* hort. ex Tanaka). Em complemento a essas informações, Williams (2010b) reporta-se às variedades

Satsuma Iwasaki, Satsuma Hashimoto e Seedless Kishu, esta última produz frutos deliciosos e de pequeno tamanho, menores que uma bola de golfe, sendo seus parentais desconhecidos.

Soost e Roose (1996) acrescentam que programas de melhoramento genético de citros desenvolveram-se na Itália, em Israel e na Austrália após a Segunda Grande Guerra Mundial, resultando na liberação de novas cultivares. Entre outras variedades, dois híbridos produtores de frutos tipo tangerina, Yafit (cruzamento entre as tangerineiras ‘Clementina’ e ‘Wilking’) e Norit (cruzamento de tangerineira ‘King’ com tangor ‘Temple’), foram liberados por Israel. Na Itália, cabe mencionar a introdução em sistemas comerciais de plantio da variedade Palazzelli (‘Clementina’ x ‘King’) e do tangelo ‘Mapo’ (mexeriqueira ‘Avana’ x pomeleiro ‘Duncan’), além de diversas seleções de limoeiro verdadeiro. Programas de melhoramento genético também vêm sendo realizados em países como África do Sul, Argentina, China, Cuba, Espanha, França (Córsega, Martinica, Montpellier), Marrocos, México, Nova Zelândia, Portugal e Uruguai, entre outros.

Reportando-se ao programa de melhoramento genético de citros espanhol, cabe destacar o importante trabalho desenvolvido pela equipe liderada pelo Dr. Luis Navarro Lucas, no Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (Ivia), relativamente à criação de tangerineiras triploides, produtoras de frutos sem sementes. Iniciado em 1996, esse programa de melhoramento genético gerou, até 2005, mais de 7.000 híbridos triploides, sendo sua capacidade de obtenção de híbridos superior a 1.000 indivíduos anuais, tendo por base cruzamentos entre parentais femininos diploides e masculinos tetraploides ( $2n \times 4n$ ), entre parentais femininos tetraploides e masculinos diploides ( $4n \times 2n$ ), e entre parentais, masculinos e femininos, diploides ( $2n \times 2n$ ) (NAVARRO et al., 2005). No que concerne aos cruzamentos entre parentais diploides, cabe esclarecer que, conforme originalmente indicado por Esen e Soost (1971), ocasionalmente podem ser produzidos embriões triploides espontâneos, resultantes da fecundação de gametas femininos não reduzidos (diploides) por gametas masculinos haploides; esses autores acrescentam que embriões triploides são encontrados, especialmente, em sementes 1/3 a 1/6 menores que as normais, que normalmente não germinam sob condições ordinárias de cultivo, exigindo o uso do cultivo in vitro para sua germinação (ALEZA et al., 2010).

Relativamente à liberação, pelo Ivia, de variedades produtoras de frutos tipo tangerina, tem-se, segundo Williams (2010b): Garbí (híbrido de ‘Fortune’ com tangor ‘Murcott’<sup>3</sup>; frutos com poucas sementes), Safor (híbrido de ‘Fortune’ com ‘Kara’; frutos com poucas sementes), Moncalina (mutação espontânea da variedade Moncada, esta um híbrido de ‘Clementina Oroval’ com ‘Kara’; frutos sem sementes), Nulesin (seleção irradiada de ‘Clemenules’ ou ‘Clementina de Nules’; frutos com poucas sementes). Esse autor, referindo-se ainda à Espanha, menciona a variedade Clemenrubi, mutação espontânea de ‘Oronules’ (mutação espontânea da ‘Clementina de Nules’), selecionada pela *Agrupación de Viveristas de Agrios S.A.* (Avasa). No tocante a variedades porta-enxerto, Williams

---

<sup>3</sup> Híbrido de origem desconhecida, possivelmente resultante de cruzamento entre tangerineira e laranja doce realizado pelo programa de melhoramento genético do Usda (HODGSON, 1967).

(2010b) cita a liberação, pelo Ivia, do citrandarin Forner-Alcaide nº 5, híbrido de tangerineira 'Cleópatra' (*C. reshni* hort. ex Tanaka) com *P. trifoliata*.

No Brasil, destaca-se a criação, em 1928, da Estação Experimental de Limeira, posteriormente denominada Centro de Citricultura Sylvio Moreira, e atual Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros Sylvio Moreira (CAPTACSM), vinculado ao Instituto Agrônomo (IAC), sigla esta do então Instituto Agrônomo de Campinas, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (Apta) da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (SAA). Os primeiros experimentos dessa instituição pioneira em pesquisas com citros no País tiveram início em 1930 (TEÓFILO SOBRINHO, 1997), tendo como base o estabelecimento de uma coleção de variedades, que atualmente reúne cerca de 1.700 acessos, representantes de *Citrus* e gêneros afins. A partir desse germoplasma, estudos de competição de variedades, copas e porta-enxertos, serviram de suporte ao estabelecimento da pujante citricultura paulista, atualmente a maior do mundo, considerando-se a produção de frutos de laranjeiras doces, cabendo salientar, também, sua importante participação no desenvolvimento e na sustentação da própria citricultura brasileira.

Os trabalhos do emérito cientista Sylvio Moreira muito contribuíram para esse sucesso, notadamente o emprego de *seedlings* nucelares na obtenção de clones de variedades copa denominados novos, rejuvenescidos pela eliminação, no processo natural de embrionia nucelar, de viroses prejudiciais aos citros, como os complexos do vírus-da-tristeza, sorose, xiloporose e exocorte, de ocorrência comum em pomares comerciais de meados do século passado. Com a implementação de atividades na área de biotecnologia, em 1990, o CAPTACSM ingressa no ainda restrito circuito da alta tecnologia, executando, entre outras ações, pesquisas dirigidas ao mapeamento de genes relacionados à herança de importantes doenças, como a clorose-variegada-dos-citros (CVC), tristeza, gomose-de-*Phytophthora* e leprose. Destacam-se, neste contexto, o sequenciamento dos genomas do CTV e da bactéria *Xylella fastidiosa* Wells et al., esta agente causal da CVC (MACHADO, 2001).

A Universidade de São Paulo (USP) tem apresentado importantes contribuições ao melhoramento genético dos citros, conforme pesquisas realizadas na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Esalq) e no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (Cena), destacando-se estudos dirigidos à criação de clones sem sementes de variedades copa tradicionais, mediante indução artificial de mutações, e à obtenção de híbridos somáticos, estes relacionados especialmente a variedades porta-enxerto, além da criação de variedades transgênicas resistentes a patógenos de alto impacto destrutivo, com ênfase nas doenças, causadas por bactérias, CVC, cancro-cítrico e *huanglongbing* (HLB, ex-*greening*, *Candidatus Liberibacter* spp.).

No Nordeste brasileiro, as primeiras ações de pesquisa com citros datam de princípios dos anos 1950, quando o então Ministério da Agricultura, contando com o empenho e a determinação do ilustre engenheiro-agrônomo Renato Gonçalves Martins, criou no Município de Cruz das Almas, Recôncavo Baiano, o Instituto Agrônomo do Leste (IAL), pertencente à rede de institutos do Departamento Nacional de Pesquisa Agropecuária (DNPEA). Trabalhos preliminares compre-

enderam a introdução de variedades comerciais e a obtenção de clones nucelares de laranja 'Bahia', principal variedade copa da citricultura nessa época. Orientado por diagnóstico realizado em 1961, intensivo programa de pesquisas foi iniciado no Instituto de Pesquisa e Experimentação Agropecuária do Leste (Ipeal), sucessor do IAL, com mandato de atuação estendido ao Estado de Sergipe, ocasião em que a citricultura começava a insinuar-se como atividade econômica na região. Seu objetivo era o de elevar a produtividade das citriculturas baiana e sergipana, mediante o controle da origem genética do material de propagação, ausente em mais de 90% dos pomares de citros, bem como das condições fitossanitárias desse material, principalmente em relação à presença de víruses.

Graças ao estabelecimento de ampla coleção de cultivares e de um programa de obtenção de clones nucelares e distribuição de clones de variedades superiores sob o ponto de vista horticultural, em substituição daqueles tradicionalmente utilizados, resultados positivos passaram a ser alcançados junto aos citricultores, triplicando-se, entre 1967 e 1970, o número de borbulhas certificadas, aproximando-se da expressiva marca de 2 milhões de propágulos. Cabe destacar que, a partir de 1972, o clone 'Pera IPEAL D6' torna-se, praticamente, a única fonte de material propagativo dessa variedade de laranja doce nas regiões Nordeste e Norte do País, atingindo-se a distribuição de aproximadamente 1 milhão de borbulhas na década de 1970. Após 1974, os citricultores passaram a utilizar suas próprias borbulhas, provenientes de lotes básicos instalados mediante a distribuição de cerca de 12.000 mudas de clones nucelares de diversas variedades comerciais, algumas ainda exploradas de maneira muito restrita, a exemplo da tangerineira Ponkan e da laranja Valência, introduzidas com a finalidade de ampliar o período de colheita, até então concentrado em poucos meses do ano. A inequívoca superioridade dos clones nucelares foi constatada em experimentos com as laranjeiras doces 'Bahia', 'Baianinha' e 'Pera', em razão da presença, nos clones denominados velhos, que vinham sendo empregados, do viroide da exocorte em copas de 'Baianinha', sorose em copas de 'Bahia' e sorose, exocorte e tristeza em copas de 'Pera'.

Com o advento da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), instituída com fundamento na Lei nº 5.851, de 7 de dezembro de 1972, vinculada, mas não subordinada, ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), surge o Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMT), instituído pela deliberação nº 24, de 13 de junho de 1975, da Diretoria-Executiva da Embrapa, tendo seu projeto de implantação aprovado por essa Diretoria em 19 de fevereiro de 1976, quando efetivamente se iniciaram os trabalhos dessa Unidade Descentralizada da Embrapa, cujo ato de instalação deu-se aos 27 de janeiro de 1977, presidido pelo Excelentíssimo Sr. Ministro da Agricultura, professor Alysson Paulinelli. O CNPMT, também denominado Embrapa Mandioca e Fruticultura, substitui o Ipeal e passa a ter missão nacional de acordo com o Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SNPA). A partir de 8 de dezembro 2004, o CNPMT sinaliza sua opção pela fruticultura tropical, adotando o nome síntese de Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Em setembro de 2010, o nome síntese, Embrapa Mandioca e Fruticultura, volta a ser oficialmente adotado.

Os trabalhos que vinham sendo conduzidos pelo Ipeal com a cultura dos citros têm continuidade, confirmando, como objetivo principal, a diversificação de variedades, copas e porta-enxertos, haja vista a concentração dos pomares brasileiros na exploração da combinação laranjeira 'Pera'-limoeiro 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck), notadamente nas regiões Nordeste e Norte. Resultados de estudos realizados de meados da década de 1960 até a atualidade, relacionados às condições edafoclimáticas da grande Unidade de paisagem de Tabuleiros Costeiros, na qual se assenta a quase totalidade da citricultura nordestina, têm permitido a indicação de diversos porta-enxertos, podendo-se citar os limoeiros 'Cravo Santa Cruz' e 'Rugoso da Flórida', tangerineiras 'Cleópatra', 'Dancy', 'Sunki Maravilha' e 'Sunki Tropical', laranjeira 'Palmeiras' (*C. sinensis*) e citrange 'Troyer', assim como os citrandarins 'Índio' (tangerineira 'Sunki' x *P. tritoliata* seleção 'English' - 63/256), 'Riverside' (tangerineira 'Sunki' x *P. tritoliata* seleção 'English' - 63/264) e 'San Diego' (tangerineira 'Sunki' x *P. trifoliata* seleção 'Swingle' - 63/314), obtidos por Joseph Rodolph Furr, na *United States Date and Citrus Station*, Índio, Califórnia, pertencente ao Usda. No que concerne a variedades copa, clones de várias laranjeiras doces vêm sendo recomendados. Entre as cultivares de maturação de frutos precoce a meia-estação tem-se Bahia, Baianinha, Cara-cara (mutação espontânea identificada na Venezuela, pertencente ao grupo das laranjas de umbigo, com polpa vermelha), Hamlin, Lima, Pineapple, Rubi, Salustiana, Sincorá e Westin, somando-se a estas a Pera, cuja maturação de frutos é de meia-estação, a Natal e a Valência, de maturação de frutos tardia. Híbridos com frutos tipo tangerina também foram recomendados, incluindo as variedades Page e Piemonte (tangerineira 'Clementina' x tangor 'Murcott'), de maturação de frutos precoce e tardia, respectivamente. Clones de limeira ácida 'Tahiti' [*C. latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka] foram igualmente disponibilizados.

Considerando as condições semiáridas nordestinas, empregando-se irrigação, observações indicam a boa adaptação e excelente qualidade de frutos apresentadas por limoeiros verdadeiros, limeiras ácidas e pomeleiros, dentre estes cabendo distinguir o bom comportamento da variedade Flame. Relativamente a áreas nordestinas de maior altitude, a exemplo da Chapada Diamantina, no Estado da Bahia, vêm sendo conduzidas pesquisas direcionadas ao estabelecimento de uma citricultura voltada para frutos de mesa, com excelentes resultados, estes apoiados na introdução de diversas variedades de laranjeiras doces, dentre as quais têm se destacado Cara-cara, Rubi, Salustiana e Westin, além das tradicionais Bahia e Baianinha, bem como de variedades com frutos tipo tangerina, como Page e Piemonte, que se somam às já cultivadas Ponkan e Murcott.

Visando à criação de novas variedades, melhor adaptadas aos trópicos, a Embrapa Mandioca e Fruticultura iniciou em setembro de 1988 um programa de hibridações, tendo como base seu Banco Ativo de Germoplasma de Citros, dotado de grande variabilidade genética, representada por um total de acessos da ordem de 800. Essa iniciativa teve como estímulo a relativamente baixa longevidade dos pomares do País, cuja vida útil está entre 15 e 18 anos nas áreas produtoras do Estado de São Paulo, onde atualmente concentram-se cerca de 80% da produção cítrica nacional, e entre 12 e 15 anos em regiões tropicais, como a nordestina, na qual sobressaem os estados da Bahia e de Sergipe, respectivamente segundo e quarto maiores estados brasileiros produtores de citros.

Como objetivos principais, o referido programa busca, particularmente, a seleção de porta-enxertos resistentes-tolerantes à tristeza, à gomose-de-*Phytophthora*, ao descamamento-eruptivo (*Bahia bark scaling* – BBS), ao declínio e à morte-súbita dos citros, tolerantes à seca, à salinidade e ao alumínio, além de portadores de características que favoreçam o convívio da citricultura comercial com o *huanglongbing* (HLB, *ex-greening*), tais como: baixa titulação, em seus tecidos, da bactéria *Candidatus Liberibacter spp.*, causadora dessa seríssima enfermidade; menor atratividade em relação ao psilídio dos citros *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) e, preferencialmente, relacionados a efeitos de antibiose sobre esse inseto vetor do HLB; capacidade de redução do porte das variedades copa neles enxertadas, de forma a permitir altas densidades de plantio; indução de alta produtividade e início precoce de produção de frutos às copas neles enxertadas.

Contando com o apoio de uma equipe multidisciplinar e multi-institucional, diversas ações de pesquisa estão em curso, compreendendo:

- Criação, mediante hibridações convencionais, de porta-enxertos cítricos adaptados a estresses bióticos (relacionados a pragas, estas compreendendo tanto insetos-pragas como doenças) e abióticos (referentes ao clima e ao solo) presentes em diferentes ecossistemas brasileiros, bem como, em plano ainda secundário, de novas variedades copa, incluindo variedades triploides produtoras de frutos tipo tangerina sem sementes e ornamentais.
- Obtenção de indivíduos tetraploides de surgimento espontâneo; há evidências de que plantas tetraploides (4X) apresentam maior tolerância à seca e à salinidade que suas contrapartes diploides, além de potencial ananicante em combinação com variedades copa, podendo ocorrer naturalmente a partir da germinação de sementes, com uma frequência variando de 1% a 7% (BARRETT; HUTCHINSON, 1982; SALEH et al., 2008).
- Obtenção de híbridos somáticos mediante fusão de protoplastos, com a finalidade de uso como porta-enxertos, objetivando reunir, em um mesmo indivíduo, características de adaptação a ambientes sujeitos a estresses bióticos e abióticos, características essas presentes em *Citrus* e em gêneros afins, permitindo, também, a superação de barreiras reprodutivas, a exemplo daquelas existentes entre *Citrus* e os gêneros *Eremocitrus* e *Microcitrus* (Swingle); estes últimos, ao contrário de *Citrus*, sobrevivem em ambientes sujeitos a intensos estresses hídricos, além de serem resistentes à gomose-de-*Phytophthora* e possibilitarem a obtenção de porta-enxertos ananicantes.
- Identificação, mediante emprego de técnicas de bandejamento cromossômico e de marcadores moleculares, de genótipos com níveis elevados de homozigidade, visando a uma maior previsibilidade de resultados em cruzamentos controlados.
- Desenvolvimento de metodologia para geração de linhagens homozigotas a partir de plantas haploides, de modo a eliminar os efeitos da heterozigidade, que comprometem a previsibilidade de resultados em cruzamentos convencionais.

- Desenvolvimento de metodologia dirigida ao controle da poliembrião, mediante excisão de embriões zigóticos imaturos em sementes em formação, seguida do complemento de sua embriogênese, *in vitro*, eliminando ou restringindo a presença de embriões de origem nucelar.
- Obtenção de porta-enxertos tolerantes a estresses abióticos, com foco principal na tolerância à seca, geneticamente modificados por transgenia.
- Desenvolvimento de metodologias que promovam a eficiência e a eficácia na seleção de porta-enxertos adaptados a condições de estresses bióticos e abióticos, com ênfase na resistência-tolerância à tristeza, à gomose-de-*Phytophthora*, ao descamamento-eruptivo, ao declínio e à morte-súbita dos citros e na tolerância à seca, à salinidade e ao alumínio.

Milhares de híbridos vêm sendo gerados em cruzamentos envolvendo limoeiros (diversas espécies), laranjeiras doces e azedas (*C. aurantium* L.), tangerineiras (diversas espécies), *P. trifoliata* e híbridos desta espécie, principalmente. Avaliações preliminares têm compreendido indivíduos sob a forma de *seedlings*, sendo aqueles selecionados como promissores, com a finalidade de uso como porta-enxertos, posteriormente estudados em combinação com diversas variedades copa de interesse comercial, compondo experimentos em diferentes ecossistemas, em nível nacional. Relativamente a híbridos criados com a finalidade de uso como variedades copa, enfatiza-se a busca por indivíduos que produzam frutos tipo tangerina, de alta qualidade, compreendendo ausência de sementes, casca de fácil remoção, alto teor de sólidos solúveis, acidez equilibrada e coloração da polpa e da casca com tons alaranjados intensos. Híbridos com potencial de uso ornamental também vêm sendo produzidos mediante cruzamentos envolvendo, além de *Citrus*, os gêneros *Poncirus*, *Fortunella* e *Microcitrus*, sendo os genótipos selecionados como promissores avaliados em combinação com porta-enxertos ananizantes, em vasos.

No tocante à obtenção de porta-enxertos híbridos, entre os parentais femininos menção especial deve ser feita à tangerineira ‘Sunki’ (Figura 1), em razão da relativamente alta porcentagem de pegamento de frutos em cruzamentos com diversos parentais masculinos e da boa quantidade de híbridos produzidos. Esta última característica é decorrente da baixa poliembrião de ‘Sunki’ e do vigor relativamente bom de suas progênes, as quais compreendem indivíduos que guardam certa semelhança entre si, situação esta indicativa do relativamente elevado grau de homozigidade presente nessa tangerineira, mais acentuado que o verificado na grande maioria das espécies de citros, o que possibilita uma maior previsibilidade de resultados em hibridações. Como parentais masculinos, seleções e híbridos de *P. trifoliata*, estes compreendendo, notadamente, os citranges ‘Argentina’, ‘Troyer’ e ‘Yuma’, o citrumelo ‘Swingle’ e o citrangequat ‘Thomasville’ [*kumquat* ‘Oval’ ou ‘Nagami’ *Fortunella margarita* (Lour.) Swingle x citrange ‘Willits’], têm possibilitado a geração de híbridos promissores.



Fotos: Walter dos Santos Soares Filho

Figura 1. Planta adulta (A) de tangerineira 'Sunki' [*Citrus sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka] e detalhe da disposição dos frutos (B).

## Mutações espontâneas

As mutações espontâneas tiveram um papel muito importante no processo evolutivo das plantas de propagação vegetativa (NYBOM; KOCH, 1965). Práticas como a enxertia e a estaquia, comumente utilizadas em árvores frutíferas, facilitaram a conservação e o acúmulo de mutações, particularmente aquelas associadas à esterilidade, que seriam eliminadas em caso de reprodução sexuada. Além disso, a embriogenia nucelar, de ocorrência generalizada em *Citrus* e gêneros afins, como *Poncirus* e *Fortunella*, possibilitou, em virtude da geração de embriões apogâmicos, a preservação de inúmeras mutações espontâneas de surgimento anterior ao das técnicas de propagação vegetativa empregadas pelo homem (NISHIURA, 1965).

Frost e Krug (1942) comentam que a enorme diversidade observada em *Citrus*, a par de sua elevada heterozigiosidade, sugere a ocorrência de frequências relativamente altas de mutações gênicas. Raghuvanshi (1969) acrescenta que células somáticas apresentando divisão desigual, restabelecimento do núcleo resultando em células poliploides, pontes somáticas e atraso dos cromossomos na anáfase parecem não ser incomuns em citros, enfatizando que tais aberrações na cariocinese poderiam facilmente induzir o aparecimento de células somáticas com genótipo modificado em regiões de crescimento, determinando, com as divisões celulares posteriores, o aparecimento de ramos modificados ou de variações em gemas e em setores de frutos. Mutações gênicas também são frequentes em *seedlings* nucleares.

Apesar de as variações somáticas verificadas em pomares comerciais serem geralmente desfavoráveis, apresentando baixa produtividade de frutos, características foliares atípicas ou fru-

tos anormais, um sem-número de mutações espontâneas de elevado valor tem sido identificado (SOOST; CAMERON, 1975; SOOST; ROOSE, 1996), haja vista que a grande maioria das variedades cítricas comerciais surgiu em decorrência de algum tipo de mutação natural. Diversas laranjeiras doces originaram-se dessa forma em regiões da China, Mediterrâneo e Américas (NISHIURA, 1965; SOOST; CAMERON, 1975; SOOST; ROOSE, 1996). A laranjeira ‘Shamouti’, por exemplo, de grande importância em Israel, surgiu na Palestina como uma mutação de gema da laranjeira ‘Beladi’. Muitas laranjas sanguíneas, como a ‘Maltese’, que se caracterizam por possuir antocianina na casca, septos e vesículas de suco, originaram-se na região mediterrânea. A laranja ‘Bahia’ (‘de Umbigo’) foi encontrada no bairro do Cabula, cidade de Salvador, Estado da Bahia, como variação de ramo da laranjeira ‘Seleta’, cabendo destacar que, no grupo das laranjas de umbigo, inúmeras variedades têm sido selecionadas a partir de mutações somáticas em gemas ou ramos, à semelhança do que se verifica em outros grupos de laranjas doces, como ‘Pera’ e ‘Valência’. As laranjas ‘Salustiana’, da Espanha, e ‘Marrs’, do Texas, são variações somáticas de maturação precoce (SOOST; CAMERON, 1975; SOOST; ROOSE, 1996). Muitos tipos de tangerina surgiram como mutações espontâneas na China, no Japão e Sudeste da Ásia. No Japão, a maioria dos clones comerciais de tangerineira ‘Satsuma’ proveio de mutações somáticas espontâneas (IWAMASA; NISHIURA, 1982; KUKIMURA et al., 1976; NISHIURA, 1965; SOOST; CAMERON, 1975; SOOST; ROOSE, 1996). No Mediterrâneo, são conhecidas várias mutações naturais no grupo da tangerineira ‘Clementina’; na Espanha, distinguem-se as clementinas ‘Oroval’, ‘de Nules’, ‘Tomatera’, ‘Esbal’, ‘Hernandina’, ‘Guillermina’ e ‘Clementard’, todas originadas da ‘Clementina Fina’, cabendo mencionar, também, as seleções ‘Marisol’ e ‘Arrufatina’, mutações naturais das clementinas ‘Oroval’ e ‘de Nules’, respectivamente (BONO et al., 1982; BONO ÚBEDA et al., 1985). Outros exemplos incluem diversos tipos de limoeiros verdadeiros, como as variedades Eureka, Fino, Lisboa e Siciliano, e pomeleiros. Estes surgiram originalmente de provável hibridação natural de toranjeira com laranjeira doce, ou em decorrência de mutação espontânea em toranjeira, tendo sua identificação inicial se dado na Ilha de Barbados, em princípios do século 18. Ainda em relação aos pomelos, pode-se dizer que todas as variedades conhecidas originaram-se, direta ou indiretamente, da cultivar Duncan, a exemplo do pomelo ‘Marsh Seedless’, tipo com polpa branca e poucas sementes, que surgiu como um *seedling* dessa cultivar (NISHIURA, 1965). O pomeleiro ‘Thompson’, mutação de ramo do ‘Marsh Seedless’, cujos frutos apresentam polpa rosada, a seu turno, deu origem a diversos variantes com frutos de polpa vermelha, como o ‘Red Blush’ (SOOST; CAMERON, 1975; SOOST; ROOSE, 1996).

Quanto às variedades porta-enxerto, os exemplos de mutações espontâneas também são frequentes. Existem diversos casos envolvendo variações de limoeiro ‘Cravo’, como a seleção ‘Santa Cruz’, mutação de gema do limoeiro ‘Cravo Santa Bárbara’. Essa seleção distingue-se pelo número relativamente elevado de sementes de seus frutos (SOARES FILHO et al., 1999a, 2001a), o que é vantajoso, em se tratando de porta-enxerto de grande importância comercial, cuja propagação dá-se por sementes, graças à ocorrência da embriogenia nucelar, que possibilita a formação de plantas geneticamente uniformes. Variações em *seedlings* nucleares também ocorrem, podendo-se mencionar a seleção ‘Tropical’, provável mutação da tangerineira ‘Sunki’, que se destaca por

apresentar número elevado de sementes por fruto, alta poliembrionia e resistência, em nível de campo, à gomose-de-*Phytophthora* (SOARES FILHO et al., 2001a, 2001b, 2001c, 2002a), resistência esta comprovada mediante inoculações artificiais com o fungo *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* em *seedlings* nucelares dessa seleção. Além disso, a ‘Sunki Tropical’ apresenta boa tolerância à seca, superior à verificada em clones comuns de tangerineira ‘Sunki’. Ainda em relação a porta-enxertos, exemplos de mutações naturais são conhecidos em praticamente todas as principais variedades comerciais, incluindo, entre outros, os grupos dos limoeiros ‘Rugoso’ e ‘Volkameriano’ (*C. volkameriana* V. Ten. & Pasq.), das laranjeiras ‘Azeda’ e ‘Caipira’ (*C. sinensis*), além de diversas ocorrências em *P. trifoliata*.

É interessante salientar que os citros, à semelhança de muitas dicotiledôneas, constituem um grupo de plantas cujos meristemas possivelmente estejam organizados em três camadas histogênicas: C-I, C-II e C-III. A camada C-I origina, praticamente, somente a epiderme; C-II produz o tecido esporógeno, incluindo o nucelo e os gametas masculinos e femininos, também formando o cortex e tecidos vasculares do caule, além de tecidos subepidêrmicos da folha e parede do ovário; a camada C-III, ou camada central, por sua vez, produz maiores ou menores quantidades das partes internas do caule, da folha e parede do ovário (CAMERON et al., 1964).

As mutações não ocorrem, necessariamente, em todas as camadas histogênicas. Observações realizadas em *seedlings* nucelares dos pomelos de polpa pigmentada (presença de caroteno e licopeno) ‘Thompson’, ‘Foster’ e ‘Burgundy’ indicam que os mesmos são quimeras periclinais. Essas cultivares surgiram como mutações somáticas de pomelos de polpa branca. ‘Thompson’ e ‘Burgundy’ apresentam coloração nas vesículas de suco, porém não na casca, enquanto que o pomelo ‘Foster’ é colorido em ambos os tecidos. ‘Thompson’ tem originado variações de gemas com polpa vermelha, a exemplo do ‘Red Blush’, conforme já mencionado, que também manifestam coloração na casca. Por outro lado, *seedlings* nucelares dos pomeleiros ‘Thompson’ e ‘Burgundy’ somente produzem frutos com polpa branca, enquanto que *seedlings* nucelares de ‘Red Blush’ dão formação a frutos com polpa vermelha, típicos dessa variedade. Tem-se, assim, que os fatores de coloração em ‘Thompson’ e ‘Burgundy’ estão presentes na camada C-I, que se relaciona à formação das vesículas de suco, mas estão ausentes em C-II. Já em ‘Red Blush’ esses fatores devem ocorrer em C-II e também em C-I, em decorrência da substituição de células de C-I por células de C-II, enquanto que seus *seedlings* nucelares apresentam-nos em todas as camadas histogênicas. Quanto ao pomelo ‘Foster’, os fatores de coloração devem estar presentes somente em C-II, com alguma interação entre tecidos, determinando a coloração rosada de sua polpa. Seus *seedlings* nucelares, entretanto, produzem frutos com polpa e casca vermelhas, significando que estes possuem fatores de coloração tanto em C-I como em C-II (CAMERON et al., 1964; SOOST; ROOSE, 1996).

Os fatos relatados são um claro indicativo de que o melhorista de citros tem à sua disposição, na natureza, imensas possibilidades de identificar variantes tanto de interesse comercial imediato como para uso em programas de melhoramento genético, a exemplo de fontes de adaptação a plantios adensados e a condições ambientais adversas, bióticas e abióticas, fontes essas importan-

tes, notadamente, no desenvolvimento de variedades porta-enxerto. Nesse contexto, excelentes oportunidades de identificação de novas variedades apresentam-se a partir do estudo do germoplasma disponível, existente em coleções de trabalho, em centros de diversidade natural e mesmo em pomares comerciais, principalmente naqueles mais antigos, que, em princípio, tiveram maiores chances de ocorrência de mutações espontâneas.

## Mutações induzidas

Conforme discutido, as mutações de manifestação espontânea são de inquestionável importância no melhoramento genético dos citros, uma vez que a grande maioria dos clones ou seleções de variedades comerciais, copas e porta-enxertos, surgiu por essa via natural. Com base nesses fatos, diversos estudos apoiados no emprego de técnicas dirigidas ao estímulo intencional de obtenção de mutantes, passíveis de resultar em novas variedades de valor prático, vêm sendo conduzidos.

Apesar de a indução artificial de mutações poder se realizar tanto mediante o emprego de mutagênicos químicos como físicos, os últimos estão entre os mais utilizados. O primeiro experimento visando à indução de mutações em citros baseou-se no uso de raios-X, em 1935 (SOOST; CAMERON, 1975; SOOST; ROOSE, 1996). A variabilidade genética, mascarada por genes dominantes em locos heterozigotos, pode, dessa forma, ser revelada, além de se evitar algumas desvantagens relacionadas à hibridação, tais como o rompimento de combinações gênicas favoráveis, a ocorrência de incompatibilidade gametofítica e a competição dos embriões nucelares com o zigótico (SPIEGEL-ROY; PADOVA, 1973).

O quimerismo é o principal problema do melhoramento genético por indução de mutação na maioria das plantas de propagação vegetativa. Para limitá-lo, técnicas como a irradiação de proembriões nucelares e a irradiação de *seedlings* nucelares, imediatamente antes ou após sua decapitação, podem ser utilizadas (BROERTJES; HARTEN, 1978; KUKIMURA et al., 1976). Esse último procedimento fundamenta-se no fato de que gemas adventícias podem originar-se de uma ou poucas células do hipocótilo de *seedlings* decapitados, possibilitando a obtenção de uma alta porcentagem de mutantes sólidos (não quiméricos), desde que o tratamento mutagênico seja realizado imediatamente antes ou após a decapitação (TULMANN NETO, 1980).

Estudos pioneiros, realizados com a laranjeira 'Shamouti' e com o pomeleiro 'Marsh Seedless', mostraram a possibilidade de se obter plantas inteiras a partir de calos provenientes de óvulos, verificando-se o desenvolvimento de embrioides, brotações e plântulas. Com base nisso, tem-se dado, também, particular atenção ao uso de técnicas *in vitro* em programas de melhoramento genético por mutação, irradiando-se calos resultantes de óvulos não fertilizados (BROERTJES; HARTEN, 1978).

Ao contrário do que ocorre quando células individuais são irradiadas, a detecção e o isolamento de mutações induzidas em tecidos organizados e multicelulares apresentam muitas dificuldades, tais como a formação de quimeras setoriais e mericlinais. Deve-se, igualmente, atentar para o

fato de que, mesmo quando formados a partir da proliferação de células mutadas, setores somáticos podem ser perdidos, desde que se manifestem em partes da planta que não originem desenvolvimentos posteriores (DONINI, 1975). É importante salientar, ainda, que, quando gemas são expostas à radiação, as mutações, em geral somáticas e de expressão recessiva, evidenciam-se somente a partir da segunda geração vegetativa –  $V_2$ , dependendo, em última análise, da camada celular (C-I, C-II ou C-III) afetada pela radiação. No primeiro ciclo vegetativo ( $V_1$ ), as células mutadas, por se darem em pequeno número e em decorrência da seleção diplôntica, não permitem a manifestação de regiões mutadas. Com a poda dos ramos  $V_1$  e surgimento de novas brotações ( $V_2$ ), as quimeras mericlinais ou setoriais podem transformar-se em periclinais. Nova poda, agora nos ramos  $V_2$ , determinando o desenvolvimento da geração vegetativa  $V_3$ , pode permitir a formação de uma quimera periclinal estável, ou de um mutante sólido. Assim, a poda severa dos ramos em crescimento ( $V_1$  e  $V_2$ ) constitui detalhe técnico de grande importância, pois essa operação pode permitir a exteriorização de mutações em princípio não detectáveis (CAMPO DALL'ORTO et al., 1983).

Quando da utilização de gemas dormentes em programas de melhoramento genético por irradiação, usualmente recomenda-se que o material a ser tratado seja obtido no início do período vegetativo, evitando-se o emprego de gemas em dormência profunda ou em estádios avançados de desenvolvimento, muito embora no início da brotação, ou da expansão, as gemas já se apresentem formadas e com uma estrutura muito complexa (NYBOM; KOCH, 1965).

R. A. Hensz, em meados do século passado, obteve milhares de plantas a partir de sementes e gemas irradiadas de pomeleiro e de laranja 'Valência', observando algumas alterações persistentes. Entre os *seedlings* resultantes, oriundos do pomeleiro 'Hudson', foi encontrado o conhecido pomelo 'Star Ruby', que se caracteriza por sua polpa vermelha e reduzido número de sementes, porém são pequenas as evidências de que esta variedade tenha sido produzida por irradiação, sendo mais provável que o referido mutante trate-se de uma variação espontânea.

Vários estudos vêm sendo conduzidos dentro dessa linha de melhoramento genético, boa parte dirigida à obtenção de variedades de mesa, produtoras de frutos sem sementes, envolvendo pomeleiros, laranjeiras doces, limoeiros e tangerineiras (SOOST; ROOSE, 1996), entre outros grupos.

Embora alguns resultados estimulem a continuidade de estudos dirigidos ao desenvolvimento de novas variedades mediante o emprego de técnicas de indução artificial de mutações, a exemplo daqueles apresentados por Latado et al. (2001a, 2001b), que indicam a possibilidade de criação de mutantes induzidos de laranja 'Pera' de interesse comercial, precoces e com reduzido número de sementes em seus frutos, até o momento poucas variedades de expressão econômica foram produzidas, dentre as quais se incluem as mencionadas por Williams (2010a, 2010b), liberadas pelo programa de melhoramento genético de citros da Universidade da Califórnia e pelo Ivia, evidenciando as dificuldades de obtenção de resultados favoráveis ao emprego de técnicas de radiação, as quais, ainda, são muito onerosas, especialmente no tocante à infraestrutura necessária à sua execução.

## Poliembrionia

A poliembrionia é comum a muitas espécies de *Citrus* e gêneros afins, também se fazendo presente em outras espécies de fruteiras, a exemplo da mangueira (*Mangifera indica* L.). Identificada pela primeira vez em 1719, em sementes de laranja doce, por Leeuwenhoeck (MAHESHWARI, 1950), passou a ser mais amplamente conhecida após estudos realizados por Strasburger, publicados em 1878, nos quais foi relatada a formação de embriões adventícios a partir de células nucelares de citros, sendo esse fenômeno denominado poliembrionia nucelar ou adventícia (BACCHI, 1943, 1944; FROST, 1926; MOREIRA et al., 1947; TORRES, 1936). Caracteriza-se pela presença de dois ou mais embriões em uma mesma semente, verificando-se, na maioria das vezes, a existência de um único embrião obtido por via sexuada, sendo os demais de origem assexuada, comumente denominados nucelares, em razão de serem formados, conforme já mencionado, com base em células do nucelo, situadas na superfície do saco embrionário, dando-se seu desenvolvimento em direção centrípeta a este (MOREIRA et al., 1947; WEBBER, 1940). Eventualmente, pode haver a geração de mais de um embrião sexuada, em decorrência da formação de dois ou mais sacos embrionários, ou por clivagem do embrião sexuada, originando, nesta situação, gêmeos geneticamente idênticos (BACCHI, 1944; FURUSATO et al., 1956; GURGEL, 1952; GURGEL; SOUBIHE SOBRINHO, 1951; MOREIRA et al., 1947; SOUBIHE SOBRINHO; GURGEL, 1953). A poliembrionia (Figura 2), particularmente a embriogenia nucelar, cabe enfatizar, desempenha importante papel na preservação natural de diversas formas de citros, sem a interferência direta do homem.



Foto: Antônio da Silva Souza

Figura 2. Embriões excisados de semente poliembriônica de citros.

Embora se reconheça que o potencial embriogênico verifica-se em toda a região do nucelo (ESAN, 1973; ESEN; SOOST, 1977; GURGEL; SOUBIHE SOBRINHO, 1951; WAKANA; UEMOTO, 1988), observa-se uma nítida concentração de embriões nucelares na região da micrópila, ou seja, no ápice do saco embrionário (DUBEY; RISHI, 1976; GURGEL; SOUBIHE SOBRINHO, 1951; MOREIRA, 1996; MOREIRA et al., 1947; VÁSQUEZ ARAUJO, 1991; WEBBER, 1940; YANG, 1968). Resultados relativos à excisão de embriões em sementes de variedades poliembriônicas de citros, apresentados na Tabela 1, evidenciam essa situação.

O desenvolvimento desses embriões não parece sincronizado, uma vez que em sementes maduras ocorrem tanto embriões grandes como pequenos, fato este que pode estar associado à

**Tabela 1.** Posição de embriões em sementes de diversas variedades cítricas.

Variedade <sup>(1)</sup>	TEE <sup>(2)</sup>	Posição de embriões na semente <sup>(3)</sup>							
		A		B		C		D	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
TSK <sup>(4)</sup>	625	623	99,7	2	0,3	-	-	-	-
LCR <sup>(4)</sup>	291	291	100,0	-	-	-	-	-	-
LCR <sup>(5)</sup>	2.448	2.139	87,4	254	10,4	54	2,2	1	0,04
LVK <sup>(4)</sup>	433	430	99,4	1	0,2	1	0,2	1	0,2
LPE <sup>(5)</sup>	1.890	1.341	71,0	356	18,8	164	8,7	29	1,5
Cleo <sup>(5)</sup>	2.667	2.082	78,1	476	17,8	69	2,6	40	1,5

<sup>(1)</sup> Variedades: TSK – tangerineira 'Sunki' [*Citrus sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka], LCR – limoeiro 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck), LVK – limoeiro 'Volkameriano' (*C. volkameriana* V. Ten. & Pasq.), LPE – laranja 'Pera' [*C. sinensis* (L.) Osbeck], Cleo – tangerineira 'Cleópatra' (*C. reshni* hort. ex Tanaka).

<sup>(2)</sup> TEE: totais de embriões excisados.

<sup>(3)</sup> A: região da micrópila, B: laterais da semente, C: região central da semente, D: região da calaza.

Fonte: <sup>(4)</sup> Moreira (1996); <sup>(5)</sup> Vásquez Araujo (1991).

maior ou menor precocidade de sua formação, respectivamente (MEDRADO, 1998; MORAIS, 1997; MOREIRA, 1996; MOREIRA et al., 1947; SOARES FILHO et al., 1994, 2000, 2002b; VÁSQUEZ ARAUJO, 1991). Quanto aos embriões zigóticos, à semelhança dos nucelares, sua localização dá-se principalmente na região micropilar da semente, o que é perfeitamente compreensível, uma vez que esta coincide com a posição da oosfera no saco embrionário (DIAZ et al., 1979; JUAREZ et al., 1976; MOREIRA, 1996; NAVARRO et al., 1979; PASQUAL, 1985; SOARES FILHO et al., 1994; THAKUR; BAJWA, 1971; VÁSQUEZ ARAUJO, 1991). A Tabela 2 complementa esse comentário.

**Tabela 2.** Posição de embriões zigóticos em sementes de diversas variedades cítricas.

Variedade <sup>(1)</sup>	Teze <sup>(2)</sup>	Posição de embriões zigóticos na semente <sup>(3)</sup>							
		A		B		C		D	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
TSK <sup>(4)</sup>	252	251	99,6	1	0,4	-	-	-	-
LCR <sup>(4)</sup>	39	39	100,0	-	-	-	-	-	-
LCR <sup>(5)</sup>	372	354	95,2	12	3,2	6	1,6	-	-
LVK <sup>(4)</sup>	52	52	100,0	-	-	-	-	-	-
LPE <sup>(5)</sup>	71	43	60,6	22	31,0	3	4,2	3	4,2
Cleo <sup>(5)</sup>	98	78	79,6	17	17,4	2	2,0	1	1,0

<sup>(1)</sup> Variedades: TSK – tangerineira 'Sunki' [*Citrus sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka], LCR – limoeiro 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck), LVK – limoeiro 'Volkameriano' (*C. volkameriana* V. Ten. & Pasq.), LPE – laranja 'Pera' [*C. sinensis* (L.) Osbeck], Cleo – tangerineira 'Cleópatra' (*C. reshni* hort. ex Tanaka).

<sup>(2)</sup> Teze: totais de embriões zigóticos excisados.

<sup>(3)</sup> A: região da micrópila, B: laterais da semente, C: região central da semente, D: região da calaza.

Fonte: <sup>(4)</sup> Moreira (1996); <sup>(5)</sup> Vásquez Araujo (1991).

O fato de tanto os embriões nucelares como os zigóticos concentrarem-se na região da micrópila, a par de evidências de que estes últimos formem-se anteriormente aos primeiros (MAHESHWARI; RANGASWAMY, 1958; RANGAN et al., 1969; WATANABE, 1985), sugere que a divisão de células pré-embriônicas, resultando em embriões nucelares, pode estar associada à fertilização do óvulo, conforme indicado por Kobayashi et al. (1982), ou, segundo Frost e Soost (1968), a estímulos determinados pela própria polinização, relacionados à penetração, per se, do tubo polínico no saco embriônico, no processo de fertilização, pois a concentração de embriões nucelares na extremidade micropilar verifica-se mesmo em sementes em que não se detecta a formação de embriões zigóticos.

Diversos são os trabalhos que, com base em resultados de cruzamentos envolvendo tipos monoembriônicos e poliembriônicos, assumem que a poliembrionia é dominante sobre a monoembrionia (CAMERON; FROST, 1968; CAMERON; SOOST, 1979; FURR, 1969; PARLEVLIET; CAMERON, 1959; SOOST; CAMERON, 1975). Parlevliet e Cameron (1959) constataram que híbridos provenientes de cruzamentos entre parentais monoembriônicos eram quase que exclusivamente monoembriônicos, enquanto que hibridações entre indivíduos monoembriônicos e poliembriônicos produziram ambos os tipos, em proporções que frequentemente se aproximaram da relação 1:1, muito embora cruzamentos entre tangerineira 'Ponkan' e quatro diferentes parentais monoembriônicos tenham apresentado proporções de híbridos poliembriônicos superiores ao esperado nessa relação. Analisando esses resultados, os referidos autores propuseram a existência de um gene principal, dominante, que denominaram de *P*, como sendo responsável pela expressão da poliembrionia. Em tipos monoembriônicos, como nas toranjeiras, nas tangerineiras 'Clementina' e 'Wilking' e no tangor 'Temple', tal gene deve ocorrer na forma homozigota recessiva (*pp*). Em tangerineira 'Ponkan', entretanto, Parlevliet e Cameron (1959) sugerem que mais de um gene principal deve estar envolvido no controle da poliembrionia, ou, alternativamente, que o elevado número de híbridos poliembriônicos obtido em cruzamentos com essa cultivar seja resultante da presença de genes modificadores, afetando o comportamento da poliembrionia. Observações conflitantes com a hipótese de que a poliembrionia tenha seu controle genético associado a um único loco gênico também foram relatadas por Cameron e Frost (1968), os quais citam que, em cruzamentos envolvendo a tangerineira 'Clementina', como parental feminino, e *P. trifoliata*, espécie poliembriônica, entre 32 híbridos obtidos, 31 comportaram-se como monoembriônicos. Evidências de que variedades essencialmente monoembriônicas não dão origem a embriões nucelares foram igualmente constatadas por Ozsnan e Cameron (1963), a partir de cruzamentos envolvendo, além da tangerineira 'Clementina', outras variedades monoembriônicas por excelência, quais sejam, a tangerineira 'Wilking' e a toranjeira 'Siamese', esta uma provável sinonímia de 'Kao Phuang' (HODGSON, 1967), utilizando como parental masculino *P. trifoliata*. Cameron e Soost (1979) reforçam a maior complexidade da herança desse caráter, comentando que a análise de progênes de citros, tendo como um dos ancestrais *P. trifoliata*, indicou que mais de um gene deve estar envolvido na manifestação da poliembrionia,

presumindo-se a presença de dois genes dominantes,  $P_1$  e  $P_2$ , complementares, e não de um gene, como inicialmente suposto. Esses autores concluíram que diferentes variedades de citros podem ser heterozigotas ou homozigotas para um ou ambos os locos gênicos propostos, de modo que as progênes de cruzamentos entre tais variedades apresentarão uma grande variação de proporções de indivíduos poliembriônicos : monoembriônicos. Assim, cruzamentos entre indivíduos monoembriônicos poderão dar formação a híbridos poliembriônicos em alguns casos, desde que cada um possua um dos genes dominantes  $P$ . Deidda e Chessa (1982) reforçam a hipótese de que a herança da poliembria não seja monogênica, sugerindo a existência de três genes dominantes e complementares:  $P_1$ ,  $P_2$  e  $P_3$ . Recentemente, mediante o emprego de marcadores moleculares associados à técnica *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), Kepiro e Roose (2010) identificaram um gene principal ligado à apomixia.

Embora seja possível caracterizar variedades e/ou espécies poliembriônicas em função da expressão de seus graus de poliembria, desde baixos, como em muitas das seleções de tangerineira 'Sunki', a elevados, como na tangerineira 'Cleópatra', esse caráter sofre influências do ambiente no que concerne à sua intensidade de manifestação, supondo-se que o número de embriões por semente seja controlado por genes menores (IWAMASA et al., 1967). Expressivas variações têm sido verificadas em uma mesma variedade, considerando-se localidades e anos distintos, temperatura, variedade polinizadora, estado nutricional do fruto, localização do fruto em relação aos quadrantes da copa, idade da planta e o porta-enxerto utilizado (CAMERON; SOOST, 1979; FROST; SOOST, 1968; MOREIRA et al., 1947; OGATA et al., 1981; PARLEVLIET; CAMERON, 1959; SOARES FILHO et al., 1995; SOOST; CAMERON, 1975; SOOST; ROOSE, 1996).

## Poliploidia

A poliploidia diz respeito a um aumento no número de conjuntos cromossômicos ou genomas, sendo coletivamente denominados poliploides indivíduos com três ou mais conjuntos cromossômicos completos. Pode ser distinguida em autopoliploidia e alopoliploidia. Os autopoliploides originam-se pela multiplicação do número de genomas de uma mesma espécie; geralmente são parecidos com as respectivas espécies diploides. Em citros, autotetraploides podem ocorrer naturalmente a partir da germinação de sementes, com uma frequência variando de 1% a 7% (BARRETT; HUTCHINSON, 1982; SALEH et al., 2008). Alopoliploides, por sua vez, são indivíduos que possuem dois ou mais genomas distintos, provenientes de diferentes espécies (METTLER; GREGG, 1973; WRIGHT, 1976). Por essa razão, os alopoliploides normalmente exibem combinações das características dos parentais envolvidos em sua formação, podendo os graus de semelhança estarem voltados para um ou outro dos pais, caso ocorra dominância, sendo difícil determinar em que nível de extensão as diferenças quantitativas e qualitativas observadas são um reflexo de mecanismos genéticos ou da poliploidia em si, cujos efeitos são melhor avaliados em autotetraploides (SWANSON, 1957).

A poliploidia comumente resulta em um aumento no tamanho das células (ANDERSON, 1972), observando-se que células tetraploides, geralmente, têm um volume duas vezes superior e um comprimento, ou largura, 20% a 25% maior do que o de células diploides correlatas, sendo tais aumentos em tamanho mais facilmente detectados nas células-guarda dos estômatos (WRIGHT, 1976). Há evidências, contudo, indicativas de que o tamanho de células, tecidos e órgãos nem sempre acompanha o nível de ploidia, nem é igual para todas as estruturas (MEDRI et al., 1980). A poliploidia, além disso, pode induzir um desenvolvimento fisiológico lento (ALLARD, 1971; SWANSON, 1957; WRIGHT, 1976).

Diversos fatores podem conduzir à poliploidia. Se um meristema é exposto a excessivo calor, estresse hídrico ou frio, por exemplo, os distúrbios provocados podem ser suficientes para impedir a formação da parede celular, sem, contudo, obstar a duplicação cromossômica durante a divisão mitótica, verificando-se uma tendência à formação de células com um número dobrado de cromossomos (ALLARD, 1971; WRIGHT, 1976). Na natureza, esse fenômeno ocorre com frequência em células somáticas, constatando-se, muitas vezes, a formação de tecidos poliploidizados em indivíduos que, no seu todo, permanecem como diploides. Mais raramente, pode não ocorrer redução do número de cromossomos durante a meiose, havendo, como consequência da união de gametas não reduzidos, a formação de indivíduos poliploides, principalmente triploides (METTLER; GREGG, 1973; WRIGHT, 1976). Intencionalmente, a poliploidia passou a ser induzida artificialmente a partir de 1937, com base no emprego da colchicina, alcaloide extraído dos bulbos da planta *crocus* do outono (*Colchicum autumnale* L.) (ALLARD, 1971).

A poliembrionia, fenômeno comum a diversas espécies de *Citrus* e gêneros afins a este, conforme já apresentado, pode favorecer a preservação de indivíduos poliploides. A esse respeito, Mehra e Bawa (1969) destacam que as espécies cítricas, de um modo geral, são pré-adaptadas à ocorrência de poliploidia, uma vez que a manifestação conjunta da reprodução sexuada e da apomixia permite um escape a possíveis casos de esterilidade, aumentando as chances imediatas de sobrevivência e difusão de novas formas.

O número haploide de cromossomos de todas as espécies de *Citrus*, bem como dos gêneros *Poncirus* e *Fortunella*, é nove, sendo a condição diploide predominante, embora poliploides sejam identificados ou produzidos, mostrando-se úteis em programas de genética e de melhoramento. Formas tetraploides têm sido reportadas para esses gêneros, havendo, também, indicações de indivíduos triploides, pentaploides, hexaploides, bem como aneuploides (CAMERON; FROST, 1968; CHAPOT, 1975).

Fenotipicamente, os tetraploides, em comparação com os diploides, apresentam folhas maiores em largura do que em comprimento, mais espessas, com tendência a uma coloração mais escura. As asas dos pecíolos são normalmente mais largas, e em algumas variedades fundem-se frequentemente com o limbo foliar. Seu desenvolvimento é mais lento, a ocorrência de brotações vigorosas é menos comum, e a copa é menos ereta e mais compacta. Além disso, apresentam

florescimento retardado e menor frutificação (CAMERON; FROST, 1968; MOREIRA, 1980), embora existam evidências de alta produtividade em seleções tetraploides de limoeiro ‘Lisboa’ e de alguns pomeleiros (CAMERON; FROST, 1968).

Quanto à influência da poliploidia sobre o número de sementes, ocorrem variações, havendo tetraploides que apresentam redução no número de sementes de seus frutos, outros que não mostram alterações, como em situações envolvendo as laranjeiras doces ‘Ruby’ e ‘Paperrind’, e outros, a exemplo de caso observado em limoeiro ‘Lisboa’, que são mais sementeados, em comparação com diploides da mesma variedade. O número de embriões por semente em geral é menor nos tetraploides, constatando-se uma tendência de aumento em seu tamanho médio, conforme Cameron e Frost (1968). Esses autores citam, também, que autotetraploides de natureza espontânea parecem ocorrer quase que exclusivamente como *seedlings* nucelares e que os efeitos da tetraploidia em *Citrus* podem ser melhor avaliados em seleções nucelares, dado que a meiose e a segregação genética não são envolvidas. Comentam, outrossim, que tetraploides, na condição de pés-francos (*seedlings*), frequentemente apresentam menor desenvolvimento em comparação com o que se verifica quando enxertados.

Reportando-se ao emprego da poliploidia na criação de variedades copa triploides, produtoras de frutas cítricas de alta qualidade para consumo in natura, países como Espanha, Estados Unidos da América e França vêm, há anos, conduzindo programas de melhoramento genético dirigidos a essa finalidade. Conforme mencionado anteriormente, o Ivia, Valência, Espanha, tem aplicado substanciais esforços nessa linha de pesquisa, já tendo produzido milhares de híbridos triploides, a partir dos quais vêm sendo selecionadas diversas variedades para uso comercial, a exemplo de Garbí e Safor.

A obtenção intencional de poliploides em programas de melhoramento genético tem na hibridação somática via fusão de protoplastos uma importante ferramenta de trabalho, aplicando-se, em citros, tanto no melhoramento de copas como, notadamente, de porta-enxertos. Espera-se que os híbridos (alotetraploides) obtidos por esse processo apresentem características complementares provenientes das variedades doadoras de protoplastos, variedades estas passíveis de relacionar-se a espécies pertencentes a diferentes conjuntos (*pools*) gênicos, entre as quais a troca de genes mediante hibridação convencional pode ser impedida por barreiras reprodutivas. Nesse contexto, cabe destacar que a fusão de protoplastos de variedades comerciais de *Citrus* com aqueles de espécies pertencentes a gêneros afins, como *Microcitrus* e *Eremocitrus*, de reconhecido valor de adaptação a ambientes sujeitos a estresses, pode apresentar perspectivas favoráveis sob o ponto de vista do melhoramento genético dos citros, particularmente no tocante à obtenção de porta-enxertos.

Por serem alotetraploides, tais híbridos mantêm as ligações gênicas presentes nos pais, em razão da ausência de segregação meiótica (OLIVEIRA, 1993). Desse modo, os genes deletérios recessivos presentes nas variedades parentais permanecem sem expressão, ocultos sob a condição

heterozigota, dando-se o contrário com as características controladas por genes dominantes ou codominantes, cuja possibilidade de manifestação nos híbridos é preservada.

Melhoristas de citros têm gerado híbridos somáticos interespecíficos (GROSSER et al., 1989, 1991; KOBAYASHI et al., 1988; OHGAWARA et al., 1989; TUSA et al., 1990) e intergenéricos de espécies sexualmente compatíveis (DENG et al., 1991; GROSSER et al., 1988) e incompatíveis (GROSSER et al., 1990, 1991).

Os limoeiros 'Cravo', 'Volkameriano' e 'Rugoso' têm despertado grande interesse como porta-enxertos, por serem altamente produtivos e tolerantes ao vírus-da-tristeza-dos-citros e à seca, porém têm a desvantagem de serem suscetíveis ao declínio dos citros, sendo os dois primeiros também intolerantes à morte-súbita dos citros. As laranjeiras doces, por sua vez, são tolerantes ao declínio e à morte-súbita dos citros, mas sua utilização como porta-enxertos tem sido drasticamente limitada em virtude da alta suscetibilidade à gomose de *Phytophthora*. Com base no exposto, tem-se que a hibridação somática de laranjeiras doces com os limoeiros 'Cravo', 'Rugoso' e 'Volkameriano' poderá originar porta-enxertos vigorosos, produtivos e tolerantes à seca, ao declínio e à morte-súbita dos citros, além de menos suscetíveis, em comparação com as laranjeiras doces, à gomose de *Phytophthora*. Outro exemplo poderia incluir a hibridação somática entre a laranjeira 'Azeda' com as tangerineiras 'Cleópatra' e 'Sunki' ou com laranjeiras doces, reunindo as características de indução de boa produtividade e qualidade de frutos, longevidade, tolerância à geadas, à seca e ao declínio, resistência à gomose de *Phytophthora*, além de boa adaptação a uma grande diversidade de solos da primeira, com a tolerância à tristeza nela ausente, porém presente nas citadas tangerineiras, assim como nas laranjeiras doces.

## Incompatibilidade

O sistema gametofítico de incompatibilidade foi identificado por East e Mangelsdorf, em 1925, em *Nicotiana <sup>s</sup>sanderiae* W. Watson, recebendo, originalmente, a denominação de sistema de alelos em oposição. Nesse sistema, a incompatibilidade é controlada por um só loco gênico, "S", que, geralmente, é caracterizado pelo grande número de formas alélicas que possui. No sistema gametofítico, o crescimento do tubo polínico é, normalmente, muito lento quando o grão de pólen e o estilo têm o mesmo alelo S; conseqüentemente, as plantas são praticamente sempre heterozigotas nesse loco (ALLARD, 1971).

Resultados de hibridações entre variedades autoincompatíveis, autopolinizações e retrocruzamentos de progênes obtidas a partir de variedades autoincompatíveis, além da ocorrência de variedades que apresentam incompatibilidade cruzada, indicam a existência de um sistema de alelos "S" determinando relações de incompatibilidade no gênero *Citrus* (FROST; SOOST, 1968; SOOST, 1965, 1969; SOOST; CAMERON, 1975; SOOST; ROOSE, 1996; UENO, 1978). Soost e Cameron (1975) e Soost e Roose (1996) comentam que *C. maxima* é a única espécie na qual esse sistema

está claramente definido. A autoincompatibilidade também tem sido verificada em tangerineira 'Clementina', nos tangelos 'Orlando' e 'Minneola', nos híbridos produtores de frutos tipo tangerina 'Robinson', 'Osceola', 'Nova' e 'Page', no orangelo (*C. paradisi* x *C. sinensis*) 'Sukega' (FROST; SOOST, 1968; SOOST, 1965, 1969; SOOST; ROOSE, 1996), bem como em cultivares de limoeiro verdadeiro e em limeiras doces (FROST; SOOST, 1968), entre outros tipos de citros.

Muitas das variedades autoincompatíveis são conhecidas, ou suspeitas, como híbridas, boa parte das quais tem em *C. paradisi* um dos parentais, cabendo acrescentar a suposição de que essa espécie tenha derivado de *C. maxima*, podendo ter recebido, desta última, genes para autoincompatibilidade (SOOST; CAMERON, 1975; SOOST; ROOSE, 1996). Soost (1969), Soost e Cameron (1975) e Soost e Roose (1996) citam que estudos compreendendo diversas variedades autoincompatíveis indicam a existência de pelo menos quatro alelos, acreditando-se que oito alelos devam estar presentes no controle desse sistema. Soost (1969) sugere, ainda, a presença de um alelo para autocompatibilidade, dominante, o qual denominou  $S_F$ , conforme se verifica pela produção de indivíduos autoincompatíveis a partir de cruzamentos entre variedades autocompatíveis. A autocompatibilidade destas últimas seria consequente da presença de alelos  $S_F$  na condição heterozigota, sendo que, nos híbridos autoincompatíveis, tais alelos estariam ausentes. Assim, conclui esse autor, cruzamentos entre variedades autoincompatíveis com variedades autocompatíveis darão origem a progênes que serão autocompatíveis ou que segregarão, caso os parentais autocompatíveis apresentem o alelo  $S_F$  na condição homozigota ( $S_F S_F$ ) ou heterozigota ( $S_F S_X$ ), respectivamente.

Cabe acrescentar que Ueno (1978), baseando-se na ocorrência de compatibilidade unilateral em cruzamentos entre *C. tachibana* [(Makino) Tanaka] com 'Hassaku' e com 'Natsu Mikan' (*C. tardiva* hort. ex Shirai), sugeriu que o controle desse caráter está relacionado a mais de um loco gênico. Essa pressuposição indica que, em citros, o controle genético da incompatibilidade pode ser complexo (SOOST; ROOSE, 1996).

A autoincompatibilidade pode ser explorada comercialmente na produção de frutas cítricas de mesa, sem sementes. No grupo das tangerineiras, são conhecidas variedades e híbridos que, apesar de possuírem pólen e óvulos viáveis, são sexualmente autoincompatíveis, pois não se autopolinizam, a exemplo do que se dá dentro do grupo das clementinas, cujos frutos não têm sementes, desde que cultivadas em pomares isolados de variedades geradoras de pólen com os quais têm compatibilidade. São diversas as variedades de 'Clementina', tais como Arrufatina, Bruno, Clementard, Clemenules, Esbal, Fina, Guillermina, Hernandina, Loretina, Marisol, Orogrande, Oronules, Oroval, Soyma e Tomatera, as quais, além de autoincompatíveis, não se cruzam entre si. Dentre os híbridos autoincompatíveis do grupo das tangerineiras, tem-se: 'Ellendale' (tangor natural), 'Fortune', 'Nova', 'Ortanique' (tangor natural), 'Osceola', 'Page' e 'Robinson', bem como os tangelos 'Orlando' e 'Minneola'. As mencionadas variedades, apesar de autoincompatíveis, cruzam-se entre si, produzindo, assim, frutos com sementes.

A autoincompatibilidade associada à monoembrionia apresenta grande potencial quanto à geração de variedades híbridas. No grupo das tangerineiras, as clementinas, assim como ‘Ellendale’ e ‘Fortune’, possuem essa particularidade.

## Esterilidade masculina

Deve-se distinguir entre incompatibilidade e esterilidade. Na incompatibilidade, o pólen e os óvulos são funcionais, e a não formação de frutos decorre de algum obstáculo fisiológico que impede a fertilização. Esse obstáculo, em geral, manifesta-se em razão da não germinação do pólen sobre o estigma, ou por um crescimento lento do tubo polínico no estilo. A principal característica da esterilidade, por sua vez, é o não funcionamento dos gametas, decorrente de aberrações cromossômicas, da ação de genes cromossômicos ou de influências de origem citoplasmática. Esses fatores atuam causando abortamento ou modificações completas da flor, dos estames ou pistilos. Podem, também, impedir o desenvolvimento do saco embrionário, do embrião ou do endosperma (ALLARD, 1971).

Em citros, Iwamasa (1966 citado por SOOST; CAMERON, 1975) constatou segregações para anteras não desenvolvidas e para pólen estéril em cruzamentos entre tangerineira ‘Satsuma’, cujo pólen é estéril, e outras variedades produtoras de pólen normal. Dentre 20 híbridos obtidos de cruzamentos de ‘Satsuma’ com diversas variedades de citros, possuidoras de pólen fértil, oito produziram anteras abortadas; dentre 46 híbridos de tangerineira ‘Satsuma’ com *P. trifoliata*, 26 apresentaram completo abortamento do pólen. Essa situação evidencia que a esterilidade masculina observada em ‘Satsuma’ deve, provavelmente, ser um caráter qualitativo. Frost e Soost (1968) citam que a laranjeira ‘Bahia’ é completamente macho-estéril, dado que as células-mãe dos grãos de pólen dessa variedade degeneram antes da primeira divisão meiótica, fenômeno este constatado em outras laranjeiras doces, a exemplo de ‘Thompson’, ‘Navelênciã’, ‘Surprise’ e ‘Piriforme’, as duas primeiras mutações de gema da laranjeira ‘Bahia’. Esse tipo de degeneração também foi identificado na limeira ácida ‘Tahiti’. Os referidos autores relataram, ainda, que altas porcentagens de pólen defectivo têm sido observadas nas laranjeiras doces ‘Valência’, ‘Pera’, ‘Lima’ e ‘Cadenera’, em diversas variedades de limoeiro verdadeiro, como Eureka, em pomeleiros, limoeiro ‘Rugoso’, laranjeira ‘Azeda Bouquet’ e em ‘Kizu’ (*C. junus* Siebold ex Tanaka). Baixas porcentagens de pólen funcional têm sido verificadas, igualmente, na laranjeira doce ‘Shamouti’, segundo Furr (1969).

## Variabilidade genética e hibridação

Os citros, gênero *Citrus* e afins, constituem complexo grupo de plantas, apresentando ampla variabilidade de formas, as quais foram se acumulando ao longo de milênios, seja em razão

de seu cultivo desde a Antiguidade<sup>4</sup>, por diversas civilizações, seja em decorrência da preservação pela própria natureza, como consequência da embriogenia nucelar, já discutida. Os frutos cítricos variam em tamanho, desde os relativamente muito pequenos àqueles muito grandes. Dentre os menores, encontram-se os *kumquats* (*Fortunella* spp.) e as limas ácidas (*C. aurantiifolia*), cujas dimensões dificilmente ultrapassam 5 cm. No extremo oposto, estão as toranjas (*C. maxima*) e as cidras (*C. medica* L.), que podem atingir 30 cm em diâmetro ou comprimento. Outros caracteres igualmente apresentam grande diversidade: a coloração da casca varia do amarelo-esverdeado nas limas ácidas ao vermelho-alaranjado em algumas tangerinas, como a ‘Dancy’; o formato do fruto também mostra claras diferenciações, do oblato ao piriforme; quando maduros, os frutos de algumas espécies e variedades apresentam-se muito ácidos, enquanto que em outras a acidez é quase nula; o tamanho dos indivíduos adultos, por sua vez, também manifesta nítidas variações; enquanto todas as espécies do gênero *Citrus* mantêm suas folhas ao longo do ano, o gênero *Poncirus*, em climas temperados e subtropicais, é caducifólio (SOOST; ROOSE, 1996).

A expressiva variabilidade genética presente em *Citrus* e gêneros afins é de inquestionável utilidade em programas de melhoramento genético baseados em hibridação, particularmente aqueles dirigidos à obtenção de porta-enxertos, sobre os quais há um grande interesse em indivíduos adaptados a altas densidades populacionais e a ambientes adversos, tanto com respeito a fatores bióticos como abióticos. Nesse sentido, *Microcitrus* e *Eremocitrus*, encontrados sob a forma selvagem quase que exclusivamente na Austrália, destacam-se por sua notável tolerância à seca. *Eremocitrus* é pronunciadamente xerofítico, capaz de se desenvolver em regiões semiáridas, em solos com pouco ou nenhum nitrogênio, além de tolerar concentrações relativamente elevadas de sais presentes na solução do solo, enquanto que *Microcitrus* é semixerofítico, podendo suportar períodos de seca prolongados. Esses gêneros, assim como *Poncirus* e *Fortunella*, também se caracterizam por sua expressiva tolerância ao frio, apresentando adaptação a habitats onde nenhuma espécie de *Citrus* consegue sobreviver.

Gêneros mais primitivos, como *Severinia* (Tenore), igualmente mostram certos graus de afinidade com *Citrus*, verificando-se que o primeiro suporta teores de boro no solo suficientemente elevados para eliminar este último, sendo surpreendente o fato de que sob tais condições as raízes de *Severinia* absorvem e translocam quantidades muito baixas desse elemento, a ponto de permitir o estabelecimento de enxertos sadios de variedades comerciais de *Citrus*, mesmo em se tratando de copas bastante sensíveis ao boro, como as de limoeiros verdadeiros.

*Citropsis gilletiana* (Swingle & M. Kellerm.), parente selvagem nativo da República do Congo, é utilizada como porta-enxerto nesse país, sendo imune ao ataque de uma broca (coleóptero curculeonídeo) cujas larvas escavam o colo de plantas de *Citrus*, além de ser resistente à doença fúngica gomose-de-*Phytophthora* (SWINGLE, 1967) e ao nematoide cavernícola (HEARN et al., 1974).

---

<sup>4</sup> Período que compreende a época do nascimento das mais antigas civilizações até a queda do Império Romano, no século V, conforme iDicionário Aulete (2013).

Ademais, *Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus*, *Eremocitrus* e *Severinia*, a exemplo do gênero *Citropsis* [(Engl.) Swingle & M. Kellerm.], são altamente resistentes à gomose-de-*Phytophthora*.

Espécies como *Severinia buxifolia* [(Poir.) Ten.], à semelhança de *Eremocitrus glauca* [(Lindl.) Swingle], possuem tolerância à salinidade. *P. trifoliata* e *S. buxifolia* são consideradas resistentes aos complexos comuns do vírus-da-tristeza-dos-citros. *E. glauca* pode ser utilizada em programas de melhoramento genético dirigidos à obtenção de porta-enxertos com adequação a solos arenosos; e as espécies *Microcitrus australis* [(A. Cunn. ex Mudie) Swingle] e *M. australasica* [(F. Muell.) Swingle] são adaptadas a áreas sujeitas a chuvas pesadas e a solos com baixa fertilidade (HEARN et al., 1974). *S. buxifolia* e várias seleções de *P. trifoliata* mostram-se resistentes-tolerantes ao nematoide dos citros [*Tylenchulus semipenetrans* (Cobb)] (HUTCHISON; O'BANNON, 1972). *P. trifoliata* distingue-se como fonte de tolerância relativamente alta a solos encharcados (YELENOSKY et al., 1974).

*Citropsis*, *Eremocitrus*, *Microcitrus* e *Clymenia* (Swingle) podem ser utilizados em programas de melhoramento genético objetivando a obtenção de porta-enxertos que reduzem o porte das plantas, de forma a permitir a formação de pomares comerciais com maiores adensamentos de plantio (CASTLE, 1979).

Diante do exposto, depreende-se que a variabilidade genética em *Citrus* e gêneros afins é capaz de permitir a criação de porta-enxertos adaptados às mais diversas condições ambientais. Apesar das hibridações entre espécies de *Citrus* e entre este e gêneros afins serem, em muitas circunstâncias, passíveis de realização, deve-se atentar para a ocorrência de barreiras reprodutivas que dificultam ou mesmo impedem determinados cruzamentos. A esse respeito, o conjunto (*pool*) gênico associado a uma determinada cultura, incluindo todas as cultivares, parentes silvestres e espécies afins, pode ser dividido em três segmentos (FAO, 1991; GIACOMETTI, 1991; HOYT, 1988, 1992):

- Conjunto gênico primário (CG-1): contém as formas domesticadas e silvestres da cultura, sendo seus indivíduos interférteis; a transferência de genes é simples.
- Conjunto gênico secundário (CG-2): seus indivíduos podem ser cruzados com os de CG-1, porém muitos dos híbridos resultantes são estéreis; a transferência de genes para formas cultivadas é possível, contudo pode haver dificuldades.
- Conjunto gênico terciário (CG-3): constitui o limite extremo de alcance do potencial genético passível de ser explorado no melhoramento de uma dada cultura, sendo a transferência de genes para CG-1 possível somente mediante o emprego de técnicas não convencionais de melhoramento genético, envolvendo fusão de protoplastos, transformação genética, utilização de espécies-ponte, duplicação do número cromossômico e o cultivo in vitro de embriões; os híbridos obtidos com CG-1 são estéreis.

Relativamente a algumas espécies e gêneros afins ao *Citrus*, Giacometti (1991), com base em estudos realizados por diversos autores, sugeriu os seguintes conjuntos gênicos:

- CG-1: *C. aurantiifolia*, *C. aurantium*, *C. maxima*, *C. jambhiri*, *C. limettioides*, *C. limon*, *C. limonia*, *C. madurensis* Lour., *C. medica*, *C. reticulata*, *C. reshni*, *C. sinensis* e os gêneros *Fortunella* e *Poncirus*.
- CG-2: *C. combara* (Raf.), *C. hystrix* (DC.), *C. ichangensis* (Swingle), *C. latipes* [(Swingle) Tanaka], *C. macroptera* (Montrouz.) e o gênero *Microcitrus*.
- CG-3: gêneros *Atalantia* (Corrêa), *Citropsis*, *Clymenia* e *Eremocitrus*.

Certamente, a relação de espécies e gêneros identificados por Giacometti (1991) dentro de cada conjunto gênico está incompleta e é passível de revisão; *C. clementina*, *C. deliciosa*, *C. paradisi*, *C. sunki*, *C. tangerina*, *C. unshiu*, *C. volkameriana* e diversas outras espécies devem ser incluídas, por exemplo, em CG-1. Essas informações, entretanto, alertam sobre a existência de situações nas quais os cruzamentos ocorrerão com um maior ou menor grau de dificuldade, podendo-se concluir, por exemplo, que hibridações entre *Citrus* (CG-1) e *Microcitrus* (CG-2) poderão apresentar algumas restrições e que aquelas entre *Citrus* e *Eremocitrus* (CG-3) serão viáveis somente mediante o emprego de técnicas não convencionais, como a de fusão de protoplastos, muito embora Swingle (1967) indique a possibilidade de cruzamentos convencionais entre *Citrus* e *Eremocitrus*.

Híbridos envolvendo *Citrus* e gêneros afins vêm sendo constantemente obtidos, havendo denominações, presentes na literatura que trata do assunto, que identificam determinados tipos de cruzamento, dentre as quais se encontram: “tangelo”: tangerineira (diversas espécies, incluindo a mexeriqueira) x pomeleiro; “tangor”: tangerineira (diversas espécies, incluindo a mexeriqueira) x laranja (doces e azedas); “orangelo”: laranja (doces e azedas) x pomeleiro; “lemonange”: limoeiro verdadeiro x laranja doce; “lemonime”: limoeiro verdadeiro x limeira (doces e ácidas); “lemandarin”: limoeiro verdadeiro x tangerineira (diversas espécies, incluindo a mexeriqueira); “citrange”: laranja doce x *P. trifoliata*; “citradia”: laranja azeda x *P. trifoliata*; “citrumelo”: pomeleiro x *P. trifoliata*; “citremon”: limoeiro verdadeiro x *P. trifoliata*; “citrandarin”: tangerineira (diversas espécies, incluindo a mexeriqueira) x *P. trifoliata*; “citrangor”: laranja doce x citrange; “citrangor”: citrange x *P. trifoliata*; “orangequat”: laranja (doces e azedas) x *Fortunella (kumquat)*; “citrangorquat”: *Fortunella* x citrange; “limequat”: limeira (doces e ácidas) x *Fortunella*; “eremolemon”: limoeiro verdadeiro x *E. glauca*; “eremorange”: laranja doce x *E. glauca*; “eremoradia”: laranja azeda x *E. glauca*; “citrangeremo”: citrange x *E. glauca* (SWINGLE, 1967).

## Identificação e frequência de híbridos em cruzamentos controlados

Em espécies com sementes poliembriônicas, o tamanho do embrião é um caráter passível de ser utilizado como ferramenta auxiliar na identificação de embriões de origem sexuada, pois há uma tendência dos embriões zigóticos encontrarem-se entre aqueles de maior tamanho, sendo esta

situação tanto mais evidente quanto menor for o grau de poliembrião, conforme se depreende pela observação da Tabela 3, na qual se verifica uma relação inversa entre a porcentagem de poliembrião e a porcentagem de embriões zigóticos de maior tamanho.

**Tabela 3.** Porcentagem de poliembrião (%P) e distribuição de embriões zigóticos (número e porcentagem) dentro de classes de tamanho, de diversas variedades cítricas.

Variedade <sup>(1)</sup>	%P	Classe de tamanho de embrião <sup>(2)</sup>							
		G		M		P		MP	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
TSK <sup>(3)</sup>	15,9	244	96,8	6	2,4	2	0,8	-	-
LCR <sup>(3)</sup>	35,2	37	94,9	2	5,1	-	-	-	-
LCR <sup>(4)</sup>	56,8	323	86,8	27	7,3	18	4,8	4	1,1
LVK <sup>(3)</sup>	58,6	43	82,7	7	13,5	2	3,8	-	-
LPE <sup>(4)</sup>	90,7	33	46,5	26	36,6	11	15,5	1	1,4
Cleo <sup>(4)</sup>	98,8	49	50,0	9	9,2	26	26,5	14	14,3

<sup>(1)</sup> Variedades: TSK – tangerineira 'Sunki' [*Citrus sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka], LCR – limoeiro 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck), LVK – limoeiro 'Volkameriano' (*C. volkameriana* V. Ten. & Pasq.), LPE – laranjeira 'Pera' [*C. sinensis* (L.) Osbeck], Cleo – tangerineira 'Cleópatra' (*C. reshni* hort. ex Tanaka).

<sup>(2)</sup> G: grande ( $\geq 5,0$  mm), M: médio (3,0 mm a 4,9 mm), P: pequeno (1,0 mm a 2,9 mm), MP: muito pequeno ( $< 1,0$  mm).

Fonte: <sup>(3)</sup> Moreira (1996), Soares Filho et al. (2000); <sup>(4)</sup> Vásquez Araujo (1991), Soares Filho et al. (1994).

Esses resultados vão ao encontro de observações realizadas por Diaz et al. (1979) e Frost e Soost (1968), os quais mencionam que o desenvolvimento de um número reduzido de embriões por semente induz a um aumento no tamanho destes, favorecendo a germinação dos eventuais embriões zigóticos e, portanto, a sobrevivência dos híbridos.

A cor de cotilédones é outro caráter que pode contribuir na identificação de embriões de natureza híbrida, em razão de influências do polinizador sobre sua manifestação (efeito de metaxenia), conforme De Lange e Vincent (1977) e Ueno e Hirai (1983). Para tanto, é importante a utilização, em cruzamentos controlados, de parentais com coloração de cotilédones contrastantes entre si (VÁSQUEZ ARAUJO, 1991; VÁSQUEZ ARAUJO et al., 1994). Exemplificando: parentais femininos cujas sementes possuem embriões com cotilédones de coloração branca, dentre os quais se incluem as laranjeiras doces, laranjeiras azedas e pomeleiros, cruzados com parentais masculinos cujas sementes apresentam embriões que possuem cotilédones verdes, situação comum a muitas tangerineiras, como 'Cleópatra' e 'Sunki', darão formação a embriões zigóticos cuja cor de cotilédones será esverdeada, enquanto que aqueles de origem nucelar terão cotilédones brancos.

Na fase de *seedling*, ou seja, considerando plantas oriundas da germinação de sementes, a distinção entre nucelares e zigóticos pode ser feita, entre diversas técnicas conhecidas, mediante o emprego de marcadores moleculares [estudos de perfis isoenzimáticos e análises de segmentos

polimórficos de DNA, como *Random Amplified Polymorphic DNA* (Rapl), *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) e *Simple Sequence Repeats* (SSR) (microssatélites), esta última a mais aplicada atualmente], análises de bandeamento cromossômico e uso de marcadores genéticos morfológicos. Nesse caso, é comum a utilização da característica qualitativa, dominante, de *P. trifoliata*, identificada em estudos conduzidos pelo insigne melhorista de citros Walter Tennyson Swingle (HODGSON; CAMERON, 1938), que determina a presença de folhas trifolioladas (folhas compostas de três folíolos) em *seedlings* de natureza sexuada, resultantes de cruzamentos envolvendo esta espécie como parental masculino, tendo como parentais femininos espécies do gênero *Citrus* e de outros gêneros afins, a exemplo de *Fortunella*, que possuem limbos foliares simples (Figura 3).



Foto: Walter dos Santos Soares Filho

Figura 3. Folhas trifolioladas de citrumelo [*Citrus paradisi* Macfad. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] 'Swingle'.

Relativamente à frequência de indivíduos zigóticos em cruzamentos controlados, hibridações envolvendo parentais femininos monoembriônicos, a exemplo das toranjeiras, tangerineiras 'Clementina' e 'Wilking', tangor 'Temple', pomeleiro 'Sukega' e *C. ichangensis*, somente darão formação a indivíduos de natureza híbrida, com raras exceções envolvendo a formação de indivíduos de origem nucelar. Nas situações em que os parentais femininos são poliembriônicos, tem-se que a frequência de híbridos é inversamente proporcional ao grau de poliembrião (MEDRADO, 1998; MOREIRA, 1996; SOARES FILHO et al., 1994, 2000, 2002b, 2009; VÁSQUEZ ARAUJO, 1991). Resultados obtidos por diversos autores, apresentados na Tabela 4, exemplificam essa afirmação.

Nesses estudos, as porcentagens de poliembrião foram obtidas mediante contagens do número de embriões a partir de sua excisão das sementes amostradas, tendo seu cultivo sido realizado sob condições controladas, in vitro, objetivando garantir a sobrevivência do maior número possível de indivíduos. A conveniência do cultivo in vitro, entretanto, está diretamente relacionada à porcentagem de poliembrião dos parentais femininos utilizados, sendo, por seus custos relativamente dispendiosos, mais recomendada nas situações em que esses parentais apresentem graus elevados de poliembrião, acima de 70%, segundo evidenciado na Tabela 5.

As porcentagens de *seedlings* zigóticos, apresentadas nas Tabelas 4 e 5, estão subestimadas, em razão da utilização de híbridos de *P. trifoliata* (citranges, citrumelos e citrangequats) como parentais masculinos nos cruzamentos realizados, implicando em segregações da característica folhas trifolioladas, com conseqüente formação de híbridos com limbo foliar simples, não identificados visualmente, tendo como base a citada característica.

**Tabela 4.** Porcentagens de poliembrionia (%P) de diversas variedades cítricas e de *seedlings* zigóticos (%SZ) – folhas trifolioladas – obtidos de cruzamentos controlados entre essas variedades, utilizadas como parentais femininos, e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. e híbridos dessa espécie.

Variedade	% de poliembrionia	% de <i>seedlings</i> zigóticos
Tangerineira Sunki [ <i>Citrus sunki</i> (Hayata) hort. ex Tanaka] <sup>(1)</sup>	15,9	53,6
Tangerineira Sunki <sup>(2)</sup>	8,3	51,1
Limoeiro Cravo ( <i>C. limonia</i> Osbeck) <sup>(3)</sup>	56,8	18,6
Limoeiro Cravo <sup>(1)</sup>	35,2	18,6
Limoeiro Volkameriano ( <i>C. volkameriana</i> V. Ten. & Pasq.) <sup>(1)</sup>	58,6	14,2
Limoeiro Volkameriano <sup>(2)</sup>	79,2	16,3
Laranjeira Azeda comum ( <i>C. aurantium</i> L.) <sup>(2)</sup>	76,4	17,4
Laranjeira 'Pera' [ <i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck] <sup>(3)</sup>	90,7	6,0
Tangerineira 'Cleópatra' ( <i>C. reshni</i> hort. ex Tanaka) <sup>(3)</sup>	98,8	5,2

Fonte: <sup>(1)</sup> Moreira (1996) e Soares Filho et al. (2000); <sup>(2)</sup> Medrado (1998) e Soares Filho et al. (2002b); <sup>(3)</sup> Soares Filho et al. (1994) e Vásquez Araujo (1991).

**Tabela 5.** Porcentagens de poliembrionia (%P) de cinco variedades cítricas e porcentagens relativas (R) de *seedlings* zigóticos (trifoliados) obtidos de cruzamentos controlados entre essas variedades, utilizadas como parentais femininos, e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. e híbridos dessa espécie, considerando as frequências (%) observadas de tais híbridos no cultivo in vitro de embriões (CIV) e no cultivo de sementes em canteiros (CSC).

Variedade <sup>(1)</sup>	%P	CIV	CSC	R <sup>(2)</sup>
TCL	1,5	56,2	51,5	8,4
TSK	8,3	51,1	48,6	4,9
LCR	56,8 <sup>(3)</sup>	18,6 <sup>(3)</sup>	16,2	12,9
LAC	76,4	17,4	12,2	29,9
LVK	79,2	16,3	11,9	27,0

<sup>(1)</sup> Variedades: TCL – tangerineira 'Clementina' (*Citrus clementina* hort. ex Tanaka), TSK – tangerineira 'Sunki' [*C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka], LCR – limoeiro 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck), LAC – laranjeira 'Azeda comum' (*C. aurantium* L.), LVK – limoeiro 'Volkameriano' (*C. volkameriana* V. Ten. & Pasq.).

<sup>(2)</sup>  $R = 100(\text{CIV} - \text{CSC}) / \text{CIV}$ .

Fonte: Medrado (1998) e Soares Filho et al. (2002b); <sup>(3)</sup> Soares Filho et al. (1994) e Vásquez Araujo (1991).

## Heterozigosidade

Quanto ao modo de reprodução, os citros, *Citrus* e gêneros afins, em geral classificam-se em um grupo intermediário entre a autogamia e a alogamia, ou seja, podem, facultativamente, autofecundar-se ou cruzar-se, sendo possível, conforme já mencionado, a hibridação entre diferentes espécies botânicas, bem como entre diferentes gêneros afins. A ocorrência de autoincompatibilida-

de e de esterilidade masculina, entretanto, a exemplo do que se verifica em *C. maxima* (toranjeiras) e em *C. unshiu* (tangerineira 'Satsuma'), respectivamente, limita algumas espécies e variedades à alogamia, segundo relatado anteriormente.

Ao longo de milênios, durante o processo evolutivo dos citros, a ocorrência natural de mutações e de cruzamentos entre espécies e gêneros, compreendendo uma ampla gama de formas cítricas, levou ao surgimento de genótipos extremamente heterozigotos e diversificados, muitos dos quais foram fixados tanto pelo fenômeno da embriogenia nucelar, comum à maioria das espécies e variedades de citros, como pela enxertia, técnica largamente empregada na propagação de indivíduos de interesse comercial e/ou científico.

Em complemento a essas observações, cabe destacar que a quase totalidade das espécies botânicas de *Citrus* tem natureza híbrida, o que indica sua condição altamente heterozigota. A esse respeito, Nicolosi et al. (2000) comentam que estudos realizados na década de 1970, por R. W. Scora, confirmados posteriormente por H. C. Barrett e A. M. Rhodes, sugerem a existência de somente três espécies verdadeiras: *C. maxima*, *C. medica* e *C. reticulata sensu Swingle* (SWINGLE, 1967). R. W. Scora, no final da década de 1980, acrescentou mais uma espécie a essa relação, *C. halimii* (B. C. Stone). Estudos envolvendo análises moleculares não suportam essa hipótese (BARKLEY et al., 2006; BAYER et al., 2009; FROELICHER et al., 2011; PANG et al., 2007), uma vez que há indícios de que essa espécie seja um híbrido entre *C. medica* e *Fortunella* (SCORA et al., 1976). Presume-se que as demais formas de *Citrus* hoje classificadas como espécies tenham resultado, primariamente, de hibridações naturais, envolvendo, direta ou indiretamente, essas espécies tidas como básicas. *Citrus sinensis*, designação botânica das laranjeiras doces, por exemplo, segundo Federici et al. (1998), trata-se de um híbrido entre *C. maxima* e *C. reticulata*. Quanto às diversas variedades constatadas dentro de *C. sinensis*, assim como em relação às variedades verificadas dentro das demais espécies de citros, sua quase totalidade, conforme já discutido, originou-se de mutações espontâneas, que constituem fontes primárias de variabilidade genética.

Diante desses fatos, os programas de melhoramento genético de citros, baseados em hibridações convencionais, são extremamente dificultados, quanto ao alcance de seus objetivos, pelos acentuados níveis de heterozigosidade constatados nesse grupo de plantas. Isso implica na obtenção de progênies muito diversificadas, sendo consideravelmente baixa a probabilidade de seleção de híbridos com valor comercial, especialmente no que concerne ao desenvolvimento de novas variedades copa visando à produção de frutos para o consumo in natura ou para o processamento industrial, uma vez que tais frutos, para serem aceitos pelos mercados consumidores, cada vez mais exigentes, devem atender a uma série de características relacionadas a sua qualidade, que vão da forma, do tamanho e da coloração, tanto da casca como da polpa, a particularidades associadas ao seu aroma e sabor, com destaque para os teores de sólidos solúveis (açúcares) e de acidez, bem como para a relação acidez-sólidos solúveis (*ratio*).

Em decorrência disso, elevado número de indivíduos híbridos deve ser obtido no intuito de possibilitar o reconhecimento de alguns poucos genótipos promissores, os quais, por sua vez, têm de passar por etapas mais avançadas de seleção, em ensaios de competição envolvendo diversos ambientes e diferentes combinações copa–porta–enxerto, objetivando a identificação final de novas variedades. Tais obstáculos, ao lado de outros, dentre os quais se destacam a manifestação da poliembrionia, que dificulta a distinção entre *seedlings* híbridos e aqueles de origem nucelar, e o longo período pré-reprodutivo, têm inibido grandemente o estabelecimento de programas de melhoramento genético apoiados em hibridações convencionais, estimulando, por outro lado, o desenvolvimento de técnicas alternativas, principalmente aquelas baseadas na fusão de protoplastos e na transgenia, visando evitar os inconvenientes da segregação gênica.

O melhoramento genético dos citros, mediante hibridações convencionais, todavia, pode ser facilitado pelo emprego de parentais que apresentem níveis relativamente elevados de homozigose, dado que suas progênes tenderão a ser mais uniformes. Essa particularidade, associada a investigações concernentes à capacidade de combinação dos cruzamentos efetuados, geral e específica, concentrando esforços naquelas hibridações com maior potencial de criação de indivíduos promissores, em conformidade com os objetivos do programa de melhoramento genético que se está desenvolvendo, pode favorecer o sucesso ou a obtenção dos ganhos genéticos que se pretende alcançar.

Nesse contexto, análises citogenéticas, baseadas no padrão de distribuição das bandas heterocromáticas CMA positivas (cromomicina A3)<sup>5</sup> e de distribuição dos sítios de DNA ribossomal (DNAr) 5S e 45S, obtidos por hibridização *in situ* fluorescente (Fish), realizadas por Cornélio et al. (2003) e Moraes et al. (2007), mostraram que a tangerineira ‘Sunki’ apresenta 100% de homomorfismo cromossômico para as bandas CMA<sup>+</sup> e sítios de DNAr, sugerindo que essa espécie possui um nível de homoziguidade relativamente elevado. Esses últimos autores também observaram homomorfismo cromossômico em *C. reshni* cv. Cleópatra, *C. deliciosa* cvs. comum, do Rio e Montenegrina, além de *C. reticulata* cv. Cravo. Moraes et al. (2007) constataram, ainda, que, com base em suas fórmulas cariotípicas, *C. reshni* e *C. sunki* pertencem a um mesmo grupo, enquanto que *C. deliciosa* e *C. reticulata* cv. Cravo encontram-se em outro grupo, havendo indícios de que esta última tenha estreita relação com *C. deliciosa*. Esses autores admitem que *C. reshni*, *C. sunki*, *C. deliciosa* e *C. reticulata* cv. Cravo podem ser entendidas como espécies biológicas puras de *Citrus*, a exemplo do que se supõe em relação a *C. medica* e *C. maxima*.

Estudos citogenéticos semelhantes, realizados por Carvalho et al. (2005), confirmados por Mendes et al. (2011), verificaram o mesmo para a cidreira, reforçando a hipótese de que *C. medica* compõe o grupo das espécies verdadeiras de *Citrus*. Tais análises citológicas, quando aplicadas em espécies botânicas sabidamente heterozigotas, como as relacionadas à laranja doce, laranja azeda e ao limoeiro verdadeiro, revelaram diversos heteromorfismos cromossômicos para número e

---

<sup>5</sup> CMA – fluorocromo que apresenta especificidade pelas sequências de bases nitrogenadas ricas em guanina (G) e citosina (C).

posição de bandas e sítios de DNA, indicando sua validade (GUERRA, 2009). Referindo-se à tangerineira 'Sunki', progênies obtidas a partir de cruzamentos utilizando-a como parental feminino (Figura 4) atestam o nível relativamente elevado de homoziguidade dessa espécie, conforme evidenciado pela obtenção de híbridos mais uniformes, além de vigorosos, comparativamente com o constatado em relação a outros parentais (SOARES FILHO et al., 2007). Ainda sobre esse assunto, Cameron e Frost (1968) comentam que *C. maxima* também parece ser mais homozigota que a maioria das formas conhecidas de citros.

## Vigor híbrido

Observações realizadas em progênies obtidas a partir de hibridações controladas em citros mostram, claramente, situações contrastantes, verificando-se, de um lado, a ocorrência de vigor híbrido, e, de outro, efeitos depressivos causados pela manifestação de alelos deletérios recessivos, em homozigose, encobertos nos parentais por uma condição heterozigota, esperando-se que tais efeitos prejudiciais se deem especialmente em circunstâncias relacionadas a cruzamentos envolvendo indivíduos aparentados, sendo, nesse caso, a autofecundação uma situação extrema.

Cameron e Frost (1968) comentam que hibridações realizadas por H. J. Webber e W. T. Swingle, no início do século passado, demonstraram que muitos *seedlings* de citranges são mais vigorosos que os nucleares correspondentes aos parentais femininos utilizados em sua obtenção; semelhantemente, cruzamentos entre citranges e pomeleiros, bem como entre *Fortunella* e citranges, têm resultado em híbridos vigorosos. Os referidos estudiosos também obtiveram pequenas populações de *C. maxima* x *P. trifoliata* e de (*C. sinensis* x *C. paradisi*) x *P. trifoliata* que se mostraram muito vigorosas. Cruzamentos controlados tendo como parental feminino a tangerineira 'Sunki', empregando como parentais masculinos *P. trifoliata* e híbridos desta espécie, resultaram em *seedlings* zigóticos cuja maioria apresentou vigor semelhante ou superior ao daqueles de origem nuclear, em estádios juvenis de desenvolvimento (SOARES FILHO et al., 1999b).

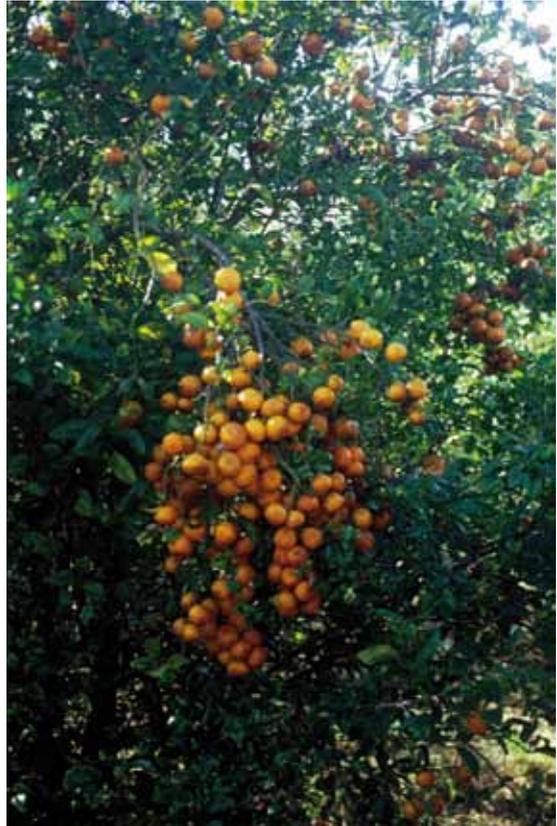


Foto: Walter dos Santos Soares Filho

Figura 4. Híbrido resultante do cruzamento de tangerineira 'Sunki' comum [*Citrus sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka] x [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x limoeiro 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck)].

Soares Filho et al. (2005, 2007), avaliando *seedlings* em fase adulta, confirmam o vigor relativamente elevado de progênies obtidas de cruzamentos entre a tangerineira 'Sunki' e híbridos de *P. trifoliata*, estes compreendendo diversos citranges, o citrumelo 'Swingle' e o citrangequat 'Thomasville'. Os referidos autores constataram, também, que o cruzamento tangerineira 'King' x citrumelo 'Swingle' deu formação a *seedlings* híbridos vigorosos, semelhantes, quanto a esse aspecto, àqueles de origem materna (*seedlings* nucelares de tangerineira 'King'). Esses resultados, analisados em seu todo, evidenciam o excelente potencial relativo à obtenção de híbridos promissores, passíveis de dar origem a novas variedades porta-enxerto, notadamente a partir de cruzamentos envolvendo *Citrus* e *P. trifoliata*.

Conforme já mencionado, cruzamentos entre indivíduos aparentados podem levar à produção de progênies pouco vigorosas, a exemplo do que foi constatado por H. B. Frost em hibridações intraespecíficas entre as laranjeiras doces 'Ruby' e 'Valência' e entre os limoeiros verdadeiros 'Eureka' e 'Lisboa'. Exceções, contudo, existem, podendo-se observar híbridos fracos em cruzamentos entre genótipos pouco aparentados, segundo verificado por W. T. Swingle e T. R. Robinson, em hibridações entre *Poncirus* e *Fortunella*, e, por H. J. Toxopeus, em cruzamentos entre *C. aurantiifolia* e *Murraya paniculata* (L.) Jack. Em *Citrus*, hibridações interespecíficas podem conduzir a resultados diversos; exemplificando: *C. maxima* cruzada com outras espécies de *Citrus* tem dado origem a híbridos vigorosos, que manifestam rápido desenvolvimento vegetativo, constatando-se o mesmo em cruzamentos dentro do diversificado grupo das tangerineiras, enquanto que hibridações entre *C. aurantium* e *C. jambhiri* têm gerado indivíduos zigóticos menos vigorosos que seus parentais (CAMERON; FROST, 1968). Sobre o assunto, Soost e Roose (1996) acrescentam que híbridos do cruzamento tangerineira x pomeleiro frequentemente são mais vigorosos que aqueles de tangerineira x tangerineira e de tangerineira x laranjeira.

Quanto à autofecundação, sua aplicação frequentemente implica na manifestação de efeitos deletérios. Os dados disponíveis a esse respeito, porém, são limitados, pois a maioria das variedades utilizadas para essa finalidade tem produzido um número muito restrito de *seedlings* sexuados. Autofecundações de uma forma provavelmente híbrida, autofértil, de tangerineira 'Clementina', têm originado muitos *seedlings* fracos. Autofecundações realizadas com o tangor 'Temple', a seu turno, têm dado formação a alguns indivíduos moderadamente vigorosos (SOOST; ROOSE, 1996).

## Referências

ALEZA, P.; JUÁREZ, J.; CUENCA, J.; OLLITRAULT, P.; NAVARRO, L. Recovery of citrus triploid hybrids by embryo rescue and flow cytometry from 2x x 2x sexual hybridisation and its application to extensive breeding programs. **Plant Cell Reports**, Berlin, DE, v. 29, p. 1023-1034, 2010.

ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blücher, 1971. 381 p.

ANDERSON, L. C. *Flaveria campestris* (asteraceae): a case of polyhaploidy or relic ancestral diploidy? **Evolution**, Chicago, v. 26, n. 24, p. 671-673, 1972.

- BACCHI, O. Cytological observations in citrus: III. Megasporogenesis, fertilization and polyembryony. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 105, p. 221-225, 1943.
- BACCHI, O. Observações citológicas em citrus: III. Megasporogênese, fertilização e poliembrião. **Bragantia**, Campinas, v. 4, p. 405-412, 1944.
- BARKLEY, N.; ROOSE, M.; KRUEGER, R.; FEDERICI, C. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, DE, v. 112, p. 1519-1531, 2006.
- BARRETT, H. C.; HUTCHINSON, D. J. Occurrence of spontaneous octoploidy in apomictic seedlings of a tetraploid Citrus hybrid. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 5., 1981, Tokyo, JP. **Proceedings...** Tokyo, JP: International Society of Citriculture, 1982. v. 1, p. 29-30.
- BAYER, R. J.; MABBERLEY, D. J.; MORTON, C.; MILLER, C. H.; SHARMA, I. K.; PFEIL, B. E.; RICH, S.; HITCHCOCK, R.; SYKES, S. A molecular phylogeny of the orange subfamily (Rutaceae: Aurantioideae) using nine cpDNA sequences. **American Journal of Botany**, Bronx, v. 96, n. 3, p. 668-685, 2009.
- BONO ÚBEDA, R.; SOLER AZNAR, J.; O'CONNOR, L. F. de C. **Variedades de agrrios cultivadas en España**. Moncada: Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, 1985. 70 p.
- BONO, R.; FERNÁNDEZ DE CÓRDOVA, L.; SOLER, J. 'Arrufatina', 'Esbal' and 'Guillermina', three Clementine mandarin mutations recently discovered in Spain. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 5., 1981, Tokyo, JP. **Proceedings...** Tokyo, JP: International Society of Citriculture, 1982. v. 1, p. 94-96.
- BROERTJES, C.; HARTEN, A. M. van. **Application of mutation breeding methods in the improvement of vegetatively propagated crops: an interpretative literature review**. Amsterdam, NL: Elsevier Scientific, 1978. 316 p.
- 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.
- CAMERON, J. W.; SOOST, R. K. Sexual and nucellar embryony in F1 hybrids and advanced crosses of *Citrus* with *Poncirus*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 104, n. 3, p. 408-410, 1979.
- CAMERON, J. W.; SOOST, R. K.; OLSON, E. O. Chimeral basis for color in pink and red grapefruit. **Journal of Heredity**, Washington, DC, v. 55, n. 1, p. 23-28, 1964.
- CAMPO DALL'ORTO, F. A.; OJIMA, M.; FERRAZ, E. S. B.; NASCIMENTO FILHO, V. F.; REGITANO, O.; TULMANN NETO, A.; ANDO, A.; MENTEN, J. O. M.; TOMBOLATO, A. F. C.; BARBOSA, W. **Melhoramento, pelo método de indução de mutação, de algumas frutíferas de clima temperado e subtropical propagadas vegetativamente**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 1983. 38 p. (IAC. Circular, 120).
- CARVALHO, R.; SOARES FILHO, W. S.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; GUERRA, M. The relationships among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. **Cytogenetic and Genome Research**, Basileia, v. 109, p. 276-282, 2005.
- CASTLE, W. S. Controlling citrus tree size with rootstocks and viruses for higher density plantings. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Orlando, v. 91, p. 46-50, 1979.
- CHAPOT, H. The citrus plant. In: HÄFLIGER, E. (Ed.). **Citrus**. Basileia: CIBA-GEIGY, 1975. p. 14-20.
- CORNÉLIO, M. T. M. N.; FIGUEIRÔA, A. R. S.; SANTOS, K. G. B.; CARVALHO, R.; SOARES FILHO, W. dos S.; GUERRA, M. Chromosomal relationships among cultivars of *Citrus reticulata* Blanco, its hybrids and related species. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, AT, v. 240, p. 149-161, 2003.
- DE LANGE, J. H.; VINCENT, A. P. Citrus breeding: new techniques in simulation of hybrid production and identification of zygotic embryo and seedlings. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, Orlando, v. 2, p. 589-595, Dec. 1977.
- DEIDDA, P.; CHESSA, I. A three-gene hypothesis for the inheritance of nucellar embryony in citrus. **Rivista della Ortoflorofruitticoltura Italiana**, Firenze, v. 66, n. 6, p. 431-436, 1982.
- DENG, X. X.; GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G. Intergeneric somatic hybrid plants from protoplast fusion of *Fortunella crassiflora* 'Meiwa' with *Citrus sinensis* 'Valencia'. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, NL, v. 49, p. 55-62, 1991.
- DIAZ, E. D. L.; XIQUES, X.; CAPIRO, N.; LIMA, H. La poliembrião en el género *Citrus*. **Ciencia y Técnica en la Agricultura, Cítricos y Otros Frutales**, La Habana, CU, v. 2, n. 1, p. 95-104, 1979.

DONINI, B. Induction and isolation of somatic mutations in vegetatively propagated plants. In: FAO/IAEA Division of Atomic Energy in Food and Agriculture (Org.). **Improvement of vegetatively propagated plants through induced mutations**. Vienna, AT: IAEA, 1975. p. 35-51.

DUBEY, K. C.; RISHI, N. Studies on the nucellar embryos of some cultivated *Citrus* species. **Horticultural Research**, Edinburgh, v. 15, n. 2, p. 49-52, 1976.

ESAN, E. B. **A detailed study of adventive embryogenesis in the Rutaceae**. 1973. 233 f. Thesis (PhD) - University of California, Riverside.

ESEN, A.; SOOST, R. K. Adventive embryogenesis in citrus and its relation to pollination and fertilization. **American Journal of Botany**, Bronx, v. 64, n. 4, p. 607-614, 1977.

ESEN, A.; SOOST, R. K. Unexpected triploids in citrus: their origin, identification and possible use. **Journal of Heredity**, Washington, DC, v. 62, p. 329-333, 1971.

FAO. Food and Agriculture Organization. **Conservación in situ de recursos genéticos**. Santiago, CL: Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe, 1991. 52 p.

FEDERICI, C. T.; FANG, D. Q.; SCORA, R. W.; ROOSE, M. L. Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, DE, v. 96, p. 812-822, 1998.

FROELICHER, Y.; MOUHAYA, W.; BASSENE, J. B.; COSTANTINO, G.; KAMIRI, M.; LURO, F.; MORILLON, R.; OLLITRAULT, P. New universal mitochondrial PCR markers reveal new information on maternal citrus phylogeny. **Tree Genetics & Genomes**, Berlin, DE, v. 7, p. 49-61, 2011.

FROST, H. B. Polyembryony, heterozygosity and chimeras in citrus. **Hilgardia**, Oakland, v. 1, p. 365-402, 1926.

FROST, H. B.; KRUG, C. A. Diploid-tetraploid periclinal chimeras as bud variants in citrus. **Genetics**, New York, v. 27, p. 619-634, 1942.

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.

FURR, J. R. Citrus breeding for arid Southwestern United States. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1968, Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1969. v. 1, p. 191-197.

FURUSATO, K.; OHTA, Y.; ISHIBASHI, K. Polyembryony in citrus. **Annual Report of the National Institute of Genetics**, Mishima, v. 6, p. 60-70, 1956.

GIACOMETTI, D. C. Taxonomia das espécies cultivadas de citros baseada em filogenética. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A. A. (Ed.). **Citricultura brasileira**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v. 1, p. 99-115.

GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G.; CHANDLER, J. L. Intergeneric somatic hybrid plants of *Citrus sinensis* cv. Hamlin and *Poncirus trifoliata* cv. Flying Dragon. **Plant Cell Reports**, Berlin, DE, v. 7, p. 5-7, 1988.

GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G.; SESTO, F.; DENG, X. X.; CHANDLER, J. L. Six new somatic citrus hybrid and their potential for cultivar improvement. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 117, p. 169-173, 1991.

GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G.; TUSA, N.; CHANDLER, J. L. Somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species: *Citrus reticulata* and *Citropsis gilletiana*. **Plant Cell Reports**, Berlin, DE, v. 8, p. 656-659, 1990.

GROSSER, J. W.; MOORE, G. A.; GMITTER JUNIOR, F. G. Interspecific somatic hybrid plants from the fusion of 'Key lime' (*C. aurantifolia*) with 'Valencia' sweet orange (*C. sinensis*) protoplasts. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, NL, n. 39, p. 23-29, 1989.

GUERRA, M. Chromosomal variability and the origin of *Citrus* species. In: MAHONEY, C. L.; SPRINGER, D. A. (Ed.). **Genetic diversity**. Nova York: Nova Science, 2009. p. 51-68.

GURGEL, J. T. A. Poliembrião e embrião adventícia em *Citrus*, *Mangifera* e *Eugenia*. **Dusenía**, Curitiba, v. 3, n. 6, p. 443-450, 1952.

GURGEL, J. T. A.; SOUBEIHE SOBRINHO, E. J. Análise da poliembrião em citros máxime em toranjas. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, v. 8, p. 726-746, 1951.

HEARN, C. J.; HUTCHISON, D. J.; BARRET, H. C. Breeding citrus rootstocks. **HortScience**, Alexandria, v. 9, n. 4, p. 357-358, 1974.

- HODGSON, R. W. Horticultural varieties of citrus. In: REUTHER, W.; WEBBER, H. J.; BATCHELOR, L. D. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1967. v. 1, p. 431-591.
- HODGSON, R. W.; CAMERON, J. W. Effects of reproduction by nucellar embryony on clonal characteristics in citrus. **Journal of Heredity**, Washington, DC, v. 29, p. 417-419, 1938.
- HOYT, E. **Conservação dos parentes silvestres das plantas cultivadas**. Roma, IT: IBPGR, 1992. 52 p.
- HOYT, E. **Conserving the wild relatives crops**. Rome, IT: IBPGR: IUCN: WWF, 1988. 45 p.
- HUTCHISON, D. J.; O'BANNON, J. O. Evaluating the reaction of citrus selections to *Tylenchulus semipenetrans*. **Plant Disease Reporter**, Washington, DC, v. 56, n. 9, p. 747-751, 1972.
- IDICIONÁRIO AULETE. **Antiguidade**. Disponível em: <<http://aulete.uol.com.br/antiguidade,%20antiguidade>>. Acesso em: 17 maio 2013.
- IWAMASA, M.; NISHIURA, M. Recent citrus mutant selections in Japan. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 5., 1981, Tokyo, JP. **Proceedings...** Tokyo, JP: International Citrus Society, 1982. v. 1, p. 96-99.
- IWAMASA, M.; UENO, I.; NISHIURA, M. Inheritance of nucellar embryony in citrus. **Bulletin of Horticultural Research Station (Ser. B)**, Okitsu, v. 7, p. 1-10, 1967.
- JUAREZ, J.; NAVARRO, L.; GUARDIOLA, J. L. Obtention de plants nucellaires de divers cultivars de clementiniers au moyer de la culture de nucelli in vitro. **Fruits**, Paris, FR, v. 31, n. 12, p. 751-762, 1976.
- KEPIRO, J. L.; ROOSE, M. L. AFLP markers closely linked to a major gene essential for nucellar embryony (apomixis) in *Citrus maxima* x *Poncirus trifoliata*. **Tree Genetics & Genomes**, Berlin, DE, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2010.
- KOBAYASHI, S.; IKEDA, I.; NAKATANI, M. Studies on nucellar embryogenesis in citrus: III. On the differences in ability to form embryoids in "in vitro" culture of ovules from poly- and mono-embryogenic cultivar. **Bulletin of the Fruit Tree Research Station. E.**, Akitsu, v. 2, p. 21-27, 1982.
- KOBAYASHI, S.; OHGAWARA, T.; OIYAMA, I.; ISHII, S. A somatic hybrid obtained by protoplast fusion between navel orange (*C. sinensis*) and satsuma mandarin (*C. unshiu*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, n. 14, p. 63-69, 1988.
- KUKIMURA, H.; IKEDA, F.; FUJITA, H.; MAETA, T.; NAKAJIMA, K.; KATAGIRI, K.; NAKAHIRA, K.; SOMEGON, M. Genetical, cytological and physiological studies on the induced mutants with special regard to effective methods for obtaining useful mutants in perennial wood plants. In: FAO. Food and Agriculture Organization; IAEA. International Atomic Energy Agency. Division of Atomic Energy in Food and Agriculture. **Improvement of vegetatively propagated plants and tree crops through induced mutations**. Vienna, AT: IAEA, 1976. p. 93-137.
- LATADO, R. R.; TULMANN NETO, A.; ANDO, A.; IEMA, A. F.; POMPEU JUNIOR, J.; FIGUEIREDO, J. O.; PIO, R. M.; MACHADO, M. A.; NAMEKATA, T.; CERAVOLO, L.; ROSSI, A. C. Clones mutantes de laranja 'Pêra' com maturação precoce de frutos, obtidos a partir de mutagênese induzida. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1., 2001, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Embrapa Arroz e Feijão: Agência Goiana de Desenvolvimento Rural e Fundiário: Universidade Federal de Goiás, 2001a. 1 CD-ROM.
- LATADO, R. R.; TULMANN NETO, A.; ANDO, A.; IEMA, A. F.; POMPEU JUNIOR, J.; FIGUEIREDO, J. O.; PIO, R. M.; MACHADO, M. A.; NAMEKATA, T.; CERAVOLO, L.; ROSSI, A. C. Mutantes de laranja 'Pêra' com número reduzido de sementes, obtidos através de mutações induzidas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 339-344, 2001b.
- MACHADO, M. A. Citrus breeding and biotechnology in Brazil. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF CITRUS NURSERYMEN, 6., 2001, Ribeirão Preto. **Proceedings...** Bebedouro: International Society of Citrus Nurserymen, 2001. p. 83-84.
- MAHESHWARI, P. **An introduction to the embryology of angiosperms**. New York: McGraw-Hill, 1950. 453 p.
- MAHESHWARI, P.; RANGASWAMY, N. S. Polyembryony and in vitro culture of embryos of *Citrus* and *Mangifera*. **Indian Journal of Horticulture**, Bangalore, v. 15, p. 273-282, 1958.
- MEDRADO, A. C. de M. **Cultivo de sementes versus cultivo in vitro de embriões de citros (Citrus spp.): implicações na sobrevivência de híbridos**. 1998. 46 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola de Agronomia, Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas.
- MEDRI, M. E.; LLERAS, E.; VALOIS, A. C. C. Comparação anatômica entre folhas diploides e poliploides do guaraná [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke]. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 10, n. 2, p. 283-288, 1980.
- MEHRA, P. N.; BAWA, K. S. Chromosomal evolution in tropical hardwoods. **Evolution**, Chicago, v. 23, n. 3, p. 466-481, 1969.

- MENDES, S.; MORAES, A. P.; MIRKOV, T. E.; PEDROSA-HARAND, A. Chromosome homeologies and high variation in heterochromatin distribution between *Citrus* L. and *Poncirus* Raf. as evidenced by comparative cytogenetic mapping. **Chromosome Research**, Oxford, v. 19, p. 521-530, 2011.
- METTLER, L. E.; GREGG, T. G. **Genética de populações e evolução**. São Paulo: Polígono: EDUSP, 1973. 262 p.
- MORAES, A. P.; LEMOS, R. R.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; SOARES-FILHO, W. S.; GUERRA, M. Chromosomal markers distinguish hybrids and non-hybrid accessions of mandarin. **Cytogenetic and Genome Research**, Basileia, v. 119, p. 275-281, 2007.
- MORAIS, L. S. **Ajustes no meio de Murashige & Tucker (MT) para o cultivo in vitro de embriões imaturos de tangerina 'Cleópatra'**. 1997. 95 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola de Agronomia, Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas.
- MOREIRA, C. dos S. **Frequência de híbridos em citros (*Citrus* spp.) em relação ao grau de poliembrionia**. 1996. 78 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola de Agronomia, Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas.
- MOREIRA, C. S. Melhoramento de citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F. (Coord.). **Citricultura brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1980. v. 1, p. 197-223.
- MOREIRA, S.; GURGEL, J. T. A.; ARRUDA, L. F. de. Poliembrionia em *Citrus*. **Bragantia**, Campinas, v. 7, n. 3, p. 69-106, 1947.
- NAVARRO, L.; JUÁREZ, J.; ALEZA, P.; PINA, J. A.; OLIVARES-FUSTER, O.; CUENCA, J.; JULVE, J. M. Programa de obtención de híbridos triploides de mandarino en España. **Phytoma**, Valencia, n. 170, p. 36-41, 2005.
- NAVARRO, L.; JUAREZ, J.; BALLESTER, J. F.; PINA, J. A.; ORTEGA, C. Obtención de plantas nucelares libres de virus de diversas variedades de agrios del grupo navel (*C. sinensis* (L.) Osbeck) por cultivo de óvulos in vitro. **Anales del INIA**, Madrid, ES, v. 12, p. 94-113, 1979.
- NICOLOSI, E.; DENG, Z. N.; GENTILE, A.; LA MALFA, S.; CONTINELLA, G.; TRIBULATO, E. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, DE, v. 100, p. 1155-1166, 2000.
- NISHIURA, M. Natural mutation and its utilization in the selection of citrus fruits. **Gamma Field Symposia**, Tokyo, JP, n. 4, p. 27-38, 1965.
- NYBOM, N.; KOCH, A. Induced mutations and breeding methods in vegetatively propagated plants. In: FAO. Food and Agriculture Organization; IAEA. International Atomic Energy Agency. (Org.). **The use of induced mutations in plant breeding**. Dorking: Adlard & Son, 1965. p. 661-678.
- OGATA, T.; SOUZA, M. de; SANTOS, M. G. F. M. Poliembrionia, efeitos do nitrato de potássio e da permanência de sementes no germinador na separação de embriões de citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 6., 1981, Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1981. v. 2., p. 693-701.
- OHGAWARA, T.; KOBAYASHI, S.; ISHII, S.; YOSHINO, K.; OIYAMA, I. Somatic hybridization in citrus: Navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) and grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, DE, v. 78, p. 609-612, 1989.
- OLIVEIRA, R. P. de. **Cultura de calos, células em suspensão e protoplastos de porta-enxertos de citros**. 1993. 117 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- OZSNAN, M.; CAMERON, J. W. Artificial culture of small citrus embryos and evidence against nucellar embryony in highly zygotic varieties. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, Saint Joseph, v. 82, p. 210-216, 1963.
- PANG, X.-M.; HU, C.-G.; DENG, X.-X. Phylogenetic relationships within *Citrus* and its related genera as inferred from AFLP markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 54, p. 429-436, 2007.
- PARLEVLIE, J. E.; CAMERON, J. W. Evidence on the inheritance of nucellar embryony in citrus. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 74, p. 252-260, 1959.
- PASQUAL, M. **Regeneração de plantas in vitro e radiosensibilidade de tecidos nucelares de citros**. 1985. 106 f. Tese. (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- RAGHUVANSHI, S. S. Cytological evidence bearing on evolution in *Citrus*. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1968, Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1969. v. 1, p. 207-214.
- RANGAN, T. S.; MURASHIGE, T.; BITTERS, W. P. In vitro studies of zygotic and nucellar embryogenesis in citrus. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1968, Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1969. v. 1, p. 225-229.

SALEH, B.; ALLARIO, T.; DAMBIER, D.; OLLITRAULT, P.; MORILLON, R. Tetraploid citrus rootstocks are more tolerant to salt stress than diploid. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, FR, v. 331, p. 703-710, 2008.

SCORA, R. W.; KUMAMOTO, J.; ESEN, A.; STONE, B. C. A phytochemical investigation of *Citrus halimii*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 4, p. 255-258, 1976.

SOARES FILHO, W. dos S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; PASSOS, O. S.; DIAMANTINO, M. S. A. S.; MOITINHO, E. D. B. Recursos genéticos e identificação de novas variedades: um exemplo com citros. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3., 2001, Londrina. **Anais...** Londrina: Instituto Agronômico do Paraná, 2001a. p. 434-436.

SOARES FILHO, W. dos S.; DIAMANTINO, M. S. A. S.; MOITINHO, E. D. B.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; PASSOS, O. S. 'Primavera' e 'Tropical': novas seleções de tangerina 'Sunki'. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1., 2001, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Embrapa Arroz e Feijão: Agência Goiana de Desenvolvimento Rural e Fundiário: Universidade Federal de Goiás, 2001b. 1 CD ROM.

SOARES FILHO, W. dos S.; DIAMANTINO, M. S. A. S.; MOITINHO, E. D. B.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; PASSOS, O. S. 'Tropical': a new selection of 'Sunki' mandarin. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF CITRUS NURSERYMEN, 6., 2001, Ribeirão Preto. **Proceedings...** Bebedouro: International Society of Citrus Nurserymen, 2001c. p. 207-209.

SOARES FILHO, W. dos S.; DIAMANTINO, M. S. A. S.; MOITINHO, E. D. B.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; PASSOS, O. S. 'Tropical': uma nova seleção de tangerina 'Sunki'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 127-132, 2002a.

SOARES FILHO, W. dos S.; LEDO, C. A. da S.; QUINTELA, M. P.; MATTOS, L. A.; PASSOS, O. S.; SOUZA, A. da S. Cruzamentos em citros: frequência e vigor de híbridos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 2, p. 393-398, 2007.

SOARES FILHO, W. dos S.; LEE, L. M.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da. Influence of pollinators on polyembryony in citrus. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 403, p. 256-265, 1995.

SOARES FILHO, W. dos S.; MEDRADO, A. C. de M.; CUNHA, M. A. P. da; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; PASSOS, O. S. Frequência de híbridos em cruzamentos controlados de citros: cultivo de sementes *versus* cultivo *in vitro* de embriões. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, n. 7, p. 981-988, 2002b.

SOARES FILHO, W. dos S.; MORAIS, L. S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; DIAMANTINO, M. S. A. S.; PASSOS, O. S. 'Santa Cruz': uma nova seleção de limão 'Cravo'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 21, n. 2, p. 222-225, 1999a.

SOARES FILHO, W. dos S.; MOREIRA, C. dos S.; CUNHA, M. A. P. da; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; PASSOS, O. S.; MORAIS, L. S. Vigor híbrido em tangerina 'Sunki'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 34, n. 5, p. 903-909, 1999b.

SOARES FILHO, W. dos S.; MOREIRA, C. dos S.; CUNHA, M. A. P. da; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; PASSOS, O. S. Poliembrião e frequência de híbridos em *Citrus* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 35, n. 4, p. 857-864, abr. 2000.

SOARES FILHO, W. dos S.; QUINTELA, M. P.; CONCEIÇÃO, H. R. da; MATTOS, L. A.; LEDO, C. A. da S.; PASSOS, O. S.; SOUZA, A. da S.; CUNHA, M. A. P. da. Cruzamentos em citros: frequência e vigor de híbridos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 3., 2005, Gramado. **Anais...** Passo Fundo: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas: Embrapa Trigo, 2005. 1 CD ROM.

SOARES FILHO, W. dos S.; SOUZA, U.; OLIVEIRA, C. R. de C.; SANTOS, M. G.; LEDO, C. A. da S.; SANTANA, L. G. L.; ROCHA, J. da S.; PISSINATO, A. G. V.; SILVA, J. S. S. da; SOUZA, A. da S.; PASSOS, O. S. Poliembrião e potencial de obtenção de híbridos em citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 5., 2009, Guarapari. **O melhoramento e os novos cenários da agricultura**: anais. Vitória: Incaper, 2009. Seção Trabalhos Técnico-científicos. 1 CD-ROM. (Incaper. Documentos, 11).

SOARES FILHO, W. dos S.; VÁSQUEZ ARAUJO, J. E.; CUNHA, M. A. P. da; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; PASSOS, O. S. Degree of polyembryony, size and survival of the zygotic embryo in citrus. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 7., 1992, Acireale. **Proceedings...** Catania: International Society of Citriculture, 1994. v. 1, p. 135-138.

SOOST, R. K. Incompatibility alleles in the genus *Citrus*. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, New York, v. 87, p. 176-180, 1965.

SOOST, R. K. The incompatibility gene system in citrus. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1968, Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1969. v. 1, p. 189-190.

SOOST, R. K.; CAMERON, J. W. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J. N. (Ed.). **Advances in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1975. p. 507-540.

SOOST, R. K.; ROOSE, M. L. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J. N. (Ed.). **Fruit breeding**: tree and tropical fruits. New York: John Wiley, 1996. v. 1, p. 257-323.

- SOUBIHE SOBRINHO, J.; GURGEL, J. T. A. Poliembrião e embrião adventícia em *Citrus*, *Mangifera* e *Myrtaceae*. **Dusenía**, Curitiba, v. 4, n. 5/6, p. 421-428, 1953.
- SPIEGEL-ROY, P.; PADOVA, R. Radiosensitivity of Shamouti orange - (*Citrus sinensis*) seeds and buds. **Radiation Botany**, Oxford, v. 13, n. 2, p. 105-110, 1973.
- SWANSON, C. P. **Cytology and cytogenetics**. New Jersey: Prentice-Hall, 1957. 596 p.
- SWINGLE, W. T. The botany of *Citrus* and its wild relatives. In: REUTHER, W.; WEBBER, H. J.; BATCHELOR, L. D. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1967. v. 1, p. 190-430.
- TEÓFILO SOBRINHO, J. Centro de Citricultura "Sylvio Moreira": resultados de um trabalho de integração com a cadeia produtiva dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 18, n. 1, p. 189-204, 1997.
- THAKUR, D. R.; BAJWA, B. S. Extent of polyembryony in some species and varieties of citrus. **Indian Journal of Horticulture**, Bangalore, v. 2, n. 2, p. 25-28, 1971.
- TORRES, J. P. Polyembryony in citrus and study of hybrid seedlings. **Philippine Journal of Agriculture**, Manila, v. 7, p. 37-58, 1936.
- TULMANN NETO, A. **Indução de mutação em plantas de propagação vegetativa**. Piracicaba: CENA-Setor de Radiogenética, 1980. 19 p.
- TUSA, N.; GROSSER, J. G.; GMITTER JUNIOR, F. G. Plant regeneration of 'Valencia' sweet orange, 'Femminello' lemon, and the interspecific somatic hybrid following protoplast fusion. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 115, n. 6, p. 1043-1046, 1990.
- UENO, I. Studies of cross-incompatibility in *Citrus tachibana* Tanaka. I. Fruit set of *Tachibana* after cross pollination with eight citrus varieties. **Bulletin of the Fruit Tree Research Station (Ser. B)**, Okitsu, v. 5, p. 1-7, 1978.
- UENO, I.; HIRAI, M. Identification of zygotic embryos in polyembryonic citrus seeds by cotyledon colour. **Bulletin of the Fruit Tree Research Station (Ser. B)**, Okitsu, v. 10, p. 35-49, 1983.
- VÁSQUEZ ARAUJO, J. E. **Identificação de embriões zigóticos em sementes poliembriônicas de citros (*Citrus* spp.) mediante características morfológicas**. 1991. 74 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola de Agronomia, Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas.
- VÁSQUEZ ARAUJO, J. E.; SOARES FILHO, W. dos S.; CUNHA, M. A. P. da; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; PASSOS, O. S.; SOUZA, A. da S. Identification of zygotic embryos in polyembryonic citrus seeds: the use of cotyledon colours. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 7., 1992, Acireale. **Proceedings...** Catania: International Society of Citriculture, 1994. v. 1, p. 142-144.
- WAKANA, A.; UEMOTO, S. Adventive embryogenesis in citrus (Rutaceae): II. Postfertilization development. **American Journal of Botany**, Bronx, v. 75, n. 7, p. 1033-1047, 1988.
- WATANABE, H. Artificial control of polyembryogenesis in *Fortunella*, by conditions gamma irradiation. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 110, n. 3, p. 418-421, 1985.
- WEBBER, J. M. Polyembryony. **Botanical Reviews**, New York, v. 6, p. 575-598, 1940.
- WILLIAMS, T. Nuevas variedades del programa de mejoramiento de cítricos en la Universidad de California Riverside. In: CONGRESO LATINOAMERICANO DE CITRICULTURA, 1., 2010, Medellín. **Una jugosa oportunidad**. Medellín: Asociación Hortifrutícola de Colombia, 2010a. Palestra apresentada. 113 slides. Disponível em: <[http://www.congresocitricos.com/congresocitricos/contenido.php?tbl\\_lenguaje=1&id\\_hit=298](http://www.congresocitricos.com/congresocitricos/contenido.php?tbl_lenguaje=1&id_hit=298)>. Acesso em: 23 mar. 2011.
- WILLIAMS, T. Tendencia global en la producción de cítricos. In: CONGRESO LATINOAMERICANO DE CITRICULTURA, 1., 2010, Medellín. **Una jugosa oportunidad**. Medellín: Asociación Hortifrutícola de Colombia, 2010b. Palestra apresentada. 88 slides. Disponível em: <[http://www.congresocitricos.com/congresocitricos/contenido.php?tbl\\_lenguaje=1&id\\_hit=298](http://www.congresocitricos.com/congresocitricos/contenido.php?tbl_lenguaje=1&id_hit=298)>. Acesso em: 23 mar. 2011.
- WRIGHT, J. W. **Introduction to forest genetics**. New York: Academic Press, 1976. 463 p.
- YANG, H. J. Fertilization and development of embryo on satsuma orange (*C. unshiu* Marc.) and natsudaidai (*C. natsudaidai* Hayata). **Journal of the Japanese Society for Horticultural Sciences**, Tokyo, JP, v. 37, p. 102-108, 1968.
- YELENOSKY, G.; BROWN, R. T.; HEARN, C. J. Tolerance of trifoliata orange selection and hybrids to freezes and flooding. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Orlando, v. 86, p. 99-104, 1974.

# Cultura de tecidos

Antônio da Silva Souza  
Hermes Peixoto Santos Filho  
Adilson Kenji Kobayashi  
Walter dos Santos Soares Filho  
Francisco de Assis Alves Mourão Filho  
Beatriz Madalena Januzzi Mendes  
Lucymeire Souza Morais Lino

## Introdução

Os citros assumem grande importância em nível mundial, notadamente pelo papel que desempenham na agricultura e economia, o que é demonstrado por sua ampla distribuição, grande produção e relevância econômica nas regiões tropicais e subtropicais (GROSSER; GMITER JUNIOR, 1990a; SOOST; ROOSE, 1996).

Os plantios comerciais de citros distribuem-se numa ampla faixa situada entre 40°N e S de latitude (GOSAL et al., 1995). Segundo estimativas, a produção mundial de citros alcançou, em 2010, a cifra de quase 112 milhões de toneladas. O Brasil é responsável por 19,05% desse total, com mais de 21 milhões de toneladas, constituindo-se, portanto, no maior produtor mundial (FAO, 2012). Além disso, é também o maior exportador de suco concentrado congelado de laranja, produzindo, aproximadamente, 1 milhão de toneladas métricas anuais. O Estado de São Paulo lidera a produção nacional de frutos de laranja, detendo 76,6% do total produzido. Depois de São Paulo, a região Nordeste possui a citricultura de maior expressão, destacando-se os estados da Bahia e de Sergipe como os principais produtores.

Apesar da importância agrícola, econômica, social e nutricional dos citros, o melhoramento genético, entretanto, pouco contribuiu para a criação de novas cultivares, principalmente para copa (CRISTOFANI, 1991). Existe uma maior proporção de cultivares originadas por mutações espontâneas em relação às obtidas por hibridações controladas. A maioria das cultivares de laranjeira [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] é originária de mutações, enquanto que os pomeleiros (*C. paradisi* Macfad) são oriundos de hibridações (HIDAKA, 1990). Pesquisas continuadas devem explorar bastante o germoplasma disponível para o melhoramento genético dos citros (LOUZADA; GROSSER, 1994), de forma a buscar novas cultivares copa e porta-enxerto adaptadas às diferentes condições edafoclimáticas, resistentes a doenças, produtivas, longevas e com frutos de aceitação comercial (FADIGAS, 1993).

O desenvolvimento de programas de melhoramento que integrem tanto os enfoques tradicionais como as novas tecnologias é um objetivo prioritário para muitos dos mais importantes países produtores de citros no mundo (OLIVARES, 1998). A biotecnologia vegetal emerge com grande potencial na solução ou minimização de problemas para os quais as metodologias convencionais têm se mostrado limitadas. Compreende diversas técnicas que têm sido aplicadas em espécies vegetais ao longo dos anos, em função da importância de cada cultura e de suas características agrônômicas, morfológicas e genéticas.

Nos citros, a biotecnologia começou a ser empregada a partir da década de 1950, e desde então diversas técnicas de cultura de tecidos têm sido empregadas com objetivos diversos, porém voltados sempre para os aspectos da regeneração *in vitro*, limpeza clonal e criação de novas cultivares. Avanços significativos têm sido alcançados nos programas de melhoramento e de propagação de material genético certificado, servindo, inclusive, como modelo para estudos em outras espécies (OLIVEIRA, 2006). Também na área de biologia molecular (ver Capítulo 6), alguns procedimentos vêm sendo adotados em apoio aos programas de melhoramento, visando caracterizar variedades, identificar híbridos e analisar o genoma das plantas cítricas.

Em razão das técnicas de cultura de tecidos abrirem novas perspectivas, suas aplicações serão a seguir abordadas dentro das áreas de regeneração e propagação, limpeza clonal e melhoramento genético, para comprovar sua importante participação no desenvolvimento dos citros, principalmente se associadas aos programas convencionais de melhoramento genético em execução, não somente em países tropicais, como também em outras regiões do mundo.

## Regeneração e propagação

A potencialidade das células vegetais para se multiplicarem indefinidamente *in vitro*, em função de sua totipotência natural (BHOJWANI; RAZDAN, 1983), é que lhes confere a particularidade de passarem de um estágio de especialização ao de células indiferenciadas, capazes de se dividirem e se diferenciarem novamente (célula meristemática e célula embriogênica) e regenerarem indivíduos completos (ESCALANT; SANDOVAL, 1992). A morfogênese é o resultado da divisão e diferenciação de células organizadas, com padrões definidos, os quais dependem, basicamente, da atividade e expressão de certos genes (HANDRO; FLOH, 1990). Desse modo, fatores que controlam ou afetam esses eventos são responsáveis pela morfogênese (AMMIRATO, 1986), sendo que os efeitos isolados ou combinados de tais fatores variam de acordo com as condições de cada tipo de célula, e podem ser mais ou menos definidos em função do tecido, do órgão, da variedade ou da cultivar e da espécie.

Apesar dos poucos estudos desenvolvidos em relação à base genética da morfogênese *in vitro* (MOLINA; NUEZ, 1995), os processos que a compõem, a embriogênese somática (formação de embriões) (MATHEWS et al., 1993) e a organogênese (formação de brotos) (HOSSAIN et al., 1993),

já haviam propiciado a regeneração *in vitro* de cerca de 100 espécies vegetais, há mais de 25 anos (SONDAHL et al., 1984).

Enfocando os citros, Moura et al. (2001) e Singh e Rajam (2009) salientam que o sucesso de técnicas biotecnológicas no seu melhoramento *in vitro* depende diretamente do desenvolvimento de protocolos eficientes para regeneração de plantas, o que pode contribuir na geração de mais variedades, aumentando, assim, o pequeno número de cultivares procedentes dos poucos programas de melhoramento convencional em execução no mundo (NAVARRO, 2005).

## Cultura de calos

O termo cultura de tecidos abrange uma ampla faixa de técnicas de cultivo *in vitro*, que vão desde a cultura de células e protoplastos até a cultura de segmentos de/ou órgãos como folhas, meristemas, óvulos, raízes, embriões, cotilédones, epicótilos, hipocótilos, etc. Quando um segmento de tecido vegetal, devidamente desinfestado, é transferido para um meio de cultura apropriado e mantido sob condições adequadas, algumas das células dividem-se e, após intensa proliferação, dão origem a uma massa não diferenciada de células (ARASU; PARANJOTHY, 1975). Essa massa é chamada de calo (Figura 1), e tem sido o explante mais empregado em culturas de tecidos de plantas, sendo capaz de crescer sem limite se subcultivado em novos e apropriados meios de cultura. De modo geral, o calo tem sido utilizado para estudar o crescimento e desenvolvimento das plantas, a exploração de produtos do metabolismo secundário e a propagação *in vitro* (CONSTABEL, 1984).



Foto: Antônio da Silva Souza

Figura 1. Calos originados de óvulos abortados de tangerineira 'Cleópatra'.

Os primeiros trabalhos com vistas à obtenção de calos em citros foram realizados em 1954, por Demetriades (ESPERANZA PEÑA et al., 1978; MURASHIGE; TUCKER, 1969), com a utilização de segmentos de hastes de cidreira (*C. medica* L.) como explantes primários. Desde então, muitos trabalhos já foram desenvolvidos com cultura de calos em *Citrus*, os quais têm propiciado o avanço dos estudos em diversas áreas. Dada a importância desse assunto, vários temas serão a seguir considerados, envolvendo aspectos como efeito do genótipo, tipo e desinfestação de explantes, meios de cultura, condições ambientais de cultivo, regeneração e enraizamento de brotos, culminando com suas principais aplicações.

A maioria dos estudos tem revelado que a calogênese é altamente influenciada pelo genótipo, como comprovou Benedito et al. (2000) em seis variedades de laranja doce (*C. sinensis*). A indução de calos foi bastante variável em 30 espécies, pertencentes ao gênero *Citrus* e a outros relacionados

com ele, que foram estudadas por Mourão Filho e Grosser (1992), obtendo-se resultados promissores com *Citropsis gilletiana* Swing. & M. Kellerm., *Aegle marmelos* (L.) Corrêa, *Afraegle gabonensis* (Swingle) Engl., *Afraegle paniculata* (Schumach.) Engl., *Balsamocitrus dawei* Stapf, limoeiro 'Rugoso' (*C. jambhiri* Lush.) e *C. grandis* Osbeck.

Independentemente do meio de cultura empregado no cultivo de nucelos, a tangerineira 'Cleópatra' (*C. reshni* hort. ex Tanaka) apresentou maior formação de calos (48,8%) que os genótipos limoeiro 'Cravo Limeira' (*C. limonia* Osbeck) e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. seleção Davis A, conforme Oliveira et al. (1994b). Zanol et al. (1998) observaram que a indução de calos e/ou embrioides, desde nucelos, ocorreu entre a sexta e oitava semanas de cultivo. Também a tangerineira 'Cleópatra' foi a variedade que propiciou maior formação de calos (25%); estes eram arredondados, esbranquiçados, altamente friáveis e embriogênicos. Em citrange 'Carrizo' (*C. sineusis* x *P. trifoliata*) e 'Flying Dragon' [uma seleção ananizada de *P. trifoliata* var. *monstrosa* (T. Itô) Swingle], houve uma formação de calos em torno de 20%, porém de formato irregular, compactos e de coloração esverdeada.

Muitos são os explantes até então utilizados como fonte de indução de calos em diversas espécies e cultivares de citros, a exemplo de albedo e vesículas de suco (MURASHIGE; TUCKER, 1969; NITO; IWAMASA, 1990), flavedo (AGRAWAL; PATWARDHAN, 1993; BARLASS; SKENE, 1986), segmentos de caules de plantas adultas (DURAN-VILA et al., 1988), embriões (BELOUALY, 1991; BERHOW et al., 1994; HIDAKA, 1995; HIDAKA; OMURA, 1989a), nucelos (CRISTOFANI, 1991; GENTILE et al., 1992; PIQUERAS et al., 1994; SAKAI et al., 1990; ZANOL et al., 1998), folhas (GOH et al., 1995; MOURÃO FILHO; GROSSER, 1992), raízes (GILL et al., 1995; RAMAN et al., 1992), segmentos de caules de plântulas cultivadas in vitro (NAVAS-CASTILLO et al., 1995; RAMAN et al., 1992), epicótilo (GILL et al., 1995), cotilédones (GOH et al., 1995) e óvulos (KAYIM; KOC, 2006).

O meio de cultura MS, de Murashige e Skoog (1962), tem sido o mais empregado no cultivo de calos de citros (BERHOW et al., 1994; GILL et al., 1995), além dos meios de White e de Gamborg (B<sub>3</sub>) (ver composições em Caldas et al. (1998)), conforme (AGRAWAL; PATWARDHAN, 1993). Já Zanol et al. (1998) indicam o MT (MURASHIGE; TUCKER, 1969), sem reguladores de crescimento, haja vista que nesse meio os calos apresentaram maior taxa de multiplicação, maior friabilidade e menor nível de oxidação.

Como fonte de energia, emprega-se geralmente a sacarose (30 g L<sup>-1</sup> a 50 g L<sup>-1</sup>). Entretanto, algumas características metabólicas em calos nucelares e suspensões celulares de laranjeira 'Hamlin' foram comparadas em meios contendo sacarose e glicerol por Vu et al. (1993). Os resultados indicaram um maior efeito estimulatório do glicerol na embriogênese, biossíntese de clorofila, atividades das enzimas fosfoenolpiruvato carboxilase (PEP-carboxilase) e sacarose fosfato sintase (SPS), e ativação da ribulose difosfato carboxilase oxigenase (rubisco). Por sua vez, Gentile et al. (1992) induziram a formação de embrioides ao transferirem calos nucelares de limoeiro 'Femminello Continella' [*C. limon* (L.) Burm. f.] para o meio MT contendo 20 mL L<sup>-1</sup> de glicerol. Outras fontes de carboidratos também têm sido eficientes na formação de embrioides, tais como galactose, lactose, maltose e

sorbitol, conforme Hidaka (1995). Dessas fontes, as combinações de galactose e sorbitol ou galactose e lactose, todas a 0,1 M, foram as que propiciaram os melhores resultados. Já Kayim e Koc (2006), obtiveram a maior taxa de proliferação de calo (500 mg) com lactose a 4%, seguida de galactose (400 mg) e glicose (360 mg), respectivamente em concentrações de 3% e 5%.

Os calos embriogênicos de citros oferecem muitas possibilidades de aplicação, envolvendo temas como: a) aspectos nutricionais; b) melhoramento genético; c) regeneração de plantas; d) eliminação de doenças; e) manutenção de bancos de genes *in vitro*; e f) produção de metabólitos secundários.

Em termos nutricionais, apenas um trabalho (NIEDZ, 1994) faz referência a alterações na composição dos sais minerais, nominalmente em relação ao nitrogênio, em meio de cultura para crescimento de calos embriogênicos de laranjeira 'Hamlin'. Como se sabe, duas formas iônicas de nitrogênio inorgânico (N) estão disponíveis no solo para serem absorvidas pelas plantas: nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e amônio ( $\text{NH}_4^+$ ). Uma significativa contribuição do popular meio MS foi a demonstração de que o  $\text{NH}_4^+$  pudesse ser benéfico para o crescimento *in vitro* dos tecidos das plantas. Além da forma iônica de N, a relação  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  pode afetar o crescimento de um tecido e a resposta em cultura *in vitro*. O aumento do peso fresco de calos de laranjeira 'Hamlin' e do pH final do meio de cultura foram significativamente afetados pelo nitrogênio inorgânico total e pela relação nitrato-amônio. A relação nitrato-amônio respondeu por 55% da variação no aumento do peso fresco dos calos, e 93% da variação no pH final do meio.

Entre as vitaminas, segundo Murashige e Tucker (1969), a tiamina-HCl foi a que apresentou a melhor resposta na indução e crescimento de calos de citros oriundos de albedo e vesículas de suco, e considerada essencial, pois nenhum crescimento ocorreu na sua ausência. O crescimento máximo do calo aconteceu na concentração de tiamina-HCl a  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , sendo que as doses de  $30 \text{ mg L}^{-1}$  e  $100 \text{ mg L}^{-1}$  foram excessivas, pois retardaram o crescimento. É interessante salientar que essa concentração de tiamina-HCl de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  para produção de calos de citros é substancialmente elevada quando comparada à de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ , a mais usada em geral, e à de  $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ , recomendada para fumo (*Nicotina tabacum* L.), provavelmente por ser rapidamente catabolizada pelas células dos tecidos de citros.

O ácido nicotínico, a piridoxina-HCl, o inositol e a glicina não foram críticos para o crescimento dos calos de citros. Entre os três, o inositol foi que mostrou melhor efeito, já que o crescimento do calo foi praticamente dobrado no nível de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . Em relação ao ácido nicotínico, houve um leve efeito estimulante entre as concentrações de  $0,3 \text{ mg L}^{-1}$  e  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , e tóxico à concentração de  $30 \text{ mg L}^{-1}$ . Não se observou nenhuma influência para a piridoxina-HCl, que mesmo na dosagem de  $30 \text{ mg L}^{-1}$  não apresentou toxidez aos tecidos. A glicina aumentou levemente a produção de calos, no nível de  $2 \text{ mg L}^{-1}$ . Já Spiegel-Roy e Kochba (1980) encontraram que o ácido ascórbico, em concentrações dentro da faixa de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  a  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , foi tóxico para calos de óvulos de citros, enquanto que Gill et al. (1995) obtiveram taxas médias de 70,8% e 61,4% de indução de calos e formação

de embriões somáticos, respectivamente, a partir de explantes de folhas, epicótilos, cotilédones e raízes de tangerineira 'Local Sangtra' (*C. reticulata* Blanco), cultivados em meio contendo, entre outros suplementos, um nível de vitaminas do MS elevado em dez vezes.

Ainda no meio de cultura básico, frequentemente são adicionados reguladores de crescimento, notadamente auxinas e citocininas. Em se tratando das auxinas, Murashige e Tucker (1969) encontraram que o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) foi mais eficiente que o ácido naftalenoacético (ANA) e o ácido indolbutírico (AIB) no crescimento dos calos de citros, principalmente na concentração de  $3 \times 10^{-6}$  M; o ANA teve o segundo melhor comportamento, quando adicionado no nível de  $3 \times 10^{-5}$  M. Para esses autores, é evidente que os tecidos de limoeiro são incapazes de efetivamente utilizarem o ácido indolacético (AIA), talvez por este ser inativado rapidamente ou não ser suficientemente móvel.

Esperanza Peña et al. (1978) concluíram que o 2,4-D complementou em grande parte a ação de endosperma líquido de três espécies vegetais, quando adicionados ao cultivo de calos de citros. Por sua vez, Spiegel-Roy e Kochba (1980) verificaram que os calos de laranja doce são muito sensíveis ao 2,4-D, já que houve uma redução de 70% na taxa de crescimento, em presença de  $1 \times 10^{-5}$  M daquela auxina; concentrações mais elevadas inibiram completamente o crescimento. Entretanto, o 2,4-D, ( $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ ), quando combinado com benziladenina (BA) ( $0,002 \text{ mg L}^{-1}$ ), proporcionou os valores máximos de atividade da enzima peroxidase (PER) em calos de flavedo de limeira ácida [*C. aurantiifolia* (Christm.) Swingle], segundo Agrawal e Patwardhan (1993).

Foram induzidas, posteriormente, variações na composição do meio MS para verificar o efeito da adição dos reguladores de crescimento AIA, AIB e ANA. Os valores máximos de peroxidase foram obtidos na presença de AIA ( $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), AIB ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) e ANA ( $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ ). O ANA também foi usado para indução de calos e embriões somáticos em epicótilos de tangerineira 'Local Sangtra' e na obtenção de calos a partir de cotilédones de toranjeira 'Thai' (*C. grandis*), em concentrações de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  e  $5 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente por Gill et al. (1995) e Goh et al. (1995). Outras auxinas empregadas na indução de calos de citros são o picloram (MOURÃO FILHO; GROSSER, 1992) e o AIA (OLIVEIRA et al., 1994b). Já Goh et al. (1995) empregaram o 2,4-D para induzir calos em folhas e subcultivar calos derivados de cotilédones de toranjeira 'Thai', respectivamente em doses de  $4,52 \mu\text{M}$  e  $2,3 \mu\text{M}$ , combinadas em ambos os casos também com BA ( $4,4 \mu\text{M}$ ).

Entre as citocininas, a cinetina (CIN) propiciou um maior crescimento de calos em limoeiro na concentração de  $10^{-6}$  M, sendo que os níveis mais elevados foram progressivamente se tornando mais tóxicos (MURASHIGE; TUCKER, 1969). Na concentração de  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ , favoreceu a máxima atividade de peroxidase em calos de flavedo de limeira ácida, de acordo com Agrawal e Patwardhan (1993). Em outros trabalhos, a CIN foi eficiente na indução de calos em citros, respectivamente em concentrações de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  a  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  e  $50 \mu\text{M}$ , conforme Gill et al. (1995) e Hidaka (1995). Nos porta-enxertos, tangerineira 'Cleópatra', limoeiro 'Cravo Limeira' e *P. trifoliata* seleção Davis A, a concentração de  $0,5 \mu\text{M}$  de CIN foi a melhor na indução de calos, em 28,8% dos nucelos cultivados

(OLIVEIRA et al., 1994b). Conforme resultados citados anteriormente, outra citocinina empregada com eficiência no cultivo de calos de citros é a BA, em combinação com o 2,4-D (AGRAWAL; PATWARDHAN, 1993; GOH et al., 1995).

Ainda em relação aos reguladores de crescimento, o ácido giberélico ( $AG_3$ ) apresentou as melhores respostas na faixa de  $3 \times 10^{-8}$  -  $10^{-6}$  M, com a concentração de  $3 \times 10^{-5}$  M demonstrando ser excessiva (MURASHIGE; TUCKER, 1969). Possivelmente, auxinas, citocininas e giberelinas são sintetizadas em quantidades substanciais nas células de limoeiro cultivadas in vitro. Entretanto, seus níveis endógenos podem ser menores que o adequado para o crescimento máximo dos calos, pois respostas têm sido obtidas ao suplementar o meio de cultura com reguladores de crescimento.

Outros aditivos também já foram usados em meio em cultura para calos de citros, tais como o ácido cítrico, que não propiciou nenhum crescimento nos calos de cidreira, limoeiro, pomeleiro, laranja e tangerineira, ao contrário do suco de laranja (10%), que o estimulou (EINSET, 1978). Isso sugere que algum(ns) componente(s), que não o ácido cítrico, presente(s) no suco de laranja, deve(m) influenciar o crescimento de calos. O suco de laranja, ainda na concentração de 10%, permitiu a manutenção, durante as subculturas, dos calos induzidos em segmentos de hastes de laranja 'Pineapple', cidreira 'Arizona Etrog' e limeira 'Mexican' (DURAN-VILA et al., 1989), e de laranja 'Washington Navel', laranja 'Pineapple' e cidreira 'Etrog' Arizona 861-S-1 (NAVAS-CASTILLO et al., 1995). Já Esperanza Peña et al. (1978) observaram aumento do peso fresco de calos de segmentos de hastes de vitroplantas de laranja 'Valência' em 26, 15 e 8 vezes, com o emprego de endosperma líquido (10%) de *Acrocomia armentalis* (Morales) Bailey, *Cocos nucifera* L. e *Roystonea regia* (H.B.K.) O. F. Cook, respectivamente. Por sua vez, Mourão Filho e Grosser (1992) encontraram que o carvão ativado ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) aumentou o desempenho de várias linhagens de calos, melhorando tanto a taxa de crescimento como a sua coloração.

O melhoramento genético em citros tem acontecido, em grande parte, em virtude da seleção de mutantes que ocorrem naturalmente. De acordo com Spiegel-Roy e Kochba (1980), embora a totipotência dos calos nucelares de *Citrus* já tenha sido comprovada, não está claro ainda se todas as células são totipotentes. Se todas as células são totipotentes ou não, o certo é que o sistema de calos pode ser aplicado para a indução e seleção de mutantes, considerando-se que as células têm o potencial para regenerar plantas, apresentando ainda a vantagem de manipular um grande número de genótipos em um pequeno espaço físico, independente da época do ano.

Os calos também têm se tornado um sistema de cultura de tecidos útil para selecionar materiais tolerantes à salinidade. Piqueras et al. (1994) expuseram calos embriogênicos de nucelos de limoeiro a  $0,17 \text{ M}$  de NaCl durante seis semanas e observaram modificações estruturais naqueles calos tolerantes à salinidade. Essas modificações estão relacionadas a mecanismos que se assemelham aos processos adaptativos desenvolvidos pelos genótipos tolerantes para sobreviverem em ambientes salinos. Para Hidaka (1995), protoplastos viáveis podem ser extraídos facilmente a partir

de calos embriogênicos e usados em estudos envolvendo seleção celular, hibridação somática e transformação genética de plantas.

A disponibilidade de métodos seguros e eficientes de regeneração de plantas é necessária para se poder aproveitar e aplicar as alternativas da biotecnologia no melhoramento vegetal (BORDAS et al., 1991; MOLINA; NUEZ, 1995). Segundo Barlass e Skene (1986), as espécies arbóreas (lenhosas) apresentam maiores dificuldades para cultivo in vitro que as herbáceas, particularmente usando-se calo como base para a regeneração de plantas. Para eles, o calo é um tecido geneticamente instável, e as plantas regeneradas podem apresentar variações, principalmente se os calos passarem por um longo período de cultivo, o que não é interessante para a multiplicação clonal in vitro. As células constituintes dos calos são desuniformes, apresentando heterogeneidade em relação a algumas características, das quais a mais importante está relacionada com o número de cromossomos. A frequência dessas anormalidades aumenta com a variação da composição do meio nutritivo, idade da cultura e espécie vegetal (DODDS; ROBERTS, 1982), e, em virtude disso, o cultivo de calos tem sido mais amplamente usado na criação de variabilidade genética (REISCH, 1983), podendo-se obter novos genótipos por variações somaclonais, apesar de que não se observou nenhuma diferença entre plantas oriundas do mesmo calo derivado de protoplastos de laranja 'Trovia', tangerineira 'Ponkan Ohta' (*C. reticulata*) e pomeleiro 'Marsh Seedless', após eletroforese de folhas para as isoenzimas peroxidase e glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) (HIDAKA; OMURA, 1989a).

Nos citros, plantas têm sido regeneradas por embriogênese (GENTILE et al., 1992; SAKAI et al., 1991), organogênese (GOH et al., 1995; SAKAI et al., 1990) ou, a depender do genótipo, em ambas as vias (BELOUALY, 1991). Normalmente, o meio de cultura empregado é o MS (HIDAKA; OMURA, 1989a), algumas vezes na metade de sua concentração (GILL et al., 1995), quase sempre suplementado com ANA (1 mg L<sup>-1</sup>) e/ou benzilaminopurina (BAP) (5 mg L<sup>-1</sup> a 10 mg L<sup>-1</sup>) e/ou AG<sub>3</sub> (1 mg L<sup>-1</sup> a 3 mg L<sup>-1</sup>), conforme Beloualy (1991), Nito e Iwamasa (1990) e Raman et al. (1992). O enraizamento também é conseguido em meio com a metade do MS ou MT, suplementado com ANA e AG<sub>3</sub>, ambos os reguladores na concentração de 1 mg L<sup>-1</sup> (BELOUALY, 1991; RAMAN et al., 1992).

Por sua vez, Duran-Vila et al. (1988) utilizaram os calos para estudar viroses como tristeza, *infections variegation*, sorose, enação-das-nervuras e xiloporose, haja vista sua facilidade de crescimento, manipulação e conservação. Para isso, utilizaram laranja 'Pineapple', limeira 'Mexican' e cidreira 'Arizona Etrog', e observaram que a produção de calos não foi afetada pela infecção inicial do explante com tristeza, enquanto tecidos infestados com *infections variegation* produziram significativamente menos calos primários que a testemunha (sadia).

Os calos derivados de plantas infectadas por tristeza e *infections variegation* foram testados por sorologia, e aqueles oriundos de material com sorose, enação das nervuras e xiloporose foram indexados por inoculação via enxertia em plantas indicadoras. Os autores consideraram que: a) o vírus-da-tristeza, um closterovírus restrito principalmente ao floema, e o vírus-da-enação-das-nervuras podem ser detectados em cultura de calos que sofreu alguns subcultivos; b) por outro lado,

os vírus de *infections variegation*, sorose e xiloporose mantiveram-se estáveis com as subculturas dos calos; e c) é necessário definir alguns pontos em relação ao *infections variegation*, tais como técnicas de purificação e microscopia eletrônica de células infectadas.

Em um trabalho mais recente, Navas-Castillo et al. (1995) estabeleceram culturas de calos desde explantes de citros infectados com vários patógenos semelhantes a vírus do grupo da sorose (sorose A, sorose B, *ringspot*, *crisacortis* ou gomose-côncava), sendo subcultivadas com êxito por até 16 meses. Plântulas de laranjeira 'Pineapple' ou pomeleiro 'Duncan', enxertadas com segmentos desses calos e incubadas em casa de vegetação com temperatura controlada, desenvolveram características de sintomas dessas doenças, enquanto que plantas indicadoras inoculadas com calos desenvolvidos a partir de explantes sadios permaneceram sem sintomas. Esses resultados permitem indicar a cultura de calos como uma alternativa para caracterização dos agentes causais de várias doenças do grupo da sorose.

Em relação à manutenção in vitro de banco de genes, de acordo com Hidaka e Omura (1989a), calos originados de embriões de sete espécies, envolvendo 11 cultivares de *Citrus*, foram mantidos in vitro durante 5 anos, com intervalos de subcultivos de 1 a 2 meses, visando estudar esse tipo de cultivo como uma forma de conservação de germoplasma. Por outro lado, com o objetivo de desenvolver um simples e confiável procedimento de criopreservação, calos derivados de tecidos nucelares de laranjeira de Umbigo foram congelados durante 10 minutos por Sakai et al. (1990). Após esse período, observou-se uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 80% das células, que permitiram inclusive a regeneração de plantas. Ambos os procedimentos podem se constituir em importantes ferramentas para a preservação in vitro de germoplasma, evitando os problemas relacionados com a conservação no campo, especialmente no caso de espécies perenes como os citros (HAMILTON, 2007).

Além de tudo isso, como o interesse em produzir enzimas desde técnicas de cultura de tecidos vegetais tem aumentado bastante, estudos desenvolvidos por Agrawal e Patwardhan (1993) demonstraram que calos de flavedo de limeira podem ser uma fonte potencial de peroxidase, inclusive para exploração comercial. Já em calos induzidos a partir de embriões nucelares imaturos de limeira 'Mexican', Berhow et al. (1994) acompanharam a biorregulação da biossíntese de flavonoides; os extratos de calos continham dois novos flavonoides derivados do kaempferol.

## Micropropagação

Em programas de melhoramento genético dos citros, objetivando melhoria nas características, tanto de copa como porta-enxerto, um problema a ser superado é a multiplicação rápida de qualquer híbrido de interesse. Métodos alternativos de propagação poderiam evitar a necessidade de esperar que híbridos promissores (incluindo novos híbridos somáticos) produzam sementes, de forma a obter plantas bem uniformes para uma completa avaliação de suas potencialidades (SABBAH et al., 1991).

No caso dos porta-enxertos dos citros, estes são propagados quase que exclusivamente via sementes, obtidas de material selecionado que produz uma grande quantidade de plantas nucleares, geneticamente idênticas (BOWMAN, 1994). No entanto, podem também ser produzidos mediante estaquia (FERGUSON et al., 1985), apesar de que as plantas originadas possuem como desvantagem a possibilidade de serem portadoras de patógenos sistêmicos que se acumulam na planta-mãe durante seu longo ciclo de vida (GROSSER et al., 1993). Muitas das cultivares utilizadas como porta-enxertos são altamente poliembrionicas, e seria interessante que só reproduzissem indivíduos geneticamente uniformes e iguais à planta-matriz. No entanto, isso nem sempre acontece, haja vista que, dependendo da espécie-cultivar, podem ser produzidos de 1% a 40% de plantas zigóticas, que devem ser separadas para que se mantenha a uniformidade clonal no viveiro (TUSA; GERACI, 1988). Convém ressaltar que as plantas de origem sexuada não são identificadas facilmente.

A propagação convencional das cultivares copa baseia-se na seleção de borbulhas e posterior enxertia em estacas previamente enraizadas ou, como é mais comumente efetuada e já mencionado anteriormente, em porta-enxertos selecionados e multiplicados mediante sementes e embriogênese nuclear (GARDNER, 1993).

O fato é que qualquer um desses métodos envolve um longo período de tempo entre a seleção de um híbrido e sua multiplicação, tanto para sofrer avaliações quanto às características que apresenta, como, posteriormente, para ser distribuído aos produtores. A micropropagação oferece a oportunidade para reduzir esse intervalo de tempo, desde que possa favorecer a disponibilidade de material para a produção de mudas. Entre as diversas biotécnicas atualmente empregadas, a cultura de ápices caulinares (domo meristemático associado a 1–3 primórdios foliares) é a de maior impacto para a agricultura, já que vem sendo utilizada na propagação de muitas espécies.

À exceção de alguns tipos celulares, que sofrem profundas alterações genéticas associadas aos processos de diferenciação e desenvolvimento, a grande maioria das células vegetais contém a informação genética necessária para regenerar uma planta completa, ou seja, são totipotentes. Entretanto, em muitos casos, a totipotência não se expressa, o que dá lugar ao conceito de competência morfogênética. Fundamentalmente, os principais fatores que determinam essa competência morfogênética são o genótipo da planta, o estado ontogênico do material de partida e as condições culturais, incluindo tanto a composição do meio como as condições ambientais (BLACKHALL et al., 1994). Dessa maneira, a totipotência e a competência das células apicais formam a base da técnica de cultura de ápices caulinares (KARTHA, 1981), oferecendo um rápido e eficiente método para a multiplicação de variedades, eliminação de doenças, intercâmbio de germoplasma e sua conservação *in vitro*, que se constitui em um sistema alternativo à preservação tradicional do germoplasma de citros em campo, com a manutenção de plantas micropropagadas em condições de crescimento mínimo (SOUZA et al., 2011).

Segundo Barlass e Skene (1986), a cultura de ápices caulinares tem sido usada extensivamente e com muito sucesso na eliminação de viroses em plantas herbáceas por muitos anos, o que não

acontece para espécies arbóreas, entre as quais os citros. No caso particular dos citros, essa técnica ainda não foi estabelecida adequadamente, haja vista que apenas em alguns trabalhos obteve-se a regeneração in vitro de plantas a partir de ápices caulinares. Dentre eles destaca-se o trabalho de Barlass e Skene (1982), um dos poucos a obter algum resultado. Mesmo assim, entre as cinco espécies estudadas, apenas o citrange ‘Carrizo’ respondeu bem, produzindo múltiplas brotações após 3 meses do início da cultura. A laranjeira ‘Symon’s’ e a tangerineira ‘Cleópatra’ apresentaram um ou alguns brotos nos ápices caulinares extraídos respectivamente de plântulas com 5 semanas de idade e de plantas adultas mantidas em casa de vegetação. Os demais genótipos, *P. trifoliata* e limoeiro ‘Cravo’, não responderam ao cultivo in vitro, independentemente da origem do explante.

Assim, a propagação in vitro de porta-enxertos de citros via segmentos nodais possibilita a obtenção de um grande número de plantas num curto espaço de tempo (MACHADO, 1991), todas geneticamente uniformes. Esse procedimento pode ser efetuado em qualquer época do ano, ocupa uma pequena área física e não fica limitado ao aspecto do fornecimento de sementes. Entretanto, só deve ser empregado desde que o material vegetal seja escasso ou interessante o bastante para justificar o trabalho e os custos envolvidos nesse processo (MOORE, 1986).

A reação morfogênica em citros tem sido descrita em diferentes espécies, a partir de diversos tipos de explantes, com o objetivo de micropropagar e recuperar plantas livres de vírus (SCHMILDT et al., 2000). Sementes, óvulos, nucelos, calos somáticos derivados de segmentos de folhas, hastes, raízes e epicótilos, ápices caulinares e gemas laterais têm sido cultivados visando estabelecer protocolos eficientes de micropropagação, associados à limpeza do material. Todos esses explantes apresentam respostas bem distintas no que se refere à produção de brotos, mediante organogênese; embora, segundo Altman e Goren (1978), o desenvolvimento de gemas laterais constitui-se, individualmente, no fator mais importante para a formação de sistemas de brotações múltiplas. As gemas laterais, que possuem meristemas axilares pré-formados, trazem ainda como vantagem a produção de material com a fidelidade genética garantida (SOOST; ROOSE, 1996).

Barlass e Skene (1982) verificaram que as gemas laterais foram a melhor fonte de explante em cinco variedades de citros, sendo capazes de sustentarem contínuas subculturas. Observaram ainda diferença na competência regenerativa entre os tecidos juvenil e maduro, um aspecto que ocorre muitas vezes com a cultura in vitro de tecidos de espécies arbóreas e que foi realçado nesse trabalho com o uso de explantes de internódios.

Gemas laterais e segmentos de internódios foram os explantes usados por Pinto et al. (1988) para a micropropagação de *P. trifoliata*, apesar de não terem conseguido proliferação nos segmentos internodais. Já para Sarrantino e Caruso (1988a), por meio do cultivo de gemas axilares, as mais altas taxas de multiplicação de brotos foram 10,5 para os citranges ‘Troyer’ e ‘Carrizo’, 12 para o citrumelo ‘CPB 4475’ (*C. paradisi* Macfad. x *P. trifoliata*), 19 para ‘Flying Dragon’ e 12,5 para um mutante anão do citrange ‘Troyer’. Gemas laterais também foram empregadas com êxito por Otoni e Teixeira (1991) na multiplicação in vitro de laranjeira ‘Pêra’, extraídas de brotações de matrizes

juvenis mantidas em casa de vegetação com podas periódicas; os ramos juvenis, com tamanho entre 15 cm e 30 cm, foram coletados entre 7 e 8 semanas após cada poda, sendo usados os segmentos nodais da parte mediana de cada ramo.

Goh et al. (1995) obtiveram a regeneração múltipla de brotos via organogênese com a cultura de segmentos de epicótilos e raízes da toranjeira 'Thai'. A regeneração de brotos foi observada em 84% dos segmentos distais dos epicótilos cultivados em meio MS com 2,2  $\mu\text{M}$  de BA, e em 83% de segmentos medianos e mais próximos dos epicótilos cultivados no meio básico MS. Os segmentos isolados de raízes, cultivados em meio com 0,089  $\mu\text{M}$  de BA, mostraram a melhor regeneração de brotos, da ordem de 71%, com uma média de 3,3 brotos por segmento.

É importante, entretanto, considerar os problemas de contaminação dos explantes, que se constituem num grande entrave para a propagação *in vitro* dos *Citrus*, principalmente quando são oriundos de ramos de plantas cultivadas no campo. Esse foi o maior problema enfrentado por Pinto et al. (1988) na condução de experimentos de citros *in vitro*, principalmente as contaminações ocasionadas por *Aspergillus* sp., apesar da presença de outros fungos e bactérias. Em diversos ensaios, para reduzir o nível de contaminação, verificaram que o benomil, em baixas concentrações, propiciou resultados promissores, enquanto que ao utilizarem uma técnica, recomendada por Giladi et al. (1979), não obtiveram sucesso, em virtude da desidratação dos tecidos dos segmentos nodais utilizados como explantes. Essa técnica consiste na imersão dos explantes em etanol a 80% durante 5 minutos, antes da transferência para o meio de cultura.

Conforme visto anteriormente, vários estudos foram desenvolvidos com o intuito de adequar protocolos de micropropagação massal de genótipos de citros, sem, contudo, avaliar o comportamento posterior das plantas obtidas. Esse foi o foco do trabalho executado por Singh et al. (2001), que compararam o crescimento de plantas micropropagadas com o de plântulas oriundas de sementes de 12 cultivares envolvendo 11 espécies de citros. Numa avaliação aos 60 dias, comprovou-se que o crescimento das plântulas foi superior ao das plantas multiplicadas *in vitro*, fato este atribuído à presença dos cotilédones nas sementes. No entanto, aos 12 meses, o crescimento das plantas micropropagadas foi significativamente superior ao das plântulas, indicando, assim, que a micropropagação pode ser a melhor alternativa para a multiplicação de genótipos de citros (ALI; MIRZA, 2006).

## Limpeza clonal

A preocupação em fornecer, ao fruticultor, mudas com a melhor garantia de autenticidade varietal e de sanidade resultou no desenvolvimento de programas efetivos de obtenção e uso de material básico em vários países de tecnologia agrícola avançada (SANTOS FILHO, 1986), principalmente por causa das infecções causadas por viroses, viroides e organismos semelhantes a micoplasmas (SOOST; ROOSE, 1996). Esse assunto vem recebendo maior atenção, como um fator significativo

na produtividade das espécies arbóreas, desde que diminuições no vigor, na produtividade e na qualidade já vêm sendo atribuídas a esses agentes desde alguns anos atrás (NAVARRO et al., 1975).

No contexto geral, felizmente, métodos estão disponíveis para recuperar plantas livres de vírus, tais como a termoterapia, que tem sido empregada para produzir material livre de certas viroses, e a cultura de ápices caulinares, usada com muito sucesso para diversas espécies herbáceas, mas não é uma técnica aplicável ainda à maioria das plantas lenhosas. No entanto, técnicas *in vitro* de obtenção de plantas cítricas livres de patógenos, que tenham características idênticas às plantas-matrizes, têm sido utilizadas em vários países. Três dessas técnicas já estão bem estabelecidas: a) cultura de nucelos, que permite conseguir plantas nucelares de variedades monoembriônicas; b) cultura de óvulos, visando à produção de plantas nucelares a partir de variedades poliembriônicas sem sementes; e c) microenxertia, para a obtenção de plantas não nucelares livres de vírus, viroides e micoplasmas (ROSSETTI, 1979).

A técnica da microenxertia é sem dúvida superior aos outros procedimentos, quando aplicada aos citros na eliminação de viroses, desde que é: a) superior à termoterapia, pois elimina viroses que mediante o tratamento térmico não se consegue, tais como *dweet mottle*, *yellow vein*, xiloporose, *stubborn* e exocorte; e b) superior a plantas nucelares, já que, apesar de ambas as metodologias possibilitarem a obtenção de indivíduos livres de vírus, a microenxertia não apresenta os mesmos problemas daquelas, tais como reversão ao estágio juvenil, abundância de espinhos, hábito de crescimento vertical e vigoroso, atraso na frutificação, produção alternada nos primeiros anos e diferenças nas características físicas dos frutos (MÜLLER et al., 1986; TUSA et al., 1988). A combinação da microenxertia com a termoterapia vem sendo cada vez mais adotada na produção de plantas livres de patógenos (SOOST; ROOSE, 1996), principalmente em se tratando da sorose (ROSSETTI, 1979).

## Embriogênese somática

Um dos primeiros enfoques da cultura de tecidos em *Citrus* foi a obtenção de embriões nucelares *in vitro* a partir de espécies monoembriônicas, com a finalidade de produzir plantas isentas de vírus. Posteriormente, intensificou-se a produção de calos nucelares, em virtude da possibilidade de se conseguir embriões somáticos em grande quantidade a partir desses calos (CRISTOFANI, 1991). Além disso, o processo da embriogênese somática constitui-se em um pré-requisito altamente importante na recuperação eficiente de plantas cítricas geneticamente modificadas por fusão de protoplastos e transformação genética com e sem o emprego de vetores, bem como originadas de células irradiadas (AGISIMANTO et al., 2011; GOSAL et al., 1995).

De acordo com Barlass e Skene (1986), talvez exista mais material publicado em relação ao comportamento dos citros *in vitro* que qualquer outra espécie frutífera arbórea, sendo essa riqueza de literatura atribuída principalmente a uma de suas características, a poliembrião, que está presente na maioria das espécies cítricas, inclusive em genótipos não apomíticos (ALEZA et al., 2010).

No processo da poliembrionia, um caráter recessivo controlado por genes múltiplos (MAHESHWARI; RANGASWAMY, 1958), ocorre o desenvolvimento de embriões a partir de células do nucelo (PEIXOTO et al., 1990), um tecido suculento que se localiza imediatamente abaixo dos integumentos (RANGAN, 1984), no saco embrionário.

Apesar de a embriogênese somática ser reconhecida como o processo de regeneração mais comum nas plantas cítricas (BENEDITO et al., 2000), os embriões nucelares (embrioides), reproduzidos vegetativamente, desenvolvem-se juntamente com o embrião zigótico, constituindo-se no maior problema para o melhoramento genético, haja vista a dificuldade de identificação e recuperação do indivíduo híbrido (RANGAN et al., 1969). Entretanto, também são importantes para o melhoramento genético, já que produzem indivíduos geneticamente uniformes e idênticos à planta-mãe, sem herdar as variações induzidas pela fusão gamética (RANGAN, 1984), aliado ao fato de serem isentos de doenças, principalmente as causadas pelos vírus e viroides que afetam os citros (MÜLLER et al., 1986).

A embriogênese somática é hoje induzida em uma série de explantes de cultivares poliembriônicas, monoembriônicas e mesmo aquelas que não possuem sementes. No entanto, apesar das vantagens que a embriogênese somática oferece, conforme visto anteriormente, existem desvantagens e problemas, tal como o longo período de juvenilidade apresentado pelas plantas derivadas de embriões adventícios, seja in vitro ou in vivo, de modo que o tempo para alcançar a maturidade e a produção de frutos pode ser muito considerável (BARLASS; SKENE, 1986). Outros inconvenientes das plantas nucelares são menor produção de frutos, vigor excessivo, grande quantidade de espinhos, baixa qualidade dos frutos e alternância de produção (AMARAL, 1996; MÜLLER et al., 1986).

Por outro lado, Spiegel-Roy e Kochba (1980) observaram variações fenotípicas em plantas nucelares, provavelmente por causa das diferenças na expressão da juvenilidade. Eles sugerem ainda que a polinização e, especialmente, a fertilização podem afetar a expressão do genoma no embrião nucelar. Navarro et al. (1985) encontraram, em 165 plantas de oito cultivares monoembriônicas de tangerineira 'Clementina' (*C. clementina* Hort. ex Tan.), mantidas em casa de vegetação, 48 (29%) com características fenotípicas anormais, especialmente em relação a mudanças na forma e no tamanho das folhas e pecíolos, porém houve ainda plantas com internódios muito curtos, sem espinhos e com frutos anormais. Baseando-se nesses resultados, aqueles autores concluíram que a cultura de nucelos in vitro não é conveniente para produzir plantas de cultivares monoembriônicas livres de vírus, em razão da alta porcentagem de indivíduos aberrantes. Entretanto, entendem que essa técnica pode ser usada para aumentar a variabilidade genética em espécies monoembriônicas de citros, com potencial para se obter novas cultivares.

Considerando a tendência natural do nucelo em formar embrioides, a maioria dos trabalhos sobre indução artificial de embriogênese somática em citros utilizou esse tecido (CABASSON et al., 1995; GARDNER, 1993; GAVISH et al., 1992; KOBAYASHI et al., 1990; OLIVEIRA et al., 1994a; SINGH et al., 1992). Entretanto, outros tipos de explantes também têm sido empregados, tais como segmentos de plântulas, raízes, epicótilos, cotilédones (GOSAL et al., 1995), e hipocótilos (JUMIN; NITO, 1996).

Segundo Thakur e Bajwa (1971), foi Frost, em 1938, quem introduziu o termo embriogênese nucelar para denominar os embriões originados no nucelo. As células nucleares dos citros são pre-determinadas como células embriogênicas (SPIEGEL-ROY; VARDI, 1984) possuindo, portanto, uma tendência natural de formar os embrioides. Os embriões nucleares não se formam ao mesmo tempo e na mesma taxa, e, dessa forma, numa semente podem-se encontrar embrioides em diferentes estádios de desenvolvimento. Têm forma irregular e podem possuir ou não o suspensor (SPIEGEL-ROY; KOCHBA, 1980).

De acordo com Ploper et al. (1977) e Prates (1977), a formação de embriões adicionais, além do sexual, pode ocorrer por três processos: a) usualmente pelo crescimento de células do nucelo; b) por divisão do embrião sexual, originando gêmeos idênticos; e c) pela formação de dois sacos embrionários em um só óvulo, o que resultaria em dois embriões sexuais. Já Kobayashi et al. (1979) propuseram dividir o processo da embriogênese nucelar nestes três passos:

- Formação da célula primordial do embrião nucelar – A célula primordial foi encontrada no óvulo do botão floral e, por essa razão, concluíram que a polinização e a fertilização não são essenciais para esse primeiro passo da embriogênese nucelar.
- Divisão dessas células primordiais – Alguns autores entendem que a oosfera produz um estímulo para a célula primordial, e, conseqüentemente, essa célula começa a se dividir logo após a primeira divisão da oosfera; por outro lado, outros autores relatam que embriões nucleares globulares foram encontrados em sementes, cujo zigoto não tinha se dividido.
- Desenvolvimento dos embriões nucleares – Considera-se que a polinização e a fertilização são necessárias para formação do endosperma, cuja condição nutricional auxilia o desenvolvimento do embrião nucelar. Portanto, aqueles autores concluíram que a formação da embriogênese nucelar fica esclarecida nos primeiro e terceiro passos, mas não o suficiente ainda no segundo passo, o qual precisa ser mais estudado.

Para iniciar a embriogênese nucelar in vitro, os nucleos devem ser extraídos num estágio apropriado de desenvolvimento (Figura 2) e cultivados num meio nutritivo adequado. Para tanto, dependendo da cultivar de citros, normalmente os frutos podem ser colhidos de 10 até 17 semanas (CRISTOFANI, 1991; RANGAN, 1984). Entretanto, no caso das laranjeiras ‘Shamouti’ e ‘Valência’ e do pomeleiro ‘Marsh Seedless’, que têm tendência em não produzir sementes, os óvulos e nucleos foram excisa-



Foto: Antônio da Silva Souza

**Figura 2.** Nucelo de citros isolado em estágio de desenvolvimento adequado para iniciar o processo de embriogênese in vitro.

dos de frutos com 1 a 6 semanas, 6 a 8 semanas e 8 semanas, respectivamente, após a polinização (KOCHBA et al., 1972).

Diversas concentrações e combinações de reguladores de crescimento e carboidratos têm sido empregadas em uma ampla faixa de explantes, para promover a embriogênese somática em cultivares monoembriônicas (NAVARRO et al., 1985) e poliembriônicas (KOBAYASHI; UCHIMIYA, 1989) de citros. O meio básico, normalmente usado na cultura de tecidos nucelares, é o MS (PASQUAL et al., 1988a, 1988b). No entanto, outros meios nutritivos também têm sido empregados no cultivo de nucelos de citros, tais como o de White (MAHESHWARI; RANGASWAMY, 1958) e o MT, este empregado com sucesso no desenvolvimento de embriões somáticos em seis espécies relacionadas aos citros por Jumin e Nito (1996). Geralmente têm sido empregados meios solidificados com 0,8% a 1% de ágar.

Os reguladores de crescimento adicionados aos meios de cultura geralmente incluem auxinas (AIA, ANA e 2,4-D), citocininas [BAP, CIN, isopenteniladenina (2iP) e zeatina (ZEA)], e  $AG_3$ , que podem estimular (PASQUAL et al., 1988b) ou até mesmo suprimir (SPIEGEL-ROY; KOCHBA, 1980) a embriogênese ao interagir com os níveis endógenos de fito-hormônios e outras substâncias de crescimento. Por outro lado, o emprego de baixas concentrações do ácido abscísico (ABA), um inibidor de crescimento, induziu a embriogênese (SPIEGEL-ROY; VARDI, 1984). Também inibidores da síntese de auxinas e  $AG_3$  estimularam fortemente a embriogênese em citros (KOCHBA; SPIEGEL-ROY, 1977). Outras substâncias de crescimento também já foram utilizadas em diversos estudos visando induzir embriogênese em *Citrus*, a exemplo do extrato de malte, da caseína hidrolizada, do sulfato de adenina, da água de coco e do suco de laranja (BUTTON; BORNMAN, 1971; GOSAL et al., 1995; RANGAN et al., 1969). Entretanto, apesar do grande interesse que as culturas embriogênicas têm despertado nos últimos anos, muito pouco foi efetuado para entender o papel dos fito-hormônios na embriogênese somática de citros (JIMÉNEZ et al., 2001).

O uso de diferentes fontes de carboidratos, como sacarose, glicose, frutose, galactose, lactose e glicerol, também tem influenciado a produção de culturas embriogênicas em citros. A concentração de 5% de sacarose foi a mais adequada para o desenvolvimento de embriões somáticos globulares em seis espécies afins aos citros, de acordo com Jumin e Nito (1996). Segundo estudos executados por Cabasson et al. (1995), a taxa de crescimento celular e o esgotamento do carboidrato foram três vezes maiores no meio com sacarose que no meio com galactose. Apesar de as células terem sido capazes de desenvolver embriões somáticos na presença da galactose, ocorreram mais divisões celulares no meio de cultura com sacarose. No entanto, em comparação com outros carboidratos, a galactose foi o que melhor estimulou a formação de embriões somáticos para a maioria das variedades de laranja doce estudadas por Benedito et al. (2000).

Por sua vez, Singh et al. (1992), estudando o limoeiro 'Meyer' (*C. meyeri* Y. Tanaka), conseguiram melhor crescimento de calo (647 mg), maior número de embrioides por calo (2) e maior taxa de culturas com embrioides (33%) em meio com 4% de lactose, enquanto que com 2% de glicerol obtiveram 459 mg de peso fresco de calo, 1,5 embrioides por calo e 18% de culturas com embrioides.

De acordo com Gavish et al. (1992), mediante uma mudança na fonte de carbono do meio de cultura, de sacarose para glicerol, as massas pró-embriogênicas, resultantes de cultivos celulares derivados de nucelos de laranja 'Azeda' (*C. aurantium* L.), são induzidas a sofrer embriogênese sincrônica, formando embriões nos estágios iniciais.

Analisando o efeito de carboidratos em diversas espécies de citros, Gosal et al. (1995) observaram que a sacarose proporcionou a embriogênese quando empregada em níveis mais baixos (8 mM a 32 mM), enquanto a galactose e lactose favoreceram a embriogênese em uma faixa de concentrações bastante ampla (8 mM a 256 mM). Glicose e frutose não foram eficazes em estimular a embriogênese em calos nucelares, enquanto que a adição de 280 mM de glicerol ao meio de cultura resultou na transformação de calos nucelares em pequenos embriões verdes dentro de 3 a 4 semanas em *C. sinensis*, *C. paradisi* e *C. limon*. Jiménez et al. (2001) também comprovaram que o glicerol favoreceu o desenvolvimento contínuo de embriões somáticos em diversas variedades de laranja doce, além de estimular o acúmulo de auxinas e citocininas na maioria dos genótipos.

Em estudo desenvolvido por Kayim e Koc (2006), o glicerol destacou-se entre seis fontes de carbono utilizadas na formação de embriões somáticos em quatro variedades de citros, que mostraram respostas diferenciadas em relação à dose desse carboidrato. Enquanto a laranja 'Washington Navel' e o limoeiro 'Zagara Bianca' (*C. limon*) apresentaram maior produção de embriões somáticos na concentração de 4% de glicerol, a tangerineira 'Clementina' e o limoeiro 'Kutdiken' (*C. limon*) formaram um maior número de embriões em meios contendo 5% do carboidrato.

Aproximadamente 10% a 20% dos nucelos isolados deram origem a embriões in vitro, sendo os melhores resultados proporcionados pela laranja 'Temple' (*C. reticulata* x *C. sinensis*) e pelo limoeiro 'Ponderosa', quando cada nucelo cultivado com êxito produziu de 15 a 20 embriões (RANGAN et al., 1969). Por sua vez, Navarro et al. (1985) relataram que, após 3 a 6 semanas, os nucelos produziram embriões somáticos em 10% a 30% e calos em 40% a 75% dos cultivos efetuados; em etapa posterior, cerca de 15% desses calos transformaram-se em embriões somáticos, que originaram plantas livres de vírus em oito cultivares monoembriônicas de tangerineira 'Clementina'.

Pasqual et al. (1988a, 1988b), em estudos com laranja 'Valência', obtiveram até 12 embriões diretamente em um único nucelo, sem a presença de reguladores de crescimento. Os embriões raramente germinam se são deixados unidos ao nucelo, calos ou outros embriões, necessitando serem individualizados em meio fresco para que tenha continuidade o processo de desenvolvimento (PASQUAL; ANDO, 1992).

## Microenxertia

As doenças causadas por vírus e patógenos semelhantes revestem-se de grande importância para a citricultura, em face da inexistência de medidas eficazes de controle e da disseminação via o material vegetativo (borbulhas) usado na propagação das plantas (SANTOS FILHO, 1984), resultando

em importantíssimas perdas econômicas em todo o mundo. De acordo com Matos et al. (1988), dentre as doenças que ocorrem na cultura dos citros, as viroses situam-se entre as mais importantes. Viroses como a tristeza, sorose e xiloporose, e o viroide-do-exocorte, estão presentes em diversas regiões citrícolas do Brasil e podem causar perdas acentuadas na produção de frutos, caso não sejam adotadas medidas de controle. Elas podem reduzir a produtividade, causar um declínio mais ou menos rápido nas plantas, impedir o estabelecimento de pomares em certas regiões e/ou até mesmo ocasionar a morte das plantas afetadas (ROSSETTI, 1979). Com o advento da biotecnologia e das técnicas de cultura de tecidos, surgiu a microenxertia, que tem entre seus objetivos, além da continuidade de crescimento entre as partes envolvidas no processo, a eliminação de doenças sistêmicas e consequente obtenção de mudas sadias (OLIVEIRA et al., 2002).

A microenxertia em si é uma técnica desenvolvida por Murashige et al. (1972) e melhorada por Navarro et al. (1975), na qual o ápice caulinar de uma planta-matriz é inserido numa incisão efetuada na haste decapitada de um microporta-enxerto (Figura 3), oriundo de semente germinada sob condições assépticas (GRATTAPAGLIA, 1990; STARRANTINO; CARUSO, 1988b). É, na verdade, uma modificação da cultura de ápices caulinares tradicionalmente empregada em diversas espécies, em razão da dificuldade de obtenção *in vitro* de plantas de citros mediante o cultivo dos meristemas apicais diretamente no meio nutritivo (SANTOS FILHO; PAZ, 1994).

Mediante a microenxertia que, juntamente com a fusão de protoplastos, constituem-se nas mais notáveis técnicas de cultura de tecidos desenvolvidas para os citros, têm-se obtido plantas isentas de doenças, principalmente as causadas por vírus e viroides (MACHADO, 1991), baseando-se fundamentalmente em dois pontos: a maioria das viroses dos citros não é transmitida pelas sementes, e o meristema apical ou ápice caulinar, tecido ainda não diferenciado, está geralmente isento de vírus e micoplasmas, mesmo que a planta da qual proceda esteja afetada por esses patógenos (ROSSETTI, 1979; SOOST; ROOSE, 1996).

A técnica de microenxertia de ápices caulinares inclui as seguintes etapas: preparo do microporta-enxerto, preparo do ápice caulinar, enxertia, cultivo *in vitro* das plantas enxertadas e transplante para vasos em casa de vegetação (NAVARRO; JUÁREZ, 2005). O tempo necessário para



Foto: Antônio da Silva Souza

**Figura 3.** Ápice caulinar de uma planta matriz inserido numa incisão efetuada na haste decapitada de um microporta-enxerto de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., oriundo de semente germinada sob condições assépticas.

realizar todo o processo é normalmente de 14 a 16 meses, incluindo o diagnóstico de patógenos nas plantas microenxertadas (NAVARRO et al., 2005b).

O processo da microenxertia, portanto, inicia-se com o cultivo de sementes do porta-enxerto, as quais podem ser de *P. trifoliata* ou um dos seus híbridos (MATOS et al., 1988) ou de citrange 'Troyer' (NAVARRO; JUÁREZ, 2005; NAVARRO et al., 2005b). A idade do microporta-enxerto tem um papel significativo na micropropagação. Navarro (1979) e Santos Filho et al. (1986) recomendam que sejam utilizadas plântulas após duas ou três semanas do plantio das sementes. Quando utilizaram plântulas mais jovens (uma semana), Navarro e Juárez (2005) observaram que a maior parte dos ápices foi coberta rapidamente pelo calo produzido nas zonas de corte do microporta-enxerto, enquanto que muitos ápices enxertados em microporta-enxertos mais velhos (3 a 4 semanas) desidrataram e morreram.

Segundo Navarro et al. (1975), não houve diferença no grau da microenxertia entre porta-enxertos que ficaram com os cotilédones intactos e aqueles em que os cotilédones foram removidos, apesar de que nas plântulas em que os cotilédones estavam presentes ocorreram brotações nas gemas axilares. Também não encontraram diferenças entre as plântulas que tiveram as raízes podadas e não, apesar da redução do tamanho do hipocótilo para 4 cm a 6 cm facilitar o manuseio das plântulas. O epicótilo deve ficar com um tamanho de 1,5 cm a 2 cm (MATOS et al., 1988). Por sua vez, Paz e Pasqual (1998) recomendam deixar tanto o hipocótilo como o epicótilo com 2 cm a 3 cm de tamanho.

Das plantas portadoras de doenças viróticas são retirados os brotos contendo os ápices caulinares, dos quais saem as folhas visíveis a vista desarmada, e desinfetados antes de submetidos à retirada do domo meristemático.

Em relação ao tamanho, os ápices caulinares maiores (0,4 mm a 0,7 mm) foram melhores para o sucesso da microenxertia (43,7%). Entretanto, é provável que ocorra uma diminuição na proporção de plantas livres de viroses, conforme Navarro et al. (1975), que recomendam o tamanho de 0,14 mm a 0,18 mm, composto por três primórdios foliares. A diminuição do tamanho do ápice caulinar para incluir apenas dois primórdios foliares provavelmente aumentaria a porcentagem de plantas sadias obtidas, porém o percentual de pega seria reduzido drasticamente a níveis que não seriam operativos em aplicações rotineiras (NAVARRO et al., 2005b).

Tanto a termoterapia (FIFAEI et al., 2007) como a fitoterapia (SHARMA et al., 2007) e a quimioterapia (PAZ; PASQUAL, 1998) podem ser utilizadas, permitindo o uso de ápices de maior tamanho e, dessa forma, contribuindo não só para um maior pegamento do microenxerto, como também aumentando a possibilidade de eliminação de vírus. Segundo Navarro (1979), ápices caulinares retirados de brotações de plantas cultivadas em campo ou casa de vegetação produziram maior percentual de êxito de microenxertias. As brotações de gemas axilares previamente cultivadas in vitro não foram uma boa fonte de ápices caulinares, já que eles se tornaram mais difíceis de serem excisados, por causa da quantidade de tecidos envolvendo-os e substancial volume de seiva ex-

sudada. No entanto, esses ápices caulinares obtidos *in vitro* podem se constituir numa fonte mais segura de material livre de vírus.

Um outro aspecto abordado por Navarro et al. (1975) é a posição em que o ápice caulinar deve ficar no microporta-enxerto. Ao colocar a superfície do ápice caulinar, onde ocorreu o corte no momento da excisão, em contato com a superfície do córtex da incisão em “T” invertido do porta-enxerto, conseguiram 45% de sucesso, além de não ter havido formação significativa de brotações adventícias. Por sua vez, Naz et al. (2007) conseguiram 34,7% de pegamento empregando o corte em “T” invertido e 26,7% quando os ápices caulinares foram colocados na superfície do microporta-enxerto podado. Já Su (2008) emprega dois métodos no procedimento de microenxertia: a) coloca o ápice caulinar em uma pequena abertura em forma de triângulo feita a uma distância de 2 mm a 3 mm do topo do microporta-enxerto podado, e b) insere o ápice caulinar em um corte em forma de “V” feito no topo do microporta-enxerto após a poda. De acordo com Starrantino e Caruso (1988b), entre as causas que provocam insucessos na microenxertia, de particular importância tem sido o desenvolvimento de calos e gemas adventícias que se originam em grande número sobre a superfície do corte no microporta-enxerto. Ao proliferarem rapidamente, os calos cobrem o ápice microenxertado e não permitem seu desenvolvimento.

A concentração de 7,5% de sacarose desempenhou um papel significativo na microenxertia, tanto com respeito ao número de enxertos bem sucedidos como no número e tamanho de folhas emitidas (NAVARRO, 1979; NAVARRO; JUÁREZ, 2005). Quanto aos reguladores de crescimento, nem o AIA nem o BA influenciaram sobre o grau de êxito da microenxertia. Entretanto, o AIA, em concentrações de 1 mg L<sup>-1</sup> e 10 mg L<sup>-1</sup>, estimulou aparentemente a iniciação de raízes laterais, enquanto que o BA, em doses maiores e igual a 0,1 mg L<sup>-1</sup>, inibiu o crescimento das raízes e induziu a brotação de numerosas gemas na região de enraizamento do microporta-enxerto. Já Starrantino e Caruso (1988b) informaram que, ao aplicarem a técnica da microenxertia em diversas espécies de citros, conseguiram aproximadamente 40% de sucesso. Todavia, ao imergirem tanto o ápice caulinar como o microporta-enxerto, antes da microenxertia, numa solução de BAP a 0,5 ppm, durante 10 minutos, a taxa de sobrevivência aumentou para 91%, originando plantas normais.

Navarro et al. (1975) obtiveram 95% de sobrevivência de microenxertos transferidos para solo após 5 a 8 semanas. Outra metodologia de transplante baseia-se no trabalho de De Lange (1978) e consiste na garfagem do microenxerto em porta-enxerto vigoroso e com diâmetro igual ao de um lápis, mantido em casa de vegetação. A plântula microenxertada deve ser sobrenxertada por garfagem lateral (Figura 4) ao atingir o estágio de duas folhas, três a cinco semanas após, e o porta-enxerto possuir um diâmetro entre 0,5 cm e 1,0 cm. Essa metodologia permite um avanço de 6 meses nos trabalhos de obtenção das plantas-matrizes para indexação.

Com o objetivo de simplificar o procedimento normal da microenxertia, em vez de colocar as plântulas microenxertadas em meio líquido e deixá-las em câmara de crescimento, Santos Filho (1984) recomenda que, após a microenxertia, elas sejam imediatamente sobrenxertadas em porta-



Foto: Hermes Peixoto Santos Filho

**Figura 4.** Plântula microenxertada sendo sobrenxertada por garfagem lateral ao atingir o estágio de duas folhas, 3 a 5 semanas após o pegamento.

enxertos com um ano de idade, preexistentes em casa de vegetação, e ali mantidas cobertas por um saco plástico para proporcionar condições de umidade alta.

Esse método produziu uma taxa de sobrevivência de 80%, com a vantagem de eliminar a etapa de transferência para meio líquido. Utilizando-se da técnica de microenxertia, Santos Filho et al. (1986) afirmaram que é possível obter material básico para certificação de mudas cítricas, ao se estabelecer um programa formado pelas seguintes etapas: a) seleção de clones; b) indexação para os vírus-da-tristeza, sorose e xiloporose, e para o viroide-do-exocorte; c) microenxertia; d) obtenção de plantas livres de vírus; e e) reindexação das plantas microenxertadas. É realmente importante que, além da limpeza clonal, seja empregado um eficiente procedimento de indexação via plantas indicadoras (MACHADO, 1991).

Segundo Rossetti (1979), as plantas obtidas mediante microenxertia deverão obrigatoriamente ser submetidas a testes em plantas indicadoras para vírus e micoplasmas, haja vista que, a depender do tamanho, o ápice caulinar pode conter tecidos infectados por esses microrganismos. Para tanto, recomenda-se: a) na detecção do vírus-da-sorose, usar mudas de laranja doce, que mostrarão sintomas foliares; b) para o viroide-do-exocorte, utilizar limoeiro 'Cravo' ou cidreira 'Etrog', sendo que esta apresenta resultados mais rápidos e mostra sintomas de epinastia-foliar, além dos

sintomas de amarelecimento-dos-ramos; e c) no caso da xiloporose, empregar o tangelo 'Orlando' [pomeleiro 'Duncan' x tangerineira 'Dancy' (*C. tangerina* Hort. ex Tanaka)], que exibe sintomas aos 8 a 9 meses após a inoculação por enxertia. Já Paz e Pasqual (1998) recomendam as seguintes plantas indicadoras para as principais viroses dos citros: laranjeira 'Pineapple' e tangor 'Dweet' (híbrido de tangerineira e laranjeira doce) (para a sorose), pomeleiro 'Duncan', laranjeira 'Azeda' e limoeiro 'Eureka' (*C. limon*) (no caso da tristeza), tangerineira 'Parson Special' (*C. reticulata*) (em se tratando da xiloporose) e cidreira 'Arizona 861/SL' (para o viroide-do-exocorte).

Para a obtenção de clones velhos sadios, Müller et al. (1986) micoenxertaram laranjeira doce 'Hamlin', limeira ácida 'Tahiti', clone Quebra galho [*C. latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka] e laranjeira doce 'Folha Murcha' em citrange 'Troyer'. Todos os clones foram testados para tristeza na planta indicadora limoeiro 'Galego' [*C. aurantiifolia* (Christm.) Swingle], para exocorte em cidreira 'Etrog RMA 861', para sorose na laranjeira doce 'Do Céu' e para xiloporose em tangerineira 'Parson Special', comprovando que os três genótipos ficaram livres das três primeiras doenças. Por sua vez, Carvalho et al. (2002) comprovaram uma eficiência de 100% de eliminação dos vírus-do-complexo-da-sorose-dos-citros em clones de laranjeiras doces 'Lima', 'Rubi', 'Piralima', 'Salustiana', 'João Nunes', 'Rosa' e 'Pêra Caire', conforme indexação realizada empregando-se a laranjeira 'Do Céu' como planta indicadora.

Antes de serem incluídos num programa de certificação de matrizes, os clones considerados isentos de vírus devem ser multiplicados para avaliação de suas características clonais (SANTOS FILHO et al., 1986), especialmente no que diz respeito à produtividade e a características qualitativas dos frutos, de forma a evitar mutações negativas que frequentemente ocorrem nos citros (STARRANTINO; CARUSO, 1988b). Na Espanha, por exemplo, o banco de germoplasma do Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (Ivia) conta com plantas livres de patógenos de todas as variedades espanholas de interesse comercial e das principais variedades estrangeiras, todas limpas mediante microenxertia e outras técnicas de cultivo in vitro.

A partir desse banco de germoplasma, os viveiristas têm fornecido aos agricultores cerca de 110 milhões de plantas desde 1982, que representam aproximadamente 90% da citricultura espanhola (NAVARRO, 2005). Além disso, a microenxertia pode também ser aplicável em procedimentos de transformação genética e regeneração de citros e outras espécies lenhosas, nas quais os brotos são difíceis de enraizar e/ou a taxa de enraizamento é baixa. O ápice microenxertado constitui-se num método rápido e eficiente para produzir plantas transgênicas de citros, haja vista que uma frequência de 100% de enxertos viáveis foi obtida empregando-se ápices caulinares de 0,1 cm a 0,4 cm de tamanho, transformados com *Agrobacterium tumefaciens* (PEÑA et al., 1995a, 1995b).

Segundo Navarro e Juárez (2005), a microenxertia pode ainda ser aplicada em *Citrus* na regeneração de: a) híbridos somáticos; b) plantas oriundas de ápices irradiados; c) plantas haploides; d) plantas tetraploides; e e) variantes somaclonais. Além disso, a microenxertia tem facilitado o intercâmbio de germoplasma, já que estacas importadas são desinfestadas e cultivadas in vitro a 32 °C em uma câmara de cultivo para induzir a brotação de gemas. Os brotos produzidos são novamente

desinfestados e procede-se o isolamento dos ápices caulinares, que normalmente estão livres de pragas e patógenos e serão microenxertado *in vitro*.

Concluindo, de acordo com Paz e Pasqual (1998), a microenxertia, além de ser uma técnica de fácil aplicação prática, apresenta uma série de vantagens dentre as quais se destacam:

- Obtenção de plantas livres de vírus, sendo no caso específico dos citros, produção de plantas-matrizes com alta qualidade fitossanitária (isentas dos vírus-da-tristeza, exocorte, xiloporose e sorose) e fisiológica (evitando o rejuvenescimento).
- Formação de blocos de plantas-matrizes para fornecimento de borbulhas certificadas a viveiristas produtores de mudas.
- Possibilidade de intercâmbio de mudas e borbulhas de maneira segura com referência à sanidade.
- Manutenção dos acessos de bancos de germoplasma livres de vírus.
- Possibilidade de aumento da produtividade nos plantios comerciais.
- Rejuvenescimento do propágulo quando feita em cascata.

Para Navarro e Juárez (2005), a técnica de microenxertia de ápices caulinares *in vitro* é provavelmente o desenvolvimento científico dos últimos 50 anos que tem apresentado o maior impacto socioeconômico na citricultura mundial.

## Melhoramento genético

A necessidade de abastecer uma população mundial em constante progressão gera uma imensa pressão na hora de desenvolver novas variedades que apresentem rendimentos altos, melhor qualidade (pré e pós-colheita), maior resistência às pragas e doenças e maior tolerância aos estresses ambientais. De acordo com Pauls (1995), para a maioria das espécies cultivadas, o tempo necessário para desenvolver, avaliar e liberar uma nova variedade, dentro de um programa de melhoramento genético clássico, leva normalmente de 10 a 15 anos. O processo completo inclui as fases de avaliação e manipulação do germoplasma disponível, seleção dos parentais, escolha do método de melhoramento, início do plano de melhoramento, estabilização genética dos novos materiais, experimentação e multiplicação das linhas selecionadas, proteção da nova variedade, produção comercial e controle de qualidade da nova cultivar.

O melhoramento de citros mediante métodos convencionais é dificultado pela complexidade de seu sistema genético, que acaba se tornando uma séria barreira para introduzir, nas variedades cultivadas, importantes características agrônômicas presentes em espécies silvestres, a exemplo de resistência a doenças e tolerância a estresses abióticos como salinidade, seca, frio e herbicidas (KAYIM; KOC, 2006).

Segundo Navarro (2005), problemas como a complexa biologia reprodutiva, embriogênese nucelar, heterozigose, desconhecimento genético, juvenilidade, escassez de marcadores moleculares e produção de sementes obrigam o melhorista a obter um grande número de híbridos de cada combinação de parentais, cultivá-los durante períodos mínimos de 10 anos, para iniciar uma avaliação eficaz, e, normalmente, eliminar a grande maioria porque não reúnem os caracteres desejados. Diante da complexidade, das limitações e da longa duração dos programas de melhoramento genético tradicionais, muitos esforços estão sendo efetuados para encontrar enfoques alternativos que simplifiquem a obtenção de resultados, acelerem sua execução, ou como sucede em muitos casos, ajudem a superar as barreiras existentes (BLACKHALL et al., 1994).

Entre essas novas alternativas, as mais promissoras são as que oferecem a biotecnologia vegetal, que se apresentam não tanto como ferramentas substitutivas das convencionais (embora às vezes o possam ser quando o mesmo resultado pode ser obtido de forma mais rápida e/ou efetiva), mas também como ferramentas complementares (quando os métodos convencionais não podem isoladamente resolver um determinado problema), estendendo assim as possibilidades do melhoramento genético como um todo (ARCE-OCHOA et al., 1995; CSÉPLÖ et al., 1986).

A biotecnologia está abrindo um leque de novas possibilidades para o melhoramento dos citros que eram impensáveis até poucos anos atrás, abrindo novas vias para a solução de uma parte importante dos problemas existentes, já que permite superar algumas limitações dos métodos tradicionais e oferece novas estratégias de trabalho mais eficientes (HERNÁNDEZ et al., 2010). No entanto, deve-se destacar que todas as técnicas apresentam vantagens e limitações. Para cada caso há que aplicar a técnica mais adequada para a solução do problema, empregando-a na geração contínua de novos porta-enxertos e variedades melhoradas (NAVARRO, 2005). E, como será visto em seguida, entre as alternativas biotecnológicas utilizadas, a maior parte delas tem sido aplicada com êxito no melhoramento genético dos citros.

## Cultura de anteras

A cultura de anteras tem sido amplamente estudada em muitas espécies vegetais, mostrando seu potencial para o melhoramento genético (HIDAKA; OMURA, 1989b). A partir dessa técnica podem-se obter plantas haploides que, de acordo com Handro (1986), sob condições naturais, surgem como resultado de certas anormalidades no processo de reprodução (apomixia, partenogênese), em taxas muito baixas. Elas são de extrema importância para o melhoramento, já que facilita a análise genética do material, elimina a complexidade do estado heterozigoto e representa uma economia de vários anos de trabalho, necessários para a obtenção de novas linhagens (MORAES-FERNANDES, 1990), ao simplificar e aumentar a eficiência da seleção (SWAMINATHAN, 1984). Portanto, as plantas haploides são de muito interesse por parte dos melhoristas e geneticistas, em virtude de seu único jogo de cromossomos possibilitar indução mais fácil e seleção de mutantes (EVANS et al., 1984).

Depois de se dobrar o número de cromossomos, podem ser obtidas plantas diploides homozigotas (GERMANÀ et al., 1994).

Por essas razões, plantas homozigotas podem ser de considerável valor no melhoramento genético de espécies perenes, a exemplo dos citros (HIDAKA, 1984, 1995). Nas pesquisas realizadas desde 1970, em várias espécies perenes, têm-se procurado obter haploides por androgênese ou ginogênese. No entanto, tentativas para produzir plantas haploides de *Citrus* e gêneros afins não têm tido muito sucesso (GERMANÀ et al., 1994), o que normalmente ocorre com as espécies arbóreas, que se caracterizam pelo longo ciclo reprodutivo, alto grau de heterozigozidade e, algumas vezes, pela autoincompatibilidade (GERMANÀ; CHIANCONE, 2003). É o que ocorreu no caso da laranjeira 'Azeda', em que a instabilidade gênica no processo de formação dos embrioides, a partir de grãos de pólen, pareceu aumentar o número de plantas diploides, não se confirmando a presença de nenhuma planta haploide (HIDAKA et al., 1982).

Em outro trabalho, plantas haploides também não foram identificadas em laranjeira 'Trovia', provavelmente pelo fato de que muitos embrioides diferenciaram-se de forma secundária a partir da região do hipocótilo dos embrioides originais (HIDAKA, 1984). Segundo (HIDAKA; OMURA, 1989b), estudos realizados nos estádios iniciais do cultivo de anteras podem propiciar informações importantes sobre a real origem das plantas e as fontes de sua variabilidade. Esses autores demonstraram que plantas obtidas mediante a cultura de anteras de *P. trifoliata* e laranjeira 'Azeda' originaram-se dos micrósporos. O desenvolvimento in vitro dos micrósporos seguiu três principais rotas, sendo que, em uma delas, estruturas celulares multinucleadas desenvolveram-se em embrioides, e a fusão nuclear que ocorreu nessa rota pareceu contribuir para a variação no nível de ploidia. Variações no nível de ploidia foram observadas por Chiancone et al. (2006) ao estudarem o efeito das poliaminas putrescina e espermidina de forma isolada ou combinada no cultivo in vitro da Clementina 'Nules'. A maioria dos indivíduos regenerados foi tri-haploide, alguns eram duplo-haploides, porém nenhuma planta haploide foi obtida.

Hidaka (1990) considera que o êxito dos estudos relacionados com a cultura de anteras envolve dois importantes fatores: o estágio de desenvolvimento das anteras e as condições de cultura, tais como reguladores de crescimento, fonte de carboidrato e temperatura. O estágio ótimo de formação de plântulas a partir de anteras está entre os estádios de tétrade e uninuclear (Figura 5), sendo este o mais adequado para a formação de embrioides em citros. No caso dos reguladores de crescimento, CIN ( $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  –  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  –  $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ ) combinada com AIA ( $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  –  $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ ) têm sido eficientes na formação de embrioides a partir de anteras de algumas espécies cítricas. A temperatura



Foto: Lucymaire Souza Morais Lino

Figura 5. Micrósporo de cidreira em estágio uninucleado.

ótima também depende da espécie, e está entre 24 °C e 28 °C. O mesmo ocorre com a concentração de sacarose, que varia de 10 g L<sup>-1</sup> a 70 g L<sup>-1</sup>, de acordo com a espécie.

Outra condição ambiental estudada foi luminosidade (GERMANÀ et al., 2005), quando anteras de Clementina ‘Nules’ foram cultivadas sob diferentes qualidades de luz. Os resultados obtidos permitiram concluir que a ausência de luz e as luzes branca e vermelha foram as mais adequadas para promover a formação de calo, enquanto a luz azul reduziu de forma significativa a indução e o crescimento dos calos. Isso indica que um fitocromo pode estar envolvido na aquisição de competência para indução de calo e organogênese dependente de luz.

Germanà et al. (1994) realizaram estudos em androgênese visando obter plantas haploides de duas cultivares do grupo de tangerineiras Clementinas (Nules e S.R.A. 63) e duas outras tangerineiras (‘Avana’ e ‘Tardivo di Ciaculli’, *C. reticulata*). Observações citológicas em calos e plantas de tangerineira ‘Nules’ revelaram um número haploide de cromossomos ( $n = x = 9$ ), que não duplicou durante o cultivo. No entanto, o número de cromossomos em calos de tangerineira ‘S.R.A. 63’ e calos e plantas de ‘Avana’ e ‘Tardivo di Ciaculli’ foi diploide ( $2n = 2x = 18$ ), indicando assim a importante influência do genótipo. Em uma pesquisa anterior, Germanà e Chiancone (2003) comprovaram novamente o efeito do genótipo sobre a androgênese e pela primeira vez lograram a regeneração de plantas haploides da tangerineira ‘S.R.A. 63’.

Outra aplicação da haploidia nos citros foi aquela desenvolvida por Ling et al. (1989), que induziram calos na região do hipocótilo de plantas haploides de calamondim (*C. madurensis* Loureiro), os quais serviram como fonte de protoplastos, que, após isolados, passaram por algumas etapas de cultivo in vitro até regenerarem plantas completas.

O certo é que esforços devem ser desenvolvidos no intuito de tornar a cultura de anteras uma ferramenta realmente útil para o melhoramento dos citros, necessitando-se, para isso, de um maior conhecimento do processo de androgênese, de forma a melhorar tanto a frequência com que os embrioides formam os embriões como o número de plantas obtido por antera (GERMANÀ et al., 1994). Conhecimentos profundos da morfologia e anatomia de regenerantes normais e anormais podem tornar possível selecionar e subcultivar aquelas linhagens consideradas mais adequadas para conversão em plântulas (BENELLI et al., 2010).

## Cultura de embriões zigóticos

O melhoramento das espécies cítricas pelos métodos convencionais de hibridação é seriamente limitado pela ocorrência da poliembrião, depressão por endogamia, esterilidade gamética, apomixia, incompatibilidade sexual, alto grau de heterozigosidade, longo período de juvenildade e formação de grandes copas (GARDNER, 1993; GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990b; MORAIS, 1997; PÉREZ-TORNERO; PORRAS, 2008; RAMAN et al., 1992; SHINOZAKI et al., 1992). No caso específico da poliembrião, se por um lado a ocorrência de embriões adventícios possibilita ao mesmo tempo

a obtenção de plantas livres de patógenos regularmente transmitidos pelas borbulhas, já que a semente normalmente não permite a entrada de microrganismos em sua estrutura, e a propagação de um conjunto de plantas com a mesma constituição genética da planta que originou a semente (AMARAL, 1996), por outro lado pode dificultar a sobrevivência do *seedling* zigótico, em virtude da competição que o embrião de origem sexuada, geralmente único, quando presente, sofre ante os de origem nucelar (MEDRADO, 1998).

Para Ploper et al. (1977), nas sementes poliembriônicas, além do embrião zigótico, resultante do cruzamento, e dos embriões nucleares, podem ser encontrados ocasionalmente outros embriões zigóticos, originados da fissão da oosfera ou do desenvolvimento de mais de um saco embrionário em um único óvulo.

Por essas razões, para o melhoramento genético dos citros é vital a distinção entre as progênies zigóticas e nucleares num estágio precoce (SPIEGEL-ROY; KOCHBA, 1980). Na maioria das espécies e cultivares poliembriônicas de *Citrus*, os embriões híbridos normalmente são pequenos, morfologicamente não são diferentes dos embriões nucleares e quase sempre não conseguem germinar quando as sementes são plantadas por métodos convencionais (OHTA; FURASATO, 1957). No desenvolvimento de novas cultivares de citros, pela hibridação, torna-se necessária essa identificação prematura e a recuperação do embrião zigótico (PEIXOTO et al., 1990), o que pode ser conseguido mediante seu tamanho, cor dos cotilédones e a posição que ocupa no saco embrionário (VÁSQUEZ ARAUJO, 1991), além da época de surgimento. Entretanto, esses métodos são trabalhosos e nem sempre confiáveis (SPIEGEL-ROY; KOCHBA, 1980).

Segundo Soares Filho et al. (1997), a identificação de *seedlings* zigóticos pode ser efetuada precocemente mediante análises de morfologia foliar, isoenzimas, segmentos polimórficos de DNA e bandeamento cromossômico, evitando assim o procedimento oneroso e pouco eficiente que é o reconhecimento em nível de campo, vários anos depois. As citadas técnicas, todavia, são comumente bastante dispendiosas, tornando-se muitas vezes inviáveis, sob o ponto de vista econômico, em programas de melhoramento genético que exigem análises rotineiras e em grande número (MORAIS, 1997).

Técnicas atuais de biotecnologia, dentre as quais a cultura in vitro de embriões, têm sido utilizadas na tentativa de contornar os problemas relacionados à poliembrião (FADIGAS, 1993). Essa técnica permite o cultivo de todos os embriões presentes numa semente, dentre os quais se encontra aquele de natureza híbrida que, numa fase posterior, poderá ser identificado. Em se tratando de parentais femininos cujas sementes apresentam elevado grau de poliembrião, o cultivo de embriões oriundos de frutos obtidos a partir de polinizações controladas deve ser feito sob condições assépticas, in vitro, de modo a possibilitar a germinação da maioria dos embriões, garantindo a sobrevivência dos eventuais *seedlings* híbridos (SOARES FILHO et al., 1997). Para Medrado (1998), em variedades com graus de poliembrião elevados (>70%), sob o ponto de vista biológico, o cultivo in vitro de embriões mostra-se mais recomendável que o cultivo convencional de sementes, no

sentido de favorecer a obtenção de híbridos. Dessa forma, a cultura de embriões representa uma ferramenta útil, pois, ao garantir a sobrevivência daqueles indivíduos resultantes dos cruzamentos, abre novas perspectivas para o melhoramento convencional dos citros.

Em sementes poliembriônicas, é realmente interessante resgatar os embriões na fase imatura (Figura 6), de forma a evitar a competição do embrião zigótico com os nucelares e, conseqüentemente, o risco de aborto (VILORIA et al., 2005). Segundo Rangan (1984), o embrião sexual nos citros é reconhecível nos estádios iniciais de desenvolvimento, desde que os nucelares ainda não tenham se desenvolvido (PLOPER et al., 1977). De acordo com Soost e Roose (1996), indivíduos zigóticos foram recuperados desde cultivares de citros altamente poliembriônicas, extraído-se o suposto embrião sexuado a aproximadamente 3 a 4 meses depois da polinização. Com esse objetivo, Rangan et al. (1969) utilizaram frutos, com 100 a 120 dias após a polinização, de um híbrido entre laranjeira 'Azeda' e *P. trifoliata*, quando apenas um embrião por semente foi encontrado, localizado na região da micrópila; não havia evidências de diferenciação embriogênica no nucelo.

Em outro estudo, Pérez-Tornero e Porras (2008) verificaram maior taxa de germinação e ocorrência de plântulas mais altas quando embriões de diversas cultivares de limão foram extraídos de sementes colhidas aos 135 a 150 dias após a antese. Além disso, observaram também que houve um forte efeito de genótipo, com os embriões do limoeiro 'Eureka', apresentando maiores taxas de germinação e sobrevivência, bem como raízes mais desenvolvidas, que as outras 26 cultivares estudadas.

Em relação ao meio de cultura, Ohta e Furasato (1957) e Rangan et al. (1969) utilizaram o de White, enquanto que Fadigas (1993) empregou o MS, na concentração normal, e Moraes-Lino et al. (2008), o MT, com a metade da concentração dos macronutrientes e concentrações normais dos micronutrientes e vitaminas, no cultivo in vitro de embriões de diferentes espécies de citros. Por sua vez, Ribeiro et al. (1998) concluíram que os embriões imaturos de laranjeira 'Pêra', em diferentes idades, apresentaram melhor desenvolvimento no meio MS a 75% de sua fórmula original. Já o meio G-B5 apresentou melhores resultados que o MS na cultura in vitro de embriões imaturos de 27 cultivares de limão (PÉREZ-TORNERO; PORRAS, 2008). A grande maioria dos trabalhos envolvendo o cultivo in vitro de embriões de citros tem utilizado meios gelificados.

O comportamento dos embriões do limoeiro 'Cravo' cultivados em meio líquido, sobre plataforma de papel, foi semelhante ao dos embriões cultivados em meios sólidos, fato que indica a



Foto: Antônio da Silva Souza

Figura 6. Plântulas originadas a partir do cultivo in vitro de embriões imaturo (esquerdo) e maduro (direito) de tangerineira 'Cleópatra'.

possibilidade de cultivar plântulas de citros, oriundas de embriões, de forma similar à preconizada por Navarro et al. (1975) para a manutenção *in vitro* de microenxertos de citros.

Na cultura de embriões de citros e de outras espécies, há a tendência de ocorrer a germinação de embriões imaturos, originando plântulas fracas e mal formadas. Pelo fato de meios de cultura, com elevada pressão osmótica, suprimirem a germinação precoce, alta concentração de sacarose tem sido utilizada para minimizar seus efeitos (PASQUAL; PINTO, 1988). A sacarose tem sido realmente a fonte de energia normalmente presente na cultura de embriões. No entanto, a glicose, numa dosagem de 30 g L<sup>-1</sup>, proporcionou melhor resposta que a sacarose no crescimento de plântulas do limoeiro 'Cravo' (FADIGAS, 1993). Anteriormente, Ohta e Furasato (1957) conseguiram melhores resultados sem a presença da sacarose no meio de cultura.

Ainda de acordo com esses últimos autores, as vitaminas B<sub>1</sub> e/ou C, ao serem adicionadas ao meio básico, numa concentração de 0,01 ppm, proporcionaram melhores resultados no cultivo de embriões considerados grandes (tamanho próximo à metade das sementes). Fadigas (1993) entende que, apesar dos embriões do limoeiro 'Cravo', com diâmetro igual ou superior a 6 mm, terem sido cultivados satisfatoriamente na ausência de tiamina-HCl, piridoxina-HCl, ácido nicotínico, glicina e inositol, é aconselhável a manutenção desses compostos no meio nutritivo, considerando-se que representam apenas 2% do custo total do meio de cultura.

Reguladores de crescimento normalmente não são requeridos em cultura de embriões (FADIGAS, 1993), apesar de que Morais (1997) recomenda 0,08 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,01 mg L<sup>-1</sup> de ANA para a germinação de embriões e desenvolvimento de plântulas de tangerineira 'Cleópatra'.

Os chamados complexos orgânicos também podem ser utilizados para melhorar o nível de resposta de embriões cultivados *in vitro*. Rangan et al. (1969) relatam que a caseína hidrolizada (400 mg L<sup>-1</sup>) propiciou melhores respostas que a água de coco e a combinação de ambas em estudos sobre as embriogêneses zigótica e nucelar em citros. Morais (1997) recomenda empregar 20 mg L<sup>-1</sup> de adenina para o cultivo de embriões imaturos e maduros, e de plântulas de tangerineira 'Cleópatra'.

Finalmente, quanto às condições ambientais, temperaturas em torno de 26 °C a 28 °C e intensidades luminosas de 100 *foot-candles* e 1.500 lux foram as empregadas respectivamente por Rangan et al. (1969) e Fadigas (1993) no cultivo *in vitro* de embriões de citros; o fotoperíodo usado por esses autores foi de 16 horas.

## Indução de mutações

Mutações espontâneas, como evidenciado por uma mudança súbita de herança em um caráter, frequentemente acontecem nos citros, observando-se, em maior intensidade, alterações como manchas nos limbos foliares ou em setores de frutos (SOOST; ROOSE, 1996). Diversas cultivares de citros comercialmente importantes originaram-se de mutações naturais em gemas (KAYIM; KOC, 2006; KOCHBA; SPIEGEL-ROY, 1977), plantas nucleares (CRISTOFANI, 1991) e sua progênie (SOOST;

ROOSE, 1996). Segundo esses últimos autores, no entanto, raramente podem ser distinguidas mutações com recombinação de genes entre as plantas sexuadas, além de que os estudos de indução de mutações nos citros são dificultados pela ocorrência de embrionia nucelar, esterilidade natural e mutações espontâneas.

As mutações induzidas têm despertado interesse quando se pretende variar um ou poucos caracteres negativos de uma variedade, sem afetar de forma significativa seu genótipo, conforme Olivares (1998). A aplicação de tratamentos mutagênicos químicos e físicos tem sido utilizada para produzir mutantes em programas de melhoramento genético de citros. Um experimento para induzir mutação em citros mediante raios X foi relatado em 1935, e desde então vários estudos foram publicados usando este e outros agentes (SOOST; ROOSE, 1996), gerando, inclusive, uma alta porcentagem de quimeras (KAYIM; KOC, 2006).

Cristofani (1991), por exemplo, estudou a sensibilidade à radiação gama em diversos tipos de explantes, visando à indução de mutações para obter resistência ao cancro-cítrico (*Xanthomonas campestris* pv. *citri*). No entanto, entre os explantes que têm sido empregados na indução de mutações em citros, os internódios, que formam meristemas adventícios em resposta ao cultivo in vitro, proporcionam um sistema potencialmente útil para obtenção de mutantes (BARLASS; SKENE, 1982, 1986; SOOST; ROOSE, 1996).

Para Olivares (1998), a variação genética mediante tratamento mutagênico de sementes ou gemas axilares tem sido aplicada para o melhoramento dos citros, porém tem-se obtido uma progênie sexual de escasso interesse e/ou difícil de selecionar. De acordo com Nadel (1989), o diacetato de fluoresceína pode ser usado como uma ferramenta na seleção in vitro de mutantes e variantes celulares, haja vista que não causou nenhum efeito tóxico sobre o crescimento de células e a embriogênese de quatro espécies de *Citrus*.

## Seleção in vitro

A incorporação de novas tecnologias em programas de melhoramento de citros oferece novas oportunidades para facilitar, acelerar e explorar totalmente a variabilidade genética que existe (PASSOS et al., 2007) tanto em nível de copa como de porta-enxerto. Considerando que as metodologias clássicas de melhoramento genético parecem oferecer uma baixa probabilidade de sucesso para conseguir resistência em nível celular, uma alternativa promissora baseia-se nos procedimentos de seleção in vitro, quando as culturas de células e protoplastos oferecem uma aproximação razoável na seleção de variantes somaclonais tolerantes a estresses bióticos e abióticos (GENTILE et al., 1992). Esses autores buscaram a regeneração de plantas de limoeiro 'Femminello Continella' tolerantes a uma fitotoxina extracelular não específica de *Phoma tracheiphila* (Petri) Kanc. et Ghik., que está envolvida na patogenicidade do mal-seco, uma enfermidade que causa sérios danos em diversas espécies cítricas em todos os países mediterrâneos, exceto na Espanha.

Cristofani (1991) relatou sobre a utilização de calos nucelares em trabalhos de seleção in vitro, visando à obtenção de plantas resistentes a salinidade e herbicidas. Por sua vez, Hidaka (1995) conseguiu algumas linhagens de calos resistentes à N-fosfometil glicina (NPG), um herbicida tipo *Roundup*, depois de irradiados com 16 kR de raios gama. Esses calos proliferaram em meio seletivo com 40 mM de NPG, enquanto que a testemunha não cresceu sob a concentração de 10 mM.

Assim como acontece na tecnologia de protoplastos, a utilização da seleção in vitro necessita da disponibilidade de culturas de calos embriogênicos de espécies e cultivares interessantes de citros (KAYIM; KOC, 2006), tornando factível, numa etapa posterior, a regeneração de plantas. Segundo Gentile et al. (1992), para o êxito da seleção in vitro, o agente seletivo e as condições experimentais devem permitir apenas a divisão das células que sofram mutação. O agente seletivo tem que matar as células suscetíveis ou inibir substancialmente seu crescimento, de forma que as células tolerantes possam crescer e proliferar. Por outro lado, quando calos são empregados em lugar de protoplastos, eles contêm uma mistura de células em que, não apenas as resistentes, mas também as suscetíveis, podem se desenvolver ou sobreviver. Assim, quando o agente seletivo é removido, ambos os tipos de células podem proliferar.

## Obtenção de triploides

Entre outras importantes características que necessitam ser abordadas em programas de melhoramento genético para a obtenção de novas variedades, um aspecto absolutamente essencial é a ausência de sementes em frutos a serem consumidos de forma in natura, principalmente nos países desenvolvidos, onde o consumidor não aceita a presença de sementes (OLIVARES, 1998). Uma alternativa que apresenta grande potencial para a produção de frutos sem sementes é a geração de híbridos triploides de citros, com 27 cromossomos em vez dos 18 das variedades normais diploides. As plantas triploides são geralmente estéreis, em virtude de que, na meiose, os gametas recebem número distinto de cromossomos, o que causa esterilidade e, conseqüentemente, não produzem sementes ou estas abortam em sua maioria (NAVARRO et al., 2005a).

Segundo Gmitter Junior et al. (1990), a recuperação de plantas triploides, seguida de polinizações controladas, pode se constituir numa estratégia útil para o melhoramento de espécies frutíferas perenes propagadas vegetativamente, nas quais a abundância de sementes é indesejável e desnecessária por causa da partenocarpia. No caso específico dos citros, o melhoramento de copas tem sido orientado para a produção de variedades triploides, com frutos sem sementes, o que poderia estimular o crescimento do mercado de fruta fresca (JIMÉNEZ, 1996). Nesse sentido, para Mourão Filho et al. (1996), a obtenção de triploides é provavelmente a mais importante aplicação da fusão de protoplastos no melhoramento genético para a produção de cultivares de citros tipo copa, considerando-se o consumo de frutos in natura, especialmente de tangerinas sem sementes, uma exigência do mercado internacional (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 2005).

A obtenção de plantas triploides, que apresentam  $3n$  dotações de cromossomos em vez dos dois habituais, pode ocorrer por meio de diferentes técnicas (MUÑOZ, 1995). Uma delas é mediante o cultivo *in vitro* de endosperma, indução de calos e regeneração de plantas triploides via embriogênese (SOOST; ROOSE, 1996), superando barreiras inerentes à hibridação sexual resultantes da apomixia (GMITTER JUNIOR et al., 1990).

Outros procedimentos para a produção de triploides em citros envolveriam esses três tipos de cruzamentos sexuais, conforme Navarro et al. (2005a):

- Cruzamentos entre parentais masculinos e femininos diploides ( $2n \times 2n$ ) – Em citros, já foi descrito, há algum tempo, que ocasionalmente são produzidos embriões triploides espontâneos depois da hibridação de dois parentais diploides. Isso se deve a que alguns genótipos apresentam anormalidades durante a meiose, e são produzidos alguns gametas femininos não reduzidos (diploides) que são fecundados por gametas masculinos haploides, dando lugar a híbridos triploides que têm dupla informação genética do parental feminino. A vantagem desse enfoque é que pode utilizar como parental masculino qualquer genótipo que tenha pólen viável e seja compatível com o parental feminino.
- Cruzamentos entre parentais masculinos tetraploides e femininos diploides ( $2n \times 4n$ ) – É o método mais clássico para obter híbridos triploides de citros. Os embriões desse tipo de híbrido se formam pela fecundação de um gameta feminino haploide por um gameta masculino que é diploide, porque procede da meiose de células tetraploides. A limitação desse método é a escassa disponibilidade de parentais tetraploides de qualidade, que são produzidos de forma espontânea em algumas ocasiões em variedades poliembrionicas por autoduplicação cromossômica de células do nucelo, que dão lugar a embriões e, posteriormente, plantas nucleares tetraploides.
- Cruzamentos entre parentais masculinos diploides e femininos tetraploides ( $4n \times 2n$ ) – Os híbridos triploides são originados pela fecundação de um gameta feminino reduzido, que é diploide porque procede da meiose de células tetraploides, por um gameta masculino haploide. O procedimento tem a vantagem teórica de poder usar um grande número de parentais masculinos com elevada eficácia. O problema é que não existiam tangerinas monoembriônicas para poder usar esse tipo de cruzamento.

Segundo Mourão Filho et al. (1996), a laranja 'Succari', uma cultivar vigorosa, precoce, de frutos com boa coloração e apresentando uma relação açúcar:acidez de 90-100:1, sendo empregada em cruzamentos interploides, pode aumentar a porcentagem da progênie zigótica triploide, apresentando frutos com taxas aceitáveis de açúcar:acidez. Entretanto, até pouco tempo atrás, havia três importantes limitações para produzir elevadas populações de híbridos triploides, conforme Navarro et al. (2005a), Olivares (1998) e Soost e Roose (1996):

- A baixa incidência de sementes viáveis, desde que os embriões triploides são encontrados normalmente em sementes pequenas, parcialmente abortadas, que raramente germinam, inclusive nas melhores condições de casa de vegetação.
- A carência de genótipos tetraploides de qualidade que pudessem ser usados nas hibridações interploides.
- E, finalmente, a análise do nível de ploidia de plantas de citros por métodos histológicos clássicos, que é extremamente lenta e pouco eficaz, razão pela qual não pode ser aplicada a grandes populações.

Atualmente, segundo esses autores, tais problemas podem ser solucionados por biotecnologias baseadas no cultivo *in vitro* e na análise de ploidia mediante citometria de fluxo. No primeiro caso, a biotecnologia oferece a possibilidade de recuperar os indivíduos triploides mediante o resgate e cultivo *in vitro* dos pequenos embriões em um meio de germinação, produzindo plantas que são recultivadas em um meio de alongamento até que alcancem o tamanho adequado para seu transplante à casa de vegetação.

A escassez de parentais tetraploides de qualidade (POVEDANO et al., 2012) é um problema mais difícil de resolver. A grande maioria dos parentais tetraploides surgiu de forma natural e são plantas autotetraploides de origem nucelar. Entretanto, a biotecnologia proporciona o emprego da hibridação somática como alternativa de produção de progenitores tetraploides (SORIANO, 2010).

Já o problema da análise da ploidia, para determinar se as plantas obtidas são realmente triploides, tem sido solucionado mediante a utilização da citometria de fluxo. Essa tecnologia permite determinar, de forma muito confiável, o número de cromossomos de uma planta em apenas dez minutos, ao contrário de aproximadamente duas horas que se necessita para realizar a análise mediante as técnicas histológicas clássicas, que, além disso, geram, em muitos casos, resultados duvidosos.

Outra opção de produção de triploides é por meio da fusão de protoplastos diploides com protoplastos gaméticos haploides, isolados de tétrades de genótipos selecionados por suas características complementares. Por exemplo, a fusão de protoplastos embriogênicos de tangerineira ‘Dancy’, cujos frutos são fáceis de descascar, porém apresentam muitas sementes, com protoplastos gaméticos haploides de alguma cultivar de pomeleiro, poderia levar ao desenvolvimento de tangelos triploides sem sementes (JIMÉNEZ, 1996).

Esse método, apresentando êxito, teria duas vantagens sobre a via anterior de se obter triploides a partir de cruzamentos sexuais entre tetraploides e diploides. A primeira seria a redução do tempo necessário para produzir os triploides, haja vista que o período para a obtenção de um triploide desde a polinização até o transplante para casa de vegetação é de um ano, necessitando-se de mais quase um ano até que as pequenas plantas cresçam o suficiente para obter gemas e possam ser propagadas e avaliadas (NAVARRO et al., 2005a). A segunda é que o emprego de um

genoma diploide intacto, sem sofrer recombinação nem segregação, poderia manter ocultos certos caracteres recessivos deletérios na progênie resultante.

Uma quarta via de obtenção de triploides seria pela manipulação cromossômica das plantas por tratamentos *in vitro*, conforme Muñoz (1995).

## Hibridação somática

Apesar da grande variabilidade genética entre os citros e outros gêneros da família Rutaceae, o melhoramento genético tradicional tem apresentado limitações à obtenção de novas variedades porta-enxerto e copa, sendo que as variedades exploradas pela citricultura mundial, neste último século, foram originadas a partir de seleções naturais e mutações, de acordo com Soost e Cameron (1975).

Já foram efetuados grandes esforços para estabelecer métodos e condições culturais que permitam a regeneração de plantas em cultivos *in vitro* (FINER, 1994). As células e os tecidos vegetais, isolados de qualquer parte de uma planta, podem ser cultivados *in vitro* para dar lugar à formação de calos e/ou à regeneração de novas plantas (BATES, 1992). Um dos aspectos mais importantes no cultivo *in vitro* é que a totipotência se mantém, mesmo sendo as células separadas daquelas adjacentes e inclusive desprovidas da parede celular. Na realidade, podem ser regeneradas plantas a partir de protoplastos, células que, por um processo enzimático, tiveram eliminada a parede celular. A totipotência dos protoplastos permite abordar certos tipos de manipulações genéticas que não são possíveis em células protegidas pela parede celular.

Os sistemas de cultivo de protoplastos propiciam uma oportunidade ímpar para a manipulação genética de importantes cultivos agrícolas, entre os quais espécies arbóreas como os citros (HIDAKA; KAJIURA, 1988). A tecnologia de protoplastos proporciona novos procedimentos de modificação genética, constituindo-se num pré-requisito para o emprego de técnicas como a hibridação somática (MOURÃO FILHO; MENDES, 2000) e a transformação de plantas (STARRANTINO et al., 1992). Dessa forma, torna-se uma ferramenta complementar em apoio aos programas de melhoramento clássico dos *Citrus* (KOBAYASHI, 1987; KOBAYASHI et al., 1985; MOURÃO FILHO, 1996; SIM et al., 1988).

Utilizada pela primeira vez em tomate, a cultura de protoplastos vem sendo aplicada em *Citrus* desde a década de 1970 (KOCHBA et al., 1972), tornando-se especialmente interessante para o melhoramento genético do gênero em virtude de problemas como esterilidade, poliembrião nucelar, elevada heterozigotidade, depressão por endogamia, apomixia, autoincompatibilidade, interincompatibilidade, longa fase juvenil e baixa produção de sementes (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990a; MOURÃO FILHO, 1996; MOURÃO FILHO et al., 1996), que acabam limitando os cruzamentos entre as diversas espécies (KOBAYASHI et al., 1991) e cultivares cítricas (SAITO et al., 1994).

Durante as duas últimas décadas, considerável progresso foi conseguido na produção de híbridos somáticos intra e intergenéricos em importantes espécies cultivadas (LING; IWAMASA,

1994). Nos citros, a hibridação somática, via técnicas de fusão de protoplastos, pode ter aplicações hortícolas de grande importância, tanto para o melhoramento de variedades de porta-enxertos como de copas (JIMÉNEZ, 1996; OLIVARES, 1998; SOARES FILHO et al., 1997), visando, entre outros aspectos, à obtenção de plantas de menor tamanho e de frutos sem sementes, respectivamente (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 2005).

A disponibilidade de sistemas eficientes para regenerar plantas, a partir do cultivo e da fusão de protoplastos, dá suporte à obtenção de novos genótipos de *Citrus*, com a criação de híbridos somáticos (LING et al., 1989) inter e intraespecíficos (SPIEGEL-ROY; KOCHBA, 1980), intergenéricos (CRISTOFANI, 1991) ou cíbridos (VARDI; GALUN, 1988). Dessa forma, a fusão de protoplastos tem grande potencial para superar algumas dificuldades enfrentadas pelo melhoramento genético, tais como incompatibilidades existentes, e assim criar novas combinações genéticas. No entanto, a exemplo do que ocorre no sistema isolamento de protoplastos – regeneração de plantas, também nos estudos relacionados com a hibridação somática deve-se levar em consideração uma série de passos, de forma a obter êxito no processo de fusão.

É interessante deixar claro que todo e qualquer trabalho visando à obtenção de híbridos somáticos deve ser conduzido em apoio e integração a programas convencionais de melhoramento, ajudando a superar as barreiras e limitações que apresentam (JIMÉNEZ, 1996; JUMIN; NITO, 1996; LOUZADA; GROSSER, 1994). Esses programas devem ser ainda orientados no sentido de aproveitar a grande variabilidade genética disponível para a produção de novas variedades (MOURÃO FILHO, 1996), apesar das diferenças no nível de ploidia e na imprevisível fertilidade de híbridos resultantes de parentais mais distanciados (SOOST; ROOSE, 1996).

Para iniciar um programa de melhoramento de citros mediante fusão de protoplastos, é imprescindível dispor dos seguintes requisitos prévios (OLIVARES, 1998; ZANOL et al., 1998):

- Espécies que possuam as características agrônômicas de interesse para os objetivos a serem alcançados.
- Calos nucleares ou suspensões celulares embriogênicas de pelo menos um dos parentais que se deseja fusionar.
- Plântulas do outro parental cultivadas in vitro.
- Métodos eficazes para o isolamento de protoplastos de qualidade a partir de calos embriogênicos e folhas.
- Protocolos de regeneração a partir de protoplastos oriundos de calos embriogênicos de tais espécies de interesse.
- Protocolos de fusão de protoplastos adaptados às condições do trabalho e às espécies vegetais a serem empregadas, e que apresentem uma elevada frequência de formação de heterocários viáveis.

- Protocolos que possibilitem a regeneração de híbridos somáticos desde esses protoplastos fusionados.
- Métodos de identificação dos híbridos somáticos.

Em relação ao genótipo, diversas espécies e cultivares de citros têm sido estudadas dentro do sistema de protoplastos, ajustando-as aos objetivos particulares de cada programa de melhoramento. Shinozaki et al. (1992), por exemplo, fusionaram protoplastos de calos embriogênicos de laranja 'Trovia' com protoplastos de folhas de *Murraya paniculata* (L.) Jack, uma espécie selvagem remota de *Citrus*, que cresce bem em solos alcalinos e apresenta resistência a nematoides. Essa espécie tem também valor ornamental, em razão de suas grandes e fragantes flores brancas e seus pequenos e bonitos frutos vermelhos.

A estratégia adotada por Louzada et al. (1992) objetivou associar resistência para doenças e pragas a características hortícolas de porta-enxertos adaptados a várias condições ambientais da Flórida, tais como:

- Limoeiros 'Rugoso', 'Volkameriano' (*C. volkameriana* V. Ten. & Pasq.) e 'Cravo' têm sido empregados como porta-enxertos porque são vigorosos, de alto rendimento e tolerantes à tristeza e seca. Entretanto, são altamente suscetíveis ao declínio-dos-citros.
- Tangerineira 'Cleópatra' tem-se constituído num importante porta-enxerto por ser menos suscetível ao declínio que os porta-enxertos citados anteriormente, além de tolerante à tristeza e ao frio.
- Laranjeiras 'Hamlin' e 'Valência' são tolerantes ao declínio-dos-citros, contudo não são usadas como porta-enxertos por causa da suscetibilidade à gomose causada por *Phytophthora*.
- A hibridação somática de tangerineira 'Cleópatra' com os limoeiros 'Rugoso', 'Volkameriano' e 'Cravo', de laranja 'Hamlin' com limoeiro 'Cravo' e de laranja 'Valência' com citrange 'Carrizo' tem buscado gerar porta-enxertos vigorosos e produtivos, com características culturais aceitáveis, porém tolerantes ao declínio.
- Laranja 'Azeda', antigamente o mais importante porta-enxerto em muitas regiões citrícolas do mundo, é ainda de grande importância em algumas áreas por causa do potencial de produção, qualidade do fruto, ampla adaptabilidade a diferentes tipos de solos e tolerância ao frio, à gomose-de-*Phytophthora* e ao declínio; no entanto, sua extrema suscetibilidade ao declínio induzido pela tristeza, quando enxertada com laranja doce ou pomeleiro, tem reduzido drasticamente ou até mesmo eliminado seu uso na maioria das regiões citrícolas, incluindo a Flórida e o Brasil.
- As hibridações somáticas de laranja 'Azeda' com tangerineira 'Cleópatra' e limoeiro 'Volkameriano' (tolerantes à tristeza), e *Smooth Flat Seville* (híbrido de *C. aurantium*) com

limoeiro 'Rugoso' (também tolerante à tristeza), têm tentado gerar porta-enxertos tipo laranja 'Azeda', que sejam tolerantes ao vírus-da-tristeza e ao declínio-dos-citros.

Por sua vez, Deng et al. (1992) buscaram a produção de híbridos somáticos entre os gêneros *Fortunella* e *Citrus* que apresentassem algum valor para o melhoramento genético, tanto de copa como porta-enxerto, especialmente em respeito à tolerância ao frio e potencialmente capazes de apresentar menor altura de copa.

Algumas estratégias também foram empregadas por Grosser et al. (1994) para produzirem híbridos somáticos:

- Previamente foram conseguidas plantas híbridas somáticas, combinando tangerineira 'Cleópatra' ou laranja 'Hamlin' com 'Flying Dragon'. O controle genético do nanismo proporcionado pelo 'Flying Dragon' parece ser completamente dominante, desde que os porta-enxertos desses dois híbridos somáticos produziram árvores enxertadas de tamanho semelhante ao 'Flying Dragon', com excelente tolerância ao frio, resistência a doenças e maior produtividade.
- Como as árvores nesses porta-enxertos podem ser muito pequenas para alguns sistemas de produção de citros, foram produzidos híbridos semelhantes empregando-se o tipo não ananizado de laranja trifoliada 'Argentina' (*P. trifoliata*), com o intuito de recuperar porta-enxertos híbridos somáticos que produzissem árvores de tamanho médio.
- A combinação com a laranja 'Succari' foi usada porque esta produz frutos com sementes e pode aumentar a probabilidade de que o correspondente porta-enxerto híbrido somático possa, subsequentemente, ser propagado por sementes.
- A laranja 'Azeda' foi combinada com 'Flying Dragon' numa tentativa para produzir um porta-enxerto híbrido ananizado trifoliado, com potencial de apresentar um melhor comportamento quando cultivado em terras calcárias, com alto pH (uma característica da laranja 'Azeda').
- Finalmente, o híbrido somático limoeiro 'Milam' (suposto híbrido sexual de *C. jambhiri* Lush. x *C. sinensis*) (+) tangerineira 'Sun Chu Sha' (*C. reticulata*) foi produzido em uma tentativa para combinar o vigor e a resistência ao nematoide cavernícola (*Radophilus citrophilus* Huettel, Dickson & Kaplan) do limoeiro (CASTLE, 1987), com a resistência ao frio, declínio-dos-citros, declínio induzido pela tristeza e doenças causadas por *Phytophthora*, propiciada pela tangerineira 'Sun Chu Sha'.

Diversos são os explantes utilizados como fonte para o isolamento de protoplastos a serem empregados nos estudos envolvendo a hibridação somática. Dependendo do genótipo e do objetivo do trabalho, protoplastos têm sido isolados desde calos embriogênicos derivados de explantes primários como hipocótilos (LING et al., 1990), óvulos (GROSSER et al., 1992; MOURÃO FILHO et al., 1996; TUSA et al., 1992), nucelos (LOUZADA et al., 1992; OLIVARES, 1998) e grãos de pólen

(SHINOZAKI et al., 1992), bem como de suspensões celulares (DENG et al., 1992; GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990a; STARRANTINO et al., 1992) e calos friáveis (GROSSER et al., 1992).

Dentro dos esquemas adotados para a seleção de híbridos somáticos, esses protoplastos têm sido fusionados com protoplastos isolados de folhas (GROSSER et al., 1992; JUMIN; NITO, 1996; LOUZADA et al., 1992; MIRANDA et al., 1997; SHINOZAKI et al., 1992; SOOST; ROOSE, 1996; STARRANTINO et al., 1992), extraídas de plântulas (DENG et al., 1992; GROSSER et al., 1992; TUSA et al., 1992) cultivadas em câmara de crescimento (MOURÃO FILHO et al., 1996) ou sob condições asépticas in vitro (Figura 7). A fusão de protoplastos derivados de calos ou suspensões celulares com protoplastos isolados de folhas facilita as determinações das frequências de fusão (GROSSER, 1994), haja vista que estes não podem ressintetizar a parede celular ou iniciar mitose em meio sem reguladores de crescimento (JIMÉNEZ, 1996), não permitindo, portanto, a regeneração de plantas (OLIVARES, 1998).

A hibridação somática baseia-se na fusão de duas células desprovidas de parede celular, os protoplastos, em uma só. Para tanto, são empregados métodos mecânicos, físicos, químicos ou elétricos, que possibilitam a fusão das membranas plasmáticas e, assim, a união de seus citoplasmas e núcleos (OLIVARES, 1998). Esse processo difere dos cruzamentos sexuais convencionais, em que apenas a planta-mãe contribui com o citoplasma (SWAMINATHAN, 1984). A ausência da parede celular permite que dois ou mais protoplastos entrem em um estreito contato e, sob certas condições, fiquem aderidos entre si. Com um estímulo apropriado pode-se provocar que ambas as células se fusionem em apenas uma.

Apesar de que, eventos de fusão possam ocorrer de forma espontânea em uma suspensão de protoplastos, essa taxa é extremamente baixa e, em consequência, de pouca aplicação prática. Diante disso, já foram desenvolvidos vários procedimentos para aumentar a eficiência do processo de fusão (JIMÉNEZ, 1996). Os métodos tradicionalmente empregados para induzir a fusão de protoplastos vegetais baseiam-se nas propriedades de certos agentes químicos ou condições físicas, para variar o potencial de membrana das células (OLIVARES, 1998). Aqueles que têm tido maior aceitação são a fusão mediada por PEG (polietileno glicol) e pela aplicação de corrente elétrica (eletrofusão). Entre os dois sistemas, a estratégia mais comumente empregada para a hibridação somática envolve a fusão induzida pelo PEG (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990b; GROSSER et al., 1992, 1994; LOUZADA et al., 1992; MOURÃO FILHO et al., 1996; SOOST; ROOSE, 1996; TUSA et al., 1992).



Foto: Antônio da Silva Souza

Figura 7. Plântulas de limoeiro 'Cravo' clone Santa Cruz para extração de protoplastos de folhas.

De acordo com Grosser e Gmitter Junior (1990a), a fusão via PEG é recomendável pela sua simplicidade, sua eficiência, seu custo barato e supostamente parece não interferir na viabilidade dos protoplastos. Deve-se ajustar a duração de exposição às soluções do PEG e de eluição para alcançar um equilíbrio entre frequência de fusão e viabilidade de protoplastos após o evento; os genótipos que liberam protoplastos mais frágeis requerem períodos de exposição mais curtos. Além disso, é interessante monitorar o pH das soluções de PEG preparadas semanalmente, porque elas acidificam rapidamente (GROSSER, 1994). Historicamente têm sido empregados PEG's de pesos moleculares 1.500, 6.000 e 8.000, sendo esses dois últimos os mais usados (DENG et al., 1992; GROSSER, 1994; GROSSER et al., 1992; LOUZADA; GROSSER, 1994).

Já a eletrofusão (LING; IWAMASA, 1994; SHINOZAKI et al., 1992), um método muito mais fácil de manipulação que o PEG (HIDAKA, 1995), baseia-se na utilização de uma fonte elétrica que proporciona tanto corrente alternada como pulsos de corrente contínua. O método consiste em ressuspender os protoplastos em um meio de baixa condutividade. Situados entre os eletrodos da câmara de fusão, os protoplastos são então submetidos à ação de um campo elétrico de corrente alternada de elevada intensidade, no qual se movem por dieletroforese até ficarem uns juntos aos outros em linha, formando verdadeiras cadeias. Em seguida, a aplicação de um pulso curto de corrente contínua dá lugar à formação de poros reversíveis nos pontos de contato das membranas plasmáticas das células, possibilitando, assim, sua fusão (OLIVARES, 1998). No entanto, para Starrantino et al. (1992) e Olivares-Fuster et al. (2005), a combinação dessas técnicas possibilitará novas oportunidades para o melhoramento dos citros pela extensão da variabilidade genética, porém com um melhor controle em nível celular.

Alguns aspectos devem ser considerados, de modo a maximizar a frequência de fusão. Densidades mais elevadas de protoplastos, por exemplo, podem reduzir a frequência de fusão e, inclusive, interferir no posterior cultivo dos produtos fusionados. Outro ponto é o tamanho dos protoplastos, haja vista que os menores fusionam a frequências mais baixas que aqueles maiores (GROSSER, 1994). Aliás, em virtude dessa diferença, é interessante misturar volumes iguais de protoplastos, em vez de considerar densidades iguais (LOUZADA; GROSSER, 1994). A frequência de fusão varia também em função do método adotado. Mediante a utilização do PEG, a frequência de formação de heterocários é geralmente baixa, na faixa de 1% a 10% (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990b). Por outro lado, Shinozaki et al. (1992) obtiveram uma frequência de 15% de heterocários, ao fusionarem eletricamente protoplastos de laranja 'Trovia' com protoplastos de *Murraya paniculata*.

A chave para um programa de melhoramento com êxito de hibridação somática reside na aplicação de um esquema de seleção muito eficiente, que permita identificar e selecionar os híbridos (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990b; JIMÉNEZ, 1996). Em relação a outros importantes grupos de plantas, os esquemas de seleção dos híbridos somáticos em citros são simples e eficientes. Em geral, protoplastos de apenas um parental são isolados a partir de tecidos derivados de nucelos, os quais têm a capacidade de sofrer embriogênese somática. Os protoplastos do segundo parental são isolados a partir de tecidos não embriogênicos, normalmente de folhas ou calos de *seedlings*, nos quais falta a capacidade de regeneração em meio de cultura sem reguladores de crescimento (GROSSER; GMITTER

JUNIOR, 1990a). De acordo com Olivares (1998), a seleção de híbridos somáticos em nível celular é muito complicada se não existem marcadores (colorimétricos, mutantes, etc.) que, inclusive, não são fáceis de serem obtidos em plantas lenhosas. Assim, dispor de um parental sem capacidade de regeneração dentro do esquema de cultivo empregado simplifica a seleção dos híbridos, pois esta se faria unicamente entre heterocários, os homocários do parental embriogênico e seus protoplastos não fusionados, sendo esse o esquema empregado nas fusões de citros realizadas com êxito até o momento.

Para Grosser (1994), esquemas sofisticados de seleção de híbridos somáticos têm sido superenfaturados, muitas vezes em detrimento dos gastos com a regeneração de plantas. O uso de inibidores metabólicos, irradiação, mutantes deficientes, protoplastos marcados, citometria de fluxo ou micromanipulação pode ser evitado com o estabelecimento de um eficiente sistema de fusão de protoplastos e regeneração de plantas. Também Grosser e Gmitter Junior (1990c) entendem que esquemas de seleção mais sofisticados não são necessários porque as plantas híbridas somáticas de citros podem ser facilmente distinguidas dos parentais diploides.

De qualquer modo, o certo é que existe uma série de técnicas que vem sendo utilizada para verificar a condição híbrida de cada uma das plantas obtidas (JIMÉNEZ, 1996), as quais serão a seguir enfocadas. Segundo Olivares (1998), no processo de caracterização dos híbridos somáticos, ainda que se disponha de um esquema de seleção que favoreça a regeneração dos produtos híbridos, torna-se necessário verificar o caráter híbrido das plantas obtidas. As características que se esperam nos híbridos somáticos incluem uma morfologia vegetativa intermediária à dos dois parentais, um número aditivo de cromossomos tetraploides e uma complementação em nível de marcadores genéticos. Entretanto, nenhum dos métodos empregados isoladamente proporciona uma confirmação suficiente do estado híbrido. Cada um tem suas limitações e pode dar resultados positivos para situações outras que não a hibridação somática (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990a).

Todos os híbridos somáticos de citros têm sido caracterizados mediante análises morfológicas, contagem de cromossomos, eletroforese de isoenzimas, cromatografia de óleo, padrões de DNA ribossômico, microssatélites, Rapd (*Randomly Amplified Polymorphic DNA* = DNA polimórfico amplificado) e citometria de fluxo, sendo os três primeiros procedimentos os mais amplamente empregados (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990b, 1990c; GROSSER et al., 1992, 1994; GUO et al., 2007; LOUZADA et al., 1992; MOURÃO FILHO, 1996; MOURÃO FILHO et al., 1996; SOOST; ROOSE, 1996; TUSA et al., 1992; VARDI; GALUN, 1988). Grosser et al. (1992), por exemplo, recuperaram 99 e 222 plantas, respectivamente de fusão entre tangelo 'Nova' (um híbrido sexual de tangerineira 'Clementina' x tangelo 'Orlando') (+) laranja 'Succari', e laranja 'Hamlin' (+) tangerineira 'Dancy'. Três plantas de cada grupo exibiram uma morfologia tetraploide típica, o que foi confirmado pela contagem de cromossomos ( $2n = 4x = 36$ ). Dessas, uma planta de laranja 'Hamlin' (+) tangerineira 'Dancy' e duas de tangelo 'Nova' (+) laranja 'Succari' foram identificadas como híbridos somáticos com base em análises de isoenzimas de folhas.

Segundo Jiménez (1996), numa avaliação morfológica, diferenças que existem entre *Citrus* e os gêneros relacionados facilitam a identificação dos híbridos somáticos. Caracteres sob o controle de genes dominantes ou codominantes identificam-se geralmente com facilidade nos híbridos somáticos, particularmente quando são utilizados parentais de pouca relação filogenética. As plantas híbridas podem ser identificadas pela expressão de qualquer caráter do progenitor não embriogênico, a exemplo da expressão da folha trifoliada de *Poncirus* (GROSSER et al., 1988b; OHGAWARA et al., 1985), pigmentos vermelhos de *Severinia disticha* (Blanco) Swingle (GROSSER et al., 1988a), folha pentafoliada de *Citropsis* [(Engl.) Swingle & M. Kellerm.] (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990b) e também características menos proeminentes, como o tamanho da ala no pecíolo, a forma e a grossura da folha (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990a), que geralmente são intermediárias as dos progenitores.

Mourão Filho (1996) comparou a morfologia e espessura foliares das possíveis plantas híbridas com as das espécies/variedades parentais da fusão. Os híbridos somáticos apresentaram morfologia foliar intermediária entre seus parentais e espessura foliar relativamente maior em virtude do caráter tetraploide. É interessante voltar a salientar que utilizar caracteres morfológicos como único método não é correto, pois já se encontrou, por exemplo, morfologia intermediária nos regenerantes originados por fusão de protoplastos, porém com eliminação de certa quantidade de material cromossômico (pré ou pós-fusão). Essas plantas não possuem toda a informação genética que deve incluir os verdadeiros híbridos somáticos tetraploides (JIMÉNEZ, 1996).

Com relação à determinação do número de cromossomos, os experimentos de fusão somática nos citros geralmente são orientados para a obtenção de heterocários, células tetraploides que possuem genomas completos de ambos os progenitores. No entanto, apenas a avaliação de possíveis híbridos mediante contagem de cromossomos é pouco confiável, desde que os regenerantes homocários (dois jogos completos de cromossomos do mesmo progenitor) também possuem um número tetraploide de cromossomos e poderiam ser confundidos com híbridos heterocários (JIMÉNEZ, 1996). A confirmação do número de cromossomos em produtos de fusão foi realizada por Mourão Filho (1996) e Olivares (1998) com base em protocolo estabelecido por Grosser e Gmitter Junior (1990a), usando pontas de raízes em crescimento. Apesar de outros autores também utilizarem células de ápices de raízes (LOUZADA et al., 1992; TUSA et al., 1992), folhas meristemáticas jovens também podem ser empregadas na determinação do número de cromossomos em hibridações somáticas envolvendo os citros (DENG et al., 1992).

Os sistemas isoenzimáticos mais úteis para a verificação de híbridos somáticos são aqueles de controle genético mais simples e com a maior disparidade de alelos entre os progenitores (cada progenitor deve ter pelo menos um alelo distinto do outro), conforme Jiménez (1996). Em citros, híbridos somáticos têm sido identificados com base em alguns padrões isoenzimáticos de folhas, notadamente PER (DENG et al., 1992; GROSSER et al., 1992, 1994; LOUZADA et al., 1992; MOURÃO FILHO et al., 1996), fosfoglucose isomerase (PGI) (GROSSER et al., 1992, 1994; LOUZADA et al., 1992; MOURÃO FILHO et al., 1996; TUSA et al., 1992), fosfoglucose mutase (PGM) (GROSSER; GMITTER

JUNIOR, 1990b; GROSSER et al., 1992, 1994; LOUZADA et al., 1992; MOURÃO FILHO et al., 1996; STARRANTINO et al., 1992; TUSA et al., 1992), glucose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH) (TUSA et al., 1992), fosfohexose-isomerase (PHI) (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990b; STARRANTINO et al., 1992), malato-desidrogenase (MDH) (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990b; STARRANTINO et al., 1992), GOT e isocitrato-desidrogenase (IDH) (STARRANTINO et al., 1992). No entanto, a análise de isoenzimas em *Citrus* apresenta algumas desvantagens em razão, fundamentalmente, de seu baixo nível de polimorfismo, pois o número de alelos para os sistemas isoenzimáticos normalmente empregados é bastante limitado, e muitos híbridos intraespecíficos e alguns interespecíficos não podem ser distinguidos, sem dúvidas, dos parentais (OLIVARES, 1998).

É interessante ainda considerar que, se num evento de fusão de protoplastos perde-se o núcleo de um dos progenitores e permanecem as organelas do outro progenitor ou de ambos, formam-se os cíbridos, os quais têm sido produzidos entre o gênero *Citrus* e aqueles afins. A produção de cíbridos, envolvendo os *Citrus* (GUO et al., 2006), é uma linha de pesquisa que poderá gerar importantes informações relacionadas com a identificação, herança e transferência de importantes características que são codificadas no DNA dos cloroplastos (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990a), estimulando sua aplicação prática em programas de melhoramento e posterior manipulação celular (SAITO et al., 1994). Para Soares Filho et al. (1997), a produção de cíbridos pode ter um impacto direto no melhoramento dos citros, desde que características como resistência a patógenos e herbicidas, e macho esterilidade citoplasmática, podem ser controladas pelos genes de organelas presentes no citoplasma.

Nos últimos seis anos, trabalhos de hibridação somática de citros também foram iniciados no Brasil, pela Universidade de São Paulo, em Piracicaba. Experimentos para indução de calos embriogênicos e isolamento de protoplastos (BENEDITO et al., 2000; COSTA et al., 2002; MENDES-DA-GLÓRIA et al., 2000b) e estudos complementares para investigação do processo de regeneração de plantas por embriogênese somática foram realizados (RICCI et al., 2002; TOMAZ et al., 2001), levando à regeneração e confirmação de híbridos somáticos de citros. As combinações produzidas foram: laranja 'Caipira' (*C. sinensis* + limoeiro 'Cravo', laranja 'Caipira' + tangerineira 'Cleópatra', laranja 'Caipira' + limoeiro 'Volkameriano', laranja 'Caipira' + limoeiro 'Rugoso da Flórida', tangerineira 'Cleópatra' + limoeiro 'Volkameriano', tangerineira 'Cleópatra' + laranja 'Azeda', limoeiro 'Cravo' + laranja 'Azeda', limoeiro 'Cravo' + tangerineira 'Sunki' [*C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka], laranja 'Ruby Blood' + limoeiro 'Volkameriano', laranja 'Valência Rohde Red' + limoeiro 'Volkameriano', laranja 'Valência' + *Fortunella* sp. (COSTA, 2001; MENDES et al., 2001; MENDES-DA-GLÓRIA et al., 2000a). Os híbridos somáticos produzidos apresentam potencial tolerância a CTV e ao declínio e encontram-se em avaliação no campo.

## Transformação genética

A incorporação de caracteres específicos de interesse agrônômico, codificados por um ou poucos genes, em genótipos elite, sem alterar o resto de suas características, é muito difícil de conseguir, mediante os métodos convencionais de melhoramento genético, particularmente em espécies lenhosas altamente heterozigotas, como os citros. Considerando esses aspectos, a tecnologia de transformação genética apresenta um grande potencial no melhoramento de citros. Por meio da engenharia genética e tecnologia de DNA recombinante, a transformação genética de plantas possibilita que uma única característica, como resistência a determinada doença, possa ser incorporada em uma variedade suscetível, conferindo-lhe resistência, sem alterar suas qualidades essenciais de clone.

Os métodos empregados para a transferência de genes, com a produção de plantas transgênicas, são divididos em duas amplas categorias: transferência indireta, utilizando vetores, e transferência direta. A transferência indireta de genes é mediada pela bactéria *A. tumefaciens*. Entretanto, pela limitada amplitude de hospedeiros de *Agrobacterium*, técnicas de transferência direta têm sido desenvolvidas, a exemplo da introdução de DNA em protoplastos via tratamentos químicos ou pulsos elétricos (KOBAYASHI; UCHIMIYA, 1989). Outra técnica atualmente bastante utilizada é a da transformação mediante bombardeamento de partículas ou biobalística, em que sequências de DNA são introduzidas diretamente nas células e nos tecidos com o auxílio de microprojéteis. Tais projéteis, de ouro ou tungstênio, carregando o DNA precipitado sobre sua superfície, são literalmente disparados para dentro do material alvo, que pode compreender tecidos intactos, embriões, embriões somáticos, ápices meristemáticos, entre outros. Comparado com outras técnicas de transformação, o bombardeamento de partículas apresenta algumas características interessantes: a) é capaz de transformar qualquer tipo de tecido; b) não requer métodos de cultura de tecidos complicados para a regeneração de plantas, como nos protocolos de regeneração de protoplastos; e c) supera o problema da especificidade genotípica comum aos métodos que utilizam *Agrobacterium*.

Em citros, os primeiros trabalhos que tiveram sucesso na obtenção de plantas transformadas utilizaram protoplastos e células em suspensão. Vardi et al. (1990) trataram protoplastos de limoeiro 'Rugoso' com PEG e um plasmídeo contendo um gene marcador, e obtiveram duas plantas transformadas. Hidaka et al. (1990) conseguiram uma planta transformada de laranja 'Washington Navel' a partir de cultura de células em suspensão cocultivadas com *Agrobacterium*. Em trabalho utilizando transferência por bombardeamento de partículas, Yao et al. (1996) transformaram tecido embriogênico de tangelo (*C. reticulata* x *C. paradisi*), produzindo 15 linhagens de embriões; entretanto, nenhuma planta completa foi obtida.

Dentre as diferentes técnicas de transformação genética que têm sido relatadas em citros, com maior ou menor grau de eficiência, certamente a transformação mediada por *Agrobacterium* é a que, até o momento, tem apresentado os resultados mais satisfatórios (Tabela 1). Embora o número de trabalhos seja considerável, apenas recentemente pesquisas com genes de interesse agrônômico foram desenvolvidas com sucesso (GUTIÉRREZ et al., 1997; KOBAYASHI et al., 2001; PEÑA et al., 2001).

**Tabela 1.** Breve descrição de alguns dos principais estudos conduzidos em transformação genética de citros.

<b>Genótipo</b>	<b>Material vegetal</b>	<b>Método de transformação</b>	<b>Resultado obtido</b>	<b>Referência</b>
Limoeiro 'Rugoso'	Protoplastos	PEG	Duas plantas transgênicas	Vardi et al. (1990)
Laranja 'Washington Navel'	Células em suspensão	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Uma planta transgênica	Hidaka et al. (1990)
Citrange 'Carrizo'	Segmentos de epicótilo	<i>A. tumefaciens</i>	Duas plantas transgênicas	Moore et al. (1992)
<i>Poncirus trifoliata</i>	Segmentos de epicótilo	<i>A. tumefaciens</i>	Sistema eficiente de obtenção de plantas transgênicas	Kaneyoshi et al. (1994)
Tangelo 'Page' ( <i>C. paradisi</i> Macf. × <i>C. reticulata</i> Blanco)	Tecido embriogênico	Biobalística	Quinze linhagens de embriões; nenhuma planta inteira	Yao et al. (1996)
Citrangeiro 'Carrizo'	Segmentos de epicótilo	<i>A. tumefaciens</i>	Sistema eficiente de obtenção de plantas transgênicas	Peña et al. (1995b)
Laranja 'Pineapple'	Segmentos internodais	<i>A. tumefaciens</i>	Sistema eficiente de obtenção de plantas transgênicas	Peña et al. (1995a)
<i>P. trifoliata</i>	Segmentos de epicótilo	<i>A. tumefaciens</i>	Introdução do gene hEGF <sup>(1)</sup> e eficiente obtenção de plantas transgênicas	Kobayashi et al. (1996)
Citrange 'Carrizo', laranja 'Azeda' e limeira	Segmentos de epicótilo	<i>A. tumefaciens</i>	Introdução do gene CTV/CP <sup>(2)</sup> e obtenção de duas plantas transgênicas de laranja, nove de limeira e nove de citrangeiro	Gutiérrez et al. (1997)
Laranja 'Pineapple'	Segmentos internodais	<i>A. tumefaciens</i>	Sistema eficiente de obtenção de plantas transgênicas maduras	Cervera et al. (1998)
Citrange	Segmentos de epicótilo	<i>A. tumefaciens</i>	Introdução dos genes LEAFY e APETALA <sup>(3)</sup> e obtenção de plantas transgênicas	Peña et al. (2001)
Laranja 'Pêra'	Segmentos internodais	<i>A. tumefaciens</i>	Introdução do gene STX <sup>(4)</sup> e eficiente obtenção de plantas transgênicas maduras	Kobayashi et al. (2001)

<sup>(1)</sup> hEGF - gene do fator de crescimento epidérmico humano; <sup>(2)</sup> CTV CP - gene da capa proteica do vírus-da-tristeza; <sup>(3)</sup> LEAFY e APETALA - genes de *Arabidopsis thaliana* relacionados com o florescimento; <sup>(4)</sup> STX - gene do peptídeo antibacteriano sarcotoxina 1A de *Sarcophaga peregrina*.

Até recentemente, o método mais utilizado na transgenia em citros era a transformação mediada por *Agrobacterium*, utilizando segmentos de epicótilo de 1 cm como explantes. Entretanto, a eficiência de transformação utilizando esse sistema de regeneração ainda é baixa. Isso se deve, principalmente, ao pequeno número de brotos obtidos por explante e ao grande número de escapes. Também, as plantas transgênicas obtidas por esse sistema são juvenis, sendo necessários vários anos para que se possam avaliar algumas de suas características comerciais (produtividade, qualidade de fruto, etc.). Visando contornar esse problema, Cervera et al. (1998) utilizaram internódios de plantas maduras de laranja 'Pineapple' como explantes para transformação, conseguindo que as plantas transgênicas florescessem após 14 meses.

A falta de técnicas adequadas de cultura de tecidos utilizando cultivares de laranja doce, adaptadas às nossas condições agroecológicas, tem dificultado o uso da tecnologia de transformação de plantas nessa cultura. Visando minimizar esse problema, novos protocolos de regeneração de laranja 'Pêra' foram desenvolvidos, usando segmentos, tanto de tecidos juvenis (BESPALHOK FILHO et al., 2001) quanto maduros (KOBAYASHI et al., 2001) (Figura 8).

## Considerações finais e perspectivas

O melhoramento genético dos citros, mediante hibridações controladas, tem sido dificultado por uma série de fatores, que limitam a obtenção de novas cultivares tipo copa, principalmente, e porta-enxerto. Fatores da biologia reprodutiva, como o longo período juvenil, apomixia, alto grau de heterozigotidade, dificuldade de reconhecimento e recuperação do indivíduo híbrido em espécies poliembriônicas, depressão por endogamia, incompatibilidades sexuais, esterilidade de grãos de pólen e óvulos, formação de copas grandes, seleção e propagação em larga escala de novos clones de porta-enxertos e baixa aplicação de programas de limpeza clonal de copas, são os principais obstáculos à transferência de genes dentro do *Citrus* e entre ele e os gêneros relacionados. O desenvolvimento de novas biotecnologias abre mais perspectivas para o melhoramento dos citros, haja vista que permite superar ou minimizar algumas das limitações descritas anteriormente.

Pelas informações apresentadas nesta revisão, pode-se perceber que alguns procedimentos biotecnológicos já estão devidamente estabelecidos e vêm sendo aplicados com muito sucesso no gênero *Citrus* como um todo, reduzindo os problemas enfrentados pelos métodos convencionais de melhoramento genético. Na área de cultura de tecidos, as técnicas vêm sendo aplicadas nos citros há quase meio século, desde os trabalhos pioneiros de Demetriades em 1954. Houve um incremento significativo de trabalhos na área de biotecnologia com o tempo (Figura 9). Esse aumento dos estudos ocorreu, principalmente, nas décadas de 1980 e 1990, quando foram desenvolvidos mais de 84% dos trabalhos em biotecnologia de citros.

Entre as técnicas de cultura de tecidos empregadas nos citros, pode-se observar que o cultivo de protoplastos tem sido o procedimento mais explorado (23%) pelas instituições (Figura 9), visando



**Figura 8.** Protocolo de regeneração de laranjeira 'Pêra' a partir de explantes maduros: plantas com ramos novos utilizados como fonte de explantes (A); gemas adventícias induzidas nos explantes (B); gema adventícia enxertada in vitro em porta-enxerto de citrange 'Carrizo' (C); planta enxertada pronta para aclimatização (D); plantas aclimatizadas em casa de vegetação (E); e planta regenerada em florescimento, após 12 meses do início da cultura (F).

notadamente à hibridação somática e à transformação genética de plantas. Vale destacar o grande avanço na utilização de procedimentos com marcadores moleculares (5%).

Algumas biotecnologias, entretanto, podem ser de grande utilidade nos próximos anos, para superar barreiras ainda existentes, e assim permitir avanços substanciais da citricultura num espaço de tempo bem mais curto, em associação com os métodos tradicionais. Pode-se destacar, por exemplo, na área de cultura de tecidos:

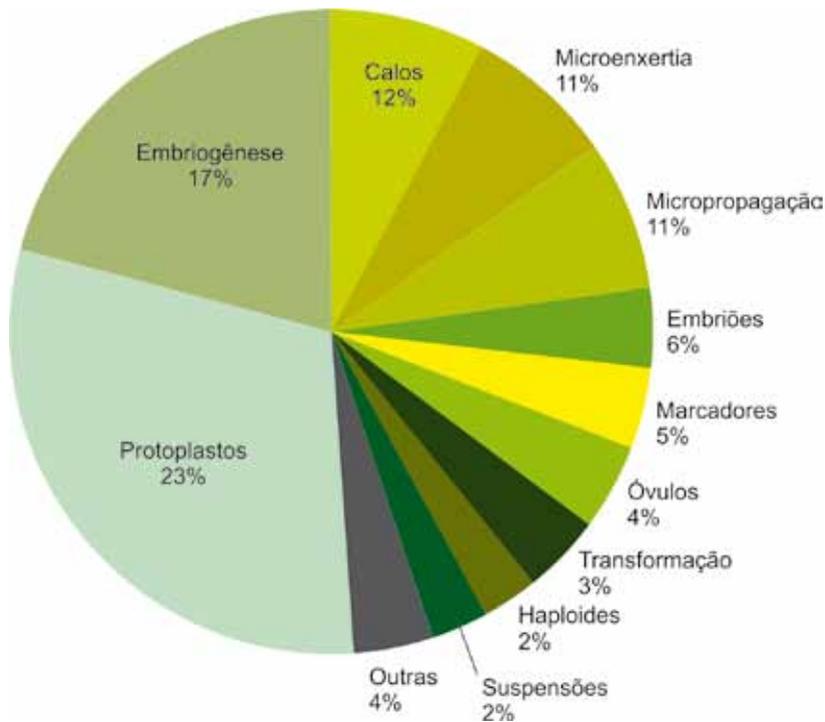


Figura 9. Biotécnicas e suas aplicações na citricultura.

- Necessidade de adequação de metodologias que permitam uma identificação mais ampla e segura de embriões híbridos.
- Isolamento desses embriões nos primeiros estádios de desenvolvimento e posterior complementação do processo de embrionia in vitro.
- Micropropagação mais eficiente, especialmente de porta-enxertos, mediante ápices caulinares.
- Obtenção de plantas haploides.
- Estabelecimento de métodos de seleção in vitro, associados ou não ao uso de produtos mutagênicos.
- Ajuste de condições para intercâmbio e conservação in vitro de germoplasma.
- Maior entendimento dos fatores envolvidos nas variações somaclonais.
- Exploração de produtos do metabolismo secundário.
- Regeneração de híbridos somáticos via fusão de protoplastos.
- Obtenção de triploides.
- Transformação genética de plantas mediante transferência direta de DNA por biolística ou eletroporação, ou, indiretamente, via *Agrobacterium*.

É importante salientar, uma vez mais, que a aplicação de técnicas de biotecnologia abre novas perspectivas para o melhoramento genético dos citros. Programas de melhoramento que envolvem tanto os enfoques clássicos como os novos procedimentos de biotecnologia vêm sendo executados com alta prioridade nos principais países produtores de citros do mundo, haja vista que essa associação oferece maiores e mais rápidas possibilidades de atingir os objetivos e as metas planejadas, que no final buscam sempre obter e colocar à disposição dos agricultores um produto de melhor qualidade.

## Referências

- AGISIMANTO, D.; NOOR, N. M.; IBRAHIM, R.; MOHAMAD, A. Efficient somatic embryo production of Limau madu (*Citrus suhuiensis* Hort. ex Tanaka) in liquid culture. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, KE, v. 11, n. 12, p. 2879-2888, 2011.
- AGRAWAL, R.; PATWARDHAN, M. V. Production of peroxidase enzyme by callus cultures of *Citrus aurantifolia* S. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, v. 61, n. 3, p. 377-378, 1993.
- ALEZA, P.; JUARÉZ, J.; OLLITRAULT, P.; NAVARRO, L. Polyembryony in non-apomictic citrus genotypes. **Annals of Botany**, London, GB, v. 106, p. 533-545, 2010.
- ALI, S.; MIRZA, B. Micropropagation of rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.): Effect of explant type and hormone concentration. **Acta Botanica Croatica**, Zagreb, HR, v. 65, n. 2, p. 137-146, 2006.
- ALTMAN, A.; GOREN, R. Development of citrus bud explants in culture. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 103, n. 1, p. 120-123, 1978.
- AMARAL, A. M. do. Aspectos da apomixia em citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 17, n. 1, p. 199-210, 1996.
- AMMIRATO, P. V. Control and expression of morphogenesis in culture. In: WITHERS, L. A.; ALDERSON, P. G. (Ed.). **Plant tissue culture and its agricultural applications**. London, GB: Butterworths, 1986. p. 23-45.
- ARASU, N. T.; PARANJOTHY, K. Tissue culture as an aid in crop improvement. In: RAJARAO, J. C.; PARANJOTHY, K. (Ed.). **National Plant Tissue Culture Symposium: proceedings**. Kuala Lumpur: Rubber Research Institute of Malaysia, 1975. p. 1-7.
- ARCE-OCHOA, J. P.; DAINELLO, F.; PIKE, L. M.; DREWS, D. Field performance comparison of two transgenic summer squash hybrids to their parental hybrid line. **HortScience**, Alexandria, v. 30, n. 3, p. 492-493, 1995.
- BARLASS, M.; SKENE, K. G. M. Citrus (*Citrus* species). In: Bajaj, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry 1: trees I**. New York: Springer-Verlag, 1986. p. 207-219.
- BARLASS, M.; SKENE, K. G. M. In vitro plantlet formation from *Citrus* species and hybrids. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, NL, v. 17, p. 333-341, 1982.
- BATES, G. W. Electrofusion of plant protoplasts and the production of somatic hybrids. In: CHANG, D. C.; CHASSY, B. M.; SAUNDERS, J. A.; SOWERS, A. E. (Ed.). **Guide to electroporation and electrofusion**. San Diego: Academic Press, 1992. p. 249-264.
- BELOUALY, N. Plant regeneration from callus culture of three *Citrus* rootstocks. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 24, n. 1, p. 29-34, 1991.
- BENEDITO, V. A.; MOURÃO FILHO, F. de A. A.; MENDES, B. M. J. Calogênese, embriogênese somática e isolamento de protoplastos em variedades de laranja doce. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 1, p. 33-38, 2000.
- BENELLI, C.; GERMANÀ, M. A.; GAMINO, T.; BEGHE, D.; FABBRI, A. Morphological and anatomical observations of abnormal somatic embryos from anther cultures of *Citrus reticulata*. **Biologia Plantarum**, Prague, CZ, v. 54, n. 2, p. 224-230, 2010.
- BERHOW, M. A.; BENNETT, R. D.; POLING, S. M.; VANNIER, S.; HIDAKA, T.; OMURA, M. Acylated flavonoids in callus cultures of *Citrus aurantifolia*. **Phytochemistry**, Elmsford, v. 36, n. 5, p. 1225-1227, 1994.
- BESPALHOK FILHO, J. C.; KOBAYASHI, A. K.; PEREIRA, L. F. P.; HISSANO, Z.; VIEIRA, L. G. E. In vitro adventitious shoot regeneration from sweet orange using thin epicotyl sections. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 1, n. 1, p. 27-34, 2001.

- BHOJWANI, S. S.; RAZDAN, M. K. Clonal propagation. In: BHOJWANI, S. S.; RAZDAN, M. K. (Ed.). **Plant tissue culture: theory and practice**. Amsterdam, NL: Elsevier Science, 1983. p. 313-372. (Developments in crop science, 5).
- BLACKHALL, N. W.; DAVEY, M. R.; POWER, J. B. Isolation, culture, and regeneration of protoplasts. In: DIXON, R. A.; GONZALES, R. A. (Ed.). **Plant cell culture: A practical approach**. New York: Oxford University Press, 1994. p. 28-39.
- BORDAS, M.; MORENO, V.; ROIG, L. A. Organogenic and embryogenic potential of several commercial lines of *Cucumis melo* L. **Cucurbit Genetics Cooperative**, Madison, n. 14, p. 71-73, 1991.
- BOWMAN, K. D. Micropropagation of smooth flat seville and yuma citrus rootstocks. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Orlando, v. 107, p. 15-18, 1994.
- BUTTON, J.; BORNMAN, C. H. Development of nucellar plants from unfertilized ovules of the Washington Navel orange through tissue culture. **The Citrus Grower and Sub-Tropical Fruit Journal**, n. 451, p. 11-14, Sept. 1971.
- CABASSON, C.; OLLITRAULT, P.; CÔTE, F.-X.; MICHAUX-FERRIÈRE, N.; DAMBIER, D.; DALNIC, R.; TEISSON, C. Characteristics of *Citrus* cell cultures during undifferentiated growth on sucrose and somatic embryogenesis on galactose. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, DK, v. 93, p. 464-470, 1995.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPQ, 1998. v. 1, p. 87-132.
- CARVALHO, S. A.; SANTOS, F. A.; MACHADO, M. A. Eliminação de vírus do complexo sorose dos citros por microenxertia associada a termoterapia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, n. 3, p. 306-308, 2002.
- CASTLE, W. S. Citrus rootstocks. In: ROM, R. C.; CARLSON, R. F. (Ed.). **Rootstocks for fruit crops**. New York: Wiley, 1987. p. 361-399.
- CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, A.; PINA, J. A.; DURÁN-VILA, N.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Genetic transformation and regeneration of mature tissues of woody fruit plants bypassing the juvenile stage. **Transgenic Research**, Philadelphia, v. 7, p. 51-59, 1998.
- CHIANCONE, B.; TASSONI, A.; BAGNI, N.; GERMANÀ, M. A. Effect of polyamines on in vitro anther culture of *Citrus clementina* Hort. ex Tan. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 87, p. 145-153, 2006.
- CONSTABEL, F. Callus culture: initiation and maintenance. In: VASIL, I. K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants: laboratory procedures and their applications**. Orlando: Academic Press, 1984. p. 27-35.
- COSTA, M. A. P. C. **Hibridação somática em citros com ênfase ao melhoramento de porta-enxertos**. 2001. 125 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- COSTA, M. A. P. C.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MENDES, B. M. J. Isolamento e eficiência de plaqueamento de protoplastos de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 472-476, 2002.
- CRISTOFANI, M. Uso da cultura de tecidos no melhoramento de citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 12, n. 2, p. 449-453, 1991.
- CSÉPLŐ, Á.; MEDGYESY, P.; MÁRTON, L. In vitro induction, isolation and transfer of chloroplast mutations in *Nicotiana*. In: IAEA. International Atomic Energy Agency. (Ed.). **Nuclear techniques and in vitro culture for plant improvement**. Vienna, 1986. p. 137-146.
- DE LANGE, J. H. Shoot-tip grafting: A modified procedure. **Citrus And Subtropical Fruit Journal**, Johannesburg, v. 539, p. 13-15, 1978.
- DENG, X. X.; GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G. Intergeneric somatic hybrid plants from protoplast fusion of *Fortunella crassifolia* cultivar 'Meiwa' with *Citrus sinensis* cultivar 'Valencia'. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, NL, v. 49, p. 55-62, 1992.
- DODDS, J. H.; ROBERTS, L. W. Initiation and maintenance of callus. In: DODDS, J. H.; ROBERTS, L. W. (Ed.). **Experiments in plant tissue culture**. New York: Cambridge University Press, 1982. p. 36-49.
- DURAN-VILA, N.; CAMBRA, M.; PINA, J. A.; BALLESTER, J. F.; NAVARRO, L. Virus content and growth patterns of callus cultured in vitro from healthy and virus-infected *Citrus* species. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 10., 1988, Riverside. **Proceedings...** California: International Organization of Citrus Virologists, 1988. p. 310-321.
- DURAN-VILA, N.; ORTEGA, V.; NAVARRO, L. Morphogenesis and tissue culture of three citrus species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 16, n. 2, p. 123-133, 1989.
- EINSET, J. W. Citrus tissue culture; stimulation of fruit explant cultures with orange juice. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 62, n. 6, p. 885-888, Dec. 1978.

- ESCALANT, J. V.; SANDOVAL, J. A. **El cultivo in vitro en el mejoramiento genético del plátano y del banano**. Turrialba: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, [1992?]. 18 p.
- ESPERANZA PEÑA, J.; LLANOS, L.; ALFONSO, A. Obtención de cultivo de tejidos de algunas variedades de citrus. **Ciencia y Técnica en la Agricultura, Cítricos y Otros Frutales**, La Habana, CU, v. 1, n. 1, p. 89-110, 1978.
- EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; BRAVO, J. E. Cell culture methods for crop improvement. In: SHARP, W. R.; EVANS, D. A.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture: crop species**. New York: Macmillan, 1984. p. 47-68.
- FADIGAS, F. de S. **Adequação de meio nutritivo para o cultivo de embriões maduros de limão 'Cravo'** (Citrus limonia Osbeck) in vitro. 1993. 72 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola de Agronomia, Universidade Federal da Bahia Cruz das Almas.
- FAO. Food and Agriculture Organization. **Faostat**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 20 mar. 2012.
- FERGUSON, J.; YOUNG, M.; HALVORSON, J. The propagation of citrus rootstocks by stem cuttings. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Orlando, v. 98, p. 39-42, 1985.
- FIFAEI, R.; GOLEIN, B.; TAHERI, H.; TADJVAR, Y. Elimination of citrus tristeza virus of Washington Navel orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) through shoot-tip grafting. **International Journal of Agriculture & Biology**, Faisalabad, v. 9, n. 1, p. 27-30, 2007.
- FINER, J. F. Plant regeneration via embryogenic suspension cultures. In: DIXON, R. A.; GONZALES, R. A. (Ed.). **Plant cell culture: A practical approach**. New York: Oxford University Press, 1994. p. 99-125.
- GARDNER, R. C. Gene transfer into tropical and subtropical crops. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, NL, v. 55, n. 1/2, p. 65-82, 1993.
- GAVISH, H.; VARDI, A.; FLUHR, R. Suppression of somatic embryogenesis in *Citrus* cell cultures by extracellular proteins. **Planta**, Berlin, DE, v. 186, p. 511-517, 1992.
- GENTILE, A.; TRIBULATO, E.; DENG, Z. N.; VARDI, A. In vitro selection of nucellar lemon callus and regeneration of plants tolerant to *Phoma tracheiphila* toxin. **Advances in Horticultural Science**, Florence, v. 6, n. 4, p. 151-154, 1992.
- GERMANÀ, M. A.; CHIANCONE, B. Improvement of *Citrus clementina* Hort. ex Tan. microspore-derived embryoid induction and regeneration. **Plant Cell Reports**, Berlin, DE, v. 22, p. 181-187, 2003.
- GERMANÀ, M. A.; CHIANCONE, B.; IACONA, C.; MULEO, R. The effect of light quality on anther culture of *Citrus clementina* Hort. ex Tan. **Acta Physiologiae Plantarum**, Cracóvia, v. 27, n. 4B, p. 717-721, 2005.
- GERMANÀ, M. A.; WANG, Y. Y.; BARBAGALLO, M. G.; IANNOLINO, G.; CRESCIMANNO, F. G. Recovery of haploid and diploid plantlets from anther culture of *Citrus clementina* Hort. ex Tan. and *Citrus reticulata* Blanco. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 69, n. 3, p. 473-480, 1994.
- GILADI, I.; ALTMAN, A.; GOREN, R. A method for aseptic culture of bud explants from citrus trees. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, NL, v. 10, n. 4, p. 357-362, 1979.
- GILL, M. I. S.; SINGH, Z.; DHILLON, B. S.; GOSAL, S. S. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, NL, v. 63, p. 167-174, 1995.
- GMITTER JUNIOR, F. G.; LING, X. B.; DENG, X. X. Induction of triploid *Citrus* plants from endosperm calli in vitro. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, DE, v. 80, p. 785-790, 1990.
- GOH, C. J.; SIM, G. E.; MORALES, C. L.; LOH, C. S. Plantlet regeneration through different morphogenic pathways in pommelo tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 43, n. 3, p. 301-303, 1995.
- GOSAL, S. S.; GILL, M. I. S.; GREWAL, H. Somatic embryogenesis in *Citrus* species. In: JAIN, S.; GUPTA, P.; NEWTON, R. (Ed.). **Somatic embryogenesis in woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. v. 2, p. 1-21.
- GRATTAPAGLIA, D. Microenxertia in vitro. **ABCTP Notícias**, Brasília, DF, n. 14, p. 2-4, 1990.
- GROSSER, J. W. Observations and suggestions for improving somatic hybridization by plant protoplast isolation, fusion, and culture. **HortScience**, Alexandria, v. 29, n. 11, p. 1241-1243, 1994.
- GROSSER, J. W.; CHANDLER, J. L.; PELOSI, R. R.; COHEN, M. In-vitro micropropagation of seedless 'Cohen' citrange. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Orlando, v. 106, p. 57-60, 1993.

- GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G. 2004 SIVB Congress Symposium Proceedings "Thinking Outside the Cell": applications of somatic hybridization and cybridization in crop improvement, with citrus as a model. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 41, p. 220-225, 2005.
- GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G. Protoplast fusion and citrus improvement. **Plant Breeding Reviews**, New York, v. 8, p. 339-374, 1990a.
- GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G. Somatic hybridization of *Citrus* with wild relatives for germplasm enhancement and cultivar development. **HortScience**, Alexandria, v. 25, n. 2, p. 147-151, 1990b.
- GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G. Wide-hybridization of *Citrus* via protoplast fusion: progress, strategies, and limitations. In: BENNETT, A. B.; O'NEILL, S. D. (Ed.). **Horticultural biotechnology, plant biology**. New York: Wiley-Liss, 1990c. v. 25, p. 31-41.
- GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G.; CHANDLER, J. L. Intergeneric somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species: *Citrus sinensis* and *Severinia disticha*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, DE, v. 75, p. 397-401, 1988a.
- GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G.; CHANDLER, J. L. Intergeneric somatic hybrid plants of *Citrus sinensis* cv. Hamlin and *Poncirus trifoliata* cv. Flying Dragon. **Plant Cell Reports**, Berlin, DE, v. 7, p. 5-8, 1988b.
- GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G.; LOUZADA, E. S.; CHANDLER, J. L. Production of somatic hybrid and autotetraploid breeding parents for seedless citrus development. **HortScience**, Alexandria, v. 27, n. 10, p. 1125-1127, 1992.
- GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G.; SESTO, F.; DENG, X. X.; CHANDLER, J. L. Six new somatic citrus hybrids and their potential for cultivar improvement. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 117, n. 1, p. 169-173, 1992.
- GROSSER, J. W.; LOUZADA, E. S.; GMITTER JUNIOR, F. G.; CHANDLER, J. L. Somatic hybridization of complementary citrus rootstocks: five new hybrids. **HortScience**, Alexandria, v. 29, n. 7, p. 812-813, 1994.
- GUO, W. W.; CHENG, Y. J.; CHEN, C. L.; DENG, X. X. Molecular analysis revealed autotetraploid, diploid and tetraploid cybrid plants regenerated from an interspecific somatic fusion in *Citrus*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, NL, v. 108, p. 162-166, 2006.
- GUO, W. W.; WU, R. C.; CHENG, Y. J.; DENG, X. X. Production and molecular characterization of *Citrus* intergeneric somatic hybrids between red tangerine and citrange. **Plant Breeding**, Berlin, DE, v. 126, p. 72-76, 2007.
- GUTIÉRREZ, M. A.; LUTH, D. E.; MOORE, G. A. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation in citrus and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the coat protein of citrus tristeza virus. **Plant Cell Reports**, Berlin, DE, v. 16, p. 745-753, 1997.
- HAMILTON, K. Ex situ **conservation of Australian Citrus species**: investigations on seed biology, cryopreservation and in vitro culture. 2007. 61 f. Thesis (Doctor of Philosophy) - School of Biomedical and Biomolecular Science, Griffith University, Brisbane, Queensland.
- HANDRO, W. Produção e uso de haploides. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1., 1985, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa-DDT, 1986. p. 57-60. (Embrapa-CNPH. Documentos, 1).
- HANDRO, W.; FLOH, E. I. S. Aspectos básicos do controle da morfogênese in vitro. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, DF: ABCTP: Embrapa-CNPH, 1990. p. 203-212.
- HERNÁNDEZ, R. M.; DIOSDADO, E.; CABRERA, J. C.; COLL, F. Efecto de los biorreguladores del crecimiento en la embriogénesis somática de mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.). **Cultivos Tropicales**, La Habana, v. 31, n. 3, p. 32-38, 2010.
- HIDAKA, T. A 'shuttle callus system': application of tissue culture in citrus. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 392, p. 39-48, 1995.
- HIDAKA, T. Citrus tissue culture: a 'shuttle callus system' and its application. In: INTERNATIONAL ASIA PACIFIC CONFERENCE ON CITRUS REHABILITATION, 4., 1990, Chiang Mai. **Proceedings...** Chiang Mai: FAO: UNDP, 1990. p. 48-56.
- HIDAKA, T. Induction of plantlets from anthers of 'Trovita' orange (*Citrus sinensis* Osbeck). **Journal of the Japanese Society for Horticultural Sciences**, Tokyo, JP, v. 53, n. 1, p. 1-5, 1984.
- HIDAKA, T.; KAJIURA, I. Plantlet differentiation from callus protoplasts induced from *Citrus* embryo. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, NL, v. 34, p. 85-92, 1988.
- HIDAKA, T.; OMURA, M. Control of embryogenesis in *Citrus* cell culture: regeneration from protoplasts and attempts to callus bank. **The Bulletin of the Fruit Tree Research Station B**, Okitsu, v. 16, p. 1-17, 1989a.

- HIDAKA, T.; OMURA, M. Origin and development of embryoids from microspores in anther culture of citrus. **Japanese Journal of Breeding**, Tokyo, JP, v. 39, p. 169-178, 1989b.
- HIDAKA, T.; OMURA, M.; UKAGI, M.; TOMIYAMA, M.; KATO, A.; OHSHIMA, M.; MOTOYOSHI, F. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of *Citrus* spp. from suspension cells. **Japanese Journal of Breeding**, Tokyo, JP, v. 40, p. 199-207, 1990.
- HIDAKA, T.; YAMADA, Y.; SHICHIJO, T. Plantlet formation by anther culture of *Citrus aurantium* L. **Japanese Journal of Breeding**, Tokyo, JP, v. 32, n. 3, p. 247-252, 1982.
- HOSSAIN, M.; RAHMAN, S. M.; ISLAM, R.; JOARDER, O. I. High efficiency plant regeneration from petiole explants of *Carica papaya* L. through organogenesis. **Plant Cell Reports**, Berlin, DE, v. 13, p. 99-102, 1993.
- JIMÉNEZ, V. M. El cultivo de protoplastos en cítricos y su potencial para el mejoramiento genético. **Agronomía Costarricense**, San José, CR, v. 20, n. 2, p. 187-204, 1996.
- JIMÉNEZ, V. M.; GUEVARA, E.; HERRERA, J.; BANGERTH, F. Endogenous hormone levels in habituated nucellar *Citrus* callus during the initial stages of regeneration. **Plant Cell Reports**, Berlin, DE, v. 20, p. 92-100, 2001.
- JUMIN, H. B.; NITO, N. Plant regeneration via somatic embryogenesis from protoplasts of six plant species related to *Citrus*. **Plant Cell Reports**, Berlin, DE, v. 15, n. 5, p. 332-336, 1996.
- KANEYOSHI, J.; KOBAYASHI, S.; NAKAMURA, Y.; SHIGEMOTO, N.; DOI, Y. A simple and efficient gene transfer system of trifoliolate orange. **Plant Cell Reports**, Berlin, DE, v. 13, p. 541-545, 1994.
- KARTHA, K. K. Meristem culture and cryopreservation: methods and applications. In: THORPE, T. A. (Ed.). **Plant tissue culture: methods and applications in agriculture**. New York: Academic Press, 1981. p. 181-211.
- KAYIM, M.; KOC, N. K. The effects of some carbohydrates on growth and somatic embryogenesis in citrus callus culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, NL, v. 109, p. 29-34, 2006.
- KOBAYASHI, A. K.; BESPALHOK FILHO, J. C.; PEREIRA, L. F. P.; MOLINARI, H. B. C.; GALVÃO, R. M.; VIEIRA, L. G. *Agrobacterium*-mediated transformation of sweet orange cv. Pêra (*Citrus sinensis* L. OSBECK) with sarcotoxin antibacterial peptide gene. In: LATIN-AMERICAN MEETING ON PLANT BIOTECHNOLOGY, 4., 2001, Goiânia. **Resumos...** Goiânia: REDBIO, 2001. p. 125.
- KOBAYASHI, S. Uniformity of plants regenerated from orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, DE, v. 74, p. 10-14, 1987.
- KOBAYASHI, S.; IKEDA, I.; NAKATANI, M. Studies on the nucellar embryogenesis in Citrus: 1. Formation of nucellar embryo and development of ovule. **The Bulletin of the Fruit Tree Research Station E**, Akitsu, n. 2, p. 9-24, 1979.
- KOBAYASHI, S.; IKEDA, I.; UCHIMIYA, H. Conditions for high frequency embryogenesis from orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 4, p. 249-259, 1985.
- KOBAYASHI, S.; NAKAMURA, Y.; KANEYOSHI, J.; HIGO, H.; HIGO, K. Transformation of kiwifruit (*Actinidia chinensis*) and trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*) with synthetic gene encoding the human epidermal growth factor (hEGF). **Journal of the Japanese Society for Horticultural Sciences**, Tokyo, JP, v. 64, p. 763-769, 1996.
- KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I.; YOSHINAGA, K.; OHGAWARA, T.; ISHII, S. Fertility in an intergeneric somatic hybrid plant of *Rutaceae*. **HortScience**, Alexandria, v. 26, n. 2, p. 207, 1991.
- KOBAYASHI, S.; SAKAI, A.; OIYAMA, I. Cryopreservation in liquid nitrogen of cultured navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) nucellar cells and subsequent plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 23, p. 15-20, 1990.
- KOBAYASHI, S.; UCHIMIYA, H. Expression and integration of a foreign gene in orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts by direct DNA transfer. **The Japanese Journal of Genetics**, Tokyo, JP, v. 64, n. 2, p. 91-97, 1989.
- KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P. Cell and tissue culture for breeding and developmental studies of Citrus. **HortScience**, Alexandria, v. 112, n. 2, p. 110-114, 1977.
- KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P.; SAFRAN, H. Adventive plants from ovules and nucelli in *Citrus*. **Planta**, Berlin, DE, v. 106, p. 237-245, 1972.
- LING, J.-T.; IWAMASA, M. Somatic hybridization between *Citrus reticulata* and *Citropsis gabunensis* through electrofusion. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 13, n. 9, p. 493-497, 1994.
- LING, J.-T.; NITO, N.; IWAMASA, M. Plant regeneration from protoplasts of Calamondin (*Citrus madurensis* Lour.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, NL, v. 40, n. 4, p. 325-333, 1989.

- LING, J.-T.; NITO, N.; IWAMASA, M.; KUNITAKE, H. Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic callus of satsuma. **HortScience**, Alexandria, v. 25, n. 8, p. 970-972, 1990.
- LOUZADA, E. S.; GROSSER, J. W. Somatic hybridization of *Citrus* with sexually incompatible wild relatives. **Biotechnology in agriculture and forestry**, Berlin, DE, v. 27, p. 427-438, 1994.
- LOUZADA, E. S.; GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G.; NIELSEN, B.; CHANDLER, J. L. Eight new somatic hybrid citrus rootstocks with potential for improved disease resistance. **HortScience**, Alexandria, v. 27, n. 9, p. 1033-1036, 1992.
- MACHADO, M. A. Biotecnologia em citros na Estação Experimental Sylvio Moreira (EESM) do IAC. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 12, n. 2, p. 455-466, 1991.
- MAHESHWARI, R.; RANGASWAMY, N. S. Polyembryony an in vitro culture of embryos of *Citrus* and *Mangifera*. **Indian Journal of Horticulture**, Bangalore, v. 15, p. 275-282, 1958.
- MATHEWS, H.; SCHOPKE, C.; CARCAMO, R.; CHAVARRIAGA, P.; FAUQUET, C.; BEACHY, R. N. Improvement of somatic embryogenesis and plant recovery in cassava. **Plant Cell Reports**, Berlin, DE, v. 13, p. 328-333, 1993.
- MATOS, A. P. de; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, A. da S.; FUKUDA, W. M. G.; SANTOS FILHO, H. P.; DANTAS, J. L. L. O uso da cultura de tecidos no Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura. **ABCTP Notícias**, Brasília, DF, n. 8, p. 2-5, 1988.
- MEDRADO, A. C. de M. **Cultivo de sementes versus cultivo in vitro de embriões de citros (*Citrus* spp.): implicações na sobrevivência de híbridos**. 1998. 46 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola de Agronomia, Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas.
- MENDES, B. M. J.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; FARIAS, P. C. M.; BENEDITO, V. A. Citrus somatic hybridization with potential for improved Blight and CTV resistance. **In vitro Cellular & Developmental Biology**, Columbia, v. 37, n. 4, p. 490-495, 2001.
- MENDES-DA-GLÓRIA, F. J.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; CAMARGO, L. E. A.; MENDES, B. J. Caipira sweet orange + Rangpur lime: a somatic hybrid with potential for use as rootstock in the Brazilian citrus industry. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, p. 661-665, 2000a.
- MENDES-DA-GLÓRIA, F. J.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MENDES, B. J. Plant regeneration from protoplast of brazilian citrus cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 35, p. 727-732, 2000b.
- MIRANDA, M.; MOTOMURA, T.; IKEDA, F.; OHGAWARA, T.; SAITO, W.; ENDO, T.; OMURA, M.; MORIGUCHI, T. Somatic hybrids obtained by fusion between *Poncirus trifoliata* (2x) and *Fortunella hindsii* (4x) protoplasts. **Plant Cell Reports**, Berlin, DE, v. 16, n. 6, p. 401-405, 1997.
- MOLINA, R. V.; NUEZ, F. Correlated response of in vitro regeneration capacity from different source of explants in *Cucumis melo*. **Plant Cell Reports**, Berlin, DE, v. 5, n. 1/2, p. 129-132, 1995.
- MOORE, G. A. In vitro propagation of citrus rootstocks. **HortScience**, Alexandria, v. 21, n. 2, p. 300-301, 1986.
- MOORE, G. A.; JACONO, C. C.; NEIDIGH, J. L.; LAWRENCE, S. D.; CLINE, K. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, DE, v. 11, p. 238-242, 1992.
- MORAES-FERNANDES, M. I. B. de. Obtenção de plantas haploides através da cultura de anteras. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, DF: ABCTP: EMBRAPA-CNPq, 1990. p. 311-332.
- MORAIS, L. S. **Ajustes no meio de Murashige & Tucker (MT) para o cultivo in vitro de embriões imaturos de tangerina 'Cleópatra'**. 1997. 95 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola de Agronomia, Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas.
- MORAIS-LINO, L. S.; SOUZA, A. da S.; SOARES FILHO, W. S.; LEDO, C. A. S. Adequação de nutrientes no meio MT para o cultivo de embriões imaturos de tangerineira 'Cleópatra'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 1, p. 1-6, 2008.
- MOURA, T. L. de; ALMEIDA, W. A. B. de; MENDES, B. M. J.; MOURÃO FILHO, F. de A. A. Organogênese in vitro de *Citrus* em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 240-245, 2001.
- MOURÃO FILHO, F. de A. A. Produção de híbridos somáticos em citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 17, n. 1, p. 159-178, 1996.
- MOURÃO FILHO, F. de A. A.; GMITTER JUNIOR, F. G.; GROSSER, J. W. New tetraploid breeding parents for triploid seedless citrus cultivar development. **Fruit Varieties Journal**, Urbana, v. 50, n. 2, p. 76-80, 1996.
- MOURÃO FILHO, F. de A. A.; GROSSER, J. W. Callus induction from *Citrus* relatives: an alternative source of protoplasts for somatic hybridization experiments. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Orlando, v. 105, p. 52-55, 1992.

- MOURÃO FILHO, F. de A. A.; MENDES, B. M. J. Hibridação somática: uma ferramenta biotecnológica no melhoramento de citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 21, n. 2, p. 391-400, 2000.
- MÜLLER, G. W.; BETTI, J. A.; KUNIYUKI, H. Obtenção de clones velhos sadios de citros através da microenxertia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 8, n. 3, p. 57-64, 1986.
- MUÑOZ, M. La ingeniería genética en los cítricos. **Levante - El Mercantil Valenciano**, Valencia, 2 feb. 1995. Ciencia e Investigación.
- MURASHIGE, T.; BITTERS, W. P.; RANGAN, T. S.; NAUER, E. M.; ROISTACHER, C. N.; HOLLIDAY, P. B. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free *Citrus* clones. **HortScience**, Alexandria, v. 7, p. 118-119, 1972.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, DK, v. 15, p. 473-497, 1962.
- MURASHIGE, T.; TUCKER, D. P. H. Growth factor requirements of *Citrus* tissue culture. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1969, Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1969. v. 3, p. 1155-1161.
- NADEL, B. L. Use of fluorescein diacetate in citrus tissue cultures for the determination of cell viability and the selection of mutants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, NL, v. 39, n. 1, p. 15-21, 1989.
- NAVARRO, L. Microinjerto de ápices caulinares in vitro para la obtención de plantas de agrios libres de virus. **Boletín del Servicio de Defensa Contra Plagas e Inspección Fitopatológica**, Madrid, ES, v. 5, p. 127-148, 1979.
- NAVARRO, L. Necesidades y problemática de la mejora sanitaria y genética de los cítricos en España. **Phytoma**, Valencia, n. 170, p. 2-5, 2005.
- NAVARRO, L.; JUÁREZ, J. Microinjerto de ápices caulinares de cítricos in vitro. **Phytoma**, Valencia, n. 170, p. 6-13, 2005.
- NAVARRO, L.; JUÁREZ, J.; ALEZA, P.; PINA, J. A.; OLIVARES-FUSTER, O.; CUENCA, J.; JULVE, J. M. Programa de obtención de híbridos triploides de mandarino en España. **Phytoma**, Valencia, n. 170, p. 36-41, 2005a.
- NAVARRO, L.; ORTIZ, J. M.; JUAREZ, J. Aberrant citrus plants obtained by somatic embryogenesis of nucelli cultured in vitro. **HortScience**, Alexandria, v. 20, n. 2, p. 214-215, 1985.
- NAVARRO, L.; PINA, J. A.; JUÁREZ, J.; ARREGUI, J. M.; ORTEGA, C.; NAVARRO, A.; BALLESTER-OLMOS, J. F.; VIVES, M. del C.; MONTALT, R.; DURÁN-VILA, N.; GUERRI, J.; MORENO, P.; CAMBRA, M.; MEDINA, A.; ZARAGOZA, S. El programa de mejora sanitaria de variedades de cítricos en España: 30 años de historia. **Phytoma**, Valencia, n. 170, p. 14-23, 2005b.
- NAVARRO, L.; ROISTACHER, C. N.; MURASHIGE, T. Improvement of shoot-tip grafting in vitro for virus-free *Citrus*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 100, n. 5, p. 471-479, 1975.
- NAVAS-CASTILLO, J.; MORENO, P.; DURAN-VILA, N. Citrus psorosis, ringspot, cristicortis and concave gum pathogens are maintained in callus culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 40, n. 2, p. 133-137, 1995.
- NAZ, A. A.; JASKANI, M. J.; ABBAS, H.; QASIM, M. *In vitro* studies on micrografting technique in two cultivars of citrus to produce virus free plants. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 39, n. 5, p. 1773-1778, 2007.
- NIEDZ, R. P. Growth of embryogenic sweet orange callus on media varying in the ratio of nitrate to ammonium nitrogen. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 39, n. 1, p. 1-5, 1994.
- NITO, N.; IWAMASA, M. In vitro plantlet formation from juice vesicle callus of satsuma (*Citrus unshiu* Marc.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 20, n. 2, p. 137-140, 1990.
- OHGAWARA, T.; KOBAYASHI, S.; OGHAWARA, E.; UCHIMIYA, H.; ISHII, S. Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, DE, v. 71, p. 1-4, 1985.
- OHTA, Y.; FURASATO, K. Embryoculture in *Citrus*. **Reports Kihara Institute Biological Research**, Yokohama, n. 8, p. 49-54, 1957.
- OLIVARES, O. **Hibridación somática de cítricos**. 1998. 202 f. Tesis (Doctorado en Ciencias Biológicas) - Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia, España.
- OLIVARES-FUSTER, O.; DURAN-VILA, N.; NAVARRO, L. Electrochemical protoplast fusion in citrus. **Plant Cell Reports**, Berlin, DE, v. 24, p. 112-119, 2005.
- OLIVEIRA, I. V. de M.; DAMIÃO FILHO, C. F.; CARVALHO, S. A. de. Enxertia em citros por substituição de ápice caulinar. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 744-747, dez. 2002.

- OLIVEIRA, R. P. de. **Biotecnologia em citros**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. 36 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 160).
- OLIVEIRA, R. P. de; MENDES, B. M. J.; TULMANN NETO, A. Cultura de células em suspensão de dois porta-enxertos de citros. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 6, n. 2, p. 141-144, 1994a.
- OLIVEIRA, R. P. de; MENDES, B. M. J.; TULMANN NETO, A. Obtenção e cultura de calos nucelares de limão Cravo. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 6, n. 2, p. 115-119, 1994b.
- OTONI, W. C.; TEIXEIRA, S. L. Propagação clonal in vitro de *Citrus sinensis* (L.) Osb. cv. Pêra, a partir da cultura de segmentos nodais juvenis: I. Influência de citocininas. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 38, n. 215, p. 17-24, 1991.
- PASQUAL, M.; ANDO, A. Influência de reguladores de crescimento sobre o enraizamento in vitro de embriões de *Citrus sinensis* Osb. cv. Valência. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 15, n. 1, p. 64-68, 1992.
- PASQUAL, M.; ANDO, A.; CRÓCOMO, O. J. Desenvolvimento de embriões nucelares de *Citrus sinensis* Osb., cv. Valência, in vitro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9., 1987, Campinas. **Anais...** Campinas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1988a. v. 1, p. 305-309.
- PASQUAL, M.; ANDO, A.; CRÓCOMO, O. J. Influência de reguladores de crescimento sobre a embriogênese in vitro de nucelos de *Citrus sinensis* CV. Valência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 23, n. 3, p. 255-259, 1988b.
- PASQUAL, M.; PINTO, J. E. B. Cultura de embriões. **ABCTP Notícias**, Brasília, DF, n. 9, p. 2-12, 1988.
- PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. dos S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; SOUZA, A. da S.; SANTOS, L. C. dos; PEIXOUTO, L. S. **Banco ativo de germoplasma de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**: passado, presente e futuro. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2007. 61 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Documentos, 163).
- PAULS, K. P. Plant biotechnology for crop improvement. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 673-693, 1995.
- PAZ, O. P. da; PASQUAL, M. Microenxertia. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, 1998. v. 1, p. 147-159.
- PEIXOTO, P. H. P.; REZENDE, L. de P.; BARRIOS, S. C.; BOTREL, N. Determinação da poliembrião em citros em diferentes estágios de desenvolvimento dos frutos. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 14, n. 2, p. 233-236, 1990.
- PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, A.; PINA, J. A.; DURÁN-VILA, N.; NAVARRO, L. *Agrobacterium*-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, DE, v. 14, p. 616-619, 1995a.
- PEÑA, L.; CERVERA, M.; JUÁREZ, J.; ORTEGA, C.; PINA, J. A.; DURÁN-VILA, N.; NAVARRO, L. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. **Plant Science**, Limerick, v. 104, n. 2, p. 183-191, 1995b.
- PEÑA, L.; MARÍN-TRILLO, M.; JUÁREZ, J.; PINA, J. A.; NAVARRO, L.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J. M. Constitutive expression of *Arabidopsis* LEAFY or APETALA1 genes in citrus reduces their generation time. **Nature Biotechnology**, New York, v. 19, p. 263-267, 2001.
- PÉREZ-TORNERO, O.; PORRAS, I. Assessment of polyembryony in lemon: rescue and in vitro culture of immature embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 93, p. 173-180, 2008.
- PINTO, J. E. B. P.; BARBOSA, M. H. P.; PASQUAL, M. Multiplicação in vitro do porta-enxerto trifoliata com gemas axilares provenientes de árvore adulta. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9., 1987, Campinas. **Anais...** Campinas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1988. v. 1, p. 407-410.
- PIQUERAS, A.; OLMOS, E.; HELLÍN, E. Cytological changes related with salt tolerance in embryogenic callus of *Citrus limon*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 39, n. 1, p. 13-18, 1994.
- PLOPER, L. D.; OSTE, C. A.; RAMALLO, N. E. V. de. Embriogênese in vitro de *Citrus* spp. **Revista Industrial y Agrícola de Tucumán**, San Miguel de Tucumán, v. 54, n. 1, p. 29-36, 1977.
- POVEDANO, L.; HENRIQUE, F. H.; TULMANN NETO, A.; LATADO, R. R. Obtenção de plantas tetraploides de citros visando a produção de frutos triploides sem sementes. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 33, n. 2, p. 65-74, 2012.
- PRATES, H. S. **Poliembrião em citros**: revisão de literatura. Campinas: CATI, 1977. 41 p.
- RAMAN, H.; GOSAL, S. S.; BRAR, D. S. Plant regeneration from callus cultures of *Citrus limon* and *C. jambhiri*. **Crop Improvement**, Ludhiana, v. 19, n. 2, p. 100-103, 1992.

- RANGAN, T. S. Clonal propagation: somatic embryos of *Citrus*. In: VASIL, I. K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants: laboratory procedures and their applications**. Orlando: Academic Press, 1984. v. 2, p. 68-73.
- RANGAN, T. S.; MURASHIGE, T.; BITTERS, W. P. In vitro studies of zygotic and nucellar embryogenesis in citrus. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1969, Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1969. v. 1, p. 225-229.
- REISCH, B. Genetic variability in regenerated plants. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan, 1983. v. 1, p. 748-769.
- RIBEIRO, V. G.; PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; VICHATO, M.; SANÁBIO, D. Cultivo in vitro de embriões de laranja 'Pêra': concentrações do meio MS e sacarose. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 22, n. 4, p. 429-434, 1998.
- RICCI, A. P.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MENDES, B. M. J.; PIEDADE, S. M. S. Somatic embryogenesis in *Citrus sinensis*, *C. reticulata* and *C. nobilis* x *C. deliciosa*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, n. 1, p. 41-46, 2002.
- ROSSETTI, V. Micro-enxertia em citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5., 1979, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1979. v. 3, p. 1187-1197.
- SABBAH, S. M.; GROSSER, J. W.; CHANDLER, J. L.; LOUZADA, E. S. The effect of growth regulators on the rooting of stem cuttings of *Citrus* related genera and intergeneric somatic hybrids. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Orlando, v. 104, p. 188-191, 1991.
- SAITO, W.; OHGAWARA, T.; SHIMIZU, J.; KOBAYASHI, S. Somatic hybridization in *Citrus* using embryogenic cybrid callus. **Plant Science**, Limerick, v. 99, n. 1, p. 89-95, 1994.
- SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, Berlin, DE, v. 9, n. 1, p. 30-33, 1990.
- SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Survival by vitrification of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) cooled to -196°C. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 137, n. 4, p. 465-470, 1991.
- SANTOS FILHO, H. P. Modified micro-grafting procedure in citrus. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, Piracicaba, v. 2, p. 327-329, 1984.
- SANTOS FILHO, H. P. Obtenção de plantas matrizes de citros pelo método de microenxertia in vitro. In: SEMINÁRIO DE TECNOLOGIA AGROPECUÁRIA INOVADORA PARA O NORDESTE, 1986, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: BNB-ETENE, 1986. p. 243-248.
- SANTOS FILHO, H. P.; DANTAS, J. L. L.; CABRAL, J. R. S. Programa de pesquisa com biotecnologia do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 8, n. 3, p. 23-27, 1986.
- SANTOS FILHO, H. P.; PAZ, O. P. da. **Microenxertia**. Cruz das Almas: Embrapa-CNPMP, 1994. 2 p. (Embrapa-CNPMP. Biotecnologia em Foco, 3).
- SCHMILDT, E. R.; GUIMARÃES, C. T.; LANI, E. R. G.; TEIXEIRA, S. L. Efeito do floriglucinol na reação morfogênica in vitro de segmentos internodais de *Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck cv. Pêra. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 47, n. 269, p. 113-120, 2000.
- SHARMA, S.; SINGH, B.; RANI, G.; ZAIDI, A. A.; HALLAN, V.; NAGPAL, A.; VIRK, G. S. *In vitro* production of Indian citrus ringspot virus (ICRSV) free Kinnow plants employing phytotherapy coupled with shoot tip grafting. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 43, p. 254-259, 2007.
- SHINOZAKI, S.; FUJITA, K.; HIDAKA, T.; OMURA, M. Plantlet formation of somatic hybrids of sweet orange (*Citrus sinensis*) and its wild relative, orange jessamine (*Murraya paniculata*), by electrically-induced protoplast fusion. **Japanese Journal of Breeding**, Tokyo, JP, v. 42, p. 287-295, 1992.
- SIM, G.-E.; LOH, C.-S.; GOH, C.-J. Direct somatic embryogenesis from protoplasts of *Citrus mitis* Blanco. **Plant Cell Reports**, Berlin, DE, v. 7, p. 418-420, 1988.
- SINGH, A. K.; NITO, N.; IWAMASA, M. Influence of lactose and glycerol on growth and somatic embryogenesis of citrus callus. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 323, p. 606-609, 1992.
- SINGH, I. P.; PARTHASARATHY, V. A.; HANDIQUE, P. J. Comparative growth of micropagated and seedling plantlets of *Citrus* species. In: WORLD CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRUS NURSERYMEN, 6., 2001, Ribeirão Preto. **Proceedings...** Ribeirão Preto: International Society of Citrus Nurserymen: FUNDECITRUS: Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro, 2001. p. 212-219.
- SINGH, S.; RAJAM, M. V. Citrus biotechnology: achievements, limitations and future directions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Orlando, v. 15, n. 1, p. 3-22, 2009.

- SOARES FILHO, W. dos S.; VILARINHOS, A. D.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; OLIVEIRA, A. A. R. de; SOUZA, A. da S.; CRUZ, J. L.; MORAIS, L. S.; CASTRO NETO, M. T. de; GUERRA FILHO, M. dos S.; CUNHA, M. A. P. da; PASSOS, O. S.; MEISSNER FILHO, P. E.; OLIVEIRA, R. P. de. **Programa de melhoramento genético de citros da EMBRAPA-CNPMPF: obtenção de híbridos** (*Citrus breeding program at EMBRAPA-CNPMPF: development of hybrids*). Cruz das Almas: Embrapa-CNPMPF, 1997. 17 p. (Embrapa-CNPMPF. Documentos, 74).
- SONDAHL, M. R.; SHARP, W. R.; EVANS, D. A. Biotechnology for agriculture of third countries. In: TISSUE culture technology and development. New York: Centre on Service and Technology for Development United Nations, 1984. p. 22-36.
- SOOST, R. K.; CAMERON, J. W. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J. N. (Ed.). **Advances in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1975. p. 507-540.
- SOOST, R. K.; ROOSE, M. L. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J. N. (Ed.). **Fruit breeding**. New York: John Wiley, 1996. v. 1, p. 257-322.
- SORIANO, L. **Hibridação somática visando à produção de genitores tetraplóides para o melhoramento de variedades copa de citros**. 2010. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- SOUZA, A. da S.; PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. dos S.; CARDOSO, M. G. S.; CARMO, R. S. do; CARVALHO, M. de J. da S. de; SANTOS, E. B. **Estabelecimento in vitro do banco ativo de germoplasma de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011. 7 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Circular Técnica, 103).
- SPIEGEL-ROY, P.; KOCHBA, J. Embryogenesis in *Citrus* tissue cultures. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, New York, v. 16, p. 27-48, 1980.
- SPIEGEL-ROY, P.; VARDI, A. Citrus. In: AMMIRATO, P. V.; EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture: crop species**. New York: Macmillan, 1984. v. 3, p. 355-372.
- STARRANTINO, A.; CARUSO, A. In vitro culture for citrus micropropagation. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 227, p. 444-446, 1988a.
- STARRANTINO, A.; CARUSO, A. The shoot-tip grafting technique applied in citriculture. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 227, p. 101-103, 1988b.
- STARRANTINO, A.; RUSSO, G.; RACITI, M.; REFORGIATO-RECUPERO, G.; CAPONNETTO, P. Embryogenic callus formation, protoplasts regeneration and somatic fusion of different citrus species. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE, 7., 1992, Acireale. **Proceedings...** Catania: International Society of Citriculture, 1992. v. 1, p. 334-337.
- SU, H. J. **Production and cultivation of virus-free citrus saplings for citrus rehabilitation in Taiwan**. Bangkok, TH: Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology: New Delhi and Asia-Pacific Association of Agricultural Research Institutions, 2008. 51 p.
- SWAMINATHAN, M. S. Tissue culture and third world agriculture: problems and potential. In: TISSUE culture technology and development. New York: Centre on Service and Technology for Development United Nations, 1984. p. 5-10.
- THAKUR, D. R.; BAJWA, B. S. Extent of polyembryony in some species and varieties of citrus. **Indian Journal of Horticulture**, Bangalore, v. 28, n. 1, p. 25-28, 1971.
- TOMAZ, M. L.; MENDES, B. M.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; DEMÉTRIO, C. B.; JANSKUL, N.; RODRIGUEZ, A. P. M. Somatic embryogenesis in *Citrus* spp: carbohydrate stimulation and histodiferentiation. **In vitro Cellular & Developmental Biology**, Columbia, v. 37, n. 4, p. 446-452, 2001.
- TUSA, N.; GERACI, G. In vitro propagation of some citrus rootstocks. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 227, p. 464-466, 1988.
- TUSA, N.; GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G.; LOUZADA, E. S. Production of tetraploid somatic hybrid breeding parents for use in lemon cultivar improvement. **HortScience**, Alexandria, v. 27, n. 5, p. 445-447, 1992.
- TUSA, N.; RADOGNA, L.; DAVINO, M.; LA ROSA, R. Micrografting technology for recovering three virus/affected "Femminello" lemon clones. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 227, p. 104-106, 1988.
- VARDI, A.; BLEICHMAN, S.; AVIV, D. Genetic transformation of citrus protoplasts and regeneration of transgenic plants. **Plant Science**, Limerick, v. 69, p. 199-206, 1990.
- VARDI, A.; GALUN, E. Recent advances in protoplast culture of horticultural crops: *Citrus*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, NL, v. 37, p. 217-230, 1988.

VÁSQUEZ ARAUJO, J. E. **Identificação de embriões zigóticos em sementes poliembriônicas de citros (*Citrus sp.*) mediante características morfológicas.** 1991. 74 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola de Agronomia, Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas.

VILORIA, Z.; GROSSER, J. W.; BRACHO, B. Immature embryo rescue, culture and seedling development of acid citrus fruit derived from interploid hybridization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 82, p. 159-167, 2005.

VU, J. C. V.; NIEDZ, R. P.; YELENOSKY, G. Glycerol stimulation of chlorophyll synthesis, embryogenesis, and carboxylation and sucrose metabolism enzymes in nucellar callus of 'Hamlin' sweet orange. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 33, n. 1, p. 75-80, 1993.

YAO, J. L.; WU, J. H.; GLEAVE, A. P.; MORRIS, B. A. M. Transformation of citrus embryogenic cells using particle bombardment and production of transgenic embryos. **Plant Science**, Limerick, v. 113, p. 175-183, 1996.

ZANOL, G. C.; OLIVEIRA, R. P. de; SOUZA, G. S. de; SOARES FILHO, W. dos S. **Fusão de protoplastos de citros: obtenção de calos.** Cruz das Almas: Embrapa-CNPMPF, 1998. 2 p. (Embrapa-CNPMPF. Pesquisa em Andamento, 54).

# Biologia molecular

Roberto Pedroso de Oliveira

## Introdução

Os *Citrus* (Linnaeus) e gêneros correlacionados, a exemplo de *Poncirus* (Rafinesque) e *Fortunella* (Swingle), pertencem à família Rutaceae, subfamília Aurantioideae. Em geral, compreendem espécies alógamas, sexualmente compatíveis, altamente heterozigotas e diploides, com número de cromossomos nas células somáticas  $2n = 18$  (CAMERON; FROST, 1968).

Embora a diversidade de gêneros, espécies, cultivares e clones de citros seja muito grande, o inverso ocorre em relação à diversificação varietal dos pomares comerciais. Esse fato, associado à ocupação de extensas áreas pela cultura e à grande plasticidade genética dos patógenos, que têm alta capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais, torna a citricultura brasileira bastante vulnerável (OLIVEIRA et al., 2005b). Dessa forma, ações de pesquisa relacionadas à potencialização do uso do germoplasma, mediante a avaliação de seu potencial agrônomo e criação de novos genótipos, com a consequente ampliação da base genética explorada comercialmente, devem ser conduzidas com vistas à sustentação e otimização do sistema produtivo.

Há mais de um século, a hibridação sexual e a seleção de mutações espontâneas têm sido empregadas no melhoramento genético dos citros, tendo sido obtidas várias cultivares interessantes (POMPEU JUNIOR et al., 1983). Fatores biológicos de natureza genética e/ou botânica, relacionados à elevada heterozigosidade, poliembrionia das sementes de muitas espécies, longo período pré-reprodutivo, esterilidade de pólen e/ou estigma, incompatibilidade e depressão por endogamia, têm sido as principais limitações encontradas no desenvolvimento de cultivares de citros (OLIVEIRA et al., 2001).

Nas últimas décadas, várias técnicas de biologia molecular passaram a ser adotadas como ferramentas auxiliares em programas de melhoramento genético de citros, possibilitando caracterização genética e estudos de filogenia e de taxonomia; identificação precisa de híbridos; diagnose de doenças; obtenção de híbridos somáticos por meio da fusão de protoplastos; mapeamento genético; sequenciamento do genoma de citros e de seus patógenos; e geração de plantas geneticamente modificadas.

Os principais avanços obtidos e as perspectivas são descritas neste capítulo.

## Caracterização genética

A existência de um banco ativo de germoplasma (BAG), ou seja, de uma coleção de materiais genéticos de diferentes procedências, é fundamental no estabelecimento de um programa de melhoramento genético. O Brasil possui diversos BAGs de citros, destacando-se dois entre aqueles de maior relevância mundial, localizados no Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio (Apta) de Citros Sylvio Moreira, em Cordeirópolis, SP, e na Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas, BA.

Em razão de muitas características morfológicas serem altamente influenciadas pelas condições ambientais, vários tipos de marcadores isoenzimáticos e moleculares têm sido extremamente úteis na caracterização genética de acessos de citros (*Citrus* e gêneros afins). Tais marcadores têm sido empregados na identificação de duplicatas em bancos de germoplasma, em estudos de similaridade-distância genética, nível de heterozigosidade e evolução dos citros (COLETTA FILHO et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2001; OLIVEIRA; RADMANN, 2005). Esses estudos também são importantes na orientação da seleção de genótipos promissores, sob o ponto de vista de seu aproveitamento comercial e do planejamento de programas de melhoramento genético, no sentido de definir cruzamentos e promover o entendimento da herança de diversos caracteres (BARBOSA NETO; BERED, 1998). Por outro lado, esses marcadores não têm conseguido explicar a variabilidade fenotípica observada em laranjeiras doces [*C. sinensis* (L.) Osbeck] e em limoeiros verdadeiros [*C. limon* (L.) Burm. f.] (NOVELLI et al., 2000; TARGON et al., 2000), mantendo a utilização de marcadores morfológicos na caracterização genética.

## Filogenia e taxonomia

A filogenia e a taxonomia de *Citrus* são bastante complexas, em função da alta variabilidade do gênero, decorrente de hibridações naturais interespecíficas, mutações espontâneas, alterações cromossômicas estruturais, apomixia e cultivo em ampla área geográfica (OLIVEIRA; RADMANN, 2005). Em função disso, são comuns as divergências relativas à origem e à classificação botânica de espécies de *Citrus*, principalmente no que diz respeito ao seu número: 16 para Swingle (1967), 3 para Barret e Rhodes (1976) e 159 para Tanaka (1977).

Nos últimos anos, além de descritores morfológicos (INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES, 1988) e de dados de distribuição geográfica, diversos tipos de marcadores moleculares têm sido utilizados na elucidação dessas questões (FEDERICI et al., 1998). Atualmente, somente *C. medica* L., *C. reticulata* sensu Swingle (SWINGLE, 1967) e *C. grandis* Osbeck têm sido aceitas na condição de subgêneros de *Citrus* (MACHADO et al., 2005). Segundo esses autores, os demais taxons são híbridos naturais entre as citadas espécies ou entre representantes sexualmente compatíveis de outros subgêneros.

## Seleção de híbridos e de plantas nucelares

Além da reprodução sexuada por meio de autopolinização ou polinização cruzada, muitas espécies dos gêneros, *Citrus*, *Poncirus* e *Fortunella*, são capazes de se reproduzir agamicamente por apomixia, formando vários embriões a partir da diferenciação de células do tecido nucelar. Dessa forma, além do embrião sexual, podem se formar um ou mais embriões nucelares por semente (FROST; SOOST, 1968).

As linhagens nucelares são importantes por serem geneticamente idênticas à planta-matriz, livres de vírus, uniformes e, geralmente, proporcionam maior produção e longevidade do que as plantas que lhe deram origem (SPIEGEL-ROY; KOCHBA, 1980). Praticamente, todos os porta-enxertos produzidos no País são derivados de linhagens nucelares, sendo, na prática, feita a semeadura e a seleção com base em características morfológicas ainda no viveiro.

Em razão dos caracteres morfológicos geralmente apresentarem natureza poligênica, com herança aditiva, e serem altamente influenciados pelo meio ambiente (CAMERON; FROST, 1968), a identificação precisa dos híbridos vem sendo feita por meio de marcadores bioquímicos e moleculares (OLIVEIRA et al., 2003).

Os marcadores moleculares *Random Amplified Polymorphic DNA* (Rapid) têm sido os mais utilizados na identificação precisa e precoce de híbridos de citros (OLIVEIRA et al., 2000). Isso decorre da fácil execução do método, da rápida obtenção de marcadores, do elevado polimorfismo, da possibilidade de automação, da necessidade de pequena quantidade de DNA, do baixo custo quando comparado a outros marcadores moleculares, da ausência de hibridação e de utilização de radioisótopos e do polimorfismo ser visualizado na forma de banda amplificada de DNA, visível em gel de agarose corado com brometo de etídio (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Como limitações dessa técnica, podem-se citar problemas de reprodutibilidade dos resultados, ambiguidade na interpretação de bandas, comigração de fragmentos de igual tamanho ou de tamanhos muito próximos e o caráter dominante da maioria dos marcadores obtidos (CRUZ; MILACH, 1998). Segundo Oliveira et al. (2000), a utilização de uma única reação de Rapid é suficiente para a detecção de mais de 99% dos híbridos de determinados cruzamentos.

Além dos Rapids, marcadores bioquímicos, ou seja, isoenzimáticos (OLIVEIRA; RADMANN, 2005) e marcadores moleculares microsatélites (SSR) (CRISTOFANI et al., 2001) têm sido empregados na identificação de híbridos.

## Diagnose de doenças

Anualmente, milhões de plantas cítricas morrem no País em decorrência de problemas fitossanitários, principalmente em função da morte-súbita-dos citros e do declínio (FUNDECITRUS, 2006).

O diagnóstico preciso dessas e de outras doenças é fundamental em programas de certificação de mudas e na sustentação da produtividade. Dessa forma, além da indexação com plantas indicadoras, testes sorológicos, como o da imunoadsorção enzimática (Elisa), são rotineiramente utilizados na diagnose do vírus-da-tristeza, além de testes moleculares, como o de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e do *Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR), na detecção da presença de bactérias causadoras do cancro-cítrico [*Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri* (Xac)], da clorose-variegada-dos-citros (*Xylella fastidiosa* Wells et al.) e do Huanglongbing (*Candidatus liberibacter* spp.), também conhecido como *greening*, bem como dos vírus da tristeza e da leprose, além do fungo causador da mancha-preta (*Guignardia citricarpa* Kiely) (ASTUA-MONGE et al., 2004).

## Hibridação somática

Em citros, a hibridação somática via fusão de protoplastos aplica-se tanto ao melhoramento de cultivares copa quanto de porta-enxertos. No caso do melhoramento de porta-enxertos, as aplicações referem-se, principalmente, à obtenção de híbridos alotetraploides entre cultivares que apresentem características complementares (GROSSER et al., 1988b). Também pode ser utilizada com a finalidade de enriquecimento de germoplasma, por possibilitar o cruzamento entre espécies sexualmente incompatíveis (GROSSER et al., 1988a).

Os híbridos somáticos obtidos são alotetraploides em decorrência do processo de fusão de protoplastos 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 dos parentais podem manifestar-se nos híbridos (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990a). Segundo Hutchison (1985), são exemplos dessas características a tolerância ao frio, resistência à gomose causada por *Phytophthora parasitica* Dastur, ao vírus-da-tristeza e ao nematoide *Tylenchulus semipenetrans* (Cobb).

Quanto ao uso da hibridação somática no melhoramento de cultivares copa, os híbridos alotetraploides obtidos podem ser cruzados com plantas diploides objetivando gerar híbridos triploides, de especial interesse em virtude da produção de frutos sem sementes (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990a).

Como desvantagens dessa técnica, somente uma única combinação por cruzamento pode ser obtida por par de parentais, e os híbridos somáticos gerados podem apresentar problemas de fertilidade, impossibilitando seu uso em ciclos subsequentes de hibridação sexual (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990b). Alternativamente, modificações na metodologia podem ser introduzidas, visando à produção de híbridos assimétricos (VARDI et al., 1990; XU et al., 2007) ou de cíbridos (híbridos citoplasmáticos) (XU et al., 2004), de forma a contornar essas limitações.

Nos dias atuais, a hibridação somática vem sendo utilizada como atividade de rotina em programas de melhoramento genético de citros conduzidos no Japão, nos Estados Unidos, na França,

em Israel, na Espanha e no Brasil. Inúmeros híbridos vêm sendo obtidos, destacando-se aqueles entre laranja 'Trovita' (*C. sinensis*) e *P. trifoliata* (L.) Raf. (OHGAWARA et al., 1985), limeira ácida 'Galego' [*C. aurantiifolia* (Christm.) Swingle] e laranja 'Valência' (*C. sinensis*) (GROSSER et al., 1989), tangerineira 'Cleópatra' (*C. reshni* hort. ex Tanaka) e laranja 'Azeda' (*C. aurantium* L.) (LOUZADA et al., 1992), laranja 'Succari' (*C. sinensis*) e tangerineira 'Dancy' (*C. tangerina* hort. ex Tanaka) (MOURÃO FILHO et al., 1996), mexeriqueira (*C. deliciosa* Ten.) e laranja 'Shamouti' (*C. sinensis*) (OLLITRAULT et al., 1996), laranja 'Valência' e limoeiro 'Femminello' (*C. limon*) (TUSA; BOSCO, 1996), tangerineiras (*C. reticulata* Blanco) e toranjeiras [*C. maxima* (Burm.) Merr.] (GROSSER et al., 2007), dentre muitos outros. Diversos híbridos somáticos vêm sendo avaliados quanto ao potencial de uso em sistemas produtivos.

No Brasil, pesquisas visando gerar híbridos somáticos resistentes ao vírus-da-tristeza-dos citros, à morte-súbita-dos-citros e ao declínio têm sido conduzidas na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Esalq) e no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (Cena) (MOURÃO FILHO; MENDES, 2002).

## Mapeamento genético

As espécies do gênero *Citrus* reúnem características bastante favoráveis à construção de mapas genéticos de ligação. São diploides com pequeno número haploide de cromossomos ( $n = 9$ ), altamente polimórficos, que possibilitam a produção de híbridos interespecíficos e intergenéricos com facilidade e apresentam genoma relativamente pequeno (OLIVEIRA et al., 2005a).

A existência de mapas genéticos de ligação saturados com marcadores moleculares representa uma base para pesquisas avançadas de genética, possibilitando a identificação e o isolamento de genes, o entendimento da herança de diversas características, assim como estudos da estrutura, expressão e função desses genes (ROOSE et al., 2000). Uma vez identificados e isolados, os genes podem ser clonados e transferidos para cultivares comerciais por meio da transformação genética, superando as barreiras biológicas existentes nas espécies de citros (GMITTER JUNIOR et al., 1996).

No planejamento de um programa de mapeamento genético, alguns requisitos são fundamentais, destacando-se: a) escolha de parentais com comportamento fenotípico contrastante em relação à característica a ser mapeada; b) reprodução sexuada controlada entre os parentais, com produção de uma progênie com eventos meióticos representativos; e c) disponibilidade de técnicas adequadas à obtenção de centenas de marcadores com comportamento mendeliano (OLIVEIRA et al., 2001).

O desenvolvimento de técnicas baseadas em 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 Rapid, *Restriction Fragment Length Polymorphism*

(RFLP), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) e *Simple Sequence Repeat* (SSR), os quais, geralmente, possibilitam a detecção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos diretamente em nível de DNA, de forma a representar todo o genoma (OLIVEIRA et al., 2001).

O mapeamento de espécies perenes de elevada heterozigosidade, como as que se verificam em citros, teve um grande impulso com o trabalho de Grattapaglia e Sederoff (1994), que propuseram a utilização da estratégia *pseudotestcross*. Essa técnica permite que a configuração de um dado cruzamento possa ser inferida após a análise de segregação dos marcadores da progênie, não havendo a necessidade de ser planejada a priori, como em um cruzamento teste clássico. Por meio dessa estratégia, mapas de ligação de cada parental podem ser construídos com base em marcadores que segregam na progênie e encontram-se em heterozigose em um parental e em homozigose recessiva no outro. Segundo Carlson et al. (1991), a eficiência desse procedimento é diretamente proporcional à heterozigose e à distância genética entre os parentais.

A construção de mapas de ligação é realizada pelo procedimento clássico denominado de mapeamento de três pontos, sendo os marcadores ordenados sequencialmente em grupos de ligação, com base em dados de frequência de recombinação genética (*crossing overs*) obtidos em uma progênie. Aplicativos específicos, como o Linkage-1 (SUITER et al., 1983), MapMaker (LANDER et al., 1987), GMendel (LIU; KNAPP, 1992) e JoinMap (OOIJEN; VOORRIPS, 2001), têm sido empregados na construção de mapas de ligação. Em cada aplicativo, diversas funções de mapeamento, como a de Crow (1990), Haldane (1919) e Kosambi (1944), podem ser utilizadas no cálculo de distâncias entre marcadores.

Dezenas de mapas de ligação já foram gerados em citros, destacando-se os de *C. grandis* x *P. trifoliata* (CAI et al., 1994), de *C. grandis* e de *C. reshni* x *P. trifoliata* (LURO et al., 1996), de *C. latipes* [(Swingle) Tanaka] e de *C. aurantium* (SIMONE et al., 1998), de *C. sunki* [(Hayata) hort. ex Tanaka] e *P. trifoliata* (CRISTOFANI et al., 1999), de *C. volkameriana* (V. Ten. & Pasq.) (GARCIA et al., 1999), de citrumele (*C. paradisi* Macfad. x *P. trifoliata*) 'Sacaton' x citrange (*C. sinensis* x *P. trifoliata*) 'Troyer' (ROOSE et al., 2000), de *C. volkameriana* x *P. trifoliata* Rubidoux e de *C. aurantium* x *P. trifoliata* Flying Dragon (RUIZ; ASINS, 2003), de *C. sinensis* cv. Pêra e de *C. reticulata* cv. Cravo (OLIVEIRA et al., 2004), de tangor 'Murcoté' (*C. reticulata* x *C. sinensis*) e *C. sinensis* cv. Pêra (OLIVEIRA et al., 2007).

A partir dos mapas de ligação descritos têm-se buscado características e/ou genes de locos quantitativos (QTLs) de tolerância a saís e ao frio (CAI et al., 1994; MOORE et al., 2000), reguladores da dormência, juvenilidade e vigor (ROOSE et al., 1994), porte de plantas e acidez de frutos (GMITTER JUNIOR et al., 1996), resistência ao vírus-da-tristeza (CRISTOFANI et al., 1999; GMITTER JUNIOR et al., 1996), ao nematoide *Tylenchulus semipenetrans* (LING et al., 2000) e à gomose causada por *Phytophthora* (SIVIERO, 2001). Para tanto, a população segregante e os parentais devem ser avaliados quanto à resposta à característica em questão. Quando os fenótipos observados segregam de acordo com as proporções esperadas pelas leis de Mendel, a característica pode ser tratada como se fosse outro marcador, sendo o gene ou QTLs identificados nos mapas de ligação. Uma vez identifi-

cados e isolados, esses genes podem ser clonados e transferidos para cultivares comerciais por meio de transformação genética (GMITTER JUNIOR et al., 1996).

## Transformação de plantas

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

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

Embora o bombardeamento de partículas, técnica conhecida como biobalística, também possa ser utilizado na transformação de plantas de citros (YAO et al., 1996), o cocultivo com *Agrobacterium tumefaciens* tem sido o método mais empregado. As principais vantagens desse sistema relacionam-se à sua fácil manipulação, à integração de poucas cópias do fragmento de DNA a ser transferido para a planta, ao baixo rearranjo no genoma, à maior probabilidade de integração em região de transcrição ativa do cromossomo e à alta fertilidade das plantas transgênicas obtidas (MACHADO et al., 2005). Na literatura, também existem alguns exemplos de transformação de citros utilizando a espécie *A. rhizogenes* (BALCH; ALEJO, 1998).

Em se tratando da introdução de genes de importância agrônômica em espécies de citros, já existem trabalhos relacionados à resistência ao vírus-da-tristeza utilizando gene da capa proteica em laranjeiras doces e 'Azeda', lima ácida 'Galego' e pomeleiro (*C. paradisi* Macfad.) (DOMÍNGUEZ et al., 2000; GUTIÉRREZ et al., 1997; YANG et al., 2000), resistência a fungos (PEÑA; NAVARRO, 1999), tolerância a solos salinos por meio do gene HAL2 (CERVERA et al., 2000), produção de frutos com menos sementes (KOLTUNOW et al., 2000), precocidade de produção com os genes LEAFY e APETALA1 (PEÑA et al., 2001) e resistência à sorose utilizando gene da capa proteica em laranjeiras doces (ZANEK et al., 2007).

No Brasil, o gene que codifica a toxina sarcotoxina IA, de reconhecida ação antibacteriana, foi introduzido em laranja 'Pêra' (ASTUA-MONGE et al., 2004); na cultivar Pineapple de laranja doce foi introduzido o gene que codifica a proteína PR-5 de tomate, visando à resistência à *Phytophthora citrophthora* (R. E. Smith & E. H. Smith) Leonian (FAGOAGA et al., 2001); cultivares de laranja doce Hamlin, Valência e Pêra foram transformadas com os genes Xa21 e attA com atividade antibacteriana, visando à resistência à *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e *Xylella fastidiosa* (BOSCARIOL, 2004);

e ainda na cultivar Valência foi introduzido o gene cecropin MB39 visando à resistência à *Xylella fastidiosa* (PAOLI et al., 2007).

## 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.

Em função do genoma dos citros ser considerado de alta complexidade e ter tamanho de 0,6 pg de DNA por célula haploide, a estratégia principal tem sido sequenciar os genomas dos principais patógenos da cultura, que são mais simples (MACHADO et al., 2005). Dessa forma, foram sequenciados os genomas das bactérias *Xylella fastidiosa*, agente causal da clorose-variegada-dos-citros (CVC) (SIMPSON, 2000) e da *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, causadora do cancro-cítrico (SILVA et al., 2002), além do genoma do vírus que causa a leprose (CiLV). Esse último sequenciamento foi efetuado pela empresa brasileira *Alellyx Applied Genomics*, do grupo Votorantim. Atualmente, com base nos resultados gerados, têm-se buscado estratégias para reduzir a patogenicidade desses organismos.

O sequenciamento de genes utilizando informações contidas nos RNAs mensageiros, ou seja, nas sequências *Expressed Sequence Tags* (ESTs), também tem sido realizado, buscando-se informações parciais sobre o genoma expresso de citros. A esse respeito, o Centro Apta Citros Sylvio Moreira já conta com mais de 250 mil ESTs sequenciadas, que podem ser empregadas em comparações entre espécies e na obtenção de marcadores *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), úteis na saturação de mapas genéticos de ligação e montagem de lâminas para *microarray* visando à análise funcional do genoma de citros (MACHADO et al., 2005).

## Perspectivas

Um universo de perspectivas foi aberto com o desenvolvimento e a aplicação de técnicas de biologia molecular, possibilitando a superação de barreiras genéticas presentes quando do uso de métodos tradicionais de melhoramento genético. A utilização dessas técnicas, com racionalidade e objetividade, deverá proporcionar grandes avanços ao desenvolvimento de cultivares mais produtivas e com fatores de resistência a agentes bióticos e de tolerância àqueles abióticos prejudiciais ao cultivo dos citros.

## Referências

ASTUA-MONGE, G.; FREITAS-ASTUA, J.; MACHADO, M. A. Biotecnologia gera produtividade e citros saudáveis. **Visão Agrícola**, Piracicaba, v. 2, p. 48-53, 2004.

- BALCH, P. M.; ALEJO, N. O. Regeneration of transgenic plants of Mexican lime from *Agrobacterium rhizogenes* transformed tissues. **Plant Cell Reports**, New York, v. 17, p. 591-596, 1998.
- BARBOSA NETO, J. F.; BERED, F. Marcadores genéticos e diversidade genética no melhoramento de plantas. In: MILACH, S. C. K. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p. 29-40.
- BARRET, H. C.; RHODES, A. M. A numerical study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. **Systematic Botany**, Tallahassee, v. 1, p. 105-136, 1976.
- BOSCARIOL, R. L. **Transformação genética de laranja doce com os genes manA, atacinaA e Xa21**. 2004. 87 f. (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, Piracicaba.
- CAI, Q.; GUY, C. L.; MOORE, G. A. Extension of the linkage map in *Citrus* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of cold-acclimation-responsive loci. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 89, p. 606-614, 1994.
- 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.
- CARLSON, J. E.; TULSIERAM, L. K.; GALUBITZ, J. C.; LUK, V. W. K.; KAUFFELDT, C.; RUTLEDGE, R. Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 83, p. 194-200, 1991.
- CERVERA, M.; ORTEGA, C.; NAVARRO, A.; NAVARRO, L.; PENA, L. Generation of transgenic citrus plants with tolerance to salinity gene HAL2 from yeast. **The Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 75, p. 26-30, 2000.
- COLETTA FILHO, H. D.; MACHADO, M. A.; TARGON, M. L. P. N.; MOREIRA, M. C. P.; POMPEU JUNIOR, J. Analysis of the genetic diversity among mandarins (*Citrus* spp.) using RAPD markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 102, p. 133-139, 1998.
- CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A.; GRATTAPAGLIA, D. Genetic linkage maps of *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. and mapping of Citrus tristeza virus resistance gene. **Euphytica**, Wageningen, v. 109, p. 25-32, 1999.
- CRISTOFANI, M.; NOVELLI, V. M.; OTAVIANO, A. R.; SOUZA, A. A.; MACHADO, M. A. Identificação de híbridos de cruzamentos interespecíficos em citros utilizando marcadores RAPD e SSR. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 22, p. 232-244, 2001.
- CROW, J. F. Mapping functions. **Genetics**, Maryland, v. 125, p. 669-671, 1990.
- CRUZ, R. P.; MILACH, S. C. K. Análise de RAPD. In: MILACH, S. C. K. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p. 107-116.
- DOMÍNGUEZ, A.; GUERRI, J.; CAMBRA, M.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; PEÑA, L. Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. **Plant Cell Reports**, New York, v. 19, n. 4, p. 427-433, 2000.
- FAGOAGA, C.; RODRIGO, I.; CONEJERO, V.; HINAJEROS, C.; TUSET, J. J.; ARNAU, J.; PINA, J. A.; NAVARRO, L.; PEÑA, L. Increase tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 7, p. 175-185, 2001.
- FEDERICI, C. T.; FANG, D. Q.; SCORA, R. W.; ROOSE, M. L. Phylogenetic relationship within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 96, p. 812-822, 1998.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).
- 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.
- FUNDECITRUS. Fundo de Defesa da Citricultura. **Manual de morte súbita dos citros**. Araraquara, 2006. 12 p.
- GARCIA, M. R.; ASINS, M. J.; FORNER, J.; CARBONELL, E. A. Genetic analysis of apomixis in *Citrus* and *Poncirus* by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 99, p. 511-518, 1999.
- GMITTER JUNIOR, F. G.; XIAO, S. Y.; HUANG, S.; HU, X. L.; GARNSEY, S. M.; DENG, Z. A localized linkage map of the citrus virus resistance gene region. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 92, p. 688-695, 1996.
- GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, Maryland, v. 137, p. 170-177, 1994.

- GROSSER, J. W.; CHANDLER, J. L.; DUNCAN, L. W. Production of mandarin + pummelo somatic hybrid citrus rootstocks with potential for improved tolerance/resistance to sting nematode. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, NL, v. 113, n. 1, p. 33-36, 2007.
- GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G. Protoplast fusion and citrus improvement. **Plant Breeding Reviews**, New York, v. 8, p. 339-374, 1990a.
- GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G. Somatic hybridization of *Citrus* with wild relatives for germplasm enhancement and cultivar development. **HortScience**, Alexandria, v. 25, p. 147-151, 1990b.
- GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G.; CHANDLER, J. L. Intergeneric somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species: *Citrus sinensis* and *Severinia disticha*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 75, p. 397-401, 1988a.
- GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G.; CHANDLER, J. L. Intergeneric somatic hybrid plants of *Citrus sinensis* cv. Hamlin and *Poncirus trifoliata* cv. Flying Dragon. **Plant Cell Reports**, Berlin, DE, v. 7, p. 5-8, 1988b.
- GROSSER, J. W.; MOORE, G. A.; GMITTER JUNIOR, F. G. Interspecific somatic hybrid plants from the fusion of 'Key lime' (*C. aurantifolia*) with 'Valencia' sweet orange (*C. sinensis*) protoplasts. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, NL, v. 39, p. 23-29, 1989.
- GUTIÉRREZ, M. A.; LUTH, D.; MOORE, G. A. Factors affecting *Agrobacterium* mediated transformation in *Citrus* and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. **Plant Cell Reports**, New York, v. 16, n. 11, p. 745-753, 1997.
- HALDANE, J. B. S. The combination of linkage values and the calculation of distance between the loci of linked factors. **Journal of Genetics**, London, GB, v. 8, p. 299-309, 1919.
- HUTCHISON, D. J. Rootstock development screening and selection for disease tolerance and horticultural characteristics. **Fruit Varieties Journal**, Urbana, v. 39, p. 21-25, 1985.
- INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES. **Descriptors for Citrus**. Rome, IT, 1988. 27 p.
- 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**, Shizuoka, v. 64, n. 2, p. 91-97, 1989.
- KOLTUNOW, A. M.; BRENNAN, P.; PROTOPSALTIS, S.; NITO, N. Regeneration of west Indian limes (*Citrus aurantifolia*) containing genes for decreased seed set. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 535, p. 81-91, 2000.
- KOSAMBI, D. D. The estimation of map distance from recombination values. **Annual Eugenetic**, London, GB, v. 12, p. 172-175, 1944.
- LANDER, E. S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, A.; DALY, M. J.; LINCOLN, S. E.; NEWBURG, L. MapMaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, Amsterdam, NL, v. 1, p. 174-181, 1987.
- LING, P.; DUNCAN, L. W.; ZENG, Z.; DUNN, D.; HU, X.; HUANG, S.; GMITTER JUNIOR, F. G. Inheritance of citrus nematode resistance and its linkage with molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 100, p. 1010-1017, 2000.
- LIU, B. H.; KNAPP, S. J. GMEDEL: a program for Mendelian segregation and linkage analysis of individual or multiple progeny populations using log-likelihood ratios. **Journal of Heredity**, Washington, DC, v. 81, n. 5, p. 407-418, 1992.
- LOUZADA, E. S.; GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G.; NIELSEN, B.; CHANDLER, J. L.; DENG, X. X.; TUSA, N. Eight new somatic hybrid citrus rootstock with potential for improved disease resistance. **HortScience**, Alexandria, v. 27, p. 1033-1036, 1992.
- LURO, F.; LAIGRET, F.; LORIEUX, M.; OLLITRAULT, P. Citrus genome mapping with molecular markers: two maps obtained by segregation analysis of progeny of one intergeneric cross. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 8., 1996, Sun City. **Proceedings...** Sun City: International Society of Citriculture, 1996. v. 2, p. 862-866.
- MACHADO, M. A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A. M.; OLIVEIRA, A. C. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico: Fundag, 2005. p. 223-277.
- MOORE, G. A.; TOZLU, I.; WEBER, C. A.; GUY, C. L. Mapping quantitative trait loci for salt tolerance and cold tolerance in *Citrus grandis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. hybrid populations. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 535, p. 37-45, 2000.
- MOURÃO FILHO, F. A. A.; GMITTER JUNIOR, F. G.; GROSSER, J. W. New tetraploid breeding parents for triploid seedlings citrus cultivar development. **Fruit Varieties Journal**, Urbana, v. 50, p. 76-80, 1996.

- MOURÃO FILHO, F. A. A.; MENDES, B. M. J. Hibridação somática para melhoramento de porta-enxertos em São Paulo (Somatic hybridization for rootstock improvement in São Paulo). In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS - MELHORAMENTO, 7., 2002, Bebedouro. **Anais... Bebedouro: Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro**, 2002. p. 134-140.
- NOVELLI, V. M.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A. Evaluation of microsatellite markers in cultivar of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osb.). **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 535, p. 47-50, 2000.
- OHGAWARA, T.; KOBAYASHI, S.; OHGAWARA, E.; UCHIMIYA, H.; ISHII, S. Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 71, p. 1-4, 1985.
- OLIVEIRA, A. C.; BASTIANEL, M.; CRISTOFANI-YALI, M.; AMARAL, A. M.; MACHADO, M. A. Development of genetic maps of the virus varieties 'Murcott' tangor and 'Pera' sweet orange using AFLPs markers. **Journal of Applied Genetics**, Warsaw, PL, v. 48, p. 219-231, 2007.
- OLIVEIRA, R. P.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A. Genetic linkage maps of 'Pera' sweet orange and 'Cravo' mandarin with RAPD markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, n. 2, p. 159-165, 2004.
- OLIVEIRA, R. P.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A. Integrated genetic map of citrus based on RAPD markers. **Fruits**, Paris, FR, v. 60, n. 3, p. 187-193, 2005a.
- OLIVEIRA, R. P.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A. Marcadores RAPD para mapeamento genético e seleção de híbridos de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 477-481, 2001.
- OLIVEIRA, R. P.; NOVELLI, V. M.; MACHADO, M. A. Frequência de híbridos em cruzamento entre tangerina 'Cravo' e laranja 'Pera': análise de marcadores morfológicos e RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 35, n. 9, p. 1895-1903, 2000.
- OLIVEIRA, R. P.; RADMANN, E. B. Genetic similarity of citrus fresh fruit market cultivars. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 332-334, 2005.
- OLIVEIRA, R. P.; RADMANN, E. B.; AUGUSTIN, E. Genetic characterization of new varieties and hybrids of citrus table fruit through isoenzymes. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 3, n. 1, p. 77-82, 2003.
- OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B.; JOÃO, P. L.; SOUZA, E. L. S. **Características dos principais porta-enxertos recomendados para citros no Rio Grande do Sul**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2005b. 6 p. (Embrapa Clima Temperado. Comunicado Técnico, 128).
- OLLITRAULT, P.; SUDAHONO, D. D.; LURO, F. Somatic hybridization in *Citrus*: some new hybrids and alloplasmic plants. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 8., 1996, Sun City. **Proceedings...** Sun City: International Citrus Society, 1996. v. 2, p. 907-912.
- OOIJEN, J. W. van; VOORRIPS, R. E. **JoinMap Version 3.0**: software for the calculation of genetic linkage maps (software). Wageningen: Plant Research International, 2001. 1 CD-ROM.
- PAOLI, L. G.; CAMARGO, R. L. B.; HAKAKAVA, R.; MENDES, B. J. M.; MOURÃO FILHO, F. A. A. Transformação genética de laranja 'Valência' com o gene cecropin MB39. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 42, n. 11, p. 1663-1666, 2007.
- PEÑA, L.; MARTIN-TRILLO, M.; JUAREZ, J.; PINA, J. A.; NAVARRO, L.; MARTINEZ-ZAPATER, J. M. Constitutive expression of Arabidopsis LEAFY or APETALA1, genes in citrus reduces their generation time. **Nature Biotechnology**, New York, v. 19, p. 263-267, 2001.
- PEÑA, L.; NAVARRO, L. Transgenic citrus. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry: transgenic trees**. Berlin, DE: Springer-Verlag, 1999. v. 8, p. 39-55.
- POMPEU JUNIOR, J.; FIGUEIREDO, J. O.; PIO, R. M. Melhoramento de variedades copas e porta-enxertos. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 4, p. 305-318, 1983.
- ROOSE, M. L.; FANG, D.; CHENG, F. S.; TAYYAR, R. I.; FEDERICI, C. T.; KUPPER, R. S. Mapping of citrus genome. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 535, p. 25-32, 2000.
- ROOSE, M. L.; JARRELL, D. C.; KUPPER, R. S. Genetic mapping in a *Citrus x Poncirus* F2 population. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 7., 1992, Acireale. **Proceedings...** Catania: International Society of Citriculture, 1994. v. 1, p. 210-213.
- RUIZ, C.; ASINS, M. J. Comparison between *Poncirus* and *Citrus* genetic linkage maps. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 106, p. 826-836, 2003.

- SILVA, A. C. R.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, R. L.; QUAGGIO, R. B.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; SLUYS, M. A.; ALMEIDA, N. F.; ALVES, L. M. C. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with different host specificities. **Nature**, London, GB, v. 417, p. 459-463, 2002.
- SIMONE, M.; RUSSO, M. P.; PULEO, G.; MARSAN, P. A.; LORENZONI, C.; MAROCCO, A.; RECUPERO, G. R. Construction of genetic maps for *Citrus aurantium* and *C. latipes* based on AFLP, RAPD and RFLP markers. **Fruits**, Paris, FR, v. 53, p. 383-390, 1998.
- SIMPSON, A. J. G. The genome sequence of plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, London, GB, v. 406, p. 151-159, 2000.
- SIVIERO, A. **Avaliação de métodos de inoculação de *Phytophthora parasitica* e mapeamento de QTLs de resistência em híbridos de *Citrus sunki* vs. *Poncirus trifoliata* à gomose**. 2001. 117 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, Botucatu.
- SPIEGEL-ROY, P.; KOCHBA, J. Embryogenesis in citrus tissue cultures. **Advances in Biochemical Engineering**, Berlin, DE, v. 16, p. 27-48, 1980.
- SUITER, K. A.; WENDEL, J. F.; CASE, J. S. Linkage-1: a PASCAL computer program for detection and analysis for genetic linkage. **Journal of Heredity**, Washington, DC, v. 74, p. 203-204, 1983.
- SWINGLE, W. T. The botany of *Citrus* and its wild relatives. In: REUTHER, W.; WEBBER, H. J.; BATCHELOR, L. D. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1967. v. 1, p. 190-430.
- TANAKA, T. Fundamental discussion of *Citrus* classification. **Study in Citrologia**, Osaka, v. 14, p. 1-6, 1977.
- TARGON, M. L. P. N.; MACHADO, M. A.; COLETTA FILHO, H. D.; CRISTOFANI, M. Genetic polymorphism of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osb.) varieties evaluated by random amplified polymorphic DNA. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 535, p. 51-54, 2000.
- TUSA, N.; BOSCO, G. F. Obtaining triploid plants by crossing citrus lemon cv. Femminello 2n x 4n allotetraploid somatic hybrids. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 8., 1996, Sun City. **Proceedings...** Sun City: International Society of Citriculture, 1996. v. 1, p. 133-136.
- VARDI, A.; BLEICHMAN, S.; AVIV, D. Genetic transformation of citrus protoplasts and regeneration of transgenic plants. **Plant Science**, Limerick, v. 69, p. 199-206, 1990.
- XU, X. Y.; HU, Z. Y.; LI, J. F.; LIU, J. H.; DENG, X. X. Asymmetric somatic hybridization between UV-irradiated *Citrus unshiu* and *C. sinensis*: regeneration and characterization of hybrids shoots. **Plant Cell Reports**, New York, v. 26, n. 8, p. 1263-1273, 2007.
- XU, X. Y.; LIU, J. H.; DENG, X. X. Production and characterization of intergeneric diploid cybrids derived from symmetric fusion between *Microcitrus papuana* Swingle and sour orange (*Citrus aurantium*). **Euphytica**, Wageningen, v. 136, n. 2, p. 115-123, 2004.
- YANG, Z. N.; INGELBRECHT, I. L.; LOUZADA, E.; SKARIA, M.; MIRKOV, T. E. *Agrobacterium* mediated transformation of the commercially important grapefruit cultivar Rio Red (*Citrus paradisi* Macf.). **Plant Cell Reports**, New York, v. 19, p. 1203-1211, 2000.
- YAO, J.; WU, J.; GLEAVE, A. P.; MORRIS, B. A. M. Transformation of citrus embryogenic cells using particle bombardment and production of transgenic embryos. **Plant Science**, Limerick, v. 113, p. 175-183, 1996.
- ZANEK, M. C.; REYES, C. A.; CERVERA, M.; PEÑA, E. J.; VELÁSQUEZ, K.; COSTA, N.; PLATA, M. I.; GRAU, O.; PEÑA, L.; GARCÍA, M. L. Genetic transformation of sweet orange with the coat protein gene of *Citrus psorosis* virus and evaluation of resistance against the virus. **Plant Cell Reports**, New York, v. 27, n. 1, p. 57-66, 2007.

# Fisiologia

Manoel Teixeira de Castro Neto

## Introdução

O aumento da produtividade de pomares cultivados com as plantas cítricas está diretamente relacionado ao conhecimento da fisiologia da planta, pois este viabiliza a aplicação ou o desenvolvimento de práticas culturais que favorecem a adaptação da cultura e, conseqüentemente, a expressão de seu potencial produtivo. Atualmente, os métodos ou as práticas usados na citricultura são basicamente os mesmos de décadas passadas, excluindo-se o emprego de agroquímicos, como fertilizantes e pesticidas modernos, e reguladores de crescimento (DAVIS; ALBRIGO, 1994; EL-OTMANI et al., 2000; GRAVINA, 2007; REUTHER, 1975). Em particular, a citricultura realizada em áreas tropicais, como no Nordeste brasileiro, ainda baseia-se em métodos ou práticas que foram desenvolvidos para seu manejo em ambientes subtropicais. Sendo assim, o conhecimento dos processos de crescimento e desenvolvimento da planta, bem como de sua fisiologia, em ecossistemas tropicais, certamente viabilizará a definição de práticas que favoreçam uma melhor produtividade e qualidade do produto nesses ambientes. Neste capítulo, foi feito um esforço no sentido de compreender o que ocorre com a fisiologia da planta sob condições tropicais. Em razão da ainda restrita disponibilidade de dados de estudos fisiológicos conduzidos sob tais condições, em algumas circunstâncias, foram feitas inferências fundamentadas no que se conhece sobre a fisiologia da planta cítrica.

## Crescimento da planta

A planta cítrica apresenta uma dinâmica de crescimento que está relacionada ao meio ambiente. Durante seu desenvolvimento, verificam-se mudanças no tamanho, na área foliar e no sistema radicular, todas acompanhadas de alterações ou substituições no sistema vascular da planta, sob a influência do ambiente. Na sua grande maioria, o volume de informações sobre o crescimento da planta cítrica refere-se a avaliações de sua fenologia em clima subtropical ou temperado. Relativamente, pouco se conhece sobre seu crescimento em clima tropical.

Constituinte da família Rutaceae, o gênero *Citrus* (Linnaeus) inclui variedades de laranjeiras doces [*C. sinensis* (L.) Osbeck] e azedas (*C. aurantium* L.), pomeleiros (*C. paradisi* Macfad.), tangerineiras (diversas espécies), mexeriqueiras (*C. deliciosa* Ten.), limoeiros verdadeiros [*C. limon* (L.) Burm. f.], limeiras ácidas [*C. latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka e *C. aurantiifolia* (Christm.) Swingle]

e doces (*C. limettioides* Tanaka), entre outras (KRUEGER; NAVARRO, 2008). Todas essas espécies apresentam características particulares quanto à arquitetura da planta, ao formato de folhas e hábito de crescimento. De uma maneira geral, a planta cítrica mostra-se sempre verde, com folhagem variando do verde-claro, na maioria das limeiras, ao verde-escuro, como ocorre nas mexeriqueiras.

Cultivada de maneira comercial, a planta cítrica geralmente apresenta-se com um único tronco que se ramifica entre 60 cm e 120 cm do solo, dando formação à copa da planta. Apesar de a arquitetura da copa poder sofrer a interferência de podas, ela, em muitas espécies, como nas laranjeiras doces, nos pomeleiros, nas limeiras ácidas e mexeriqueiras, naturalmente se apresenta com formato arredondado, não ultrapassando os 4 m de altura, embora pomeleiros originados de sementes possam alcançar os 20 m de altura. O tronco tem forma cilíndrica, exceto em plantas velhas, que, em muitas circunstâncias, apresentam canaletas acima do colo e abaixo da interseção do tronco com os ramos de maior tamanho. Essas canaletas são mais frequentes em limoeiros que em outras espécies de citros (SCHNEIDER, 1968).

## Morfologia da planta

A arquitetura arredondada da planta cítrica é resultado do sistema de crescimento de seus ramos. No geral, as laranjeiras doces e os pomeleiros produzem um grande número de ramos pequenos, enquanto nos limoeiros os ramos são mais longos, resultando em uma copa mais achatada.

Nas laranjeiras doces, os ramos formam-se mediante ritmos ou fluxos de crescimento sucessivos. Os ramos vegetativos formam folhas de maior tamanho, com entrenós maiores e mais numerosos que os dos ramos reprodutivos (MEDINA et al., 2005; SCHNEIDER, 1968). A ocorrência de fluxos de crescimento, assim como os subsequentes períodos de repouso, é influenciada pela combinação copa/porta-enxerto (POMPEU JÚNIOR et al., 2008), idade da árvore, estado nutricional e condições climáticas. Em climas temperado e subtropical, o período de repouso é induzido, principalmente pelas baixas temperaturas do inverno.

As plantas cítricas geralmente apresentam folhas simples, embora algumas espécies possuam folhas compostas, com pecíolo alado e limbo variando do elíptico ao oblongo. As folhas possuem um anel de abscisão entre o pecíolo e o caule ou entre o limbo e o pecíolo. Um sistema vascular eficiente distribui-se pelo limbo da folha, com o crescimento secundário do xilema dando-se apenas na nervura central e nas veias de maior diâmetro. Normalmente, as veias maiores terminam em vasos formados apenas por uma única traqueia.

As folhas possuem o mesmo padrão anatômico das espécies com sistema fotossintético  $C_3$ . A epiderme foliar é composta por uma camada de células tubulares, formando o tecido paliádico. Algumas das células desse tecido contêm cristais de oxalato de cálcio. A parte superior da folha é protegida por uma camada grossa de cutícula. Não se vê a presença de estômatos na parte superior

da folha. Nos bordos das folhas, pode-se notar a ocorrência de glândulas de óleo, que são mais frequentes na metade da extremidade da folha que na sua base. A face inferior da folha também é formada por um tecido de células tubulares, parenquimatosas, protegido por uma epiderme semelhante ao da face superior. Nesse tecido, veem-se estômatos, os quais possuem a mesma estrutura dos estômatos localizados no caule, sendo compostos por duas células-guarda, ostíolo e câmara subestomatal. A câmara subestomática liga o interior da folha ao meio externo, por onde se dá a transpiração estomática. O interior da folha é constituído de células espaçadamente arranjadas, formando o tecido esponjoso ou mesófilo.

As folhas originam-se de primórdios foliares (pontos meristemáticos) e geralmente duram duas ou mais estações sob clima subtropical. Esse período pode ser bem menor quando a planta é cultivada em clima tropical sujeito a deficit hídrico e a temperaturas de grande intensidade. O crescimento foliar é sensível ao estresse hídrico, embora a planta cítrica apresente mecanismos que minimizam seus efeitos. Na fase inicial de crescimento, mesmo um pequeno deficit hídrico diminui o crescimento das folhas e o desenvolvimento da copa, causando redução na absorção da radiação solar e, conseqüentemente, na fotossíntese. Por outro lado, se a copa já está formada, um pequeno deficit hídrico pode ter efeito pouco expressivo sobre a formação de novas folhas.

Aspectos anatômicos da folha, como a presença marcante de asas no pecíolo, têm sido empregados por melhoristas na identificação de híbridos. *C. paradisi* (pomeleiros), *C. aurantium* (laranjeiras azedas) e *C. grandis* Osbeck (toranjeiras) possuem pecíolo com asas grandes. Já nas laranjeiras doces, os pecíolos são menos alados, e os limoeiros verdadeiros não possuem essa característica.

As folhas possuem filotaxia de 3/8, como na laranjeira doce, no limoeiro verdadeiro, na limeira ácida (*C. aurantiifolia*) e em outras espécies. Na sua descrição sobre a filotaxia dos citros, Schneider (1968) cita as espécies *C. grandis* e *C. paradisi* como possuindo filotaxia 3/8 e 2/5, respectivamente. Essa confusão pode ser em virtude dos tipos de ramos observados, uma vez que a filotaxia pode variar de ramo para ramo no mesmo indivíduo (FOSKET, 1994; MEDINA et al., 2005).

Na determinação da filotaxia, a direção da espiral pode dar-se para a direita ou para a esquerda e determina a especialização da espécie na absorção de luz no processo fotossintético. Sendo assim, aquelas que apresentam maior número de folhas sem superposição absorvem mais da energia luminosa.

As gemas axilares estão localizadas na axila de cada folha e encontram-se protegidas por escamas ou catáfios. Ademais, na base interna de cada catáfio, existe uma gema acessória determinando a gema axilar como múltipla, e, na base desta, há um espinho, que pode estar situado à esquerda ou à direita, conforme a direção apresentada pela filotaxia.

O caule jovem apresenta uma seção transversal triangular que desaparece com o seu desenvolvimento, assim como o formato de zigue-zague dos fluxos de crescimento originados de gemas laterais (SCHNEIDER, 1968). Na extremidade do caule, encontra-se uma região meristemática

denominada gema apical, composta por dois tecidos geneticamente diferentes: a) uma massa de células meristemáticas com o formato de um cone, que dá origem às diversas estruturas da parte aérea da planta, e b) os primórdios foliares, juntamente com suas gemas foliares, florais e espinhos, arranjados em formato de uma espiral que se abre do topo para a base da região meristemática. A forma triangular do ramo em crescimento é por causa da forma do procâmbio e da presença de rudimentos foliares em cada um dos ângulos.

A disposição das gemas no caule determina o ângulo e o tipo de ramificação que os ramos terão, e estes determinam o formato da copa da planta, caso não haja a interferência de podas. Na tangerineira 'Ponkan' (*C. reticulata* Blanco), por exemplo, os ramos são dispostos em ângulos mais fechados, determinando uma copa mais ereta. Já na laranjeira 'Baianinha' (*C. sinensis*), os ângulos dos ramos são dispostos mais abertos, e, portanto, a copa é mais arredondada e globosa.

O formato e a altura da copa podem ser modificados pelo porta-enxerto. Entretanto, este não influencia muito o formato dos frutos e das folhas. Atualmente, dá-se prioridade a porta-enxertos que reduzem o porte da planta e aumentam sua capacidade produtiva. Plantas com copas menores facilitam a colheita e os tratos culturais, permitem plantios adensados e a obtenção de maior produtividade (MEDINA et al., 2005; POMPEU JÚNIOR et al., 2008).

O sistema vascular do caule e ramos origina-se do procâmbio e surge juntamente com os primórdios foliares, as gemas axilares, os espinhos e as gemas florais. O procâmbio apresenta tecidos contínuos, que vão de dentro de cada um dos primórdios até o cilindro provascular localizado mais abaixo do primórdio na parte mais madura do ramo. Geralmente, o tecido provascular estende-se até o oitavo internódio a partir da gema apical (MEDINA et al., 2005; SCHNEIDER, 1968). Com base no que se conhece sobre o padrão de desenvolvimento de tecidos, seria razoável pensar que o procâmbio desenvolve-se a partir de primórdios recém-formados. Entretanto, existem dúvidas sobre esse assunto, havendo a possibilidade de desenvolvimento simultâneo do procâmbio ao longo do seu comprimento e de sua diferenciação em ambos os sentidos verticais (para cima e para baixo) a partir de um ponto no caule (MEDINA et al., 2005; SCHNEIDER, 1968).

A organização geral do caule, quando imaturo, compreende o cilindro provascular, no centro, além de elementos do protoxilema, do protofloema e do tecido meristemático básico da protoderme. Na parte mais externa do tecido meristemático básico, verificam-se glândulas de óleo. O protoxilema e o protofloema vão originar o xilema e o floema, respectivamente, enquanto a epiderme provém da protoderme. A protoderme é protegida pela cutícula, embora os caules imaturos ainda não estejam cutinizados. Uma vez desenvolvida, a epiderme possui estômatos e é protegida por uma grossa cutícula.

Após o término do processo de crescimento, o caule maduro apresenta seu xilema secundário composto por vasos, traqueias e fibras. Em condição subtropical, ocorre considerável atividade cambial no final da primavera e início do verão, havendo a produção de novo xilema. Durante o verão não existe atividade cambial nem a produção de novo xilema. Nessas condições, provavel-

mente, a temperatura deve ser o principal fator determinante do comportamento dos citros. Sob condição tropical e na falta de um regime distinto de temperatura, os veranicos provocados pela distribuição irregular da precipitação, possivelmente, são o principal fator que interfere na atividade do tecido cambial. Reforçando essa hipótese, pode-se citar o fato da emissão de fluxo vegetativo após a ocorrência de chuvas. Sendo assim, seria razoável admitir que a atividade cambial da planta cítrica cultivada sob clima tropical dá-se quase que continuamente, dependendo da distribuição das chuvas.

Baixas temperaturas, quando acompanhadas de deficit hídrico, podem causar problemas na funcionalidade do sistema vascular do xilema. Nessa condição, a possibilidade de ocorrência de cavitação da coluna de água dentro do xilema, levando à perda de sua função, é maior. A cavitação insere uma bolha microscópica de ar dentro do xilema, que, em alguns casos, não pode ser removida, mesmo durante a noite (sob transpiração praticamente nula), quando pode ocorrer a reidratação dos tecidos.

O floema difere do xilema, por ser um tecido vivo e possuir um parênquima responsável pela recomposição de células, que vão perdendo suas funções ou morrendo. A recomposição do floema também está relacionada aos períodos de crescimento da planta, bem como ao regime de temperatura. Na planta cítrica, o floema apresenta-se em três estádios: a) floema em desenvolvimento e funcional, b) floema em degeneração, e c) floema não funcional. O floema em desenvolvimento origina-se do tecido cambial; a célula-mãe, ou célula do tecido cambial, divide-se para originar o elemento crivado, a célula-companheira, as células do parênquima e as fibras do floema. Sob clima subtropical, estima-se que a parte mais velha do floema tenha a idade das folhas mais velhas, com aproximadamente dois a três anos. O floema em degeneração situa-se na margem externa do floema funcional. A primeira evidência do começo da degeneração do floema é a deposição da calose, um polissacarídeo, no elemento crivado. A deposição da calose acontece na união de um elemento crivado com o outro, inviabilizando o transporte de carboidratos. O floema não funcional ocorre extensivamente no tronco e nos ramos velhos da planta, consistindo de uma camada de fibras, células do parênquima e elementos crivados e células-companheiras mortas.

## Sistema radicular

O sistema radicular dos citros é do tipo pivotante, desde que não haja quebra da radícula no transplante da muda ou em razão de outros acontecimentos durante o desenvolvimento desta. Logo após a germinação, a raiz primária é o primeiro órgão a aparecer, apresentando coloração branca leitosa e aspecto sólido, podendo apresentar pelos absorventes. Uma das características típicas da raiz primária é a presença de oito elementos do protoxilema. Contudo, na raiz filamentosas, estes podem variar de três a um, a depender de seu diâmetro. Caso a raiz primária não seja cortada, esta dará formação à raiz pivotante.

A ramificação da raiz primária ocorre poucos dias após sua formação. Geralmente, as raízes secundárias são de dois tipos: a) pioneiras, que se caracterizam por um maior tamanho e diâmetro; e b) raízes ramificadas, mais finas e filamentosas, formando um sistema fasciculado. As raízes filamentosas ocorrem em pequenos cachos ao longo da raiz principal e nas raízes secundárias de plantas mais velhas.

O crescimento radicular acontece em fluxos, nestes surgindo muitas raízes simultaneamente. O crescimento do sistema radicular pode ser interrompido por um mecanismo fisiológico acionado por determinado fator ambiental ou prática cultural. Entretanto, pode ser reiniciado no mesmo ponto de sua paralisação, no último fluxo de crescimento.

Comparando-se estruturalmente o sistema vascular da raiz com o dos caules e ramos, nota-se a disposição alternada radial do protoxilema e do protofloema na raiz e a disposição colateral dessas estruturas nos caules e ramos. Outras partes estruturais das raízes dos citros envolvem a coifa e a região de alongamento localizada logo acima da coifa. As raízes não possuem primórdios foliares, nós ou internódios. As ramificações nas raízes resultam da formação de núcleos meristemáticos no periciclo e não de gemas dormentes como acontece nos ramos. Outra diferença é a ausência de glândulas de óleo nas raízes.

Observações realizadas em diversos pomares revelaram que o sistema radicular da planta cítrica está confinado a uma área de 2 m a 3 m de raio ao redor de seu tronco, enquanto a quase totalidade das radículas localiza-se a uma profundidade de até 90 cm (MOREIRA, 1992). Entretanto, caso não haja nenhuma camada de impedimento, o sistema radicular pode atingir profundidades superiores a 3 m, com boa distribuição de raízes secundárias, formando um sistema radicular eficiente. O sistema radicular da planta cítrica comercial depende diretamente do porta-enxerto utilizado (MOREIRA, 1992), assim como das condições de clima e solo, sistema de irrigação empregado e manejo da copa (SYVERTSEN; LLOYD, 1994).

Nos solos dos Tabuleiros Costeiros, caracterizados por uma camada de impedimento, geralmente localizada entre 30 cm e 70 cm de profundidade, o sistema radicular da planta cítrica apresenta-se de forma achatada (Figura 1). Estudo com plantas de laranja 'Valência' (*C. sinensis*) enxertada em limoeiro 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck), em pomar com diferentes profundidades de cova, objetivando a quebra da camada coesa e melhor condição para o crescimento do sistema radicular (MANSUR, 2001), sugere que mesmo em covas de 120 cm de profundidade, onde houve o



Foto: Manoel T. de Castro Neto

**Figura 1.** Conformação achatada do sistema radicular de laranjeiras sobre limoeiro 'Cravo' cultivado em um Latossolo com camada adensada.

rompimento completo da camada adensada, o sistema radicular não ultrapassou a profundidade da cova. Esses resultados podem ser explicados pelo fato de que a muda já possuía um sistema radicular mal formado antes de ser plantada ou podem ser em razão da manutenção de condições de compactação nas paredes da cova de plantio.

Segundo Rezende et al. (2002, 2013), plantas enxertadas em porta-enxertos semeados diretamente no campo, cujo sistema radicular não foi mutilado ou danificado, apresentaram melhor desenvolvimento em relação àquelas formadas de modo convencional, em tubetes ou sacos plásticos, cultivadas na mesma época. A esse respeito, observações feitas em plantas produzidas em tubetes de 5 cm x 19 cm indicam que estas têm suas raízes principais podadas quando atingem o fundo dos tubetes. Essa poda natural, resultante da exposição da raiz principal ao ar, estimula a formação de muitas raízes secundárias, fazendo com que o sistema radicular adquira uma constituição fasciculada. Esses resultados indicam a necessidade da realização de pesquisas visando a um melhor entendimento da influência do sistema radicular intacto sobre o crescimento, o desenvolvimento e a produção da planta cítrica, especialmente em solos com camadas adensadas, a exemplo daqueles que ocorrem nos Tabuleiros Costeiros.

Considerando-se a fisiologia da floração da planta cítrica, uma vez gerado o impulso floral, inicia-se a diferenciação das gemas nos fluxos vegetativos das gemas dormentes, em ramos maduros e enfolhados; principia, assim, o crescimento da flor. A gema axilar começa crescendo como um fluxo vegetativo, mas, logo no seu início e após sua brotação, a gema apical é transformada em gema floral apical. As folhas no ramo em floração originam-se de primórdios que estavam presentes na gema dormente. O caule do ramo florado origina-se do meristema intercalar do ramo em crescimento. As gemas axilares do ramo em processo de floração desenvolvem-se após a formação da gema floral terminal, com o ramo apresentando ainda um tamanho de aproximadamente 1 cm (MEDINA et al., 2005; SCHNEIDER, 1968).

A sequência de desenvolvimento das estruturas florais em laranjeira doce tem início com a formação do cálice e tem continuidade até a formação dos grãos de pólen. Cada estrutura desenvolve-se acima da estrutura precedente. Após a formação do cálice, inicia-se a formação da corola e assim tem seguimento até a formação completa da flor.

A flor da laranjeira doce é composta por um cálice, contendo cinco sépalas curtas semia-derentes, que se inserem no receptáculo sem aparente linha de separação entre elas. Como nas folhas, a superfície inferior das sépalas possui estômatos, enquanto na superfície superior nota-se a presença de glândulas de óleo e cristais idioblastos.

A corola é geralmente formada por cinco pétalas distintas, que se alternam com as sépalas. As pétalas são carnosas, de coloração esbranquiçada e textura coreácea. A superfície muito cutinizada dá-lhes uma aparência cerosa. As pétalas também possuem estômatos na superfície inferior, contudo estes não são abundantes e mostram-se inseridos em suaves depressões. Glândulas de óleo são localizadas imediatamente abaixo da superfície inferior.

Os estames (microesporófitos) são geralmente em número de 20 a 40, possuem coloração esbranquiçada e bases unidas. As células epidérmicas dos filamentos possuem a parede celular primária levemente cutinizada e com forma cúbica. Na parte apical dos estames, encontram-se as anteras, com coloração amarela e quatro lóbulos. Nos lóbulos, as células-mãe dos micrósporos produzem os grãos de pólen, que são protegidos pelo tapetum. Os estames estão inseridos no disco floral, que ao iniciar seu crescimento o faz verticalmente, ao redor da base do ovário, até a queda das pétalas. O disco floral produz um néctar que é segregado pelos estômatos e, por isso, recebe também a denominação de nectário.

Completando as estruturas florais, o pistilo é formado pelo estigma, estilo e ovário. O estigma possui uma forma esférica no topo do estilo.

A floração da planta pode acontecer em inflorescências cimosas ou nas axilas das folhas dos ramos. Acontecendo em inflorescências, nas axilas das folhas, a floração é dita mista e, geralmente, produz mais frutos que a inflorescência cimosa (DAVENPORT, 1990).

Em estudos morfológicos sobre o desenvolvimento de estruturas florais, pode-se recomendar a aplicação de método em que estacas de ramos com gemas induzidas naturalmente à floração são colhidas, tratadas com reguladores de crescimento visando ao enraizamento (ácido naftalenoacético – ANA e ácido indol-3-butírico – AIB) e plantadas em areia esterilizada. Com esse procedimento, as flores têm surgimento sem que haja a ocorrência de folhas.

O número de flores produzidas é sempre muito superior ao número de frutos que efetivamente se desenvolvem. Pode-se notar, facilmente, que apesar de haver muitas flores nas inflorescências terminais, há, geralmente, apenas a formação de um único fruto. Sendo assim, infere-se que o processo de floração em citros consome muita energia na produção de flores, que são abortadas.

## Área foliar

Um dos aspectos mais importantes no tocante à produtividade das plantas cítricas é o desenvolvimento da área foliar, posto que se relaciona diretamente ao processo fotossintético. A área foliar da planta varia com diversos fatores, destacando-se o porta-enxerto como um dos mais importantes. Em laranjeiras doces, a depender do porta-enxerto, o índice de área foliar (IAF é a razão entre o somatório das áreas de todas as folhas de uma determinada copa cítrica e o espaço ocupado pela projeção desta na superfície do solo) pode chegar a 9 ou 11 (SYVERTSEN et al., 1988; YUAN et al., 2005), mas, geralmente, apresenta valores menores. Altos valores de IAF não significam, necessariamente, alta produção fotossintética da planta. Em geral, as plantas cítricas possuem uma área externa de copa menor que sua área foliar total (ERICKSON, 1968; MEDINA et al., 2005), indicando que existe considerável autossombreamento foliar. No processo fotossintético, isso é desastroso, porque as folhas sombreadas passam da condição de fonte para a de dreno de fotoassimilados produzidos, competindo com os frutos. Observações efetuadas em plantas com três anos de idade indicam que a

área externa da copa representa quase metade da área foliar, enquanto que em plantas mais velhas essa relação é menor, de aproximadamente 31% a 35% (ERICKSON, 1968; MEDINA et al., 2005).

A área foliar da planta cítrica está em constante renovação. As folhas que caem são substituídas por novas. Essa característica é mais marcante em clima tropical por causa dos constantes veranicos que afetam a planta, causando a queda de folhas e brotação de novos ramos. A duração de uma folha na planta é variável, contudo existem relatos de que ela pode permanecer na planta entre 17 e 24 meses (ERICKSON, 1968; MEDINA et al., 2005). Diversos fatores podem determinar a duração de uma folha na planta, destacando-se a temperatura, o estresse hídrico, o encharcamento do solo, deficiências na nutrição mineral, baixa umidade e ventos fortes. Problemas como doenças ou pragas da parte aérea ou do sistema radicular também causam queda de folhas.

Segundo Erickson (1968), o processo físico da abscisão foliar em citros parece começar com a expansão rápida da parede das células do parênquima no meio da camada cortical da zona de abscisão. As células em expansão criam uma tensão entre as células suberizadas e a nova camada de celulose, resultando na ruptura da lamela média. Esse autor comenta que após a abscisão, as células envolvidas no processo ficam ovaladas e com a superfície rugosa, acrescentando que, embora a maioria das mudanças ocorra antes da abscisão e necessite de muitos dias para o seu desenvolvimento, o processo de expansão das células do parênquima pode completar-se em poucas horas. Assim, para as folhas que caem durante a noite, o estímulo necessário para a extensão da parede celular deve ter ocorrido previamente. A disponibilidade de água é indicada como o fator responsável por provocar a expansão da parede celular (ERICKSON, 1968), embora o estímulo para a abscisão possivelmente ocorra em virtude da diminuição do gradiente de auxina ao longo da zona de abscisão.

Considerando o potencial produtivo da área foliar da planta cítrica, Erickson (1968) menciona que para a produção de 1 kg de frutos é necessária uma área foliar mínima de 2,3 m<sup>2</sup>, valor este encontrado em árvores de nove anos de idade. Contudo, Castro et al. (2001) indicam que é necessário 1 m<sup>2</sup> de área foliar em pomeleiros e tangerineiras para a produção de 0,45 kg e de 1 kg a 1,1 kg de frutos, respectivamente. Segundo Siqueira et al. (2000), o teor máximo de sólidos solúveis totais em frutos da variedade Hamlin (*C. sinensis*) foi encontrado quando se deixou na planta uma relação de 100 folhas/fruto.

## Fotossíntese

A fotossíntese é um dos processos mais importantes que ocorrem na planta, não apenas por ser o único na fixação de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e produção de carboidratos, mas também por sua relação com outros processos de fundamental importância, como a transpiração e a respiração.

O processo fotossintético em plantas cítricas está diretamente ligado a algumas características das folhas. Geralmente, essas características envolvem: a) taxas de assimilação de CO<sub>2</sub> e condutância

estomática relativamente baixas (em alguns casos, como em laranja doce, a taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$  é normalmente menor que  $8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); b) baixa condutância do  $\text{CO}_2$  nas células do mesófilo; c) aumento da taxa líquida de assimilação, após retirada do oxigênio ( $\text{O}_2$ ) do ar absorvido pelas folhas; d) oscilação cíclica na taxa de assimilação e na transpiração com periodicidade de 20 a 40 minutos; e) alta sensibilidade estomática ao déficit de vapor de água do ar; e f) ponto de saturação luminosa relativamente baixo (ÁVILA et al., 2012; MEDINA et al., 2005; SYVERTSEN; LLOYD, 1994).

Os estômatos são responsáveis pelo controle da fotossíntese e da transpiração, atuando no sentido de maximizar a absorção de  $\text{CO}_2$  e minimizar a perda de água pela transpiração. São sensíveis aos diversos fatores ambientais, como umidade do ar e déficit de vapor, temperatura, luminosidade e disponibilidade de água do solo (ÁVILA et al., 2012; MEDINA et al., 2005; SYVERTSEN; LLOYD, 1994).

Semelhantemente a outras espécies, nas plantas cítricas, geralmente, os estômatos são numerosos e estão localizados na parte inferior (abaxial) da folha. A localização dos estômatos nessa parte das folhas protege-os da incidência direta da luminosidade e do aumento da temperatura foliar. Em relação à intensidade luminosa, a assimilação de  $\text{CO}_2$  ou a fotossíntese aumenta linearmente até um determinado valor, denominado ponto de saturação luminosa, após o qual permanece constante. Dados de Davis e Albrigo (1994) e Syvertsen e Lloyd (1994) indicam que, para os citros, o ponto de saturação luminosa varia de  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a  $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A variação no ponto de saturação luminosa para uma mesma espécie e região ocorre, provavelmente, por causa da interação dos estômatos com outros fatores ambientais ou circunstâncias durante a sua determinação. Entretanto, na literatura pertinente, há a concordância de que o ponto de saturação luminosa, em citros, é baixo, e que apenas 30% da disponibilidade luminosa de um dia de verão com céu claro é suficiente para que o sistema fotossintético da planta atinja seu potencial máximo.

O baixo ponto de saturação luminosa das plantas cítricas é considerado uma adaptação à sombra. O uso prático dessa característica pode ser explorado pelo manejo da cultura, mediante o emprego de espaçamentos mais adensados sem que haja diminuição na produtividade ou na qualidade dos frutos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Produção de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] enxertada em limoeiro 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck), em caixas de 40,8 kg por planta, e qualidade do fruto, sob diferentes densidades de plantio, avaliadas durante três anos consecutivos.

Espaçamento (m)	Planta/ha	Ano de produção					
		1968		1969		1970	
		Caixa/planta	°Brix/acidez	Caixa/planta	°Brix/acidez	Caixa/planta	°Brix/acidez
7 x 7	204	0,79a	11,4a	2,81a	10,6a	2,53b	9,9a
7 x 5	286	0,80a	11,9a	2,68a	10,0a	1,80a	9,9a
7 x 3	476	1,25a	13,3b	1,51a	10,7a	1,37a	10,1a

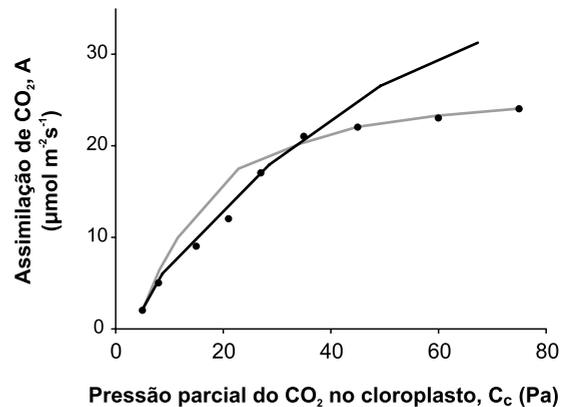
Fonte: Passos et al. (1977).

O estudo dos movimentos estomáticos em citros é importante na determinação de mecanismos reguladores das repostas de suas diferentes espécies aos fatores ambientais, relativamente à sua capacidade de adaptação tanto a regiões tropicais úmidas como a regiões semiáridas. Nesse sentido, pesquisadores procuram entender como os estômatos percebem as mudanças na condição hídrica do meio e iniciam processos para ajustar-se a distintas situações. Sugestão para explicar esse mecanismo foi apresentada por vários autores (BALLESTER et al., 2013; GARCIA-TEJERO et al., 2010; SCHULZE et al., 1987).

Embora, em citros, o controle da fotossíntese seja mais evidente em estudos envolvendo mecanismos estomáticos, as baixas taxas encontradas podem ser explicadas pela baixa condutância do  $\text{CO}_2$  nas células do mesófilo até os cloroplastos. Segundo Syvertsen e Lloyd (1994), a concentração de  $\text{CO}_2$  nos cloroplastos de *C. paradisi* e *C. limon* é muito mais baixa que na câmara subestomática. Diferenças nessa concentração podem chegar a  $80 \mu\text{mol mol}^{-1}$ . Outro problema que pode estar limitando a difusão de  $\text{CO}_2$  até os estômatos é que as folhas espessas diminuem os espaços intracelulares, dificultando a difusão do  $\text{CO}_2$ . A baixa relação entre a área dos cloroplastos e a área total da folha nas plantas cítricas também contribui para as relativamente reduzidas taxas de fotossíntese encontradas.

Além disso, como a Rubisco (ribulose bifosfato carboxilase-oxigenase) combina tanto com o  $\text{CO}_2$  quanto com o  $\text{O}_2$ , que possui maior taxa de difusão, existe uma competição entre os dois gases pelos locais de fixação da enzima. Sendo assim, a retirada do  $\text{O}_2$  do ar favorece altas taxas fotossintéticas. O aumento da concentração de  $\text{CO}_2$  nas folhas tem demonstrado que a presença de Rubisco é suficiente para que a planta atinja altas taxas fotossintéticas (Figura 2). Cabe acrescentar que o transporte de elétrons pode configurar outra limitação.

Em clima subtropical, a taxa fotossintética das plantas cítricas tem sido de aproximadamente  $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a  $8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , dependendo da idade da folha (Figura 3), conforme Iglesias et al. (2002). Valores semelhantes foram encontrados por Kriedemann (1968, 1971), Manes et al. (1999) e Syvertsen e Lloyd (1994). Valores de  $9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , sob alta intensidade luminosa ( $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), respectivamente para laranja doce e pomeleiro, foram encontrados por Davis e Albrigo (1994).



**Figura 2.** Taxa fotossintética em função da concentração interna de  $\text{CO}_2$  no cloroplasto. Linha sólida representa a limitação do processo fotossintético em virtude da concentração de Rubisco. Linha cinza representa a limitação em razão do transporte de elétrons. Fonte: adaptado de Syvertsen e Lloyd (1994).

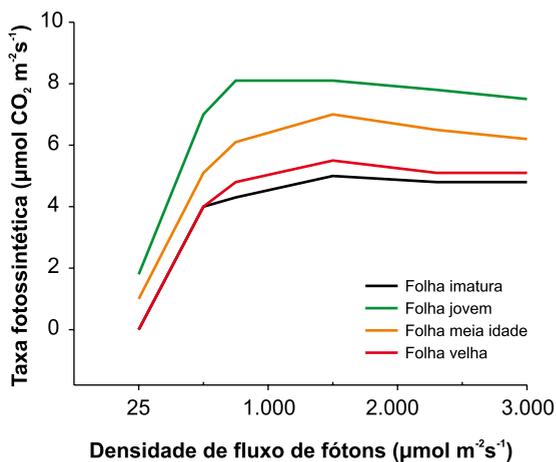


Figura 3. Taxa fotossintética de folhas com diferentes idades da tangerina 'Satsuma' (*Citrus unshiu*) cv. Okitsu.

Fonte: adaptado de Iglesias et al. (2002).

aos encontrados em regiões subtropicais. Machado et al. (2002), avaliando a fotossíntese da laranja 'Valência' sobre diferentes porta-enxertos, obtiveram resultados semelhantes aos de Mansur (2001), estes visualizados na Figura 4. No estudo conduzido por Machado et al. (2002), entretanto, o limoeiro 'Cravo' não alcançou valores superiores a  $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Embora a não disponibilidade de dados que expliquem as diferenças entre as taxas fotossintéticas de plantas cultivadas em regiões tropicais e subtropicais, sugere-se que as altas temperaturas das primeiras influenciem positivamente, dentro de certos limites, a condutância do  $\text{CO}_2$  nas células do mesófilo, aumentando a concentração desse gás nos cloroplastos.

Estudos sobre o comportamento fotossintético da planta cítrica em regiões tropicais são importantes na identificação de fatores que limitam a obtenção de altas produtividades e maior longevidade sob tais condições. Nos trópicos, variedades cítricas apresentam longevidade em geral variando entre 12 e 15 anos (DAVIS; ALBRIGO, 1994), enquanto que em climas subtropicais as mesmas variedades podem produzir satisfatoriamente até os 40 anos.

Uma análise dessas variações de comportamento, em diferentes ambientes, pode ser realizada com base em avaliações da fotossíntese e da respiração. Esta última pode influenciar negativamente a longevidade da planta por ser um processo catabólico (construção a partir da quebra de moléculas maiores) e envolver o consumo de energia e a perda de  $\text{CO}_2$  para a atmosfera. Sendo assim, a planta, sob clima tropical, com altas temperaturas médias, teria um metabolismo mais acelerado e com taxas relativamente mais elevadas. Embora a fotossíntese, sob altas temperaturas, atinja taxas mais elevadas, levando à produção de mais carboidratos, o processo de fotorrespiração, diminuindo a eficiência da fotossíntese e a respiração, também seria mais alto e favoreceria o esgotamento das reservas da planta mais rapidamente.

Estudos realizados sob clima tropical, visando determinar o comportamento de combinações de laranja 'Valência' com limoeiro 'Cravo', em um latossolo com camada natural de impedimento, identificaram uma taxa fotossintética de  $14,8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , conforme Mansur (2001) (Figura 4). Segundo a referida autora, as taxas fotossintéticas na parte da manhã foram 25% maiores que no período da tarde. Nas condições em que as medições foram realizadas, o fluxo de energia fotossinteticamente ativa raramente seria muito superior ao ponto de saturação luminosa. Os valores verificados por Mansur (2001) em região tropical, portanto, foram superiores

Segundo Erickson (1968), mesmo em clima subtropical, folhas de limoeiro verdadeiro e de laranja doce, no estágio de expansão e desenvolvimento, manifestam taxas de absorção de oxigênio mais altas que a taxa de evolução do  $O_2$  durante o processo de fotorrespiração. Essas taxas seriam maiores em clima tropical, aumentando a demanda por fotoassimilados e exigindo mais do sistema fotossintético. Em síntese, sob clima tropical, a planta seria mais demandada, mantendo um metabolismo mais acelerado, implicando na necessidade de mais energia para sua manutenção. Isso, associado aos estresses bióticos e abióticos comuns em climas tropicais, deve influenciar negativamente a longevidade da planta cítrica.

Embora os princípios bioquímicos e biofísicos relativos à aquisição de  $CO_2$  por um mecanismo metabólico  $C_3$ , como é o caso das plantas cítricas, sejam razoavelmente entendidos (FARQUHAR; CAEMMERER, 1982; HOPKINS, 2006; SHARKEY, 1985; TAIZ; ZEIGER, 2010), controvérsias ainda existem sobre a relação fonte-dreno em plantas cítricas. Evidências do controle da fotossíntese, com base na relação fonte-dreno, provêm de observações do aumento da taxa fotossintética durante o período de intensa frutificação ou crescimento vegetativo, e de baixas taxas fotossintéticas durante o período em que esses processos não estão acontecendo. Estudos envolvendo a remoção de frutos ou brotos e observações das taxas fotossintéticas têm reforçado a sugestão de que em citros a demanda por fotoassimilados aumenta a taxa fotossintética (IGLESIAS et al., 2002).

Na citricultura, a influência da temperatura sobre a planta é uma preocupação constante, principalmente porque as áreas ocupadas pela cultura, em sua maioria, estão localizadas entre as latitudes de 35° Norte e Sul (DAVIS; ALBRIGO, 1994).

Segundo Yelenosky (1991), os tecidos da planta são pobres condutores de calor, aumentando as possibilidades de dano sob o efeito direto da luz solar. As consequências do acúmulo de calor podem ser vistas pela queima de frutos, folhas e ramos internos, apresentando estes últimos a casca danificada, prejudicando a condução da seiva elaborada e abrindo janelas de entrada de doenças.

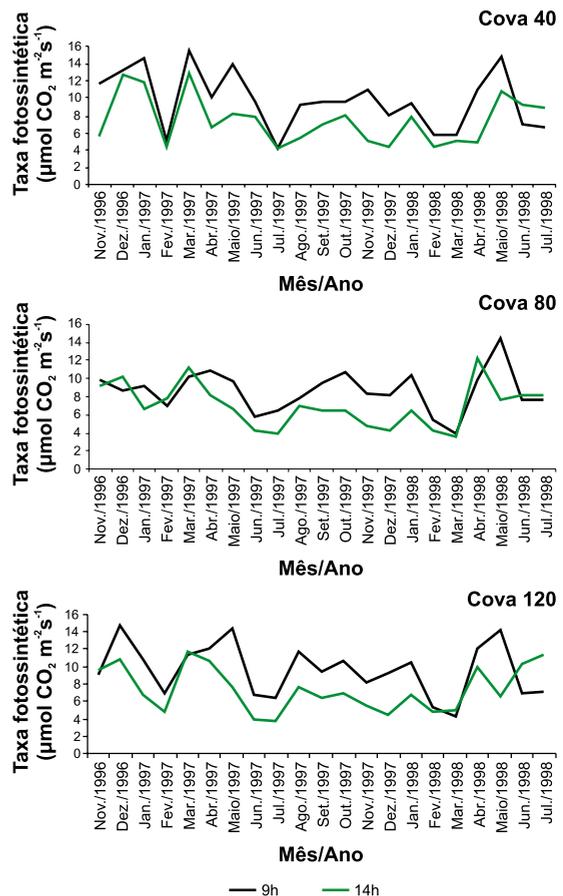


Figura 4. Comportamento fotossintético para a laranja 'Valência' sobre limão 'Cravo', de um pomar situado em Cruz das Almas, BA, sobre um Latossolo do Tabuleiro Costeiro, em covas de plantio com diferentes profundidades.

Fonte: Mansur (2001).

## Adaptação da planta cítrica ao estresse de alta temperatura

A planta cítrica possui mecanismos capazes de minimizar os danos ocasionados pelo excesso de calor, a exemplo da reflexibilidade e do enrolamento das folhas, da transpiração e até mesmo do autossombreamento. A queima de frutos de laranjeiras doces, especialmente, tem desestimulado alguns fruticultores de polos brasileiros de irrigação, particularmente os nordestinos, a implantar novos pomares, por causa da perda de qualidade da produção. A utilização de nebulizadores automáticos, acionados por sensores quando a temperatura eleva-se muito, tem reduzido expressivamente o problema da queima de frutos. Além disso, observações indicativas de que a temperatura de 48 °C é letal a frutos de 'Valência' (KETCHIE, 1969) e, de que aos 55 °C, verificam-se injúrias na folhagem de laranjeira 'Hamlin' (AHEMS; INGRAM, 1988) permitem concluir, com base nesses valores, que temperaturas letais provavelmente não ocorram em larga escala na maioria dos pomares. Objetivando proteger o fruto, vários fruticultores têm utilizado caldas fertilizantes compreendendo diferentes elementos, como cobre (Cu), manganês (Mn), magnésio (Mg), zinco (Zn) e boro (B), aplicados em combinação ou isoladamente.

Sobre o enrolamento foliar, que evita a queima da folhagem, esse mecanismo natural de proteção da planta baseia-se na diminuição da área da folha exposta à interceptação luminosa, ocasionando uma redução na carga de calor da folha, economizando água, uma vez que o processo de transpiração também tem suas taxas diminuídas. Geralmente, o encurvamento da folha ocorre quando a planta é submetida ao déficit hídrico.

Com o aumento da temperatura, em decorrência do aquecimento global (*Green House Effect*), a preocupação de seus efeitos sobre o crescimento e desenvolvimento da planta cítrica tem aumentado (REUTHER et al., 1979). Em razão disso, a procura de germoplasma com genes de tolerância a altas temperaturas, relacionado a mecanismos que evitem esse tipo de estresse ambiental, torna-se de fundamental importância para o futuro.

Na opinião de Yelenosky (1991), estudos com citros deveriam focar os efeitos de proteínas tolerantes ao calor, conhecidas como *Heat Shock Proteins*, mesmo que estas ainda não sejam razoavelmente conhecidas quanto às respostas ao estresse de temperatura. Segundo esse autor, em conformidade com Craig (1985), a possibilidade de síntese de tais proteínas, sob altas temperaturas, merece toda a atenção, na esperança de se identificar mecanismos na planta capazes de tolerar estresses dessa natureza. A formação de novas proteínas, em resposta a estresses de temperatura, aparentemente é universal, supondo-se que genes de proteínas relacionadas à tolerância ao calor sejam conservados pelo processo de evolução (VOELLMY, 1986). Em soja [*Glycine max* (L.) Merrill], muitas informações já são disponíveis relativamente a proteínas tolerantes ao calor. Semelhante conhecimento deve ser obtido em relação aos citros.

Ainda considerando a solução de problemas relacionados ao estresse de temperatura, estudos sobre o efeito da giberelina e de outros reguladores de crescimento na reversão da inibição do crescimento da planta têm sido propostos (MATSUI et al., 1986), além da determinação de níveis de termotolerância, mediante a exposição da planta a estresses hídricos progressivos, empregando diferentes concentrações de Cu, cádmium (Cd) e Zn, em razão destes não demandarem a síntese de proteínas tolerantes ao calor em plântulas de milho (*Zea mays* L.) (BENHAM-SMITH et al., 1987).

O estresse de temperatura parece não ser muito severo na determinação de nanismo em laranjeiras doces, bem como em macieira (*Malus domestica* Borkh.) (STEFFENS et al., 1989), embora aparentemente cause danos aos pigmentos fotossintéticos, interferindo no sistema de transporte de elétrons. Em maracujá (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.), temperaturas entre 48 °C e 52 °C inativam o sistema fotossintético I, mediante a foto-oxidação do citocromo-554 e de componentes das membranas dos cloroplastos. Esses eventos podem ser empregados como indicadores no monitoramento de danos causados aos tecidos vegetais pelo estresse de calor (SMILLE, 1979).

## Deficit hídrico

Há muito conhecido, o deficit hídrico é o estresse ambiental que causa mais prejuízos às plantas, afetando sensivelmente seu desenvolvimento pela paralisação do crescimento celular, tanto em expansão de volume quanto em número de células, além de inibir a síntese de proteínas. Dependendo da intensidade e da duração do estresse imposto à planta, todos os processos fisiológicos são afetados.

Grande parte dos pomares baianos e sergipanos, principais produtores nordestinos de citros, à semelhança do que se verifica em todo o País, não é irrigada, sendo as plantas, portanto, dependentes de chuvas adequadas ao seu desenvolvimento. Em tais sistemas de cultivo, as plantas ficam sujeitas a períodos de deficit hídrico, por causa da distribuição irregular das chuvas. Além de afetar o crescimento das plantas, os frequentes veranicos observados em muitas áreas tropicais, causados pela distribuição irregular das chuvas, especialmente no Nordeste brasileiro, provocam a formação de vários ciclos de floração, fazendo com que, em uma determinada fase fenológica, seja possível encontrar flores, frutos e ramos vegetativos em diferentes estádios de desenvolvimento. Não havendo sincronia entre os diferentes estádios de desenvolvimento da planta, a produção e sua qualidade ficam prejudicadas. Verifica-se uma competição pela distribuição de fotoassimilados entre os diversos órgãos da planta em desenvolvimento, diminuindo ou até mesmo inviabilizando a translocação de substâncias de reserva para os frutos (GOLDSCHMIDT; GOLOMB, 1982).

Segundo Reuther (1975), a planta cítrica não apresenta características xeromórficas que a capacitariam a resistir a longos períodos de deficit hídrico. De acordo com esse autor, as espécies comerciais de citros são oriundas de regiões tropicais úmidas, não possuem, portanto, tais características, apresentando, geralmente, uma natureza mesofítica. Os citros, em sua maioria de espécies,

possuem um sistema radicular moderadamente superficial, com hábito de crescimento lateral, não adaptado à sobrevivência em ambientes sujeitos a estiagens prolongadas. Tais espécies, além disso, apresentam folhas sempre verdes, largas e finas, sendo o córtex dos ramos suculento, não especializado no sentido de limitar a perda de água pela transpiração e resistir a temperaturas extremas.

Muito da tolerância ao deficit hídrico manifestada pelas diferentes espécies está, entretanto, relacionada ao mecanismo estomático, resistência do protoplasto à dissecação e ao sistema radicular pivotante. Segundo Syvertsen e Lloyd (1994), a ocorrência de estômatos quase que exclusivamente na superfície inferior da folha e a presença de uma camada de cera sobre a superfície foliar capacitam a planta cítrica a resistir a períodos de estiagem, desde que não muito longos. A esse respeito, estudos dirigidos ao sistema radicular, sob condições de deficiência hídrica localizada (EISSENSTAT et al., 1999; ESPELETA; EISSENSTAT, 1998; KOSOLA; EISSENSTAT, 1994), sugerem que a planta cítrica pode tolerar períodos de deficit hídrico de aproximadamente 50 dias, contanto que parte de suas raízes possa acessar a água armazenada em camadas mais profundas do solo.

Savé et al. (1995), analisando características morfológicas e fisiológicas de diferentes espécies de citros, sugerem que a arquitetura da copa da planta, a disposição e o tamanho das folhas e o controle estomático da perda de água são aspectos importantes na relação da planta com o deficit hídrico. Entretanto, as espécies estudadas, apesar de não realizarem ajustamento osmótico, mecanismo este eficiente na manutenção da turgescência das células sob estresse hídrico, manifestaram um ajustamento elástico, ou seja, mudanças nas características elásticas da parede celular, o que confere a algumas espécies um mecanismo de tolerância ao estresse hídrico. Outra característica evidenciada foi a manutenção da transpiração cuticular das espécies mais tolerantes ao estresse hídrico. Nesse estudo, o tangor (*C. reticulata* x *C. sinensis*) foi mais tolerante ao estresse hídrico que a laranja doce. Em outros trabalhos, Levy e Syvertsen (1981) reiteram que a habilidade da planta cítrica em resistir ao estresse hídrico está relacionada ao controle estomático da transpiração e à presença de uma camada cuticular cerosa na superfície das folhas.

As relações hídricas da planta cítrica, tanto em ambientes tropicais como subtropicais, provavelmente são semelhantes. Entretanto, em virtude das condições ambientais serem mais regulares em clima subtropical, em que ocorre uma melhor definição das estações, as diversas fases fenológicas do desenvolvimento da planta cítrica em ambiente tropical ficam sujeitas à ocorrência de estresses hídricos. Sendo assim, é de fundamental importância o conhecimento da sensibilidade das diversas fases fenológicas a tais estresses. A esse respeito, o período de crescimento do fruto é umas das fases fenológicas mais sensíveis. Segundo Dreyer (1993), o efeito do estresse hídrico durante a fase de frutificação depende do estágio de desenvolvimento em que se encontra o fruto. De acordo com o referido autor, existem três fases de desenvolvimento do fruto, conforme visualizado na Figura 5, em que a fase inicial dá-se em setembro e a final, em julho.

O estresse hídrico, na primeira fase, não é muito crítico em relação ao crescimento do fruto; nessa fase o estresse acarretará a queda de frutos, diminuindo o número de frutos por planta e ten-

dendo a baixar a produtividade. Entretanto, caso nas fases subsequentes ocorram condições de desenvolvimento favoráveis, a planta pode compensar a perda de frutos aumentando o tamanho e peso destes, em virtude de uma menor competição por fotoassimilados. O estresse hídrico, na segunda fase, determina os efeitos negativos mais expressivos ao crescimento do fruto, os quais não podem ser compensados nas fases subsequentes, mesmo com a manifestação de boas condições ambientais. O estresse hídrico, durante a terceira fase, tem um efeito limitado ao crescimento do fruto, também podendo ser compensado.

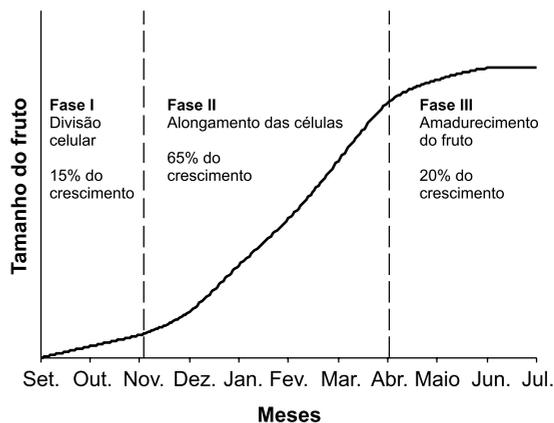


Figura 5. Estádios de crescimento do fruto da laranja (*Citrus sinensis*).

Fonte: adaptado de Dreyer (1993).

Estresses hídricos intermitentes causam sérios prejuízos à qualidade do fruto. A esse respeito, é comum em pomares, sob condições tropicais, o aparecimento de rachaduras nos frutos. Esse problema ocorre em razão de uma condição de estresse durante a segunda fase de desenvolvimento do fruto, causando um engrossamento nas paredes das células, tornando-as rígidas. Com a incidência de chuvas após essa fase, a entrada de água nos frutos provoca sua rachadura, danificando-os para a comercialização. Outro problema é a ocorrência de estresse hídrico na fase de amadurecimento do fruto, que provoca o direcionamento de sua água para outras funções da planta, deixando-os parcialmente secos.

Sob condições tropicais, sem irrigação, após os veranicos, pode-se notar claramente que o próprio estresse hídrico estimula a floração da planta (DAVENPORT, 1990), ocasionando diversas fases fenológicas distintas e simultâneas, levando a uma queda de qualidade e produtividade. O estresse hídrico também predispõe a planta a doenças, que não a atacariam caso a condição de estresse não fosse imposta. Certamente, plantas com viroses ou bacterioses (tristeza, cancro-cítrico, etc.), por exemplo, exteriorizarão os sintomas dessas enfermidades de forma mais acentuada sob condição de estresse. Além disso, é muito comum a morte de plantas após longos períodos de estiagem.

As informações apresentadas indicam, portanto, que, na exploração econômica da citricultura sob condições tropicais, é de fundamental importância utilizar variedades que possam se adaptar ou resistir a períodos de estresse hídrico. Nesse sentido, deve-se priorizar o uso de porta-enxertos cujo sistema radicular seja capaz de acessar a água armazenada em camadas mais profundas do solo. Também é importante o emprego de técnicas de manejo do solo e de cultivo que possibilitem uma maior conservação e aproveitamento da água disponível, como a utilização de subsolagem e o uso de cobertura morta. Essas duas técnicas permitem um maior aprofundamento do sistema

radicular durante os períodos chuvoso e seco, respectivamente, viabilizando altas produtividades em ambientes sujeitos a deficit hídrico.

## Floração da planta cítrica

O processo de floração em plantas tem sido objeto de inúmeros trabalhos e revisões em razão de sua importância primordial na produção agrícola (BERNIER et al., 1981a, 1981b; DAVENPORT, 1990). Tem sido estudado mais frequentemente em plantas herbáceas que sofrem uma forte influência do fotoperíodo (BERNIER et al., 1993; O'NEILL, 1992), historicamente considerado de fundamental relevância para a floração de certas espécies.

Na maioria das plantas, o processo de floração tem ocorrido sob influência de algum tipo de sinal do ambiente em que se encontram. Geralmente, a maioria das espécies completa seu ciclo reprodutivo dentro de condições ambientais favoráveis. O grande desafio dos fisiologistas vegetais e biólogos tem sido a identificação dos fatores ambientais responsáveis pela mudança do metabolismo vegetativo para o metabolismo reprodutivo, destacando-se, como principais, o fotoperíodo, a temperatura e o deficit hídrico (BERNIER et al., 1993).

O processo de floração da planta cítrica foi revisado por Davenport (1990), podendo-se supor que ele ocorra segundo dois acontecimentos distintos: indução e iniciação. A indução é tida como o fator que promove a mudança do metabolismo vegetativo para o reprodutivo. Segundo esse autor, a indução é percebida pelas gemas meristemáticas tanto nos ápices dos ramos como as localizadas ao longo deles, em suas axilas foliares. Uma vez percebido o fator indutor, dá-se o desencadeamento de uma série de processos fisiológicos que levam à floração. Dentre esses processos, verifica-se um aumento de etileno concomitante com uma redução na concentração de giberelina. Os ramos em floração também têm apresentado maior concentração de carboidratos que aqueles sem floração.

A iniciação segue a indução e consta da diferenciação da gema meristemática dando formação aos órgãos florais. É na iniciação que, realmente, dá-se a formação da inflorescência, sendo, para tanto, necessário que a gema ou o tecido meristemático esteja crescendo.

Nem todas as espécies ou variedades de plantas cítricas respondem de maneira semelhante aos fatores ambientais. Por meio dessas respostas particulares, podem-se identificar diferenças na sensibilidade de distintas espécies e cultivares aos variados fatores indutores de floração (DAVENPORT, 1990).

Um agente complicador na determinação dos principais fatores indutores da floração em plantas é que eles podem interagir entre si e dificultar a compreensão da participação de cada fator *per se* no processo de indução. Sendo assim, em regiões de clima temperado geralmente a floração da planta cítrica acontece no final do inverno, quando os dias são curtos. Nesse caso, o fator temperatura confunde-se com o fator fotoperíodo.

A maioria dos estudos sobre floração em citros foi realizada sob condição de campo, o que dificulta a diferenciação da potencialidade de cada fator, individualmente, como indutor floral. Muitos fisiologistas e fitotecnistas, entretanto, parecem concordar que o efeito das baixas temperaturas é mais evidente que o do fotoperíodo como indutor floral. Temperaturas entre 20 °C e 26 °C durante o dia e entre 8 °C e 12 °C durante a noite induzem a floração em plantas cítricas, enquanto que, ao contrário, temperaturas entre 32 °C e 36 °C durante o dia inibem sua floração (DAVENPORT, 1990).

O conhecimento do efeito dos fatores ambientais sobre a floração da planta cítrica tem permitido programar épocas de colheita e determinar o manejo da cultura.

Cabe acrescentar que a indução floral em plantas jovens, visando à produção precoce de frutos, é de grande importância em programas de melhoramento genético, em razão de possibilitar a antecipação de resultados de hibridações, sendo este um dos usos que se pode dar ao conhecimento dos mecanismos de floração dos citros. A indução floral em mudas recém-formadas de citros acontece naturalmente em viveiros localizados em áreas subtropicais, como resposta a baixas temperaturas. Em áreas tropicais, esse processo poderá ser imitado em condições controladas mediante o emprego de câmaras de crescimento com controle de temperatura, a exemplo do que se tem obtido, com sucesso, em mangueira (*Mangifera indica* L.).

## Referências

- AHEMS, M. J.; INGRAM, D. L. Heat tolerance of citrus leaves. **HortScience**, Alexandria, v. 23, p. 747-748, 1988.
- ÁVILA, C.; GUARDIOLA, J. L.; NEBAUER, S. G. Response of the photosynthetic apparatus to a flowering-inductive period by water stress in *Citrus*. **Trees**, New York, v. 26, n. 3, p. 833-840, 2012.
- BALLESTER, C.; CASTEL, J.; INTRIGLILOLO, D. S.; CASTEL, J. R. Response of navel Lane late citrus trees to regulated deficit irrigation: yield components and fruit composition. **Irrigation Science**, New York, v. 31, n. 3, p. 333-341, 2013.
- BENHAM-SMITH, P. C.; KAPOOR, M.; BEWLEY, J. D. Establishment of thermotolerance in maize by exposure to stresses other than a heat shock does not require heat shock protein synthesis. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 85, p. 575-580, 1987.
- BERNIER, G.; KINET, J. M.; SACHS, R. M. **The physiology of flowering**: transition to reproductive growth. Boca Raton: CRC Press, 1981b. v. 2.
- BERNIER, G.; KINET, J. M.; SACHS, R. M. **The physiology of flowering**: the initiation of flowers. Boca Raton: CRC Press, 1981a. v. 1.
- BERNIER, G.; LANGE, A. H.; HOUSE, C.; JEAN, A. P.; JEJUNE, P. Physiology signals that induce flowering. **The Plant Cell**, Rockville, v. 5, p. 1147-1155, 1993.
- CASTRO, P. R. C.; MARINHO, C. S.; PAIVA, R. E.; MENEGUCCI, J. L. P. Fisiologia da produção dos citros. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 22, n. 209, p. 26-38, 2001.
- CRAIG, E. A. The heat shock response. **Critical Reviews in Biochemistry**, Cleveland, v. 18, p. 239-280, 1985.
- DAVENPORT, T. L. Citrus flowering. **Horticultural Reviews**, Westport, v. 12, p. 349-408, 1990.
- DAVIS, F. S.; ALBRIGO, L. G. **Crop production science in horticulture 2**: citrus. Wallingford: CAB International, 1994. 254 p.
- DREYER, F. Producing citrus under drought conditions. **Citrus Journal**, Johannesburg, v. 3, n. 5, p. 27-29, 1993.
- EISSENSTAT, D. M.; WHALEY, E. L.; VOLDER, A.; WELLS, C. E. Recovery of citrus surface roots following prolonged exposure to dry soil. **Journal of Experimental Botany**, London, GB, v. 50, n. 341, p. 1845-1854, 1999.

- EL-OTMANI, M.; COGGINS, C. H.; AGUSTÍ, M.; LOVATT, C. Plant growth regulators in citriculture: world current uses. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Oak Ridge, v. 19, n. 5, p. 395-447, 2000.
- ERICKSON L. C. The general physiology of citrus. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L. D.; WEBBER, H. J. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1968. v. 2, p. 86-126.
- ESPELETA, J. F.; EISSENSTAT, D. M. Responses of citrus fine roots to localize soil drying: a comparison of seedlings with adult fruiting trees. **Tree Physiology**, Palo Alto, v. 18, p. 113-119, 1998.
- FARQUHAR, G. D.; CAEMMERER, S. von. Modeling of photosynthetic responses to environmental conditions. In: LANGE, O. L.; NOBEL, P. S.; OSMOND, C. B.; ZIEGLER, H. (Ed.). **Encyclopedia of plant physiology**. New York: Springer-Verlag, 1982. p. 549-587. (Physiological plant ecology, v. 12B).
- FOSKET, D. E. **Plant growth and development: A molecular approach**. San Diego: Academic Press, 1994. 580 p.
- GARCIA-TEJERO, I.; VICENT, R. R.; JIMÉNES-BOCANEGRA, J. A.; MARTINEZ-GRACÍA, G.; DURÁN-ZUAZO, V. H.; MURIEL-FERNÁNDEZ, J. L. Response of citrus trees to deficit irrigation during different phenological periods in relation to yield, fruit quality, and water productivity. **Agricultural Water Management**, Amsterdam, NL, v. 97, n. 5, p. 689-699, 2010.
- GOLDSCHMIDT, E. E.; GOLOMB, A. The carbohydrate balance of alternate-bearing citrus trees and the significance of reserves for flowering and fruiting. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 107, n. 2, p. 206-208, 1982.
- GRAVINA, A. Aplicación del ácido geberélico em citrus: revisão de resultados experimentales em Uruguay. **Agrociencia**, Montevideo, UY, v. 11, n. 1, p. 57-66, 2007.
- HOPKINS, W. **The green world: Photosynthesis and respiration**. New York: Chelsea House, 2006. 168 p.
- IGLESIAS, D. J.; LLISO, I.; TADEO, F. R.; TALON, M. Regulation of photosynthesis through source: sink imbalance in citrus is mediated by carbohydrate content in leaves. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, DK, v. 116, p. 563-572, 2002.
- KETCHIE, D. O. The effect of high temperature in citrus. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1968, Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1969. v. 1, p. 267-270.
- KOSOLA, H. R.; EISSENSTAT, D. M. The fate of surface roots of citrus seedling in dry soil. **Journal of Experimental Botany**, London, GB, v. 45, n. 280, p. 1639-1645, 1994.
- KRIEDEMANN, P. E. Photosynthesis and transpiration and function of gaseous diffusive resistances in orange leaves. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, DK, v. 24, p. 218-225, 1971.
- KRIEDEMANN, P. E. Some photosynthetic characteristics of citrus leaves. **Australian Journal of Biological Sciences**, Victoria, v. 21, p. 895-905, 1968.
- KRUEGER, R. R.; NAVARRO, L. Citrus germoplasm resources. In: KHAN, I. A. **Citrus breeding and biotechnology**. Cambridge: CABI International, 2008. p. 45-140.
- LEVY, Y.; SYVERTSEN, J. P. Water relations of citrus in climates with different evaporative demands. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, Tokyo, JP, v. 2, p. 501-503, 1981.
- MACHADO, E. C.; MEDINA, C. L.; GOMES, M. M. A.; HABERMANN, G. Variação sazonal da fotossíntese, condutância estomática e potencial da água na folha de laranja 'Valência'. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, n. 1, p. 53-58, 2002.
- MANES, F.; SEUFERT, G.; VITALE, M.; DONATO, E.; CSIKY, O.; SILLI, V. Ecophysiological characterization of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck and relationships with type and amount of biogenic emissions. **Physics and Chemistry of the Earth, Part B: Hydrology, Oceans and Atmosphere**, New York, v. 24, n. 6, p. 699-703, 1999.
- MANSUR, H. C. N. **Desenvolvimento da laranja 'Valência' plantada em diferentes profundidades de cova em Latossolo Amarelo, nos Tabuleiros Costeiros do Recôncavo Baiano**. 2001. 89 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- MATSUI, S.; RYUGAR, K.; KLIOWER, W. M. Growth inhibition of Thompson Seedless and Napa Gamay berries by heat stress and its partial reversibility by application of growth regulators. **American Journal of Enology and Viticulture**, Reedley, v. 37, p. 67-71, 1986.
- MEDINA, C. L.; RENA, A. B.; SIQUEIRA, D. L.; MACHADO, E. C. Fisiologia dos citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônomo: Fundag, 2005. p. 147-195.
- MOREIRA, C. S. O sistema radicular das plantas cítricas. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS, 2., 1992, Bebedouro. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1992. p. 182-186.

O'NEILL, S. D. The periodic control of flowering: progress toward understanding the mechanism of induction.

**Photochemistry and Photobiology**, Elmsford, v. 56, n. 5, p. 789-801, 1992.

PASSOS, O. S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; COELHO, Y. S.; RODRIGUES, E. M. Behavior of orange trees under three spacing in the State of Bahia, Brazil. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF THE SOCIETY OF CITRICULTURE, 1., 1977, Lake Alfred.

**Proceedings...** Orlando, 1977. v. 1, p. 169-171.

POMPEU JÚNIOR, J.; BULMER, S.; POMPEU, B. G. Tangerinas como porta-enxertos para laranjeiras 'Pêra'. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1218-1223, 2008.

REUTHER, W. Potential for citrus culture in the Amazon Valley. In: ALVIM, P. T. (Ed.). **Ecophysiology of tropical crops**. Itabuna: CEPLAC, 1975. v. 2, p. 228-258. Reprints of paper presented at the International Symposium on Ecophysiology of Tropical Crops, 1975, Manaus, Brazil.

REUTHER, W.; NAUER, E. M.; ROISTACHER, C. N. Some high temperature effects on citrus growth. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 104, p. 353-356, 1979.

REZENDE, J. de O. Plantio direto: mito ou realidade. **Bahia Agrícola**, Salvador, v. 9, n. 2, p. 72-85, 2013.

REZENDE, J. de O.; MAGALHÃES, A. F. de J.; SHIBATA, R. T.; ROCHA, E. S.; FERNANDES, J. C.; BRANDÃO, F. J. C.; REZENDE, V. J. R. P. **Citricultura nos solos dos Tabuleiros Costeiros**: análise e sugestões. Salvador: Secretaria da Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária, 2002. 97 p.

SAVÉ, R.; BIEL, C.; DOMINGO, R.; RUIZ-SÁNCHEZ, C.; TORRECILLAS, A. Some physiological and morphological characteristics of citrus plants for drought resistance. **Plant Science**, Limerick, v. 110, p. 167-172, 1995.

SCHNEIDER, H. The anatomy of citrus. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L. D.; WEBBER, H. J. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1968. v. 2, p. 1-85.

SCHULZE, E. D.; TURNER, N. C.; GOLLAN, T.; SHACKEL, K. A. Stomatal responses to air humidity and to soil drought. In: ZEIGER, E.; FARQUHAR, G. D.; COWAN, I. R. (Ed.). **Stomatal function**. Stanford: Stanford University Press, 1987. p. 311-321.

SHARKEY, T. D. Photosynthesis in intact C3 plants: physics, physiology and rate limitations. **Botanical Review**, Bronx, v. 51, p. 53, 1985.

SIQUEIRA, D. L. de; PEREIRA, W. E.; SALOMÃO, L. C. C.; BENEDITO, V. A. Características físicas e químicas do fruto da laranja 'Hamilin' em função do número de folhas e de anelamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, n. 1, p. 106-110, 2000.

SMILLE, R. M. Coloured components of chloroplast members as intrinsic membrane probes for monitoring the development of heat injury in intact tissues. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 6, p. 121-133, 1979.

STEFFENS, G. L.; JACOBS, F. W.; ENGELHAUPT, M. E. Thermosensitive genetic dwarfs of apple. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, DK, v. 76, p. 368-374, 1989.

SYVERTSEN, J. P.; LLOYD, J. J. Citrus. In: SCHAFFER, B.; ANDERSEN, P. C. (Ed.). **Handbook of environmental physiology of fruit crops**: sub-tropical and tropical crops. Boca Raton: CRC Press, 1994. v. 2, p. 65-99.

SYVERTSEN, J. P.; LLOYD, J. J.; KRIEDEMANN, P. E. Salinity and drought stress effect on foliar iron concentration, water relation and photosynthetic characteristics of orchard citrus. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 39, p. 619-627, 1988.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Sunderland: Sinauer Associates, 2010. 782 p.

VOELLMY, R. The heat shock genes: a family of highly conserved genes with a superbly complex expression pattern. **Bioessays**, Cambridge, v. 1, p. 213-217, 1986.

YELENOSKY, G. Responses and adaptation of citrus trees to environmental stresses. **Israel Journal of Botany**, Jerusalem, IL, v. 40, p. 239-250, 1991.

YUAN, R.; ALFEREZ, F.; KOSTENYUK, I.; SINGH, S.; SYVERTSEN, J. P.; BURNS, J. Partial defoliation can decrease average leaf size but has little effect on orange tree growth, fruit yield and juice quality. **Hortscience**, Alexandria, v. 40, n. 7, p. 2011-2015, 2005.



# Fisiologia dos frutos e tratamento pós-colheita

Marcos Pozzan

## Introdução

O Brasil sempre possuiu vocação e aptidões naturais para a produção dos mais diversos tipos de frutíferas, como abundância de terras e clima favorável, desde o ambiente úmido e quente dos trópicos até o clima subtropical da região Sul, passando por inúmeras microrregiões específicas que conferem vários atributos qualitativos às espécies frutíferas.

Não é por menos que o País é hoje o terceiro produtor mundial de frutas. Combinando-se novas fronteiras agrícolas, aumento do consumo de alimentos e, dentro desse parâmetro, o aumento do consumo de frutas consideradas como alimento funcional, os incentivos promovidos aos agricultores, como recursos para aquisição de terras, máquinas, equipamentos para irrigação e modernização do sistema de logística, incluindo-se aí a cadeia de frio e exportação, em poucos anos o País poderá se tornar o celeiro de produção frutícola mundial. O nome *Brazilian fruit* já é hoje uma realidade.

O que falta é o alinhamento de toda a cadeia, como é o caso das exportações de frutas, já que existem previsões do Instituto Brasileiro de Frutas (Ibraf) de um crescimento dos atuais US\$ 559,5 milhões para US\$ 1,7 bilhão em 2020, com crescimentos anuais na faixa de 5% a 8% ao ano, tendo como destino os principais países importadores da Europa (INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS, 2010).

Outros fatos que tornam o negócio muito atrativo é que ele mobiliza, também segundo o Ibraf (NOGUEIRA, 2010), 5 milhões de postos de trabalhos. Cada R\$ 20 mil investidos geram três empregos diretos e dois indiretos, alto investimento por hectare e baixo tempo de retorno. Pequenas propriedades podem ser exploradas com intensiva mão de obra e alto retorno sobre o investimento.

Diante de todo esse cenário otimista, há de se considerar que ainda existem perdas significativas de frutas no ponto da sua maior vulnerabilidade, que são os ataques de fungos e outros organismos na pós-colheita, além das reações biológicas como respiração e transpiração, quando já não contam com aportes de água, nutrientes e proteção natural da planta. É a partir daí que se inicia uma corrida contra o tempo, contra a senescência natural a que toda fruta é submetida.

Torna-se imprescindível, por isso, a utilização de tratamentos pós-colheita que vão retardar essas reações adversas, aumentando o tempo de vida útil desde seu desligamento da planta até a chegada aos mercados consumidores internos ou internacionais, levando-se em conta grandes percursos a serem percorridos e muitas vezes em situações de extrema adversidade. O uso de tecnologias, desde a pré-colheita até as casas de embalagem, vem se intensificando e se modernizando com o emprego de produtos como sanitizantes, ceras das mais diversas espécies e misturas e fungicidas pós-colheita que são hoje e serão cada dia mais importantes na extensão da vida das frutas, permitindo que elas abasteçam os mais diversos mercados consumidores, com grandes aportes de divisas para toda a economia local.

## Aspectos da fisiologia dos frutos cítricos

### Desenvolvimento fisiológico

Os frutos cítricos, quando se encontram unidos à árvore, apresentam um comportamento que se caracteriza pelo aporte de substâncias nutritivas mediante o fluxo constante de seiva, que contém como componentes principais a água e produtos produzidos pela fotossíntese. Para um melhor entendimento das modificações que ocorrem nas fases pré e pós-colheita, ou seja, a partir do momento em que o fruto é separado da árvore pela colheita, torna-se necessário o conhecimento da sua fisiologia durante as fases finais do seu desenvolvimento ainda na árvore, das principais reações internas e dos fatores ambientais que vão afetá-lo com maior ou menor intensidade. Essas reações vão ter um papel preponderante ao longo de toda sua vida na pós-colheita.

A fase de pré-maturação pode ser caracterizada pelo aumento significativo do volume do fruto, apesar de ele ainda não estar pronto para o consumo, segundo Chitarra e Chitarra (1990). Na maturação propriamente dita, o fruto emerge de um estágio incompleto, atingindo o crescimento pleno e a máxima qualidade comestível. Nessa fase, ocorrerão mudanças na cor, no sabor e na textura, tanto da casca como da polpa, além da intensificação da produção das ceras cuticulares, que os protegem das perdas de peso ainda na árvore e os protegerão dessas perdas durante sua vida na pós-colheita. Grande parte desse processo ocorre, portanto, com o fruto ainda não colhido.

A etapa final da maturação é conhecida como amadurecimento, durante a qual o fruto cítrico apresenta-se completamente desenvolvido com relação à sua aparência e qualidade para consumo. As principais mudanças que ocorrem durante essa fase são químicas. Logo após esse período, ocorre a senescência, quando os processos bioquímicos de envelhecimento substituem as trocas químicas do amadurecimento, já que na fase final a capacidade de síntese é muito limitada, e, a partir de um dado momento, as transformações levam à degradação, ocasionando a perecibilidade do fruto.

A partir do momento da colheita, a situação de equilíbrio entre o fruto e a árvore, que se iniciou a partir do pegamento dele (*fruit set*), rompe-se bruscamente, e as perdas causadas pelos processos fisiológicos da respiração e transpiração não serão mais compensadas, passando o fruto a depender exclusivamente de si mesmo, utilizando-se de suas reservas. Apesar de estar separado da árvore, o fruto possui vida própria, e seus processos metabólicos continuarão em atividade, levando a uma perda gradual de suas qualidades estéticas e organolépticas, relacionadas ao sabor e à qualidade como alimento.

Os fatores que permitirão que o fruto seja mais ou menos resistente às condições adversas da pós-colheita são muitos e difíceis de serem analisados separadamente, uma vez que atuam em conjunto e apresentam diferentes intensidades ao longo do período do seu desenvolvimento, tanto na pré como na pós-colheita propriamente dita. Aspectos como a combinação variedade e porta-enxerto, idade da planta, zona de cultivo, práticas culturais (irrigação, tratamentos hormonais, ataques de pragas e doenças, estresses ao longo da colheita e transporte), manuseios e tratamentos a partir da chegada ao local do processamento, conhecido como casa de embalagem ou *packing house* são alguns desses fatores. Todos eles terão forte influência na vida de prateleira dos frutos. Não obstante esses fatores e para fins didáticos, serão detalhados os principais fenômenos relacionados à fisiologia da maturação dos frutos cítricos.

## Respiração

Os frutos em geral apresentam diferentes comportamentos respiratórios durante sua fase de maturação, podendo ser classificados em climatéricos e não climatéricos. Nos frutos climatéricos e nessa fase do desenvolvimento, a taxa respiratória diminui para um valor mínimo, chamado de mínimo pré-climatérico, para depois sofrer um brusco aumento e iniciar a senescência. Essas mudanças estão diretamente relacionadas à síntese autocatalítica do etileno, considerado o hormônio da maturação ou da senescência, trazendo consigo a transformação do amido em açúcar, o abrandamento do fruto e alterações na coloração da casca, que poderá sofrer variações significativas dependendo da zona de cultivo. Nos frutos não climatéricos, que é o caso das espécies cítricas, esse aumento brusco da taxa respiratória não acontece, ocorrendo, por outro lado, uma diminuição gradual dela, como consequência de reações químicas internas.

Dessa forma, pode-se considerar que a respiração tornar-se-á o principal processo fisiológico após a colheita do fruto, uma vez que ele já não dependerá da absorção de água e sais minerais efetuada pelas raízes, nem dos processos subsequentes. A partir desse momento, o fruto terá vida independente e utilizará para tal suas próprias reservas de substratos que foram acumulados ao longo do seu desenvolvimento e mais intensamente durante a fase da pré-colheita.

A atividade respiratória será influenciada pela composição do fruto completamente formado e pelas alterações químicas que ocorreram durante a fase de maturação. Esse fenômeno provocará

mudanças significativas e irreversíveis em tais substratos, podendo ser altamente indesejáveis sob o ponto de vista da qualidade.

A intensidade das atividades fisiológicas da pós-colheita determinará, em grande parte, a longevidade do fruto durante seu manuseio, armazenamento e etapas posteriores. A respiração, como fenômeno, consiste na decomposição oxidativa dos substratos complexos presentes nas mitocôndrias das células, como amido, açúcares e ácidos orgânicos, em moléculas mais simples, como gás carbônico (CO<sub>2</sub>) e água (H<sub>2</sub>O), com a produção de energia e outras moléculas, que podem ser usadas pelas células para reações de síntese (KADER, 1987).

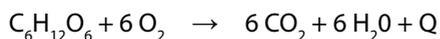
A manutenção do nível de adenosina trifosfato (ATP) é o principal propósito da respiração, sendo que o processo total da respiração aeróbia inclui a transformação do ATP em adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorgânico, com a liberação de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. Normalmente os frutos encontram-se em uma atmosfera rica em oxigênio e desenvolvendo uma respiração aeróbia; na falta desse elemento, o fenômeno passa a ser anaeróbio, com a produção de álcoois, reação mais conhecida como fermentação, que vai afetar de maneira marcante a qualidade interna do fruto.

O processo da respiração pode ser resumido como uma combustão indireta do carbono na presença do oxigênio, sendo o ácido pirúvico formado e completamente oxidado a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, de acordo com a seguinte reação:



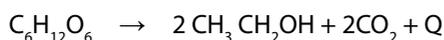
Glicose                      Ácido pirúvico

Se a respiração for aeróbia, a fase seguinte realizar-se-á de acordo com o ciclo de Krebs, resumida na seguinte reação:



Energia

A respiração anaeróbia terá lugar uma vez esgotado todo o oxigênio disponível do meio, pela conversão do piruvato em álcool. Essa reação pode ser resumida da seguinte maneira:



Glicose                      Álcool etílico

## Quociente respiratório e intercâmbios gasosos

A relação entre o volume de CO<sub>2</sub> desprendido e o volume de O<sub>2</sub> consumido pelo fruto no processo de respiração da pós-colheita é chamado de quociente respiratório (QR). Essa medida é uti-

lizada para quantificar a respiração, permitindo avaliar a natureza do processo respiratório. Quando esse quociente for igual a 1, conclui-se que o substrato que está sendo metabolizado é um açúcar. Valores maiores que a unidade indicam que o substrato é um ácido orgânico que, em comparação com o açúcar, necessita de uma menor quantidade de  $O_2$  para gerar quantidade comparável de  $CO_2$ . Se o quociente for menor que 1, há várias possibilidades, como a que indica que o substrato apresenta uma proporção de transformação de  $O_2$  em  $CO_2$  menor que a hexosa, que a oxidação não está sendo completa ou que o  $CO_2$  formado está sendo utilizado em outros processos de síntese, como, por exemplo, na formação de ácido málico e oxalacético, a partir do piruvato e  $CO_2$ .

O conhecimento desse índice, portanto, é importante para saber a natureza do substrato usado na respiração, a intensidade da passagem de  $O_2$  para  $CO_2$  e até que ponto o processo é aeróbio ou anaeróbio. Normalmente, um quociente muito elevado indica alta porcentagem de respiração anaeróbia, implicando em diversos problemas na qualidade dos frutos, a exemplo da produção de substâncias voláteis, como álcool etílico e acetaldeído, que levarão o fruto a apresentar *off flavors*, ou sabor passado ou podre, característico de frutos com pobre manuseio em pós-colheita, ou com tempo largo de prateleira, dentre outros fatores.

A taxa respiratória será um bom indicativo da longevidade do fruto após colhido. A intensidade respiratória é considerada como a medida da taxa em que está sendo realizado o metabolismo e, como tal, com frequência é considerada como um índice da vida potencial de armazenamento do fruto. Assim, uma alta taxa respiratória estará associada com uma vida curta de armazenamento.

Os intercâmbios gasosos no fruto são realizados pelos estômatos, pelas lenticelas, pela cutícula, pelo pedicelo e pelas placas de ceras epicuticulares, segundo Ben-Yehoshua (1987). Dentro do fruto, os gases movem-se através dos espaços intercelulares, que se comunicam entre si. Esses espaços são responsáveis por um adequado intercâmbio gasoso, e qualquer ação que provoque sua oclusão poderá levar a um intercâmbio inadequado dando margem à fermentação, como resultado final. Muitas células estão em contato com a fase gasosa nesses espaços. A atmosfera interna, em geral, é distinta, quanto à sua composição, da atmosfera externa do fruto. A composição da atmosfera dos tecidos do fruto é controlada por três fatores, sendo eles as taxas de  $O_2$  utilizado e de  $CO_2$  produzido, a permeabilidade da epiderme natural ou os recobrimentos artificiais aplicados na sua superfície e as diferenças de pressão desses gases, dentro e fora do fruto segundo Eaks e Ludi (1960).

Os intercâmbios gasosos entre o meio ambiente e o fruto seguem os seguintes passos: difusão dos gases externos na fase gasosa do fruto através do sistema dermal, difusão na fase gasosa através do sistema intercelular, intercâmbio de gases entre a atmosfera intercelular e a solução celular e difusão da solução dentro da célula para o centro de consumo de  $O_2$ .

Após a colheita, a respiração dos frutos cai gradualmente. Em experimentos com laranja 'Valência' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], Ben-Yehoshua (1969) concluiu que houve uma diminuição do  $O_2$  interno de 18% para 10% e um aumento do  $CO_2$  de 3% para 7% durante 2 meses de armazenamento, em frutos não tratados. Essas alterações, aparentemente pequenas, provocaram a perda do

seu valor comercial. O referido autor sugeriu que o flavedo foi o primeiro lugar do fruto a oferecer resistência à difusão do  $O_2$ . Medições feitas em laranjas doces (*C. sinensis*) das variedades 'Valência' e 'Shamouti' mostraram que a resistência à difusão gasosa para esses gases aumentou de quatro a cinco vezes em decorrência da perda de umidade da casca de frutos não tratados, mantendo-os em atmosfera na faixa de 84% a 95% de umidade relativa.

## Fatores que afetam a respiração

O estágio de desenvolvimento, a composição química dos tecidos e o tamanho do fruto são alguns dos fatores que afetam diretamente sua taxa respiratória, além de lesões que o fruto possa vir a sofrer desde seu período de permanência na árvore, seu processamento no *packing house*, armazenamento e exposição nos locais de venda (PANTASTICO, 1975).

Fatores ambientais também têm um papel muito importante na taxa respiratória durante a vida pós-colheita dos frutos cítricos, sendo a temperatura o mais influente de todos pelo dramático efeito no aumento das taxas de reações biológicas (BEN-YEHOSHUA, 1987). Sobre o assunto, Eaks e Ludi (1960), com base no aumento da oxidação que se observa em altas temperaturas, relataram que à medida que a temperatura se eleva ocorre, na composição da atmosfera interna do fruto, aumentos significativos no conteúdo de  $CO_2$  e diminuições no de  $O_2$ . Segundo a lei de Van'Hoff, dentro das faixas de temperaturas biológicas, a velocidade das reações aumenta de duas a três vezes a cada dez graus de aumento da temperatura, sendo esse efeito mais intenso na faixa de 5 °C a 20 °C. O aumento da temperatura, portanto, trará como consequência o aumento no consumo de substâncias respiratórias com a consequente aceleração da senescência do fruto.

Com a diminuição da temperatura, observa-se o contrário, ou seja, a diminuição dessas reações, prolongando a vida dos frutos, desde que respeitadas as temperaturas mínimas suportáveis para cada variedade, sem causar-lhes danos por frio. Cabe acrescentar que os efeitos da temperatura são distintos entre diferentes variedades cítricas, conforme relatos de Biale (1961), baseados em avaliações envolvendo frutos das laranjeiras doces 'Valência' e 'Bahia'. Sabe-se também que limões [*C. limon* (L.) Burm. f.] e pomelos (*C. paradisi* Macfad.) são ainda mais sensíveis às baixas temperaturas no armazenamento.

O etileno, por sua ação hormonal e atuação direta e indireta na regulação do metabolismo, é outro fator importante que afeta a taxa respiratória. Entre os efeitos fisiológicos e biológicos conhecidos dessa substância em produtos colhidos, inclui-se o aumento da atividade respiratória. Nos frutos cítricos, poderá haver um estímulo à respiração em qualquer momento de sua vida a partir do momento da colheita, que vai levar a um aumento na concentração desse gás. A sua eliminação levará a um retorno à taxa respiratória anterior à sua aplicação (KADER, 1987).

A utilização de ceras sintéticas para recobrimento de frutos, quando aplicadas na pós-colheita, também causará importantes modificações na taxa respiratória dos frutos e no seu intercâmbio

gasoso, já que vai afetar diretamente esse intercâmbio que naturalmente ocorre entre a atmosfera e o fruto (PURVIS, 1983).

## Transpiração

A transpiração, considerada como um fator físico, consiste na evaporação da água dos espaços intercelulares existentes entre as células do parênquima poroso do fruto para o seu entorno. Esse fenômeno deve-se à diferença entre a pressão do vapor da água nesses espaços e à pressão que envolve o fruto. A transpiração leva a uma perda de peso e textura do fruto e acentua o estresse hídrico de sua casca, tornando-o mais sensível a algumas alterações fisiológicas, tendo um efeito negativo em sua qualidade comercial e tempo de prateleira (POZZAN, 1992).

Sabe-se que o fruto perde água durante toda sua vida, estando ou não preso à árvore. Esse processo tem importância vital na vida pós-colheita, em virtude da impossibilidade de se repor essas perdas pelo fluxo da seiva. Uma vez que os tecidos estejam em um meio ambiente insaturado, eles perderão água proporcionalmente ao déficit da pressão de vapor do ambiente em que se encontram.

A água livre para a evaporação é aquela que envolve as paredes celulares e os protoplastos. Essa água é quase pura, estando provavelmente retida na cutícula ou nos espaços interfibrilares, em razão da tensão de superfície ou forças absorventes, e está também em equilíbrio dinâmico com os constituintes celulares, dependendo da pressão de turgência. O vapor de água sai através de aberturas naturais, como lenticelas, aberturas ou feridas na superfície do fruto, pela epiderme e cutícula.

Evidências anatômicas sugerem que a água move-se através da pele do fruto, seguindo o sistema vascular no mesocarpo, difunde-se através do exocarpo e evapora na superfície (KAUFMANN, 1970). As vesículas de suco, localizadas no interior do fruto, não participam da rota da transpiração. Desse modo, as perdas de água dos frutos cítricos estão restritas, em sua grande maioria, à sua casca, não havendo conexão entre tais perdas e o pericarpo (PURVIS, 1983).

Com base nessas considerações, pode-se dizer que os fatores que afetam a transpiração dos frutos terão efeito pouco pronunciado nas relações com as vesículas de suco, considerando as condições normais à que eles são submetidos durante sua vida, afetando mais sua casca e provocando, em casos extremos, danos à sua aparência. Esse fato foi comprovado por Ben-Yehoshua (1969), em experimentos com laranja 'Valência', nos quais se verificou que, após 2 meses de armazenamento, a 20 °C e com umidade relativa de 60%, a casca dos frutos perdeu 9,5% do seu peso e a polpa apenas 2,1%. Nesse mesmo período, a espessura da casca diminuiu 50% e a da polpa apenas 10%.

## Fatores que afetam a transpiração

A velocidade com que o fruto perde água é resultado de vários fatores que dependem do ambiente onde ele se encontra, a exemplo das condições de armazenamento e do próprio fruto. A ação conjunta desses fatores intervirá de maneira decisiva em sua vida pós-colheita, uma vez colhido.

A morfologia e a anatomia do fruto são de especial importância em sua transpiração, uma vez que o processo está diretamente condicionado à relação área-volume. Quanto maior essa relação, mais intensa será a taxa de transpiração. Portanto, frutos esféricos e de maior tamanho perdem menos água que frutos não esféricos ou pequenos (CUQUERELLA, 1990). A estrutura da epiderme, bem como a espessura da cutícula, lesões mecânicas e o conteúdo e composição da cera epicuticular que recobre o fruto, também influem de maneira significativa no processo.

Quanto aos fatores ambientais, dentre os quais se incluem as condições de armazenamento, os aumentos na temperatura provocarão aumentos significativos na transpiração, como é de se esperar de qualquer produto de origem vegetal. As perdas de peso e o enrugamento da casca estão mais correlacionados ao déficit de vapor de água que à umidade relativa do ambiente (GRIERSON; WARDOWSKI, 1978).

## Fatores relacionados à qualidade e à resistência do fruto na pós-colheita

O fruto cítrico, antes de chegar ao mercado consumidor final, deve passar por diferentes tratamentos, de modo a cumprir uma série de requisitos previstos em normas estabelecidas por órgãos oficiais competentes, como secretarias de agricultura, Centrais de Abastecimento e Armazéns (Ceasas), Centro de Qualidade em Horticultura da Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais do Estado de São Paulo (Ceagesp) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), entre outros, relativos à sua homogeneidade, a qualidades interna e externa e apresentação.

Deve-se levar em conta que atualmente os compradores das frutas, as grandes redes de supermercados e empresas exportadoras, têm estabelecido uma série de exigências na compra de produtos hortifrutigranjeiros para o produtor. Como exemplos, podem ser citados os protocolos de qualidade nacionais, como os de Produção Integrada de Frutos (PIF), já estabelecidos para uma série de frutíferas, como mamão, maçã, citros, entre outros, e os selos de garantia de origem.

Ganha importância também os protocolos de garantia da produção internacionais como GlobalGap<sup>1</sup>, que estabelecem não somente normas de qualidades organolépticas, mas garantias

---

<sup>1</sup> Organização privada que estabelece normas voluntárias para a certificação de produtos agrícolas em todo o mundo.

de rastreabilidade da produção, limites máximos para resíduos de defensivos agrícolas, adequações ambientais e trabalhistas nos locais de processamento das frutas (*packing house*), dentre outras.

Os tratamentos aos quais o fruto é submetido durante sua passagem pelo *packing house* ou casa de embalagem, além de outros eventuais tratamentos, como o desverdecimento e a conservação frigorífica, provocarão importantes alterações em sua fisiologia e vida pós-colheita. Entre as principais alterações, podem-se citar aumentos na taxa respiratória (PARKER et al., 1984), aceleração da senescência (GRIERSON et al., 1986a), eliminação significativa de parte da cera natural produzida pelo próprio fruto e que recobre sua superfície (HALL, 1981), manchas na casca decorrentes do frio (WANG, 1982) e ataques por fungos (TUSET, 1987).

É muito importante ressaltar que, antes mesmo do fruto ser colhido, muitos outros fatores também estarão atuando de maneira decisiva em sua vida pós-colheita, determinando sua maior ou menor longevidade, resistência ao manuseio e qualidade final. Esses fatores podem ser divididos entre as fases da pré-colheita, colheita e transporte ao *packing house*, e pós-colheita.

## Fatores pré-colheita

São fatores inerentes ao próprio fruto, ao seu cultivo e aqueles presentes durante a fase que se aproxima da colheita.

### Variedade copa

A escolha da variedade é de fundamental importância para o início da atividade citrícola, uma vez que relacionada a ela encontra-se uma série de outros fatores como espaçamentos entre plantas, níveis de produtividade, épocas de colheita, qualidade da produção e manejos diferenciados, de acordo com as exigências de cada cultivar. Donadio et al. (1995) descreveram as características das principais variedades cítricas brasileiras comercializadas e suas diferenças.

### Variedade porta-enxerto

Segundo Albrigo (1992), os porta-enxertos têm influência significativa no desenvolvimento da planta e do fruto cítrico e relacionam-se com sua habilidade em fornecer água às plantas e com sua capacidade em acumular nutrientes. Variedades mais vigorosas são melhores extratoras da água do solo, mantendo a planta (combinação copa/porta-enxerto) sob uma menor pressão de água, determinando, por outro lado, um menor acúmulo de sólidos solúveis nos frutos, o que está diretamente relacionado à qualidade interna destes. Porta-enxertos menos vigorosos, ao contrário, levam à produção de frutos com melhor qualidade interna.

Exemplos práticos dessa afirmativa são encontrados quando se comparam frutos de variedades copa enxertadas em cavalos que induzem a formação de plantas mais vigorosas, como os

limoeiros 'Volkameriano' (*C. volkameriana* V. Ten. & Pasq.), 'Rugoso' (*C. jambhiri* Lush.) e 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck), este último o porta-enxerto mais utilizado na citricultura brasileira, com frutos de variedades copa cujos porta-enxertos são menos vigorosos, a exemplo de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. e de seus híbridos, como os citranges (*C. sinensis* x *P. trifoliata*) 'Carrizo' e 'Troyer' e o citrumelo (*C. paradisi* Macfad. x *P. trifoliata*) 'Swingle', haja vista que essas variedades induzem uma melhor qualidade aos frutos produzidas por plantas enxertadas nelas.

Os porta-enxertos também exercem influências visíveis sobre a rugosidade da casca e o tamanho dos frutos, importantes atributos de sua qualidade, além de influenciarem a planta com relação à resistência ou suscetibilidade a pragas e doenças (CASTLE et al., 1993).

## Fatores nutricionais

A qualidade e resistência do fruto também estão diretamente relacionadas aos tratamentos nutricionais sofridos pela planta durante seu ciclo. Trabalhos como os de Chapman (1968), Embleton e Jones (1973) e Reese e Koo (1975) indicam que os maiores efeitos da nutrição na qualidade do fruto estão relacionados à fertilização de nitrogênio (N) e potássio (K). Baixos níveis de N levam à produção de frutos de menor tamanho e menor conteúdo em ácidos. Por sua vez, altos conteúdos de N podem provocar o reverdecimento da casca, atrasando sua colheita, frutos com casca mais espessa e menor conteúdo em suco.

Todas essas alterações vão afetar, em maior ou menor grau, o conteúdo de sólidos solúveis do fruto e seu índice de maturação, dado que determina uma elevação da acidez, além de interferir sobre a quantidade de suco e tamanho do fruto. Um alto teor de K, por sua vez, leva à diminuição dos sólidos solúveis e ao aumento da acidez, também afetando de maneira marcante o tamanho do fruto.

## Ataques de pragas e doenças

O manejo de pragas e doenças tem importância decisiva na aparência da casca, no que concerne à presença de manchas que poderão depreciar o valor de mercado do fruto. Também pode interferir no rendimento industrial como em ataques severos do ácaro-da-falsa-ferrugem (*Phyllocoptruta oleivora* Asmead), que provoca o emplacamento do fruto (WHITESIDE, 1986) e dificulta a extração de suco.

As principais pragas e doenças que ocorrem no parque citrícola do Estado de São Paulo e que podem afetar a qualidade dos frutos na pós-colheita são o ácaro-da-falsa ferrugem (*P. oleivora*), verrugose (*Elsione* spp.), melanose (*Diaporthe citri* Wolf), cochonilhas, como a pardinha (*Selenaspis articulatus* Morgan) e ortézia (*Orthezia praelonga* Douglas), ácaro-branco (*Polyphagotarsonemus latus* Banks), antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Et Saccs), alternaria [*Alternaria alternata* (Fr.) Keissl] e mancha-graxa (*Mycosphaerella citri* Whiteside) (POZZAN, 1996).

A partir da década de 1990, a pinta-preta, doença causada pelo fungo *Guignardia citricarpa* Kiely que provoca manchas escuras na casca, foi reintroduzida na citricultura paulista e, a partir de então, vem se tornando uma das principais ameaças à produção de frutos in natura no Estado de São Paulo, tanto do ponto de vista quantitativo, por causar quedas significativas na produção de frutos, como qualitativo, por depreciar significativamente a sua qualidade (FEICHTENBERGER et al., 1997), quando os tratamentos com fungicidas não são utilizados.

## Tratamentos hormonais

O uso de reguladores vegetais, ou biorreguladores, vem crescendo no Brasil, mas já é de grande utilização em países com produção tradicionalmente voltada para o mercado de fruta de mesa. A citricultura espanhola pode ser mencionada como o principal exemplo do uso desses produtos, em que são empregados para regular o florescimento das plantas, desbaste químico em tangerineiras, atraso da colheita, dentre outras utilidades (AUGUSTÍ; ALMELA, 1991).

Pesquisas com fitorreguladores à base de ácido giberélico ( $AG_3$ ) têm mostrado que a aplicação na pré-colheita pode afetar a qualidade do fruto uma vez colhido. De acordo com Arpaia (1995), observaram-se influências na manutenção da firmeza da casca de laranjas doces e maior resistência a danos por frio e redução de *pufiness* (fruto estufado) em tangerinas da variedade 'Satsuma' (*C. unshiu* Marcow.).

Atualmente, reguladores dos grupos das auxinas, giberelinas, citicininas, retardadores e inibidores podem ser utilizados nas diversas fases de desenvolvimento dos citros. No Brasil, existem poucos produtos comerciais registrados para a cultura, o que impede sua ampla utilização. Contudo, resultados experimentais mostram que o uso dessas substâncias podem melhorar a qualidade, a produtividade e, como consequência, a rentabilidade dos citros.

Trabalhos de Castro et al. (1997) mostram que, para atrasar a colheita de tangerinas, utiliza-se o ácido giberélico a  $20 \text{ mL L}^{-1}$  + ácido diclorofenotiacético (2,4-D) a  $8 \text{ mL L}^{-1}$ , bem como a aplicação associada com citocinina. Para atrasar a perda de clorofila na lima ácida 'Tahiti' [*C. latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka], durante o armazenamento e transporte, recomenda-se 2,4-D a  $2.000 \text{ mg L}^{-1}$  e  $AG_3$  entre  $100 \text{ mg L}^{-1}$  e  $600 \text{ mg L}^{-1}$ . Para o controle de abscisão em frutos maduros, Augustí e Almela (1991) recomendam aplicações de  $AG_3$  a  $5 \text{ mg L}^{-1}$  e 2,4-D a  $15 \text{ mg L}^{-1}$  associados ou não a fungicida. Os biorreguladores podem também provocar o retardamento ou a aceleração da pigmentação da casca dos frutos ou o adiantamento na sua maturação, dependendo da época da aplicação, do tipo de substância utilizada e da época de aplicação.

## Irrigação

A influência da água disponível, durante todas as fases de desenvolvimento do fruto, é marcante, sendo a irrigação, quando presente, a prática cultural que mais interfere sobre qualidade

dos frutos no conjunto das demais práticas. Irrigações excessivas, entretanto, provocarão expansões demasiadas do fruto, diluindo os sólidos solúveis, afetando negativamente sua qualidade, principalmente durante as fases finais do desenvolvimento e próximas à colheita. Isso pode provocar a turgência da casca, tornando-a mais suscetível às alterações da pós-colheita, como a oleocelosis, que provoca a ruptura das glândulas de óleo essencial da casca e manchas na superfície do fruto, como consequência da oxidação desse óleo e que será discutida mais adiante.

Essa prática, que tem crescido de maneira significativa nos últimos anos, vem sendo utilizada por muitos citricultores que produzem especificamente para o mercado in natura, objetivando garantir a produção em anos muito secos, promover a antecipação da produção e produzir frutos de maior tamanho, esse um atributo qualitativo de grande importância.

## Climatologia

Segundo Davies e Albrigo (1994) e Reuther e Ríos-Castaño (1969), a ação climática é a que exerce maior influência sobre o desenvolvimento e a qualidade do fruto. Muitos estresses ambientais afetam adversamente sua qualidade, sendo que as diferentes respostas observadas no fruto dependem, em grande parte, da região em que ele é cultivado. Fatores como amplitude térmica entre o dia e a noite, que influenciam a coloração da casca, e índice de insolação, que pode, a partir de dada intensidade, queimar a casca dos frutos, são de grande importância na determinação da qualidade desses, implicando em cuidados específicos no manejo dos pomares.

O vento também está entre os principais fatores climáticos, pois pode causar manchas na casca decorrentes do atrito entre ramos, folhas e frutos, desde os primeiros estádios de desenvolvimento. Medidas como a utilização de quebra-ventos minimizam o problema, prática comumente observada em citriculturas especializadas na produção de frutos de mesa, como são os casos do Uruguai e da Argentina.

A condição climática no momento da colheita, outrossim, é de grande importância, uma vez que nas primeiras horas da manhã os frutos estão túrgidos, sendo sua casca extremamente sensível a golpes e pressões ocorridos durante a colheita. Dias de chuva e de alta umidade ambiental, ou situações em que os frutos mostrem-se molhados, não são, portanto, recomendáveis à prática da colheita.

## Estádio de maturação do fruto

É sabido que quanto mais maduro o fruto, mais sensível e menos resistente será sua casca ao manuseio ao qual será submetido durante todo o processo pós-colheita. Portanto, recomenda-se monitorar a maturação para a tomada de decisão do momento ideal da colheita, que deve se situar na faixa de 10 a 16 de índice de maturação, para a grande maioria das variedades cítricas destinadas ao mercado in natura ou mercado de fruta de mesa.

Di Giorgi et al. (1993) estudaram detalhadamente fatores qualitativos e a influência do clima sobre parâmetros como maturação, época de colheita, cor e sabor dos frutos destinados à industrialização. Muitos dos parâmetros analisados, como o conteúdo de açúcares da fruta, ou °Brix, acidez e substâncias chamadas de flavonoides, também se relacionam de maneira significativa com a qualidade da fruta fresca.

## A colheita e o transporte do fruto

A grande maioria da produção mundial de citros é colhida manualmente, utilizando escadas e diversos tipos de sacolas para acomodar os frutos, de acordo com Davies e Albrigo (1994). A colheita e o transporte do fruto podem ser considerados, sem nenhuma dúvida, como momentos críticos da produção. É nesse momento que qualquer trabalho voltado à melhoria da qualidade do fruto pode ser perdido, caso não se observem algumas regras básicas, tratando-se da colheita de frutos destinados ao mercado in natura. Os principais cuidados são, a seguir, comentados.

### Material de colheita

O material utilizado na colheita deve ser cuidadosamente escolhido. Caixas plásticas com capacidade de 27 kg de frutos têm sido o recipiente preferido pelas empresas que atuam na área de fruta in natura, por permitirem uma acomodação menos agressiva ao fruto, ao contrário da colheita a granel. Nesse caso, devem ser utilizadas caixas novas ou em bom estado de conservação e limpas, descartando-se aquelas quebradas ou que apresentem ranhuras ou bordas salientes, que poderão machucar o fruto (POZZAN; TRIBONI, 2005).

Os baldes utilizados na colheita de limões verdadeiros [*C. limon* (L.) Burm. f.] e de limas ácidas, especialmente a 'Tahiti', devem seguir os mesmos princípios. As sacolas utilizadas pelos colhedores e as luvas devem estar sempre limpas e secas. As escadas e os ganchos também devem ser utilizados com o máximo de cuidado, evitando machucar os frutos e a própria árvore.

### Métodos de colheita e cuidados

Os métodos utilizados na colheita, segundo Rodriguez et al. (1991), são o da torção seguida do arrancamento do fruto ou por corte do pedúnculo por alicates apropriados, sendo esta prática mais aplicada à colheita de variedades de tangerinas e frutos destinados à exportação. No primeiro método, deve-se evitar ao máximo pressionar demasiadamente o fruto, o que poderia causar o rompimento de glândulas de óleo essencial e, como consequência, determinar o surgimento de uma alteração pós-colheita, muito comum, denominada oleocelose. No segundo método, deve-se evitar que a ponta do alicate machuque o fruto. O corte do pedúnculo deve se dar o mais rente possível à superfície do fruto, uma vez que segmentos remanescentes do pedúnculo, se grandes, poderão machucar outros frutos durante o contato entre eles na passagem pelo *packing house*. Deve-se

também evitar ao máximo o atrito entre frutos, acomodando-os de maneira a não os pressionar na caixa e evitar a queda deles no esvaziamento das sacolas de colheita.

Frutos que se encontrem no chão, podres ou sujos de terra, ou mesmo frutos sujos localizados nas partes inferiores da copa, não devem ser aproveitados, pois sempre trarão consigo esporos de fungos que poderão provocar doenças posteriores, durante o armazenamento ou a comercialização.

A turma de colheita deverá estar muito bem orientada com relação a esses cuidados e também no que diz respeito à qualidade exigida de frutos para mercados de fruta de mesa, principalmente com relação ao tamanho mínimo requerido, à cor da casca e aos defeitos decorrentes de ataques de pragas e doenças. Uma colheita mal feita encarecerá de maneira significativa todo o processo subsequente, uma vez que aumentará a quantidade de descartes e prejudicará a qualidade final do produto.

## Transporte

Os cuidados com o transporte começam com o enchimento da caixa ou de qualquer outro recipiente utilizado na colheita. Frutos da parte superior de caixas muito cheias, quando empilhadas, serão pressionados pelas caixas superiores, causando-lhes danos. É importante proteger a carga de frutos com uma lona, no caminhão ou outro veículo utilizado no transporte, evitando os efeitos do sol, do vento e da poeira. Uma vez acondicionada a carga, o veículo deve ser dirigido o mais rápido possível ao local do processamento pós-colheita. Viagens em horas mais frescas do dia ou à noite também reduzirão o estresse provocado aos frutos durante seu transporte.

## Alterações da pós-colheita que afetam a qualidade do fruto

Uma vez percorrido esse trajeto, o fruto estará prestes a ser ofertado ao mercado consumidor. Todos os tratos e maus tratos recebidos pelo fruto nessa fase terão influência decisiva no tocante à qualidade com que ele chegará à mesa do consumidor final. As alterações pós-colheita verificadas nesse caminho podem ser divididas em: a) fisiológicas, relacionadas ao ambiente interno e externo do fruto, a danos químicos e físicos causados por tratamentos e a danos determinados pelo frio, no caso de armazenamento em câmara fria; e b) patológicas, relacionadas ao ataque de microrganismos.

## Alterações fisiológicas

### Oleocelose

Refere-se a manchas na superfície do fruto, de cor amarela, verde ou marrom, de contorno irregular, causadas pelo rompimento de glândulas de óleos essenciais da casca, em virtude da colheita em tempo úmido ou estando o fruto molhado e da excessiva pressão durante a colheita e

manipulação (GRIERSON, 1986). Todas as espécies de *Citrus* (Linnaeus) são suscetíveis a esse tipo de alteração, sendo as limas doces (*C. limettioides* Tanaka) e ácidas [*C. latifolia* e *C. aurantiifolia* (Christm.) Swingle], limões verdadeiros e laranjas doces do tipo 'Bahia' ou de umbigo ('Navel') as mais sensíveis.

Essa alteração poderá relacionar-se não só às situações citadas, mas também a todas as fases seguintes do processamento do fruto (OFFERS, 1987). Visando a sua prevenção, os frutos não devem ser colhidos molhados, nas primeiras horas da manhã e quando a umidade do ambiente estiver muito alta, pois eles estarão excessivamente túrgidos. Deve-se também evitar danos físicos durante o transporte, o armazenamento e a passagem pelo *packing house*.

### Granulação

Caracteriza-se pelo secamento das vesículas de suco dos gomos do fruto, manifestando-se como uma matéria seca e sem gosto, perdendo o fruto sua acidez e seu sabor. Ocorre, principalmente, na zona peduncular do fruto (ERICKSON, 1968). Essa alteração normalmente surge quando o fruto permanece na árvore em estágio avançado de maturação, acentuando-se com a colheita. É também um fenômeno comum a frutos de árvores jovens e muito vigorosas, levando-os à perda de valor comercial. No sentido de impedir essa alteração, recomenda-se observar o período adequado de colheita, evitando que os frutos permaneçam por muito tempo na árvore a partir da sua maturação.

### *Pufiness* (fruto estufado)

Caracteriza-se pela separação do albedo do fruto da casca, fazendo com que a polpa fique solta dentro dele. É um fenômeno típico da tangerina 'Ponkan' (*C. reticulata* Blanco), quando o fruto atinge um índice de maturação elevado (POZZAN, 1997). De modo a evitar essa alteração, recomenda-se não retardar a colheita por muito tempo, estando o fruto maduro e pronto para comercialização.

### *Creasing*

Defeito que se verifica na parte interna da casca do fruto, que consiste em sulcos deprimidos no albedo, provocando seu rompimento (BROWNING et al., 1995). A alteração acontece em frutos de laranja doce e de tangerina, quando ainda estão na árvore e em estágio avançado de maturação (GRIERSON, 1986). Para que essa alteração não se verifique, também se recomenda não retardar a colheita por muito tempo, estando o fruto maduro e pronto para comercialização.

Sua causa não é bem conhecida, sendo atribuída, por alguns, a desequilíbrios nutricionais entre N e K, ou a um excesso de fósforo (P) nas folhas. Também se aventa sua relação com a umidade do solo, associando-se sua manifestação à ocorrência de períodos secos, em que há uma diminuição do crescimento do fruto, seguidos de períodos chuvosos.

### *Splitting* (fendilhado)

Alteração que ocorre tanto em tangerinas como em laranjas, na fase final de maturação, que consiste na abertura do fruto em sentido longitudinal, em virtude de estresse hídrico ou nutricional sofrido nas fases iniciais de desenvolvimento. Seu controle é feito pelo raleamento de frutos na árvore, aplicação de  $AG_3$  ou de nitrato de potássio ( $KNO_3$ ) no início do desenvolvimento do fruto (DAVIES; ALBRIGO, 1994).

## Danos químicos e físicos durante o processamento

Os danos químicos são aqueles provocados por fitotoxidades decorrentes da excessiva permanência dos frutos em contato com produtos químicos ou da demasiada concentração dos frutos, vindo a causar manchas na casca parecidas com queimaduras. Os frutos tratados com ceras podem apresentar aspecto esbranquiçado ou com escamas brancas, em virtude da ruptura do filme da cera aplicada em excesso.

Com o crescente uso de ceras artificiais e outros produtos químicos, como fitorreguladores e detergentes, torna-se importante a observância das corretas dosagens e regulagens das máquinas presentes no *packing house*, bem como do tempo de aplicação desses tratamentos, de modo a evitar tais danos e eventuais contaminações dos frutos por esses produtos.

Quanto aos danos físicos, esses, geralmente, são causados pelo excesso de manipulação do fruto durante sua passagem pelas máquinas. A escovação suave do fruto melhora sua aparência, uma vez que a cera natural presente na casca, ao ser escovada, dá brilho. Mas uma escovação excessiva, tanto em duração quanto em intensidade, e o tipo de escova podem causar o aparecimento de manchas escuras, provocando, em casos mais graves, uma oleocelose. Esse problema será acentuado quando o estado de maturação do fruto estiver avançado.

Para prevenir essa alteração, são necessários cuidados na regulação da velocidade das escovas e no dimensionamento de seu número, na linha. Segundo Amat (1991), a velocidade ideal de escovação para laranjas doces é de 150 rpm, e para tangerinas, que apresentam casca mais sensível, de no máximo 90 rpm. O material ideal para as escovas é a crina de cavalo.

Outro dano que poderá ocorrer no local do processamento dos frutos, onde se dá a aplicação de cera seguida da passagem dos frutos pelo túnel de secagem, é a queima da casca por altas temperaturas. Visando evitar essas injúrias, deve-se observar o tempo máximo de permanência do fruto no interior do túnel, que poderá variar de acordo com a qualidade do fruto e temperatura ambiente. Em geral, recomenda-se que a temperatura do secador não ultrapasse os 50 °C, e o tempo de passagem pelo túnel não seja maior que 3 minutos.

O acondicionamento inadequado dos frutos nas embalagens pode também causar danos. Dependendo da qualidade das caixas de papelão, os frutos da parte inferior de um *pallet* poderão

ser deformados e amassados, com prejuízos à sua qualidade e longevidade. As caixas de madeira, apesar de mais resistentes, podem causar danos por causa dos grampos ou das tampas. As bolsas de ráfia podem marcar os frutos, quando muito cheias ou mal acondicionadas na carga de transporte ou no local de venda.

## Danos por frio

Apesar de pouco utilizada no Brasil, a conservação frigorífica é uma prática muito comum em países onde a citricultura está mais voltada para o mercado de fruta de mesa. A conservação é feita tanto para o controle das operações do *packing house*, servindo de pulmão ao processamento, e para causar uma diminuição da atividade fisiológica do fruto recém-colhido, quanto para fins comerciais no transporte para longas distâncias. Outra finalidade prática da conservação frigorífica é a de estocar frutos colhidos no final de uma safra, visando a sua comercialização na entressafra, no intuito de se obterem melhores preços. Também pode ser utilizado para tratamentos quarentenários contra a mosca-das-frutas (VÁZQUEZ, 2008).

O dano por frio, que é diferente das lesões por congelamento, ocorre na conservação do fruto a temperaturas iguais ou inferiores às críticas, que são superiores ao seu ponto de congelamento, variando em torno de 2 °C para laranjas, sendo de até 12 °C para pomelos, estando os limões, limas ácidas e tangerinas em pontos intermediários. Fatores como o tempo de conservação devem ser considerados nesse processo, bem como as condições da fruta a ser armazenada, como sua maturação e tratamentos na pré e pós-colheita.

O dano por frio mais comum é chamado de *pitting* e caracteriza-se por depressões na casca, que com o tempo adquirem uma coloração marrom, aumentando em diâmetro e profundidade, sendo mais comuns em variedades de pomelo mantidas por muito tempo em câmara frigorífica (GRIERSON, 1981).

## Alterações patológicas e controle químico

As alterações provocadas por processos parasitários, que têm fungos como agentes, são de fundamental importância na comercialização dos frutos cítricos e responsáveis por perdas significativas. Ainda que se utilizem corretamente as técnicas disponíveis nas operações que envolvem a colheita, o transporte e a manipulação, essas perdas estão compreendidas entre 3% e 6% de toda a produção em um ano normal, podendo chegar a 8% em anos mais chuvosos, em países como a Espanha (TUSET, 1987). No caso do Brasil, as condições climáticas são distintas, e não há, até o momento, estudos que quantifiquem essas perdas, embora suponha-se que também sejam significativas, principalmente durante os períodos mais úmidos ao longo do processo de colheita e transporte.

Além de fatores climáticos, também devem ser consideradas as condições do próprio fruto, como a suscetibilidade de seus tecidos aos patógenos, o índice de maturação e suas condições fisiológicas, a presença de danos ou feridas na casca, que podem servir de entrada a infecções, e a limpeza do local de processamento.

Com relação aos fungos, deve-se atentar para a quantidade de inóculos que poderá causar uma infecção e seu grau de agressividade, que varia de acordo com as diferentes espécies e sua localização no fruto. Sabe-se também que a passagem dos frutos pelo *packing house* e posterior armazenamento proporcionarão muitas vezes condições favoráveis ao desenvolvimento de doenças, dependendo de fatores como temperatura e umidade do local de armazenamento e sua higiene.

Ainda segundo Tuset (1987), foram isolados e identificados, até o momento, 16 fungos pertencentes às classes dos Ficomycetos, Ascomycetos e Deuteromycetos, que estão presentes na citricultura espanhola e, possivelmente, sejam também encontrados na citricultura brasileira. Os graus de incidência e importância deles nas condições espanholas estão resumidos na Tabela 1, sendo descritos a seguir aqueles de comprovada ocorrência e importância na citricultura brasileira.

- *Penicillium digitatum* Saccardo: é o agente causal da podridão-verde (*green mold*), sendo considerado um dos principais fungos da pós-colheita dos citros no mundo e está presente durante toda a safra. O fungo causa uma podridão macia de coloração verde, fazendo com que o fruto perca sua forma rapidamente, transformando-se em uma massa disforme. No começo da infecção, a área afetada mostra uma coloração mais escura que o normal, e os tecidos perdem sua consistência firme, tornando-se mais macios. O fungo é favorecido pela alta umidade e pelo excesso de chuvas, coincidindo, portanto, com a fase da maturação das variedades tardias nas condições da citricultura brasileira. Ataca principalmente o grupo das laranjas e tangerinas.
- *Penicillium italicum* Wehmer: é o agente causal da podridão-azul (*blue mold*), sendo, depois do *P. digitatum*, o fungo de maior importância e ocorrência, chegando a superar o primeiro quando se trata de conservação frigorífica. Seu ataque também causa uma podridão macia na superfície do fruto apresentando uma coloração azulada.
- *Alternaria alternata* (Fr.) Keisler: o fungo pode estar presente desde as flores e os primeiros estádios de desenvolvimento dos frutos. Em condições de alta umidade e baixa temperatura, germinam e penetram no interior dos frutos através da zona estilar e peduncular. Os sintomas são uma podridão seca e negra situada na região estilar ou próxima dela, sendo mais notada em laranjas das variedades 'Bahia' e 'Baianinha', chamada de podridão-negra. O ataque do fungo é favorecido pelo seu grau de maturação, sendo mais elevado o ataque quanto maior o índice de maturação. Esse fungo é considerado importante na pós-colheita da citricultura espanhola. No Brasil, a doença causada por esse fungo é conhecida como mancha-marrom-de-alternaria e foi constatada pela primeira vez na região citrícola pau-

**Tabela 1.** Ocorrência de podridões na citricultura espanhola.

Fungo	% de podridão <sup>(1)</sup>	
	Durante o armazenamento	Durante toda a comercialização
<i>Penicillium digitatum</i> Saccardo	30–55	55–80
<i>Penicillium italicum</i> Wehmer	15–35	2–35
<i>Alternaria citri</i>	10–30	8–16
<i>Botrytis cinerea</i> Persoon ex Fries	8–25	8–15
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Penz.	0–7	2,5–6
<i>Geotrichum candium</i>	0–5	2–3
<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill.	0–4	1–3
<i>Cladosporium herbarium</i>	0–2	2–4
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler	0–1	0–2
<i>Phytophthora citrophthora</i> (Smith and Smith) Leonian	0–3	1–2
<i>Trichoderma viridae</i> Pers. ex Fries	0–0,7	0–0,7
<i>Trichothecium roseum</i> (Pers.) Link	0–0,08	0–0,5
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht. e <i>F. solani</i> <i>Fusarium solani</i> (Mart.) Appel and Wr. emed. Snyd. and Hans	0–1,5	0–2
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary	0–1	0–0,5
<i>Diplodia mutila</i> Fr.	0–0,1	0–0,1
<i>Phomopsis citri</i> H. Fawc.	0–0,08	0–0,08

<sup>(1)</sup> Em laranjas e tangerinas.

Fonte: Tuset (1987).

lista no ano de 2003, em pomares de tangor ‘Murcott’<sup>2</sup> e tangerina ‘Ponkan’. Nesse caso, o fungo ataca folhas, ramos novos e frutos no início do seu desenvolvimento, apresentando sintomas como lesões inicialmente deprimidas com centro marrom-escuro, circundadas por um halo marrom-claro ou alaranjado, causando, em ataques severos, a queda dos frutos, com grandes prejuízos ao produtor e à própria planta cítrica.

Em virtude da importância dos ataques fúngicos e de sua presença generalizada no campo e *packing houses*, são necessários cuidados para evitar ao máximo a contaminação por tais agentes patogênicos. Esses cuidados começam na colheita e no transporte e passam pela limpeza das áreas de processamento e armazenamento dos frutos. Entretanto, essas medidas não são suficientes para

<sup>2</sup> Híbrido de origem desconhecida, possivelmente resultante de cruzamento entre tangerineira e laranjeira doce, realizado pelo programa genético do Usda (HODGSON, 1967).

que sejam evitados os ataques, e há que se lançar mão do uso de produtos químicos específicos para tal, os fungicidas que controlarão os fungos presentes em todas essas fases.

O controle químico tem um histórico que vem se desenvolvendo nos últimos 60 anos, evoluindo desde produtos tóxicos e de curto espectro a produtos de baixa toxicidade, de amplo espectro e poder residual, obedecendo às exigências dos mercados consumidores modernos.

Entre os produtos de grande utilização, destacam-se aqueles do grupo dos benzimidazóis, que foram introduzidos no mercado no final da década de 1960. O thiabendazol (TBZ) e o benomil lograram uma melhora no controle das doenças da pós-colheita, possuindo uma alta eficiência sobre os principais fungos. O thiabendazol vem sendo atualmente utilizado no Brasil para o controle das podridões verde e azul, mas o benomil já está fora de uso tanto no Brasil como nos países para onde se exporta a fruta local.

Dez anos após a introdução desses produtos, foram desenvolvidos os fungicidas do grupo dos imidazóis, sendo o imazalilum dos produtos mais utilizados hoje em dia. Esse produto possui alta eficiência sobre fungos do gênero *Penicillium* e pouca atividade sobre fungos de outros gêneros, como *Alternaria*, *Botrytis* e *Geotrychum*.

Segundo Artés (2005), nas condições espanholas autorizam-se os produtos tiabendazol (1.000 ppm a 1.200 ppm de ingrediente ativo em *drench* e 500 ppm na cera com 1 L de cera por tonelada de fruto), imazalil (400 ppm a 500 ppm do ingrediente ativo em *drench*, 150 ppm em pulverização sobre os frutos e 200 ppm em ceras) e ortofenilfenol (13% diluindo 1,0 L do produto em 9,0 L de água e aplicando em cortina de espuma durante 30 a 40 segundos, ou em banho de imersão, diluindo a 13% de ingrediente ativo em água a 3% durante 4 minutos).

Com relação às técnicas de aplicação, o uso de *drencher*, técnica que consiste em molhar os frutos diretamente nas caixas de colheitas vindas do campo com suspensão fungicida em um túnel aplicador, é indicado para frutos destinados à conservação frigorífica por longos períodos ou ao desverdecimento, não sendo utilizado no Brasil.

Os tratamentos mais utilizados, no *packing house*, são o banho de imersão, em que os frutos passam por uma balsa com suspensão fungicida logo após sua descarga na linha, aplicação por aspersão em escovas, logo após a lavagem e pré-secagem ou aplicação veiculada na cera, em que o fungicida é misturado à cera comercial, sendo aplicado em conjunto com ela.

Conforme exposto, as ceras artificiais poderão ser empregadas como veículo na aplicação de fungicidas de pós-colheita, como os derivados dos benzimidazóis e imidazóis. Apesar de apresentarem essa vantagem prática, resultam não ser tão eficazes em comparação com a aplicação em suspensão aquosa, para uma mesma dosagem, pelo efeito que sofrem com a diluição na cera. Para que essa forma de aplicação seja eficaz, é necessário um aumento na dosagem do fungicida (MARTÍNEZ-JÁVEGA et al., 1984). Desse modo, se a distribuição do fungicida na cera for uniforme e a aplicação bem feita, a eficácia do tratamento poderá ser igual à do tratamento convencional.

# Tratamentos à base de ceras

## Ceras naturais

Muitas das desordens fisiológicas da casca dos frutos cítricos são expressões do estresse hídrico diário no campo e de perdas contínuas de peso depois que o fruto é colhido. Essas perdas levam a uma redução de sua vida pós-colheita, influenciando de maneira negativa sua qualidade e seu valor comercial (ALBRIGO, 1972).

A casca do fruto é constituída de duas camadas distintas, conhecidas como flavedo e albedo. Na primeira, encontram-se as glândulas de óleo essencial, os estômatos e as células epidérmicas, cobertas pela cutícula. No albedo, camada mais interna e rica em constituintes pécnicos, encontra-se o sistema vascular do fruto. A camada epidérmica externa é a principal responsável pela síntese dos elementos que compõem as ceras naturais, que são produzidas pelos próprios frutos, nas cutículas, tanto na parte interna (intracuticulares) como na parte externa (epicuticulares), segundo Albrigo (1986).

As ceras cuticulares são muito importantes como fator regulador das perdas de água pelo fruto, na absorção, e perdas de produtos químicos e, às vezes, têm um papel muito importante na proteção contra ataques de fungos e abrasões mecânicas e na resistência a geadas.

A produção e o acúmulo das ceras estão presentes desde as primeiras fases de desenvolvimento do fruto e estendem-se até a maturação, mesmo estando o fruto separado da árvore (EL-OTMANI et al., 1986). Durante todo seu ciclo, costumam ocorrer modificações na concentração da cera em relação à superfície do fruto em virtude de variações no seu crescimento, de acordo com a época do ano, fatores ambientais e variedades. Dentre os conteúdos de cera relatados para laranjas doces, encontram-se  $70 \mu\text{g cm}^{-2}$  para frutos de 'Valência' e 'Shamouti', em Israel, e  $80 \mu\text{g cm}^{-2}$  a  $90 \mu\text{g cm}^{-2}$  para frutos de 'Pineapple' e 'Washington Navel', na Flórida (EL-OTMANI; COGGINS, 1985).

Em experiências com laranja 'Shamouti', Schulman e Monselise (1970) concluíram que o contínuo aumento na produção de cera pelo fruto deveu-se a aumentos em seu tamanho e sua superfície, sem haver acúmulos por  $\text{cm}^2$ , uma vez que sua produção permaneceu constante, após uma diminuição inicial decorrente do efeito da diluição, como consequência do aumento no tamanho do fruto. Por outro lado, os frutos mostraram um acúmulo de cera em razão da diminuição de seu crescimento, determinada por baixas temperaturas observadas no inverno e pela chegada da maturação. Dessa forma, os referidos autores concluíram que a espessura da camada de cera aumenta quando o crescimento do fruto é interrompido, independente de sua causa.

Com relação a compostos orgânicos presentes na cera, observam-se aldeídos (29% a 44%), alcanos (23% a 42%), álcoois primários (6% a 15%) e ácidos graxos (até 19%) (BAKER et al., 1975). Quanto à morfologia e estrutura que as ceras apresentam na superfície do fruto, estas mostram-se

dispostas em lâminas aplanadas, que se tornam duras e quebradiças durante o desenvolvimento do fruto. Em estádios mais avançados, elas se rompem formando rachaduras, o que leva à diminuição de sua eficiência.

Como em todos os processos fisiológicos que afetam o desenvolvimento do fruto cítrico, os fatores ambientais influenciam diretamente a produção e composição das ceras naturais. Baixas umidades relativas estimulam a produção de cera, em comparação com ambientes mais úmidos. Práticas culturais, como irrigação, adubação e pulverizações, também determinam variações na produção e composição das ceras.

## Ceras artificiais

Os frutos, ao chegarem ao *packing house*, apresentam em sua superfície uma capa formada por cera natural, poeira, esporos de fungos e resíduos de tratamentos químicos recebidos no campo. Para eliminar todos esses resíduos, torna-se necessário lavá-los e escová-los com detergente e água, sendo estes os primeiros tratamentos aplicados durante seu processamento. Em razão disso, parte da cera natural será também eliminada, tornando o fruto mais sensível a perdas de peso por transpiração, o que apressará sua senescência. A utilização de ceras artificiais, que são constituídas de produtos de distintas naturezas, tem como objetivo devolver à superfície do fruto parte dessa cera eliminada e melhorar sua aparência, aumentando seu brilho, além de prolongar sua vida comercial. Com o comércio de frutos sendo feito a distâncias cada vez maiores, esse fator será de suma importância.

As ceras artificiais devem ser empregadas de acordo com as necessidades fisiológicas e de mercado dos frutos. A formulação elegida deverá permitir um intercâmbio gasoso mínimo através da película formada, para evitar que acúmulos de CO<sub>2</sub> no interior do fruto produzam alterações em sua respiração, tendo como consequência a formação de *off flavors*. Por outro lado, devem formar uma barreira efetiva contra a passagem do vapor de água, evitando que o fruto perca peso pela transpiração (DAVIS; HOFMANN, 1973).

Dentre as características desejáveis, esses produtos devem possuir baixa toxicidade, formulação estável, forte aderência à superfície do fruto após a aplicação e por um longo período e ser de secagem fácil e rápida. Durante o armazenamento, a casca do fruto deve manter o brilho, observando-se custos competitivos, que não encareçam significativamente o processo e o preço final do produto tratado. Dependendo do tipo de veículo utilizado em sua formulação, a cera poderá ser classificada como cera solvente ou cera solúvel em água (emulsões aquosas), de acordo com Cuquerella (1990).

As ceras solventes foram muito utilizadas na década de 1970 nos *packing houses* espanhóis. Entretanto, em virtude do fato de apresentarem uma série de problemas práticos para seu uso, como dificuldade de limpeza das máquinas e formação de gases tóxicos e inflamáveis no ambiente de trabalho, essas ceras motivaram o desenvolvimento das ceras solventes em água, atualmente

empregadas na grande maioria dos casos. Segundo Martínez-Jávega et al. (1984), os tipos e componentes das ceras são descritos a seguir.

## Ceras solventes

São compostas pela dissolução de uma ou mais resinas em hidrocarburetos de petróleo, que atuam, por sua vez, como dissolventes, sendo as mais comuns a cumarona-indeno e a resina de petróleo. Nessas formulações, também intervêm um ou mais agentes plastificantes, como óleo de algodão ou amendoim, que dão mais flexibilidade ao filme formado.

Para a aplicação desse tipo de cera, é necessário que o fruto esteja completamente seco antes de receber o tratamento, uma vez que os solventes utilizados são insolúveis em água, e a presença desta causaria uma falta de aderência e de homogeneidade do produto na superfície do fruto, prejudicando a qualidade da operação e causando alterações posteriores.

## Ceras solúveis em água

Compreendem dois tipos: a) solução de resinas, que consiste na mistura de uma ou mais resinas solúveis, como proteína de soja, milho ou leite, utilizadas como coadjuvantes de formulações, e b) ácidos orgânicos e agentes espalhantes. As resinas mais utilizadas são as de colofonia, resina natural obtida de coníferas europeias e americanas, mediante processo de destilação, e a goma laca, resina procedente da Índia, oriunda de fêmeas do inseto *Tachardia lacca*.

A emulsão aquosa é outro tipo de solução de resinas. Em sua formulação, utilizam-se ceras de origem vegetal, animal e mineral, além de substâncias sintéticas. A esses compostos adicionam-se, também, as soluções de resinas anteriormente citadas, na proporção de 20% a 50%, com o objetivo de melhorar o brilho final dos frutos.

As ceras de origem vegetal mais utilizadas são as de carnaúba, obtida de folhas da palmeira *Copernica cerifera* (Arruda) Mart., espécie disseminada nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, cera de candelilla, que se extrai de várias espécies da família das euforbiáceas, provenientes de regiões áridas dos Estados Unidos e do México.

Com relação às ceras de origem animal, são utilizadas ceras de abelha, provenientes dos favos da produção de mel e cera de esperma de baleia. Entre as ceras de origem mineral, a mais comum é a parafina, que se obtém a partir da destilação fracionada do petróleo. Entre as ceras sintéticas, a cera de polietileno, esse um polímero do etileno, é a mais conhecida e utilizada.

Segundo Mazzuz (1996), na Espanha, principal produtor e exportador mundial de frutos para consumo in natura e onde são desenvolvidas e empregadas as mais avançadas técnicas de processamento de fruta para o exigente mercado europeu, são empregados dois tipos de ceras de emulsões aquosas, compostos por ceras vegetais (carnaúba) e/ou ceras sintéticas (polietileno), adicionadas de

resinas para melhorar o brilho. A primeira é chamada de cera de confecção, utilizada no tratamento efetivo dos frutos na linha de processamento; possui teor de sólidos solúveis de 18%. A segunda é denominada cera de conservação, empregada na conservação de frutos em câmaras frias, para posterior processo; nesse caso, a cera não pode apresentar teor de sólidos solúveis superior a 10%.

No Brasil, observa-se um aumento no consumo de ceras, não só para uso em cítricos, mas em uma série de outras frutas, como mamão, melão e maçã, boa parte das quais importada da Espanha. A aplicação dessas ceras é feita de maneira indireta, uma vez que, em virtude de suas características de formulação, o fruto não necessita estar completamente seco, como anteriormente citado. O produto é aplicado por meio de aspersores móveis, e a distribuição e impregnação sobre a superfície dos frutos produzem-se pelo seu avanço por escovas giratórias que têm em sua composição ao redor de 50% de crina de cavalo.

O principal problema desse tipo de aplicação está na dificuldade de se conseguir que cada fruto receba uma quantidade de cera similar. O estabelecimento da dose do produto está relacionado à capacidade horária da linha de processo, ao número de aspersores do aplicador, ao diâmetro dos orifícios e à pressão de trabalho da bomba injetora. Para a evaporação da água utilizada na fixação da película envolvente de cera, é necessário, nesse caso, que se acople à saída do aplicador de cera um túnel de secagem com rolos metálicos e injeção de ar quente.

As ceras solúveis em água também podem ser utilizadas como veículo para a aplicação de fungicidas e outros produtos, como hormônios (BROWN, 1984; HALL, 1981). A razão mais evidente para esse procedimento está na facilidade e na economia da operação, não sendo necessário nenhum outro tipo de aplicador complementar, trazendo como vantagem adicional a redução da quantidade de água colocada no fruto durante a aplicação específica desses produtos, que deveria ser posteriormente eliminada.

## Efeitos das ceras artificiais na fisiologia e qualidade do fruto

Apesar das vantagens que os tratamentos com ceras possam trazer à qualidade, apresentação e aumento do tempo de prateleira do fruto, os mesmos tratamentos poderão causar alterações fisiológicas prejudiciais. A aplicação de ceras artificiais resulta em uma nova superfície de envolvimento, com uma estrutura diferente da natural. Essa nova camada possui fissuras e é muito menos eficiente no controle da transpiração, reduzindo-a, muitas vezes, de maneira inadequada (BEN-YEHOSHUA et al., 1985). Além disso, por terem uma natureza líquida, esses produtos penetram nos estômatos e poros da casca, obstruindo-os e dificultando o intercâmbio gasoso, provocando, como consequência, um acúmulo de CO<sub>2</sub> e diminuição de O<sub>2</sub>. Daí a importância da cera com relação à sua composição, conteúdo em sólidos solúveis e da espessura depositada sobre a superfície do fruto.

Em estudos com laranjas 'Valência' e 'Washington Navel', Eaks e Ludi (1960) concluíram que quanto mais alta a temperatura maior foi o conteúdo de CO<sub>2</sub> produzido e menor o conteúdo de O<sub>2</sub>.

As mudanças observadas ocorreram tanto em frutos sem nenhum tipo de tratamento quanto em frutos lavados e tratados com cera, dependendo, entretanto, da qualidade do produto utilizado. Esses autores constataram também que a lavagem e o tratamento com cera conduziram a um aumento desses níveis, modificando a atmosfera interna dos frutos, dependendo diretamente da formulação e quantidade da cera aplicada. O tratamento com cera, além disso, diminuiu a perda de peso, em comparação com a testemunha não tratada e com frutos submetidos apenas à lavagem.

Cuquerella e Martínez-Jávega (1984) também chegaram a conclusões similares, trabalhando com laranjas ‘Washington Navel’ e ‘Valência’, em diferentes condições de armazenamento, verificando que aumentos no conteúdo de sólidos solúveis das ceras solventes em água podem levar à incidência de desordens fisiológicas, bem como a acúmulos de substâncias voláteis, responsáveis pelos *off flavors*.

## Processamento do fruto no *packing house*

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, atrás apenas da China e Índia. Em 2005, essa produção superou as 35 milhões de toneladas, representando 5% da produção mundial, segundo Chitarra (2008). Para o processamento dessa produção, são necessários estruturas e investimentos compatíveis para o melhor aproveitamento possível desse enorme volume de alimentos. A produção, a produtividade, a qualidade e o comportamento do mercado, tanto interno como o de exportação, são fatores essenciais para se avaliar o grau de evolução do setor, que vem apresentando crescimento expressivo no âmbito do aperfeiçoamento tecnológico, tanto na pré como na pós-colheita. Ainda segundo Chitarra (2008), o setor de fruticultura apresenta uma grande importância socioeconômica, pois, além de estar fundamentado em pequenas e médias propriedades, emprega 5,6 milhões de pessoas, totalizando 27% da mão de obra agrícola no País.

Dentro desse mercado, encontra-se inserido toda a cadeia de citros, que vem movimentando ao longo desses últimos anos cerca de 2 milhões de toneladas de frutas de mesa das mais diversas variedades, como laranjas, limas, limões e tangerinas, que são produzidas em praticamente todos os estados, de Norte a Sul, e processadas localmente, atendendo mercados locais e internacionais. Para o seu processamento, são utilizadas instalações desde as mais simples, que promovem operações como lavagem e escovação, como as mais complexas, com a utilização de tecnologias que se comparam a países mais desenvolvidos e com grande *expertise* nesse assunto.

Segundo Rodriguez et al. (1991), a finalidade dos *packing houses* ou casas de embalagem é a de oferecer aos frutos melhores condições de conservação, apresentá-los em embalagem comercial e prática, e dar-lhes um aspecto atraente, permitindo, ao mesmo tempo, a separação entre frutos destinados ao consumo in natura e à industrialização. Para que esse objetivo seja alcançado, é de fundamental importância um planejamento das instalações, tanto no tocante à infraestrutura (construções, acessos, etc.), como às máquinas necessárias, uma vez que são exigidos altos investimentos

em sua construção e operação. Nesse sentido, primeiramente é importante que se faça um correto dimensionamento do *packing house*, levando-se em conta o tipo de matéria-prima a ser processado, seus volumes e sua distribuição ao longo do ano, observando também possíveis variações nesses volumes, fornecedores, condições climáticas, dentre outros fatores.

Com relação às instalações propriamente ditas, devem-se levar em conta a distribuição das máquinas, as áreas de recepção, expedição e carregamento, estoque de frutos e outros produtos, e tratamento de efluentes, buscando sempre facilitar as tarefas de maneira racional e eficiente, voltando constantemente a atenção para o aspecto do custo da operação e retorno esperado.

Na escolha das máquinas, deve ser avaliada a relação custo x benefício do conjunto, já que existe no mercado uma série de fabricantes nacionais e estrangeiros. Os fatores mais importantes a serem considerados são a sua capacidade horária, sua qualidade do serviço, seu consumo de energia e sua disponibilidade de assistência técnica, principalmente durante os períodos mais críticos de processamento.

Outro aspecto a ser considerado, refere-se à mão de obra, fator de extrema importância para que o *packing house* possa funcionar adequadamente, sendo necessária uma organização racional quanto à contratação, orientação e constante motivação das pessoas relativamente à execução das tarefas que lhes serão exigidas, dimensionando-as de maneira que não haja ociosidade ou excesso ao longo de todo o período de trabalho.

## Descrição das operações no *packing house*

No processamento do fruto, visando obter um produto final de qualidade e que satisfaça clientes e consumidores, vários fatores devem ser levados em consideração. O primeiro é verificado antes mesmo do processamento propriamente dito, pois refere-se à escolha da matéria-prima. Para isso, faz-se necessário um profundo conhecimento, em nível de campo, sobre a produção e a colheita, uma vez que em função disso haverá ou não reduções significativas no trabalho feito no *packing house*.

Assim, devem ser considerados os defeitos e o descarte de frutos inadequados, procedimentos que afetam de maneira decisiva o rendimento e a rentabilidade de todo o processo. Devem-se também conhecer a fundo o processo, as técnicas, os melhores produtos a serem utilizados e possuir um controle de qualidade dinâmico e eficiente para que se possa manter um padrão constante e dentro dos limites previamente estabelecidos.

Com relação ao processamento do fruto propriamente dito, existem muitas maneiras de fazê-lo e uma infinidade de equipamentos e combinações de máquinas destinadas a tal finalidade. Além disso, devem ser levadas em consideração diferenças entre frutos de distintas variedades, que apresentam maior ou menor sensibilidade à passagem pela linha do *packing house*.

Como exemplos práticos, podem ser citados o tangor 'Murcott' e a tangerina 'Ponkan', que necessitam de maiores cuidados, como menor velocidade das escovas ou mesmo um número reduzido delas, quando comparados com as laranjas doces. O destino dos frutos, mercado interno ou exportação, e a época de colheita também devem ser levados em conta, uma vez que em função desses aspectos serão exigidos maiores ou menores cuidados. O próprio mercado pode interferir no tipo de máquina a ser utilizado.

Para fins didáticos, será descrita a seguir uma linha de processo completa, procurando mostrar as variações existentes, quando se fizer necessário ou merecer destaque.

## Descarga e primeira seleção

O local destinado à descarga de frutos dependerá dos tipos de embalagem nas quais eles serão acondicionados e transportados, desde o campo. Nos *packings* tradicionais, os frutos, que chegam em caixas plásticas com capacidade de 27 kg, são despejados manualmente em uma esteira composta de roletes, dimensionando-se a distância entre eles de modo a permitir que folhas, ramos e outros materiais estranhos ao processo caiam por entre eles (*trash*).

Em processos mais modernos, em que a colheita de frutos é feita em caixas-pallet com capacidade para até 400 kg, eles são despejados mecanicamente na esteira de recepção, havendo também casos automatizados para caixas plásticas e *packings* em que os frutos são descarregados em uma balsa de água, sendo esta uma prática desejável no sentido de se evitarem golpes na superfície da fruta durante essa operação.

Em outra variação do sistema, os frutos chegam a granel, em caminhão, são descarregados em uma rampa situada em desnível com relação ao local do processo e são levados para a esteira de recepção por um elevador de canecas. A inconveniência desse sistema está no fato de os frutos, por não serem acondicionados em caixas, sofrerem uma excessiva pressão durante o transporte, principalmente aqueles da parte inferior da carga, além de colidirem entre si durante a descarga, o que afeta sua qualidade. A primeira seleção deve ocorrer nesse momento, descartando-se os frutos impróprios ao consumo, como frutos verdes, machucados e podres. O índice de descarte será diretamente proporcional aos cuidados tomados durante a colheita e o transporte.

## Pré-calibração

O pré-calibrador, como seu nome indica, é uma máquina que faz a separação dos frutos em três diâmetros básicos. Frutos miúdos e excessivamente graúdos, que não apresentarem diâmetro desejável à comercialização in natura, serão separados para envio posterior à industrialização ou mesmo descartados, prosseguindo na linha somente aqueles com diâmetros intermediários e de valor comercial, esperando-se que estes correspondam à maior proporção da colheita.

## Lavagem

Esse tratamento destina-se à eliminação, da superfície do fruto, de restos de produtos aplicados no campo, pragas e esporos de fungos e poeira, dentre outros. Após a pré-calibração, os frutos passam por uma balsa, onde podem ser combinados tratamentos com fungicidas. No caso da citricultura de países como Espanha e Argentina, poderá ser empregado o produto ortofenilfenato sódico (OPPS), de acordo com Tuset (1987). Essa técnica é a melhor maneira de se aplicar os fungicidas, especialmente os derivados de benzimidazóis e imidazóis. Com esse procedimento, a penetração do produto será maior, alcançando todas as partes externas dos frutos. Essa operação é opcional. Caso não sejam aplicados fungicidas, os frutos passarão diretamente para a máquina de lavagem, que consiste de rolos de náilon em número aproximado de 20, segundo Mazzuz (1996), ou 40, segundo Rodriguez et al. (1991).

A aplicação de detergente poderá se dar em forma de cortina de espuma, realizando-a no início da linha de rolos. A partir desse momento, os frutos serão escovados, recomendando-se que a velocidade das escovas situe-se na faixa de 120 rpm a 145 rpm (GRIERSON et al., 1986b).

Em seguida, haverá o enxágue dos frutos por jatos de água sob pressão, passando-os por rolos de látex ou pvc, para a eliminação do excesso de água. Essa operação também permite a aplicação conjunta de fungicidas, que podem ser misturados ao detergente (AMAT, 1991). Esse tipo de aplicação, geralmente, apresenta menor eficiência que a aplicação na balsa, por ser menos uniforme e não permitir contato eficiente do produto com os frutos.

## Aplicação de fungicidas em spray

Conforme relatado, a aplicação de fungicidas pode ser realizada durante distintas fases do processo. A aplicação de fungicidas em spray consiste em uma operação específica logo após a lavagem e enxágue. Ao saírem dos rolos de enxágue, os frutos passam por rolos de crina de cavalo, quando o produto é aplicado por aspersores na superfície dos frutos e por meio de sua impregnação nos rolos.

Visando a uma correta aplicação, além da observação da dosagem do produto, recomenda-se a instalação de um agitador no tanque da suspensão, uma vez que os produtos, em sua maioria, são insolúveis em água. Outro detalhe importante é a constante inspeção dos bicos dos aspersores, que podem vir a entupir com o passar do tempo, prejudicando a distribuição e homogeneidade da aplicação.

## Pré-secagem

Destina-se à secagem dos frutos, previamente ao tratamento com ceras. Os frutos devem passar por um túnel, onde é injetado ar quente em sentido contrário ao seu fluxo. Nessa operação,

a temperatura deve estar na faixa de 45 °C a 50 °C, nunca excedendo os 54 °C, sendo o tempo de permanência de 1,45 a 2 minutos (GRIERSON et al., 1986b).

Além da observação das indicações de temperatura apresentadas, deve-se atentar para a temperatura ambiente, verificando-se na saída do túnel se os frutos não se encontram demasiadamente quentes. Deve-se, também, acompanhar, de maneira sistemática, o correto funcionamento do termostato e garantir que os frutos girem nos rolos enquanto avançam pelo túnel. A escovação excessiva nessa fase, em combinação com altas temperaturas, pode favorecer a aparição de uma desordem chamada de necrose peripeduncular, por provocar uma transpiração excessiva na zona peduncular dos frutos.

Em muitos casos, após o processo de secagem, os frutos passam por um conjunto de escovas polidoras, em número de 60 (RODRIGUEZ et al., 1991), feitas de crina de cavalo, realçando a cera natural que os recobre, terminando nesse ponto o processo.

## Aplicação de ceras artificiais

Uma vez secos, os frutos devem passar pela máquina aplicadora de ceras artificiais, que consiste em um conjunto de bicos aspersores (em número de quatro, em linhas com largura de 1,75 m ou 2 m) que deslizam por uma barra em sentido transversal à passagem dos frutos na linha. O produto é aspergido na passagem dos frutos por escovas de crina de cavalo, impregnando-as, e o tratamento dá-se pela distribuição da cera pelas escovas de maneira uniforme na superfície dos frutos.

O número mínimo recomendável de escovas é de seis a oito (MARTÍNEZ-JÁVEGA et al., 1984), não devendo sua velocidade exceder os 80 rpm, de modo a não produzir espuma, permitindo uma distribuição homogênea das ceras. Durante o tratamento, é necessário que se verifique continuamente a quantidade de cera que está sendo aplicada, que deverá ser de aproximadamente 1 L por tonelada de fruto.

Uma aplicação mal feita pode levar à ocorrência de frutos esbranquiçados, em virtude da ruptura da película formada pela cera, ou com manchas, o que poderá causar seu rechaço no mercado. Sendo assim, é necessário revisar periodicamente os aspersores com relação a possíveis obstruções ou entupimentos.

## Secagem dos frutos

O processo de secagem assemelha-se ao pré-secamento, quando os frutos passam pelo túnel de secagem. As mesmas recomendações são válidas, sendo que o tempo de permanência, nesse caso, deverá ser de 2,5 a 3 minutos (GRIERSON et al., 1986b). Com relação à temperatura, os mesmos cuidados devem ser tomados, para que se evitem queimaduras e manchas na casca dos frutos, sendo que a temperatura nesse ponto não deverá ser maior que 50 °C. Uma vez secos, os frutos

podem passar novamente por um conjunto de escovas polidoras de crina de cavalo, objetivando incrementar seu brilho.

## Segunda seleção

Trata-se da principal seleção, em que serão separados frutos com problemas de manchas, defeituosos ou fora das especificações previamente definidas. Essa escolha é feita em uma esteira de roletes metálicos, devendo a mão de obra responsável pela operação ser treinada e orientada no sentido de seguir à risca as especificações estabelecidas.

Outro fator importante a ser observado refere-se ao ambiente onde esse trabalho é realizado, já que ele exige atenção e concentração por parte dos funcionários. Detalhes como iluminação apropriada, turnos de trabalho, descansos periódicos e altura das esteiras deverão ser levados em conta.

## Classificação

Essa operação visa à separação dos frutos em distintos diâmetros, em uma máquina chamada de classificador. Existem no mercado diversos tipos de classificadores, sendo os mais comuns os tradicionais modelos mecânicos, que consistem em um conjunto de esteiras e roletes ajustados em função de distintos diâmetros de fruto. A escolha do modelo ideal dependerá basicamente do tipo de fruto a ser trabalhado e do capital passível de ser investido em sua aquisição.

Em *packing houses* modernos, a classificação é feita por máquinas comandadas por computadores, em que peso e volume são monitorados por leitores óticos, quando os frutos caem em canecas e são pesados e escaneados eletronicamente, sendo aqueles com pesos ou volumes similares direcionados a uma mesma esteira, para posterior embalagem. Essas máquinas também são utilizadas para separar frutos por cor da casca, quando o objetivo é o de se destinar frutos para a desverdização.

## Embalagem

De acordo com Mazzuz (1996), o acondicionamento dos frutos em embalagens tem implicações com sua manipulação, seu transporte, sua distribuição e sua apresentação, objetivando evitar que eles se machuquem, sujem ou se contaminem durante essas fases do processo mercadológico, mantendo sua aparência atrativa e respondendo aos anseios dos clientes e consumidores e às normas estabelecidas pelos governos, entidades normatizadoras e fiscalizadoras.

Uma boa embalagem deve assegurar ao produto proteção frente a fatores adversos, como temperatura e umidade inadequadas à sua conservação, pragas e insetos, e possíveis golpes que possam comprometer sua integridade, além de apresentar custo compatível com o retorno finan-

ceiro esperado com sua comercialização. Outro fator, cuja importância vem aumentando continuamente, diz respeito à reciclagem do material utilizado na confecção das embalagens, uma vez que estas, em sua maioria, serão destruídas ou recicladas em seu destino final.

Uma vez classificados, os frutos vão para as bancas de embalagem, podendo essa operação ser feita de distintas maneiras. A embalagem tradicionalmente utilizada no mercado interno brasileiro é a caixa de madeira de 20 kg, que é enchida manualmente, colocando-se os frutos em camadas, em número variável de acordo com o seu diâmetro. Esse tipo de embalagem visa, também, atender certas exigências das Ceasas.

Bolsas de rafia, cujo peso pode variar entre 2 kg e 20 kg, têm sido amplamente utilizadas na comercialização de frutas cítricas, especialmente em hipermercados, estabelecimentos que se destacam por seu número e sua importância no atual mercado consumidor. O preenchimento dessas bolsas dá-se manualmente ou por meio de máquinas apropriadas, que controlam seu peso e fecham-nas automaticamente.

Outro tipo de embalagem, empregado via de regra na exportação de frutos in natura, é a caixa de papelão com capacidade que pode variar de 8 kg a 20 kg. Dentre os modelos disponíveis, destacam-se a caixa telescópica fundo e tampa, com capacidade para 18 kg, e a caixa do tipo *platform*, esse um modelo patenteado e de grande utilização no mercado internacional, por ser mais resistente e autoexpositor. Em ambos os casos, são necessárias máquinas para a colagem e montagem das caixas, o que ocorre no próprio *packing house*. Após a acomodação das frutas, as caixas são dispostas em pilhas que comporão um *pallet*, com dimensões específicas para os porões dos navios frigoríficos ou contêineres refrigerados.

Além dos modelos citados, mais utilizados na prática, diferentes exigências de clientes e apresentações dos frutos têm levado ao desenvolvimento de outros tipos de embalagens.

## A higienização do *packing house*

A higienização do *packing house* é de extrema importância, condição esta cada vez mais exigida da parte dos mercados compradores. Relaciona-se diretamente à qualidade do fruto e à sua vida pós-colheita. Esse cuidado deve ser constante, o que exige a adoção de algumas medidas na rotina das casas de embalagem. A primeira consiste na planificação do *packing* por meio da separação do que seja a zona suja, que compreende as áreas de recepção, lavagem e primeira escolha, da zona de processamento propriamente dita, onde os frutos recebem os tratamentos, sendo finalmente selecionados e embalados.

Devem também existir proteções contra a entrada de insetos, pássaros e outros animais, além de poeira ou qualquer outro tipo de agente poluente, eliminando-se imediatamente possíveis focos de contaminação, como frutos podres.

Outro ponto muito importante diz respeito ao controle das contaminações microbianas, por meio da lavagem sistemática das máquinas e dos equipamentos utilizados e de toda a área do *packing house*. Para uma limpeza mais grosseira, deve ser utilizada água pressurizada, de boa qualidade e acrescida de produtos de higiene específicos, como detergentes e fungicidas, visando reduzir a ocorrência de patógenos.

## Normas de classificação da laranja

Como qualquer produto dirigido a mercados mais exigentes em qualidade, a laranja, para ser comercializada, deve passar por uma série de tratamentos, conforme descrito. Uma vez processada, ela deve ser selecionada de acordo com critérios pré-estabelecidos, de forma a possibilitar a venda de lotes homogêneos. Para isso, foram desenvolvidas e recentemente aperfeiçoadas normas para a classificação da laranja [Classificação da Laranja, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, Programa de Adesão Voluntária, 2000].

O Grupo Brasileiro de Citros de Mesa, coordenado pela Ceagesp, definiu classificação como a “separação do produto por cor, tamanho e qualidade” (MENEGUCCI, 2000). Ainda segundo o referido grupo, “classificar a laranja é unificar a linguagem do mercado, onde produtores, atacadistas, indústrias, varejistas e consumidores devem ter os mesmos padrões para determinar a qualidade do produto” (MENEGUCCI, 2000). Dessa maneira, obtêm-se transparência na comercialização, melhores preços para os consumidores, menores perdas e melhor qualidade. Essas regras se aplicam não apenas à laranja, mas a todas as frutas cítricas, devendo ser uma referência para todos que atuam no setor.

Com relação à coloração, são distinguidos cinco grupos, que vão desde o verde-banderado, ou seja, quando a fruta inicia seu processo de mudança de cor, até a cor alaranjada típica. O calibre da fruta é classificado em 15 diferentes classes, variando desde a classe 106, que abrange diâmetros entre 106 mm e 116 mm, frutas consideradas grandes, até a classe mínima de 54, referente ao diâmetro de 54 mm.

Com relação aos defeitos, são considerados graves os danos profundos, decorrentes de quaisquer lesões de origem mecânica, patológica ou entomológica que atinjam o albedo da fruta. Também são considerados defeitos as podridões causadas por fungos que resultem em decomposição, desintegração ou fermentação da fruta, assim como frutas passadas, com alterações típicas de sabor em virtude de um estado adiantado de maturação, ou sobremaduros. Os defeitos leves referem-se a quaisquer desvios da forma característica da cultivar, incluindo os de origem fisiológica e mecânica (amassamentos), além da falta de turgescência causada por desidratação. Dividem-se em níveis 1 e 2.

Como “manchas”, considera-se qualquer alteração na coloração original da casca da laranja, independentemente de sua origem. Manchas difusas são aquelas que não encobrem a cor original

da casca da fruta, permitindo sua perfeita visualização, ou seja, um conjunto de pequenas manchas. Já as manchas profundas são aquelas que não permitem a visualização original da casca da fruta, incluindo-se nesse grupo danos causados por cicatrizes, lesões patológicas, entomológicas e as provocadas por ácaros, que não atinjam o albedo. Também dividem-se em níveis 1 e 2.

O tipo ou a categoria do fruto será determinado pela ocorrência de defeitos graves ou leves, associados a requisitos de homogeneidade e à presença de cálice. Da combinação de defeitos graves e manchas, determina-se a categoria dos frutos em porcentagem. Frutos de categoria Extra são aqueles que praticamente não apresentam defeitos graves e, no máximo, 5% de manchas de nível 1. A partir daí, os frutos são classificados em Categoria I até Categoria IV, esta última com maiores porcentagens de defeitos e manchas. A classificação ainda estabelece outros requisitos, como porcentagem máxima de frutos sem cálice, que varia de 5%, na Extra, a até 100% na Categoria IV.

Como requisitos gerais, as laranjas deverão apresentar características típicas da cultivar quanto à forma, cor da casca e da polpa, sempre levando-se em conta a região produtora. Não é permitida, dentro do programa idealizado pela Ceagesp, a venda de laranja imatura, considerada como sendo aquela que não atingiu o teor de sólidos solúveis mínimo, o índice de maturação (*ratio*) e a porcentagem de suco considerada aceitável para consumo. Dentro do programa, não é permitida a mistura de diferentes variedades na mesma embalagem.

A classificação também abrange detalhes sobre a embalagem e rotulagem do fruto. O rótulo é o certificado de origem do produto e garante sua rastreabilidade, devendo, segundo o Grupo Brasileiro de Citros de Mesa, ser de uso obrigatório e regulamentado pelo governo federal. O rótulo deve ter um código de barras, que será utilizado na captura de dados nos processos automatizados.

## Certificação da produção e resíduos de defensivos agrícolas

Por mais diferentes que sejam as culturas e os hábitos de consumo no tocante a produtos hortifrutigranjeiros, os consumidores sempre levam em conta sua qualidade no momento da compra. Dentre as diferentes definições para esse termo, duas podem ser citadas como válidas para o mercado de citros in natura. A Real Academia Espanhola (CALIDAD, 1992, p. 365) define qualidade como: “o conjunto de propriedades inerentes a um produto que permite apreciá-lo como igual, melhor ou pior que os restantes da sua espécie”. Já para Pozzan (2004), todas as características que determinam o valor de um produto por parte dos consumidores indicam sua qualidade.

No caso dos frutos cítricos, e da grande maioria das espécies frutíferas, a qualidade vai depender de uma série de fatores e características relacionadas com suas condições intrínsecas e das manipulações que eles tenham sofrido. A qualidade dos frutos, no momento da colheita, vai

representar sua qualidade potencial. A partir daí, tal qualidade poderá ser mantida ou deteriorada, dependendo em grande parte dos tratamentos que venham a receber.

Com o intuito de se manter essa qualidade potencial, os frutos são tratados, desde os primórdios da sua produção no campo, até o final da sua passagem pela linha de processamento, com produtos conhecidos por defensivos agrícolas, como inseticidas e fungicidas, que têm como objetivo evitar ataques de pragas e doenças antes, durante e depois do seu processamento. Esses tratamentos, se bem conduzidos, são eficientes e certamente vão proporcionar, aos consumidores, frutos de muito boa qualidade, tanto cosméticas, quanto organolépticas. Mas, se mal conduzidos, podem trazer problemas com relação aos resíduos que tais produtos podem deixar, com riscos à saúde do consumidor.

A produção não orgânica de frutas cítricas, praticada pela grande maioria dos produtores, exige a utilização de produtos químicos, dentre os quais há os defensivos. Em relação a esses, há uma constante preocupação no sentido de se evitar resíduos prejudiciais à saúde humana e à preservação do meio ambiente. Para que tais resíduos não venham causar problemas de contaminação, alguns cuidados devem ser tomados ao longo da produção até o processamento no *packing house*, como os descritos por Pozzan (2004):

- Utilização correta dos defensivos agrícolas, que devem ser prescritos por engenheiros-agrônomo habilitados para tal, levando-se em conta os preceitos do manejo ecológico de pragas, que visa a uma utilização racional desses produtos, além da opção por produtos menos tóxicos possíveis, com maior seletividade a inimigos naturais e baixo risco ao meio ambiente.
- Respeito às dosagens de rótulo dos produtos, com o objetivo de se promover um manejo da resistência das pragas e doenças, destacando nesse caso aqueles produtos utilizados nos *packing houses*, cujos frutos serão consumidos logo na sequência do processamento.
- Respeito às carências dos produtos antes de se efetuar a colheita, minimizando o risco de contaminação dos frutos.
- Registro de todas as aplicações de pesticidas, visando promover a rastreabilidade da produção.

Agindo dessa maneira, o produtor estará satisfazendo as exigências básicas para uma produção segura, que vai atender aos mais diversos e exigentes mercados, quer seja ele interno ou externo. Isso se torna fundamental para atender aos atuais protocolos de garantia da qualidade, como o EurepGap<sup>3</sup> e GlobalGap, e de protocolos internos seguidos à risca por cadeias de supermercados.

Dentre os temas que vêm preocupando produtores e exportadores de citros e demais frutas, a harmonização europeia é, sem dúvida, um dos assuntos principais. Iniciado no ano de 1991,

---

<sup>3</sup> EUREP refere-se a *European Retailers Produce Working Group*, que preparou um protocolo de Boas Práticas Agrícolas (*Good Agricultural Practices – GAP*), que devem ser seguidas pelos produtores, que recebem certificação de uma terceira parte.

pela Diretiva 91/414/CE, o processo visa harmonizar o uso de produtos agroquímicos nos países comunitários europeus. Desde então, cada país desse imenso bloco que congrega mais de 450 milhões de consumidores está harmonizando sua legislação com a dos demais para o registro, o uso, a rotulagem e a comercialização de todos os ingredientes ativos, na prática mais de 900, em um processo que, no seu final previsto para o próximo ano, vai manter apenas a metade dos registros desses produtos.

Essa questão deverá impor mais um desafio ao agricultor que destina sua fruta aos mais diferentes mercados, internos ou externos, e mesmo para a produção de sucos e néctares, pois lhe trará uma preocupação a mais na hora de utilizar um determinado produto, pois ele não poderá usar um produto sem registro no Brasil e no exterior; e, se utilizá-lo, deverá se certificar que este não deixe resíduos acima do limite máximo permitido (LMR) pela legislação local ou do país a que queira exportar.

## Referências

- ALBRIGO, L. G. Distribution of stomata and epicuticular wax on oranges as related to stem-end-rind breakdown and water loss. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, College Park, v. 97, p. 220-223, 1972.
- ALBRIGO, L. G. Influências ambientais no desenvolvimento dos frutos cítricos. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS, 2., 1992, Bebedouro. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1992. p. 100-106.
- ALBRIGO, L. G. Peel morphology and fruit blemishes. In: FERGUSON, J. J. (Ed.). **Citrus flowering, fruit set and development**. Gainesville: University of Florida, 1986. p. 73-80.
- AMAT, S. R. **Defectos y alteraciones de los frutos cítricos en su comercialización**. Almassora: Lit. Nicolau, 1991. 153 p.
- ARPAIA, M. L. Pre-harvest management influences post-harvest quality. **Citrograph**, Riverside, v. 6, p. 10-12, 1995.
- ARTÉS, F. Tratamientos de postcosecha de productos hortofrutícolas de producción integrada. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO INTEGRADA DE FRUTAS, 7., 2005, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2005. 1 CD ROM.
- AUGUSTÍ, M.; ALMELA, V. **Aplicación de bioreguladores en citricultura**. Barcelona: Aedos, 1991. p. 77-100.
- BAKER, E. A.; PROCOPIOU, J.; HUNT, G. M. The cuticles of citrus species: Composition of leaf and fruit waxes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Cambridge, v. 26, p. 1092-1101, 1975.
- BEN-YEHOSHUA, S. Gas exchange, transpiration and the commercial deterioration of orange fruit in storage. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, College Park, v. 94, p. 524-526, 1969.
- BEN-YEHOSHUA, S. Transpiration, water stress and gas exchange. In: WEICHMANN, J. (Ed.). **Postharvest physiology of vegetables**. New York: Marcel Dekker, 1987. p. 113-170.
- BEN-YEHOSHUA, S.; BURG, S. P.; YOUNG, R. Resistance of citrus fruit to mass transport of water vapor and other gases. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 79, p. 1048-1053, 1985.
- BIALE, J. B. Postharvest physiology and chemistry. In: SINCLAYR, W. B. (Ed.). **The orange fruit**. Riverside: University of California Press, 1961. p. 96-131.
- BROWN, G. E. Efficacy of citrus post harvest fungicides applied in water or resin solution water wax. **Plant Disease**, St. Paul, v. 68, n. 5, p. 415-418, 1984.
- BROWNING, H. W.; MACGOVERN, R. J.; JACKSON, K. J.; CALVERT, D.; WARDOWSKI, W. F. **Florida citrus diagnostic guide**. Lake Alfred: Florida Science Source, 1995. 244 p.
- CALIDAD. In: DICCIONARIO de la lengua española. 21. ed. Madrid, ES: Real Academia Española, 1992. Tomo 1, p. 365.

- CASTLE, W. S.; TUCKER, D. P. H.; KREZDORN, A. H.; YOUTSEY, C. O. **Rootstocks for Florida citrus**. Gainesville: University of Florida, 1993. 92 p.
- CASTRO, P. R.; MEDINA, C. L.; PACHECO, A. C. Potencialidades para a utilização de reguladores vegetais na planta cítrica. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 17, n. 1, p. 109-122, 1997.
- CHAPMAN, H. D. The mineral nutrition of citrus. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L. D.; WEBBER, H. J. (Ed.). **The citrus industry**. Riverside: University of California, 1968. p. 127-289.
- CHITARRA, A. B. Histórico da pós-colheita no Brasil. In: NASCIMENTO, L. M.; DE NEGRI, J. D.; MATTOS JÚNIOR, D. (Org.). **Tópicos em qualidade e pós-colheita de frutas**. Campinas: Instituto Agronômico: Fundag, 2008. 285 p.
- CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: Esal-Faepe, 1990. 320 p.
- CUQUERELLA, J. **Efectos de distintos recubrimientos céreos y plásticos en la fisiología post-recolección y en la calidad de frutos cítricos**. 1990. 204 f. Tesis (Doctorado en Post-recolección) - Universidad Politécnica de Valencia, España.
- CUQUERELLA, J.; MARTÍNEZ-JÁVEGA, J. M. Waxing of Spanish citrus fruit. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 5., 1984, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo: International Society of Citriculture, 1984. v. 2, p. 494-496.
- DAVIES, F. S.; ALBRIGO, L. G. **Citrus**. Wallingford: Cab International, 1994. 254 p.
- DAVIS, P. L.; HOFMANN, R. C. Effects of coatings on weight loss and ethanol build-up in juice of oranges. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 21, p. 455-458, 1973.
- DI GIORGI, F.; IDE, B. Y.; TRIBONI, H. R.; MARCHI, R. J.; WAGNER, R. L. Qualidade de laranja para industrialização. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 14, n. 1, p. 97-118, 1993.
- DONADIO, L. C.; FIGUEIREDO, J. O.; PIO, R. M. **Variedades cítricas brasileiras**. Jaboticabal: FUNEP, 1995. 228 p.
- EAKS, I. L.; LUDI, E. A. Effects of temperature, washing and waxing on the composition of the internal atmosphere of orange fruits. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, Beltsville, v. 76, p. 220-228, 1960.
- EL-OTMANI, M.; COGGINS, C. W. Fruit age and growth regulator effects on the quantity and structure of the epicuticular wax of 'Washington Navel' orange fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, College Park, v. 110, n. 3, p. 371-378, 1985.
- EL-OTMANI, M.; COGGINS, C. W.; EAKS, I. L. Fruit age and gibberellic acid effect on epicuticular wax accumulation, respiration and internal atmosphere of navel orange fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, College Park, v. 111, n. 2, p. 228-232, 1986.
- EMBLETON, T. W.; JONES, W. W. Valencia orange creasing, fruit color and other factors affecting crop value, as influenced by N, K and Mg and their interrelations. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, Griffith, n. 1, p. 93-101, 1973.
- ERICKSON, L. C. The general physiology of citrus. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L. D.; WEBBER, H. J. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California Press, 1968. p. 86-126.
- FEICHTENBERGER, E.; MULLER, G. W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p. 261-296.
- GRIERSON, W. Disorders. In: WARDOWSKY, W. F.; NAGYRAND, S.; GRIERSON, W. (Ed.). **Fresh citrus fruit**. Westport: Avi Pub., 1986. p. 361-377.
- GRIERSON, W. Physiological disorders of citrus fruit. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, Griffith, v. 2, p. 764-767, 1981.
- GRIERSON, W.; COHEN, E.; KITAGAWA, H. Degreening. In: WARDOWSKY, W. F.; NAGYRAND, S.; GRIERSON, W. (Ed.). **Fresh citrus fruit**. Westport: Avi Pub., 1986a. p. 253-274.
- GRIERSON, W.; SMITH, A. F. G.; THORNTON, F.; FELSENTEIN, G. Packingline machinery. In: WARDOWSKY, W. F.; NAGYRAND, S.; GRIERSON, W. (Ed.). **Fresh citrus fruit**. Westport: Avi Pub., 1986b. p. 287-313.
- GRIERSON, W.; WARDOWSKI, W. F. Relative humidity effects on the postharvest life of vegetables. **HortScience**, Alexandria, v. 13, n. 5, p. 570-573, 1978.

- HALL, D. J. Innovations in citrus waxing - an overview. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Orlando, v. 94, p. 258-263, 1981.
- HODGSON, R. W. Horticultural varieties in citrus. In: REUTHER, W.; WEBBER, H. J.; BATCHELOR, L. D. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1967. v. 1, p. 431-591.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. **Plano diretor estratégico para 2010-2020**. São Paulo, 2010. 357 p.
- KADER, A. A. Respiration and gas exchange of vegetable. In: WEICHMANN, J. (Ed.). **Postharvest physiology of vegetables**. New York: Marcel Dekker, 1987. p. 25-43.
- KAUFMANN, M. R. Water potential components in growing citrus fruit. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 46, p. 145-149, 1970.
- MARTÍNEZ-JÁVEGA, J. M.; JIMENEZ-CUESTA, M.; CUQUERELLA, J.; CERVERA, L. Encherado de frutos cítricos. **Revista Levante Agrícola**, Valencia, v. 251-252, p. 106-113, 1984.
- MAZZUZ, C. A. **Calidad de frutos cítricos, manual para su gestión desde la recolección hasta la expedición**. Reus: Ediciones de Horticultura, 1996. 317 p.
- MENEGUCCI, J. L. P. **Classificação da laranja**. São Paulo: CEAGESP, 2000. 1 folder.
- NOGUEIRA, J. G. A. **Proposta de plano estratégico para a fruticultura brasileira ampliar a participação no mercado internacional**. 2010. 165 f. Dissertação (Mestrado em Administração) – Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- OFFERS, J. A. **Citrus: diseases and defects found in the marketplace**. Papendrecht: J. A. Offers, 1987. 69 p.
- PANTASTICO, E. B. **Fisiología de la postrecolección, manejo y utilización de frutos y hortalizas tropicales y subtropicales**. Westport: Avi Pub., 1975. 630 p.
- PARKER, M. L.; WARDOWSKY, W. F.; DEWEY, D. H. A damage test for oranges in a commercial packing house line. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Orlando, v. 97, p. 136-137, 1984.
- POZZAN, M. A. Comportamento e tratamentos de frutos cítricos em pós-colheita. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 18, n. 1, p. 189-204, 1997.
- POZZAN, M. A. Problemas fitossanitários e de resíduos de agrotóxicos na pós-colheita de citros. **Visão Agrícola**, Piracicaba, v. 1, n. 2, p. 117-122, 2004.
- POZZAN, M. A. **Selección de recubrimientos cereos y plásticos en la comercialización de frutos cítricos**. 1992. 104 f. Dissertação (Master of Science) - Universidad Politécnica de Valencia, España.
- POZZAN, M. A. Situação do manejo pós-colheita no Brasil. In: REUNIÓN INTERNACIONAL DE POSTCOSECHA Y MERCADOS CÍTRICOS, 1., 1996, Concordia. **Anais...** Concordia: RIAC-INTA, 1996. p. 103-114.
- POZZAN, M. A.; TRIBONI, H. R. Colheita e qualidade do fruto. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico: Fundag, 2005. p. 800-822.
- PURVIS, A. C. Moisture loss and juice quality from waxed and individually seal packaged citrus fruit. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Orlando, v. 96, p. 327-329, 1983.
- REESE, R. L.; KOO, R. C. J. Effects of N and K fertilization on internal and external quality of three major Florida orange cultivars. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, College Park, v. 100, p. 425-428, 1975.
- REUTHER, W.; RÍOS-CASTAÑO, D. Comparison of growth, maturation and composition of citrus fruit in subtropical California and tropical Colombia. In: INTERNATIONAL SOCIETY CITRICULTURE, 1., 1969, Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1969. v. 1, p. 277-300.
- RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A. A. **Citricultura brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1991. 941 p.
- SCHULMAN, Y.; MONSELISE, S. P. Some studies on the cuticular wax of citrus fruit. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 45, p. 471-478, 1970.
- TUSET, J. J. **Podredumbres de los frutos cítricos**. Valencia: Generalitat Valenciana, Conselleria D'Agricultura y Pesca, 1987. 206 p.
- VÁZQUEZ, D. Danos causados por frio em postcosecha de cítricos. In: NASCIMENTO, L. M.; DE NEGRI, J. D.; MATTOS JÚNIOR, D. (Org.). **Tópicos em qualidade e pós-colheita de frutas**. Campinas: Instituto Agronômico: Fundag, 2008. 285 p.

WANG, L. C. Y. Physiological and biochemical responses of plants to chilling injury stress. **Hortscience**, Alexandria, v. 17, n. 2, p. 169-186, 1982.

WHITESIDE, J. O. Diseases of fruit. In: FERGUSON, J. J. (Ed.). **Citrus flowering, fruit set and development**. Gainesville: University of Florida, 1986. p. 81-89.

# Cultivares porta-enxerto

Almir Pinto da Cunha Sobrinho

Orlando Sampaio Passos

Walter dos Santos Soares Filho

## Introdução

As plantas cítricas podem ser propagadas por sementes, graças à embrionia nucelar, ou por enxertia, estaquia, alporquia e, ainda, mediante técnicas de cultura de tecidos. A multiplicação por sementes nem sempre é viável, porque há cultivares que não as têm, são aspérmicas, enquanto outras são monoembriônicas, resultando em descendência muito variável, obtida por cruzamento ou autofecundação naturais, não reproduzindo, portanto, a planta-mãe. A propagação por sementes apresenta também outros inconvenientes sérios, como vigor excessivo, presença de espinhos e início tardio de produção. Além disso, há que se considerar a incidência de podridões de *Phytophthora* spp. em genótipos suscetíveis propagados sob a forma de pés-francos, como são chamadas as plantas originadas de semente, o principal inconveniente também da propagação por alporquia e estaquia. Esses dois últimos métodos, embora resultem em indivíduos geneticamente idênticos à planta-mãe e sem as desvantagens da juvenildade das plantas oriundas de semente, não são usados em citricultura porque, de maneira geral, as estacas de citros enraizam com dificuldade e não formam bons sistemas radiculares (DORNELLES, 1988; GONZÁLEZ-SICILIA, 1960; POMPEU JUNIOR, 1991).

Dos métodos citados, o mais empregado é a enxertia, pelas inúmeras vantagens que apresenta, destacando-se dentre essas a obtenção de plantas uniformes, praticamente idênticas à planta-mãe, e com início precoce de produção. A escolha correta do porta-enxerto favorece o aumento da produtividade, a obtenção de frutos de melhor qualidade, a resistência ou tolerância a condições adversas de clima, solo e pragas (termo aqui aplicado a artrópodes-praga e a doenças). A enxertia é o sistema de multiplicação no qual se provoca a soldadura dos tecidos de duas plantas. Uma delas, o porta-enxerto, ou cavalo, fornece o sistema radicular e a parte basal do tronco, enquanto a outra, chamada de enxerto, copa ou cavaleiro, forma a parte aérea. A parte aérea resulta do desenvolvimento de um fragmento (borbulha ou garfo) retirado de uma planta-matriz, sendo, portanto, geneticamente igual a esta, de modo que produzirá frutas idênticas às da variedade que está sendo propagada, com as ressalvas dos efeitos do porta-enxerto (DORNELLES, 1988).

## Histórico

Os porta-enxertos distinguem-se entre os componentes mais interessantes e importantes da história da citricultura mundial. No Brasil, sua trajetória ao longo do tempo, pode ser resumida da seguinte forma: da introdução dos citros, feita pelos portugueses por volta de 1530–1540 até os fins do século 19, as plantas cítricas eram propagadas por semente. Em princípios do século 20, quando a cultura atingiu expressão comercial, e com o conhecimento das vantagens da enxertia, iniciou-se o uso dessa técnica, empregando-se a laranjeira doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] ‘Caipira’ como porta-enxerto na maioria dos casos. A baixa tolerância à seca e a suscetibilidade à gomose ou podridão causada por *Phytophthora* spp. dessa cultivar levaram à sua substituição pela laranjeira ‘Azeda’ (*C. aurantium* L.), que passou a ser o principal porta-enxerto, no País e no mundo cítrico. Em menor escala, eram utilizados o limoeiro ‘Cravo’ (*C. limonia* Osbeck), a laranjeira ‘Caipira’, o limoeiro ‘Rugoso’ (*C. jambhiri* Lush.) e a limeira ‘da Pérsia’ (*C. limettoides* Tanaka).

Com a introdução do vírus-da-tristeza-dos-citros (*Citrus tristeza virus*, CTV), no final da década de 1930 e início da de 1940, e sua rápida disseminação pelos pomares brasileiros, as plantas enxertadas na laranjeira ‘Azeda’ e na citada limeira morreram. Depois desse verdadeiro desastre, esses porta-enxertos foram definitivamente substituídos pelo limoeiro ‘Cravo’, pela laranjeira ‘Caipira’, pela tangerineira ‘Cleópatra’ (*C. reshni* hort. ex Tanaka) e pelo limoeiro ‘Rugoso’, que se mostraram tolerantes ao vírus causador da doença, em ensaios conduzidos pelo Instituto Agrônomo, em São Paulo. A partir da década de 1960, o limoeiro ‘Cravo’ assumiu definitivamente a predominância em todo o País, situação que permanece até os dias atuais, em virtude de a morte-súbita-dos-citros (MSC) não ter se expandido como era previsto. A suscetibilidade do limoeiro ‘Cravo’ aos viroides da exocorte e da xiloporose mostrou que a vulnerabilidade dos porta-enxertos ainda não estava resolvida, porque a grande maioria dos clones usados à época era portadora dos agentes causais dessas doenças, e as plantas apresentavam os sintomas e problemas que advinham da presença desses patógenos. A solução, portanto, não estava somente na substituição do porta-enxerto, mas no uso adequado deste e de matrizes livres de vírus e viroides. Os clones nucelares e porta-enxertos tolerantes tiveram papel preponderante na recuperação da citricultura brasileira, após o advento da tristeza. Os porta-enxertos tolerantes a essa virose, especialmente, e de forma bem marcante o limoeiro ‘Cravo’ e os clones nucelares livres de vírus e viroides, tornaram possível o soerguimento da citricultura brasileira e o seu desenvolvimento nas últimas décadas, até que o País atingisse a posição de primeiro produtor mundial de frutas cítricas e de maior produtor e exportador de suco concentrado congelado de laranja (ALMEIDA, 2004; MOREIRA; MOREIRA, 1991; POMPEU JUNIOR, 1991).

## Porta-enxertos no Brasil: situação atual

Conforme mencionado no início deste capítulo, após o uso das laranjeiras ‘Caipira’ e ‘Azeda’, a citricultura brasileira adotou de maneira ampla e definitiva o limoeiro ‘Cravo’ como quase único

porta-enxerto, exceção feita aos estados de Sergipe, onde o 'Cravo' divide com o limoeiro 'Rugoso' a sustentação dos pomares, com predominância do primeiro, e do Rio Grande do Sul, onde prevalece o emprego do trifoliata [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.].

No Estado de São Paulo, os primeiros levantamentos efetuados já mostravam a supremacia do limoeiro 'Cravo' nos pomares, que passou de 76,6% dos cavalos em 1961 para 99,1% em 1970. Uma das causas desse crescimento foi a utilização de borbulhas de matrizes nucelares, livres de exocorte e xiloporose, às quais o 'Cravo' é suscetível.

Na década de 1970, surgiu o declínio-dos-citros, ao qual o limoeiro 'Cravo' é vulnerável, implicando na necessidade de busca permanente da utilização de porta-enxertos tolerantes na citricultura em todo o mundo. Em São Paulo, o declínio forçou uma pequena diversificação de porta-enxertos, ocasionando a diminuição do uso do limoeiro 'Cravo', cuja população caiu de 78,7% para 64,9%, no quinquênio 1984 a 1988. Nesse mesmo período, a tangerineira 'Cleópatra', que pareceu ser uma boa alternativa, apresentando tolerância à doença, teve sua participação aumentada, ocupando o segundo lugar na preferência dos citricultores. Sua participação nos viveiros paulistas de 1984 a 1988, em virtude da suscetibilidade dos limoeiros 'Cravo' e 'Volkameriano' (*C. volkameriana* V. Ten. & Pasq.) ao declínio, foi da ordem de 24%, alcançando o máximo de 33,6%, em 1987. Em função de algumas limitações, notadamente a indução de início tardio de produção de frutos, essa cultivar teve sua utilização reduzida nos anos seguintes, voltando, contudo, a ter uso expressivo em 2003, com uma participação em 32,6% das mudas produzidas em viveiros paulistas, em razão da sua tolerância à morte-súbita-dos-citros, surgida poucos anos atrás.

A partir do início da década de 1980, dados do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) mostraram a adoção de novos porta-enxertos pela citricultura paulista, como a tangerineira 'Sunki' [*C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka] e o citrumelo (*C. paradisi* Macfad. x *P. trifoliata*) 'Swingle', ambos tolerantes ao declínio. O limoeiro 'Volkameriano', considerado uma boa opção em lugar do 'Cravo', teve sua presença reduzida nos viveiros em função de sua suscetibilidade ao declínio e incompatibilidade com a cv. Pera (*C. sinensis*) (POMPEU JUNIOR, 2005; POMPEU JUNIOR; BLUMER, 2008).

Pompeu Junior e Blumer (2008) analisaram dados do Fundecitrus relativos aos anos de 1999 a 2004 e constataram haver continuidade na preferência do limoeiro 'Cravo', da ordem de 74,7%, alcançando 82,0% de 1999 a 2002, caindo nos dois anos seguintes, em virtude de sua suscetibilidade à morte-súbita-dos-citros e ao declínio. Nesse mesmo período, em virtude da sua tolerância a esses dois distúrbios, o citrumelo 'Swingle' e a tangerineira 'Cleópatra' passaram a participar com 9,9% e 8,8%, respectivamente, na produção de mudas em viveiros de São Paulo.

Levantamentos efetuados em viveiros de citros paulistas, no período de 2004 a 2007, indicaram que o emprego do limoeiro 'Cravo' voltou a crescer, subindo de 38,7% em 2004 para 69,6% em 2007. Contudo, sua suscetibilidade à morte-súbita-dos-citros foi motivo de maior diversificação de porta-enxertos posteriormente. O referido porta-enxerto, que havia participado de 74,7% das mudas em 1999 a 2004, foi usado em 56,1% das enxertias no quadriênio 2004 a 2007. O citrumelo 'Swingle',

que havia sido utilizado em 9,9% das mudas formadas entre 1999 e 2004, teve sua participação aumentada para 20,4% no mencionado quadriênio e vem sendo o porta-enxerto de maior crescimento nos viveiros paulistas. As plantas enxertadas nele são tolerantes ao declínio e à morte-súbita-dos-citros, têm início de produção mais precoce e são mais tolerantes à podridão causada por *Phytophthora* que aquelas nas tangerineiras ‘Cleópatra’ e ‘Sunki’. Apesar dessas vantagens, o citrumelo ‘Swingle’ é menos tolerante à seca que os limoeiros ‘Cravo’ e ‘Volkameriano’ e tem pouca afinidade com os clones de laranja ‘Pera’ de maior uso em São Paulo, os quais, quando nele enxertados, mostram-se pouco produtivos e com vida curta.

A participação da tangerineira ‘Cleópatra’ caiu de 17,4% em 2004 para 3,2% em 2007, com média de 9,3% nesse período, enquanto o citrumelo ‘Swingle’ manteve sua participação entre 22,9% e 18,2%. A tangerineira ‘Sunki’ foi empregada na produção de 9,3% das mudas, nesse período, superior à sua utilização de 1999 a 2004, quando participou com apenas 1,8%. O interesse por essa cultivar deve-se à sua tolerância ao declínio, à morte-súbita-dos-citros e maior produção de frutos em relação à ‘Cleópatra’. Seu emprego chegou a ultrapassar a casa dos 13%, baixando posteriormente, em virtude de baixa tolerância à seca e à podridão causada por *Phytophthora*, início de produção mais tardio e pequeno número de sementes por fruto, em comparação com o limoeiro ‘Cravo’ e citrumelo ‘Swingle’. Pompeu Junior e Blumer (2008) também chamam a atenção para o fato de as referidas tangerineiras serem os únicos porta-enxertos de uso possível com copa da laranja ‘Pera’, porque os dois outros tolerantes ao declínio e à morte-súbita-dos-citros, *P. trifoliata* e citrumelo ‘Swingle’, são incompatíveis com a referida cultivar.

O limoeiro ‘Volkameriano’ foi considerado um bom substituto do ‘Cravo’, por sua tolerância à seca e boa produção de frutos, mas sua suscetibilidade ao declínio e à morte-súbita-dos-citros, aliada à qualidade inferior do suco e incompatibilidade com a laranja ‘Pera’, reduziram o interesse pelo seu plantio, que caiu do quarto lugar no período de 1999 a 2004 para o quinto nos quatro anos seguintes. O *P. trifoliata* teve utilização de pouco mais de 1% entre 1999 e 2002, subindo nos dois anos seguintes, voltando a baixar e conservando a média de cerca de 1% até o ano de 2009. A seleção ‘Flying Dragon’ de *P. trifoliata* vem sendo utilizada como porta-enxerto para a limeira ácida ‘Tahiti’ [*C. latifolia* (Yu Tanaka) Tanaka].

Nos pomares paulistas, além dos porta-enxertos de maior uso, têm sido empregados outros, como os citranges (*C. sinensis* x *P. trifoliata*) ‘Troyer’ e ‘Carrizo’, a ‘Caipira’ e outras laranjeiras doces, o tangelo ‘Orlando’ (*C. paradisi* x *C. tangerina* hort. ex Tanaka), o limoeiro ‘Rugoso’, a laranja ‘Azeda’ ‘Gou Tou Chen’, esses perfazendo menos de 4% das mudas (AMARO; BAPTISTELLA, 2010; POMPEU JUNIOR, 2005; POMPEU JUNIOR; BLUMER, 2008). Analisando dados básicos do Fundecitrus, obtidos nos anos de 2005 a 2009, Amaro e Baptistella (2010) consideram que, mesmo levando em conta a prevalência do limoeiro ‘Cravo’, com média de 65% de uso no período, observa-se, paulatinamente, uma diversificação de porta-enxertos nos viveiros paulistas, em relação a anos passados.

Até o momento, a tangerineira ‘Sunki’ tem mostrado tolerância ao declínio. De comportamento semelhante ao da tangerineira ‘Cleópatra’, em solos argilosos e arenosos induz às copas nela enxertadas maior produção de frutos que essa última; sua maior limitação é a alta suscetibilidade à podridão causada por *Phytophthora* spp., produzindo também poucas sementes por fruto, cerca de três. Uma nova seleção da Embrapa Mandioca e Fruticultura, ‘Sunki Tropical’, tem boa potencialidade como porta-enxerto em viveiros comerciais, em função do bom número médio de sementes por fruto e elevada porcentagem de poliembrionia, ao redor de 100%, o que possibilita a produção uniforme de *seedlings* (planta oriunda de semente ou pé-franco) ou cavalinhos (SOARES FILHO et al., 2002, 2003). A ‘Sunki Tropical’, além disso, manifesta boa tolerância à seca e resistência à podridão causada por *Phytophthora*.

O limoeiro ‘Rugoso da Flórida’ tem mostrado boa produtividade em pomares comerciais instalados em solos da Grande Unidade de Paisagem de Tabuleiros Costeiros do Estado de Sergipe, onde já foi o principal porta-enxerto por bastante tempo, e na principal região produtora da Bahia, o litoral norte. Em Sergipe, o limoeiro ‘Rugoso’ ocupa atualmente 40% dos plantios (PRUDENTE et al., 2006). Em outros estados, seu comportamento é conhecido apenas em experimentos, nos quais tem tido bom desempenho. Na Bahia, em ensaio com laranjeira ‘Hamlin’ (*C. sinensis*), diversas seleções de limoeiro ‘Rugoso’ superaram o limoeiro ‘Cravo’ em produção (CUNHA SOBRINHO et al., 1986). Todavia, segundo Pompeu Junior (1991), os limoeiros ‘Rugoso da Flórida’ e ‘Rugoso Nacional’ não devem ser recomendados para o Estado de São Paulo, por motivos expostos neste capítulo, especialmente em razão do curto período de vida das plantas e incompatibilidade com a laranjeira ‘Pera’.

O limoeiro ‘Volkameriano’ foi introduzido no Brasil como tolerante à seca, porém, além de ser suscetível ao declínio, é incompatível com a laranjeira ‘Pera’. No Estado de Sergipe, essa incompatibilidade tem sido relegada a um segundo plano, dando-se preferência ao limoeiro ‘Cravo’ por outras razões. Em ensaio com copa de laranjeira ‘Hamlin’, conduzido na Bahia, o ‘Volkameriano’ ficou entre as seleções mais produtivas de limoeiro ‘Rugoso’, superando o ‘Cravo’ (CUNHA SOBRINHO et al., 1986). O ‘Volkameriano’ é uma boa alternativa para enxertia da limeira ácida ‘Tahiti’ por sua tolerância à exocorte, especialmente para o clone chamado de Quebra-Galho, originalmente portador da doença.

A utilização de *P. trifoliata* e seus híbridos tem aumentado. No Rio Grande do Sul, único estado onde a participação dessa espécie é expressiva, seu uso já alcançou a casa dos 90% dentre os porta-enxertos empregados. Trabalhos desenvolvidos pela Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (Fepagro), Centro de Pesquisa de Fruticultura, Município de Taquari, nesse estado, permitiram a recomendação de três citrangeres – C 13, C 37 e C 41 – que se destacaram especialmente sob a copa das laranjeiras doces ‘Valência’, ‘Hamlin’ e ‘Franck’, bergamoteira ‘Comum’ – tangerineira ‘Mexerica’ (*C. deliciosa* Ten.) – e limoeiro verdadeiro [*C. limon* (L.) Burm. f.] ‘Siciliano’, mostrando tolerância à podridão causada por *Phytophthora* (PORTA-ENXERTO..., 199?). Wrege et al. (2004) recomendaram diversos porta-enxertos para diferentes regiões do Rio Grande do Sul, destacando a obrigatoriedade

do uso de *P. trifoliata*, citrumelo 'Swingle' e dos citranges C 13, 'Carrizo' e 'Troyer', tolerantes ao frio, nas áreas mais sujeitas a geadas nesse estado.

Resultados obtidos com *P. trifoliata* em ensaios experimentais nas condições tropicais do Recôncavo Baiano não foram animadores, estando essa espécie enxertada com laranjeiras doces (PASSOS et al., 1976b), provavelmente em virtude das condições físicas e químicas dos solos coesos dos Tabuleiros Costeiros e da pequena disponibilidade de água nos períodos de estiação que prevalecem em áreas onde ocorrem essas formações (REZENDE et al., 2002).

Em São Paulo, o interesse pelo trifoliata e seus híbridos 'Troyer' e 'Carrizo', e mais recentemente pela variedade de trifoliata Flying Dragon, tem aumentado gradualmente. Uma boa alternativa dentre esses híbridos é o citrumelo 'Swingle', introduzido dos Estados Unidos da América (EUA) em 1948. Ainda relativamente pouco estudado no Brasil, é tolerante ao declínio, proporciona boa produtividade de frutos às copas, porém apresenta incompatibilidade com as laranjeiras doces 'Pera' e 'Shamouti', com os limoeiros verdadeiros 'Siciliano', 'Eureka' e 'Lisboa' e com o tangor 'Murcott' (CARLOS et al., 1997; POMPEU JUNIOR, 1991; STUCHI, 2002).

O interesse pelo uso do *P. trifoliata* e de seus híbridos deve-se a características como redução do porte da planta, permitindo maior densidade de plantio, produção de frutos de boa qualidade e melhor tolerância à podridão do pé e de raízes (podridão causada por *Phytophthora*), devendo-se levar em conta, contudo, a pequena tolerância à seca, tornando obrigatória a irrigação, suscetibilidade ao declínio e incompatibilidade com algumas cultivares.

Em São Paulo, na Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro (EECB), estudou-se a possibilidade de uso do *P. trifoliata* 'Flying Dragon' em plantios altamente adensados da limeira ácida 'Tahiti' (STUCHI; CYRILLO, 1998). Levantamento realizado pelo Fundecitrus em viveiros do Estado de São Paulo, em 2002, evidenciou sintomas de incompatibilidade em plantas de laranjeira 'Pera' enxertadas em trifoliata da ordem de 28,2%, de 26,4% no limoeiro 'Volkameriano', de 19,3% no citrumelo 'Swingle' e de 16,2% no citrange 'Carrizo' (SALVA, 2001).

Na Bahia, resultados obtidos com híbridos de trifoliata gerados pela United States Date and Citrus Station, Indio, Califórnia, pertencente ao United States Department of Agricultura (Usda), relacionados à produtividade e ao vigor de plantas de laranjeira 'Pera', demonstraram a possibilidade de sua inclusão em programas de diversificação de porta-enxertos em áreas de condições ambientais semelhantes às dos locais das avaliações, merecendo destaque os híbridos tangerineira 'Sunki' x *P. trifoliata* seleção 'English' (63/256 e 63/264) e 'Sunki' x *P. trifoliata* seleção 'Swingle' (63/314), segundo Passos et al. (2005), citrandarins estes recém-recomendados como porta-enxertos pela Embrapa Mandioca e Fruticultura, sob as denominações de 'Indio' (PASSOS et al., 2011a), 'Riverside' (PASSOS et al., 2011b) e 'San Diego' (PASSOS et al., 2011c).

Com o surgimento da morte-súbita-dos-citros, em pomares de Minas Gerais e de São Paulo por volta de 1999, verificou-se novamente uma tentativa de diversificação de porta-enxertos nesses

estados, face à suscetibilidade do limoeiro 'Cravo' ao distúrbio. Constatando-se não haver sintomas em plantas enxertadas em outros cavalos, a utilização do limoeiro 'Cravo', que chegou a alcançar 82%, baixou para 45%, ocupando o segundo lugar nas preferências o citrumelo 'Swingle', seguido pelas tangerineiras 'Sunki' e 'Cleópatra', tolerantes à morte-súbita-dos-citros (AMARO; BAPTISTELLA, 2010; POMPEU JUNIOR, 2005).

## Uso de porta-enxertos nas regiões Norte e Nordeste do Brasil

A história do uso de porta-enxertos nas regiões Norte e Nordeste assemelha-se bastante à sua trajetória histórica no País. Seu emprego em escala comercial teve início no século 20, especialmente nos estados onde a cultura dos citros alcançou maior importância econômica, Bahia e Sergipe. Atualmente, nos estados da região Norte, apesar de utilizados apenas em pomares domésticos, sem expressão comercial, os pés-francos ainda fazem parte do cenário cítrico. Provavelmente, as primeiras enxertias nessas regiões, e no Brasil, aconteceram na Bahia. Foi dessa forma que, no bairro do Cabula, em Salvador, ainda no século 19, propagou-se a laranjeira 'Bahia' (*C. sinensis*), variedade sem sementes, surgida de mutação natural de gema da laranjeira doce 'Seleta', naquele local.

Hoje, nessas regiões, como uma extensão do que acontece em todo o País, é utilizado de maneira abusiva o limoeiro 'Cravo' como porta-enxerto de todas as variedades cultivadas, em todos os tipos de solo e de clima. A única exceção à regra é o Estado de Sergipe, onde o limoeiro 'Rugoso da Flórida' também é usado, juntamente com o 'Cravo', mas em menor porcentagem que este. É interessante lembrar que, antes da introdução do 'Cravo', empregava-se unicamente o limoeiro 'Rugoso'.

Porta-enxertos, como o limoeiro 'Volkameriano' e a tangerineira 'Cleópatra', estão presentes em proporções insignificantes, especialmente o primeiro. Como a combinação limeira ácida 'Tahiti'/ limoeiro 'Cravo' tem alta suscetibilidade aos fungos do gênero *Phytophthora*, causadores da podridão do pé e de raízes, tem-se procurado alternativas, como o já citado 'Volkameriano', o citrumelo 'Swingle' e até o *P. trifoliata* cv. Flying Dragon. O primeiro, por sua possível melhor tolerância a esses fungos, e os últimos pela resistência. Observa-se uma tendência de estabelecimento do uso da tangerineira 'Sunki Tropical' em pomares do litoral norte da Bahia e em Sergipe, dada sua boa tolerância à seca e ao declínio-dos-citros, resistência à podridão causada por *Phytophthora*, boa compatibilidade e indução de alta produtividade a diversas copas cítricas comerciais, como a laranjeira 'Pera' e a limeira ácida 'Tahiti'. Essa tangerineira, possível mutação natural de origem nucelar da tangerineira 'Sunki' comum, além disso, apresenta excelente produção de frutos, com elevado número de sementes (próximo a 20), de alta poliembrionia (próxima a 100%).

## Porta-enxertos e meio ambiente: clima e solos

O clima é, provavelmente, o fator mais importante na distribuição das plantas cítricas nas diferentes regiões do globo terrestre, principalmente de algumas espécies mais exigentes, exercendo enorme influência sobre a planta e especialmente sobre a qualidade do fruto. Segundo Cassin (1984), a influência dos fatores climáticos sobre as características dos frutos cítricos é que tem determinado a distribuição geográfica de suas espécies e variedades.

Apesar de o porta-enxerto influenciar a tolerância das plantas cítricas às intempéries, como secas e geadas, Castle e Gmitter Junior (1999) lembram o caráter passageiro dessas condições ambientais, considerando que, quando esses fenômenos são rotineiros, os danos e as perdas causados às plantas independem do porta-enxerto. Nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, devem ser levados em consideração apenas as estiagens e os períodos chuvosos prolongados, estes últimos pela possibilidade de encharcamento do solo.

As propriedades físicas e químicas do solo – profundidade, textura, fertilidade, dentre outras – especialmente as primeiras, estão entre os mais importantes fatores a ser considerados quando da escolha da área para implantação de pomares cítricos. Castle e Gmitter Junior (1999) entendem que características como textura, pH, teor de carbonato de cálcio e salinidade são fatores a ter em mente na seleção do porta-enxerto, particularmente em condições extremas. Lembram esses autores que as plantas cítricas, em combinação com a maioria dos porta-enxertos, geralmente desenvolvem-se e frutificam bem em solos limosos, mas as diferenças de comportamento em função do porta-enxerto utilizado tornam-se mais evidentes em solos arenosos ou argilosos pesados, sendo essas diferenças mais evidentes à medida em que as condições do solo mostram-se mais desfavoráveis ao cultivo dos citros.

As plantas cítricas, embora prefiram solos leves, areno-argilosos, desenvolvem-se tanto em solos arenosos quanto argilosos, graças à capacidade de adaptação de diferentes porta-enxertos. No presente capítulo, são apresentadas considerações a respeito de condições naturais dos solos onde atualmente está implantada a grande maioria dos pomares da região Nordeste, a Grande Unidade de Paisagem de Tabuleiros Costeiros, portadora de condições especiais, e do comportamento de alguns porta-enxertos nesse ambiente.

## Solos da região Nordeste onde são cultivados os citros

A implantação de pomares cítricos na região Nordeste é feita, de maneira geral, em áreas planas, pela facilidade de tratamentos culturais e mecanização. A maioria dos pomares situa-se próxima ao litoral, onde ocorre também maior precipitação pluvial e estão localizados os maiores centros consumidores.

Nessa faixa litorânea, verificam-se formações do terciário, denominadas Tabuleiros Costeiros (TC), cujos solos apresentam adensamento natural de horizontes subsuperficiais. Em virtude dos diferentes graus de adensamento, a camada coesa desses solos apresenta-se entre dura, muito dura e até extremamente dura, quando seca, e friável apenas quando úmida (REZENDE et al., 2002).

Apesar da potencialidade desses solos para o cultivo dos citros, devem-se considerar alguns aspectos não favoráveis, como a má distribuição das chuvas, 70% a 75% concentradas em 5 a 6 meses contínuos (abril a setembro, com maior frequência de junho a agosto) e a ocorrência das camadas coesas já citadas, próximas à superfície do solo. Esses fatores impõem sérios riscos à citricultura e requerem investimentos no sentido de ajustar o manejo da cultura. Uma das decisões mais acertadas no manejo do pomar é a escolha do porta-enxerto, que, além da compatibilidade com a copa, deve ser o mais adaptado possível ao ambiente em que será utilizado.

Como os porta-enxertos diferem relativamente à adaptação a estresses ambientais, bióticos (relacionados a pragas) e abióticos (relacionados ao clima e ao solo), devem ser vistos como uma das principais alternativas de manejo da cultura. Essa adaptação, no que concerne particularmente ao clima e ao solo, está relacionada, especialmente, ao volume total, à configuração, à distribuição lateral e em profundidade do sistema radicular, em razão da importância das raízes na absorção de água e nutrientes, no processo respiratório e na possibilidade de rompimento de camadas adensadas (CASTLE et al., 1993; CINTRA et al., 1999; REZENDE et al., 2002).

Cintra et al. (1999) estudaram a distribuição do sistema radicular de cinco porta-enxertos em solo de tabuleiro (TC) do Estado de Sergipe, concluindo que a restrição ao aprofundamento das raízes, imposta pelas camadas coesas superficiais, foi um dos principais fatores responsáveis pela vulnerabilidade dos citros aos déficits hídricos comuns na região. Dentre os porta-enxertos estudados, o limoeiro 'Cravo' foi o que apresentou menor volume de raízes, enquanto a tangerineira 'Cleópatra', além de mostrar maior volume de raízes, também apresentou leve tendência de aprofundamento do sistema radicular. Determinando o balanço hídrico na área do referido ensaio, Cintra et al. (2000) verificaram, contudo, com base na taxa de evapotranspiração manifestada pelos porta-enxertos nos estádios fenológicos de maior demanda hídrica, que o limoeiro 'Cravo' relacionou-se às melhores características de adaptação à área estudada, enquanto a tangerineira 'Cleópatra' mostrou-se menos adaptada.

Avaliando 11 porta-enxertos sob copa de laranjeira 'Pera' em solo de Tabuleiro Costeiro no Estado da Bahia, Peixoto et al. (2006) observaram maior densidade de raízes e exploração de um maior volume de solo quando o porta-enxerto era o limoeiro 'Rugoso Mazoe', seguido dos híbridos tangerineira 'Sunki' x trifoliata 'English', seleções 63/264 e 63/256, e da tangerineira 'Sunki Maravilha'. Os limoeiros 'Cravo' e 'Volkameriano' apresentaram menor crescimento radicular, com a quase totalidade das raízes – 93% a 100% – penetrando até 0,41 m de profundidade, enquanto os híbridos citados, de melhor desempenho, tiveram raízes abaixo dessa marca.

As vantagens atribuídas à topografia plana, à grande profundidade dos solos e ao clima deixam de existir nos solos coesos submetidos a longos períodos de déficit hídrico, por causa do impedimento à penetração das raízes e, ainda, da relativa rapidez com que esses solos passam do estado extremamente úmido, durante as chuvas, ao estado extremamente seco, nos períodos de estiagem (CINTRA et al., 1997 citados por REZENDE et al., 2002). Esse fato obrigaria o emprego de porta-enxertos que possuem as características de tolerância ao encharcamento e à seca.

Pelo exposto, pode-se dizer que, além da distribuição irregular das chuvas, com períodos significativos de estiagem, deve-se levar em consideração o que Rezende et al. (2002, p. 34) comentaram:

[...] entende-se que o restrito crescimento radicular em profundidade, devido aos impedimentos físico e químico, associado à pobre aeração, ao baixo armazenamento de água no perfil e ao baixo suprimento de nutrientes, reflete-se na baixa produtividade e longevidade dos citros cultivados nesses solos.

Atenção especial deve ser dada à seleção de porta-enxertos para plantio nos Tabuleiros Costeiros, em virtude das limitações de seus solos e da má distribuição das chuvas. Como as propriedades físicas e químicas do solo são fatores dos mais importantes a considerar quando da escolha da área a ser cultivada com citros, sem dúvida alguma, ao lado das práticas de manejo para melhorar essas condições, o emprego de porta-enxertos melhor adaptados a elas seria a medida mais importante, sob o ponto de vista econômico, a ser tomada.

## A experimentação com porta-enxertos nas regiões Norte e Nordeste do Brasil

Provavelmente, o primeiro ensaio com porta-enxertos nas regiões Norte e Nordeste brasileiras foi instalado nos anos 1960, na Estação Experimental de São Gonçalo dos Campos, localizada no município de mesmo nome, no Recôncavo Baiano. A referida estação estava vinculada ao Instituto Agrônomo do Leste (IAL), da rede de institutos do Departamento Nacional de Pesquisa Agropecuária (DNPEA), antecessor da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). Embora não existam registros ou publicações que possam ser consultados, sabe-se que a variedade copa era a laranja Bahia, em combinação com cinco porta-enxertos, dentre os quais estavam os limoeiros 'Cravo' e 'Rugoso da Flórida' e a laranja 'Caipira'.

Passos et al. (1970) publicaram as primeiras observações sobre o comportamento de porta-enxertos na Bahia, obtidas de ensaios instalados no Instituto de Pesquisa Agropecuária do Leste (Ipeal), denominação que substituiu a do IAL até o advento da Embrapa. Os primeiros experimentos, instalados em 1965, tinham como copa as laranjeiras doces 'Bahia', 'Baianinha' e 'Natal', de origem nucelar. Os porta-enxertos estudados foram os limoeiros 'Cravo', 'Rugoso da Flórida' e 'Rugoso da

Flórida FM', as laranjeiras doces 'Caipira', 'Palmeiras' e 'Hamlin', as tangerineiras 'Cleópatra', 'Swatow' (*C. reticulata* Blanco) e 'Dancy' (*C. tangerina* hort. ex Tanaka), o *P. trifoliata*, o citrange 'Troyer' e os tangelos 'Seminole', 'Minneola' e 'Sampson' (*C. paradisi* x *C. tangerina*). Os fatos de maior destaque nos cinco primeiros anos de observação podem ser assim resumidos:

- Constatação de alta suscetibilidade à podridão causada por *Phytophthora* da tangerineira 'Sunki' sob a copa de laranjeira 'Bahia'.
- Com a copa de laranjeira 'Natal', o limoeiro 'Rugoso da Flórida FM' propiciou maior precocidade de produção e vigor às plantas, enquanto o *P. trifoliata* mostrou má adaptação às condições do local do ensaio, provavelmente e principalmente ao déficit hídrico, tendo sido substituído.
- Em combinação com a cultivar Baianinha, o limoeiro 'Cravo' induziu produção mais precoce de frutos, seguido pelos dois clones do limoeiro 'Rugoso' ('da Flórida' e 'da Flórida FM'); as plantas mais vigorosas foram as enxertadas no limoeiro 'Rugoso da Flórida'; as tangerineiras 'Cleópatra' e 'Dancy' apresentaram suscetibilidade à podridão-do-pé, e o *P. trifoliata* repetiu a má performance já apresentada no ensaio com laranjeira 'Bahia'.

Na fase adulta desses três ensaios, a análise de dez safras permitiu as seguintes constatações (CUNHA SOBRINHO, 1992; CUNHA SOBRINHO et al., 1986; SOARES FILHO et al., 1980, 1981):

- Em combinação com a laranjeira 'Bahia', os porta-enxertos laranjeira 'Hamlin' e tangerineira 'Cleópatra' induziram a formação de plantas mais vigorosas; a tangerineira 'Dancy' e a laranjeira doce 'Palmeiras' propiciaram bom crescimento, vigor e maior produtividade, 19,1 t ha<sup>-1</sup> e 17,7 t ha<sup>-1</sup>, respectivamente, considerando-se as médias das dez safras. As plantas estavam espaçadas de 7 m em 7 m, que resultaria em 204 plantas ha<sup>-1</sup>. Os referidos cavalos levaram à formação de frutos de boa qualidade e de maior peso médio, mas não determinaram diferenças significativas quanto às características dos frutos, à exceção do diâmetro, maior na laranjeira 'Palmeiras' e menor na tangerineira 'Cleópatra'. O limoeiro 'Rugoso' não confirmou sua característica de indução de bom vigor e alta produtividade, observada nas combinações com as laranjeiras 'Baianinha' e 'Natal'. Provavelmente, em virtude da origem nucelar da copa, todas as combinações mostraram incidência da podridão causada por *Phytophthora*, mais elevada na laranjeira 'Hamlin' e na tangerineira 'Cleópatra', porta-enxertos que induziram a formação de copas mais vigorosas.
- No ensaio com a laranjeira 'Baianinha', os porta-enxertos mais produtivos nos cinco primeiros anos de safra foram, também, os mais produtivos nos cinco anos seguintes. Nas cinco primeiras colheitas, do quinto ao décimo ano de vida do pomar, as maiores produções couberam aos dois clones de 'Rugoso da Flórida', vindo a seguir o limoeiro 'Cravo' e a tangerineira 'Cleópatra'. Do 11° ao 15° ano de vida do pomar, o limoeiro 'Rugoso da Flórida' confirmou a produtividade mais elevada, bem como os três porta-enxertos menos

produtivos – as laranjeiras doces ‘Caipira’ e ‘Palmeiras’ e a tangerineira ‘Dancy’ – mantiveram sua posição. A tangerineira ‘Cleópatra’, que tem início de produção tardio e ocupou a quarta posição no primeiro período, igualou-se ao limoeiro ‘Cravo’ nessa segunda fase. O citrange ‘Troyer’ também se aproximou desses dois últimos nessa fase, demonstrando, assim como a tangerineira ‘Cleópatra’, ser um porta-enxerto indutor de boas safras de frutos, porém mais tardias, com maiores incrementos posteriores ao décimo ano de instalação do pomar.

- Verificou-se alternância de produção em todas as combinações, maior no período de produção mais elevada, dos 11 aos 15 anos de idade das plantas, e nas combinações mais produtivas. A produção média dos cinco primeiros anos de safra, do sexto ao décimo ano de vida do pomar, foi de 490 caixas de 40,8 kg ha<sup>-1</sup>, e a do período mais produtivo, do 11º ao 15º ano, de 1.035 caixas de 40,8 kg ha<sup>-1</sup>. Considerando-se essas médias, constatou-se a existência de dois verdadeiros patamares nas dez safras, chamando atenção a elevação brusca da produção, ocorrida quando as plantas atingiram 11 anos de idade (Figura 1). Somente os cinco porta-enxertos mais produtivos ultrapassaram a média de 1.000 caixas por hectare no período mais produtivo, sendo o limoeiro ‘Rugoso da Flórida’ o primeiro a superar essa marca.

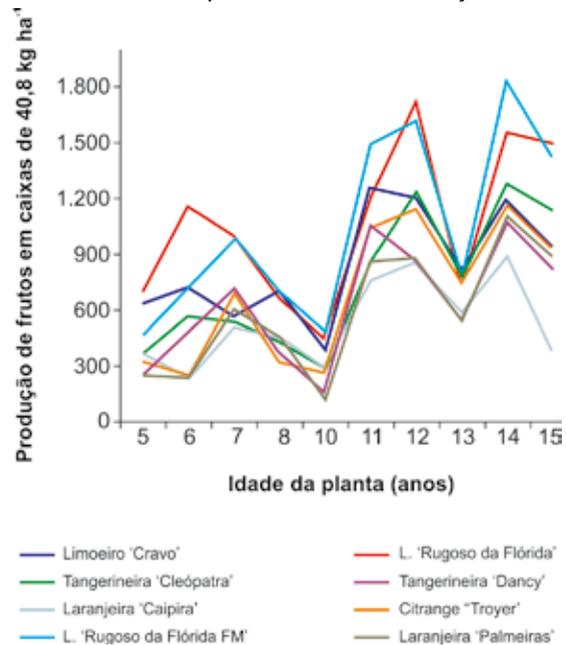


Figura 1. Produção de frutos de laranjeira ‘Baianinha’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] sobre oito porta-enxertos, em caixas de 40,8 kg ha<sup>-1</sup>, em um período de 11 anos, no Recôncavo Baiano. Fonte: Cunha Sobrinho (1992).

- Nos primeiros anos de produção, os porta-enxertos que induziram maior crescimento ou crescimento intermediário às plantas foram, também, os que produziram mais por metro cúbico de copa, e, somente nas avaliações feitas aos 12 e 14 anos de idade, os porta-enxertos que induziram menor tamanho de planta foram, igualmente, os mais produtivos por unidade de volume de copa. A produção mais elevada por área foi determinada pelos porta-enxertos que proporcionaram plantas mais desenvolvidas.
- Constatou-se efeito altamente significativo do porta-enxerto sobre o crescimento e vigor das plantas – diâmetro do tronco, circunferência da copa, altura da planta e volume da copa –, verificando-se também correspondência entre essas medidas, tendo as plantas de maior diâmetro do tronco apresentado maior circunferência, altura e volume de copa.

- O porta-enxerto exerceu maior influência sobre as características químicas do fruto que sobre as físicas, podendo-se dizer que o efeito do ambiente sobre essas características foi mais acentuado que o dos porta-enxertos. A anos de menor produção corresponderam frutos de peso, altura e espessura da casca relativamente maiores. Alguns porta-enxertos mostraram-se mais constantes nas variáveis estudadas, com menor variação de ano para ano, observando-se, ainda, que a expressão de alguns caracteres foi mais constante que o de outros caracteres de frutos. Relativamente aos caracteres físicos de frutos, a laranjeira 'Caipira', a tangerineira 'Cleópatra' e o citrange 'Troyer' demonstraram maior estabilidade, enquanto o clone FM do limoeiro 'Rugoso da Flórida' foi o menos estável. Dentre os caracteres de fruto estudados, os menos variáveis foram o peso e o diâmetro do fruto, e o conteúdo de suco o mais instável de todos. As laranjeiras doces 'Caipira' e 'Palmeiras' foram mais estáveis quanto às características químicas manifestadas, e os clones do limoeiro 'Rugoso da Flórida' os de menor estabilidade. Dentre os caracteres avaliados, o conteúdo de sólidos solúveis totais foi o que mostrou maior variação.
- Não houve influência do porta-enxerto sobre o peso do fruto, embora tenha sido constatada uma tendência de produção de frutos mais pesados, de maior diâmetro e espessura da casca e de menor conteúdo de suco nos clones do limoeiro 'Rugoso'. Relativamente aos caracteres físicos de frutos, a laranjeira 'Caipira', a tangerineira 'Cleópatra' e o citrange 'Troyer' demonstraram maior estabilidade, enquanto o clone FM do limoeiro 'Rugoso da Flórida' mostrou ser o menos estável de todos. Os caracteres cuja manifestação foi mais estável entre os porta-enxertos foram o peso e a altura do fruto, enquanto o conteúdo de suco e o diâmetro do fruto apresentaram-se como os de expressão mais instável de ano para ano. Quanto à acidez e aos sólidos solúveis totais, os porta-enxertos tiveram efeito altamente significativo, observando-se que a acidez total foi a variável mais estável entre os porta-enxertos.
- Resultados de 11 safras do pomar de laranjeira 'Natal', obtidos no período de 1969 a 1979, indicaram que as duas seleções do limoeiro 'Rugoso' ('da Flórida' e 'da Flórida FM') foram as mais produtivas, com  $37,8 \text{ t ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$  e  $36,5 \text{ t ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ , superando o limoeiro 'Cravo' em  $8,8 \text{ t ha}^{-1}$  e  $7,5 \text{ t ha}^{-1}$ , respectivamente. As combinações estudadas tiveram comportamento mais ou menos semelhante, relativamente à qualidade dos frutos, com teores de suco ao redor de 55%, relação acidez-sólidos solúveis totais de cerca de 0,9/10 e peso médio dos frutos superior a 200 g. O limoeiro 'Rugoso da Flórida FM' induziu a produção de frutos mais pesados e com ligeira tendência de diminuição do teor de açúcares. Embora sem diferença estatística, a laranjeira 'Caipira' determinou teor de suco mais elevado que os demais porta-enxertos e, contrariamente ao esperado, casca mais espessa. Os dois clones estudados do limoeiro 'Rugoso' induziram a formação de plantas mais vigorosas, superando também o 'Cravo' nesse aspecto, enquanto a laranjeira 'Caipira'

induziu crescimento superior apenas em comparação com a tangerineira 'Dancy', que se relacionou às menores plantas das combinações com laranjeira 'Natal'.

Avaliações feitas durante 11 anos em um pomar experimental de laranjeira 'Pera', enxertada em seis porta-enxertos, instalado na mesma área dos ensaios referidos anteriormente, revelaram que as plantas mais vigorosas foram as enxertadas na tangerineira 'Cleópatra', seguidas daquelas sobre os limoeiros 'Rugoso da Flórida' e 'Cravo'. Os citranges 'Troyer' e 'Carrizo' vieram a seguir, e as plantas menos desenvolvidas foram as enxertadas no citrumelo 'Sacaton'. Nos primeiros quatro anos de produção, observou-se crescimento igual nos porta-enxertos mais produtivos – 'Cleópatra', 'Cravo', 'Rugoso' e 'Carrizo'. Considerando-se um período de nove safras, a tangerineira 'Cleópatra' e o limoeiro 'Cravo' apresentaram produtividade mais elevada. Em plano imediato ficou o limoeiro 'Rugoso da Flórida', vindo a seguir os híbridos de *P. trifoliata*, relacionando-se o citrumelo 'Sacaton' às produções mais baixas. É interessante assinalar que a tangerineira 'Cleópatra' superou apenas o citrumelo 'Sacaton' no primeiro ano de produção, mostrando frutificação menos precoce até mesmo em relação aos citranges. Nos oito anos seguintes, contudo, a 'Cleópatra' ultrapassou os demais porta-enxertos, sendo superada apenas pelo limoeiro 'Cravo' e citrange 'Carrizo' na safra do terceiro ano.

De um modo geral, os diversos porta-enxertos comportaram-se de forma semelhante quanto aos caracteres de fruto estudados, observando-se, entretanto, que os maiores teores de sólidos solúveis totais foram induzidos pelo citrumelo 'Sacaton' e os menores pelo limoeiro 'Rugoso'. As plantas sobre limoeiro 'Rugoso' apresentaram sintomas de incompatibilidade, e aquelas sobre 'Carrizo' mostraram caneluras na porção do porta-enxerto, enquanto o 'Troyer' teve esses sintomas em uma planta apenas; os citranges e o citrumelo foram mais sensíveis à seca que os demais (CUNHA SOBRINHO et al., 1980; PASSOS et al., 1976a).

Resultados obtidos em outros ensaios com a copa de laranjeira 'Pera' destacaram como mais produtivas as combinações com as tangerineiras 'Oneco' (*C. reticulata*), 'Swatow' e 'Sunki', com os limoeiros 'Rugoso Nacional' e 'Rugoso Mazoe' e com o citrange 'Morton'. Nessa mesma área experimental, dados de produção de frutos da cultivar Bahia em combinação com porta-enxertos de uso tradicional e seleções e híbridos de trifoliata e tangerineiras mostram boa performance dos limoeiros rugosos 'Nacional' e 'Estes' e dos citranges 'Uvalde' e 'Carrizo' (CUNHA SOBRINHO et al., 1986).

Em ensaio semelhante, conduzido na mesma área, tendo a laranjeira 'Hamlin' como copa, as combinações mais produtivas foram aquelas com os limoeiros 'Rugoso Schaub' e 'Rugoso da Flórida'. Em um segundo grupo, ficaram os limoeiros 'Volkameriano', 'Rugoso Nacional', 'Rugoso Vermelho' e 'Cravo'. Reunidos em um terceiro grupo, menos produtivo, mas ainda com produções acima da média do Estado da Bahia, encontraram-se os porta-enxertos: tangerineira 'Sunki' x trifoliata 'English' 63/264 (citrandarin 'Riverside'), limoeiro 'Rugoso Soh Jahlia', tangerineira 'Cleópatra' x citrange 'Carrizo' 63/226, tangerineira 'Sunki' x trifoliata 'English' 63/256 (citrandarin 'Indio') e limoeiro 'Cravo' x tangerineira 'Cleópatra'. Os híbridos tangerineira 'Sunki' x trifoliata 'Swingle' seleções 63/314 (citrandarin 'San Diego') e 63/308 e o próprio citrumelo 'Swingle' apresentaram produções semelhantes

às de porta-enxertos tradicionais, como a laranjeira 'Caipira' e as tangerineiras 'Sunki' e 'Cleópatra' (CUNHA SOBRINHO et al., 1986). Ensaios com alguns desses híbridos foram instalados em pomares dos estados da Bahia e do Piauí e na Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas, cujos resultados têm se mostrado animadores, sugerindo seu uso em escala comercial.

Dados de produção e vigor da laranjeira 'Pera' confirmaram a competitividade, em relação ao limoeiro 'Cravo', dos híbridos tangerineira 'Sunki' x trifoliata 'English', seleções 63/256 (citrandarin 'Indio') e 63/264 (citrandarin 'Riverside'), e a superioridade destes sobre o citrumelo 'Swingle'. Os híbridos de tangerineira 'Sunki', seleções citadas, e o híbrido dessa cultivar com o trifoliata 'Swingle', seleção 63/314 (citrandarin 'San Diego'), mostraram taxa de poliembrião próxima a 100%. Foram constatados sintomas de médios a fortes de incompatibilidade em limoeiro 'Volkameriano' e em citrumelo 'Swingle', e fortes em 'Rugoso Mazoe' (PASSOS et al., 2005).

É interessante assinalar que, segundo observações anteriormente efetuadas em mudas de laranjeira 'Hamlin' sobre os híbridos citados e outros, ao lado de diversos outros porta-enxertos, em viveiro e no campo, ficou evidenciado vigor comparável dos híbridos de tangerineira 'Sunki' com as seleções de trifoliata 'English' e 'Swingle' ao de cultivares tradicionais, como os limoeiros 'Cravo' e 'Rugoso', tangerineira 'Cleópatra' e laranjeira 'Caipira'. Foram vistas caneluras na porção do porta-enxerto em 81% das mudas sobre os híbridos no viveiro e em 70% dessas já no campo (PASSOS et al., 1976b). Santos Filho et al. (1979) inocularam experimentalmente com *Phytophthora citrophthora* plantas da cultivar Pera sobre alguns desses porta-enxertos e obtiveram as menores lesões no híbrido tangerineira 'Cleópatra' x citrange 'Carrizo' 63/226 em contraste com as maiores observadas nos limoeiros 'Cravo' e 'Rugoso Nacional', sabidamente suscetíveis ao patógeno. Lesões intermediárias foram produzidas nos híbridos tangerineira 'Cleópatra' x trifoliata 'Swingle', seleções 63/205 e 63/314, tangerineira 'Sunki' x trifoliata 'Swingle' 63/309, limoeiro 'Cravo' x citrange 'Carrizo', no limoeiro rugoso 'Vermelho' e *C. macrophylla*.

Procurando identificar genótipos obtidos pelo Programa de Melhoramento Genético de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura resistentes à podridão causada por *Phytophthora*, Oliveira e Soares Filho (2000) fizeram observações baseadas em lesões no tronco de *seedlings* com seis anos de idade, constatando que essas lesões foram mais acentuadas nos híbridos de limoeiros ('Cravo', 'Rugoso da Flórida' e 'Volkameriano') e laranjeiras doces ('Palmeiras', 'Valência' e 'Hamlin'), e, a partir de amostras de solo, encontraram maiores densidades de inóculo associadas a esses porta-enxertos. Os menores índices de potencial de inóculo encontrados tinham relação com híbridos tendo como parentais *P. trifoliata* e híbridos dessa espécie. Híbridos de citrange 'Yuma' e de citrumelo 'Swingle', bem como alguns outros de *P. trifoliata*, além da ausência de plantas mortas, não apresentaram lesões características da doença. Híbridos dos cruzamentos limoeiro 'Cravo' x *P. trifoliata* e tangerineira 'Sunki' x (limoeiro 'Cravo' x *P. trifoliata*) foram exceções.

Relativamente à tristeza-dos-citros, os cruzamentos mais favoráveis à obtenção de híbridos tolerantes/resistentes ao complexo do vírus foram os seguintes: limoeiro 'Cravo' x citrumelo 'Swingle',

limoeiro 'Volkameriano' x limoeiro 'Cravo', tangerineira 'Sunki' x (limoeiro 'Cravo' x *P. trifoliata*), tangerineira 'King' (*C. nobilis* Lour.) x citrumelo 'Swingle', tangerineira 'Clementina de Nules' (*C. clementina* hort. ex Tanaka) x citrange C-35 e tangerineira 'Sunki' x citrumelo 'Swingle' (SOARES FILHO et al., 2002). Dentre os cruzamentos com alta frequência de híbridos suscetíveis à tristeza foram observados os seguintes: limoeiro 'Volkameriano' x laranja 'Palmeiras', limoeiro 'Volkameriano' x laranja 'Valência', tangerineira 'Clementina de Nules' x citrumelo 'Swingle' e tangerineira 'Clementina de Nules' x 'Hybrid' (híbrido de *P. trifoliata*) (DIAMANTINO et al., 2001).

Soares Filho et al. (1999), comparando uma seleção do limoeiro 'Cravo', identificada na Embrapa Mandioca e Fruticultura como variação de gema do limoeiro 'Cravo Santa Bárbara', batizada com o nome de 'Santa Cruz', com outras três seleções do 'Cravo', constataram número de sementes por fruto e porcentagem de poliembrião relativamente mais elevados nessa seleção, características que a indicam com bom potencial como porta-enxerto em viveiros comerciais de citros.

Dois seleções da tangerineira 'Sunki' foram identificadas e caracterizadas na Embrapa Mandioca e Fruticultura, com os nomes de 'Sunki Maravilha' e 'Sunki Tropical'. A 'Sunki Maravilha' produz cerca de oito sementes por fruto, mais que o dobro do número observado em seleções comuns dessa cultivar; possui alto grau de poliembrião, cerca de 100%, e tem ainda moderada resistência à gomose causada por *Phytophthora*. A segunda apresenta número médio relativamente alto de sementes por fruto, 19, e igualmente elevado grau de poliembrião, próximo a 100%, além de boa tolerância à seca e resistência à podridão causada por *Phytophthora*.

O maior número de sementes por fruto favorece a obtenção de maior quantidade de *seedlings*, e a alta poliembrião garante a uniformidade deles, pela produção de elevadas porcentagens de plantas de origem nucelar, geneticamente idênticas à planta-mãe, atributos de suma importância para a citricultura e para os viveiristas de citros em particular. Tais características indicam a possibilidade dessas seleções constituírem alternativas de diversificação do uso de porta-enxertos em áreas onde apresentem boa adaptação (SOARES FILHO et al., 2002, 2003, 2004).

A área onde foram realizados os experimentos está situada em uma região que não é bem caracterizada como uma única zona climática, mas como uma transição entre as zonas Af e Aw, segundo a classificação de Köppen. De acordo com a classificação de Thornthwaite, o clima é do tipo C1, seco e subúmido. Os dados climatológicos do período de realização desses trabalhos foram: temperatura média anual de 24,1 °C, 82% de umidade relativa do ar e precipitação pluvial de 1.197 mm anuais (SOARES FILHO et al., 1980).

O solo da área foi classificado como Latossolo Amarelo Distrófico A moderado, textura argilosa, fase transição floresta subperenifólia/caducifólia, com declividade de 0% a 3%. Além de profundo, possui deficiência acentuada quanto à fertilidade natural e pH fortemente ácido, saturação de bases baixa e soma de bases trocáveis com valores entre 0,5 meq 100 g<sup>-1</sup> e 1,3 meq 100 g<sup>-1</sup>, podendo apresentar deficiência moderada de água, principalmente quando ocorrem estiagens prolongadas (EMBRAPA, 1991).

No Estado de Sergipe, Trindade et al. (1987), estudando clones nucelares e clones velhos da cultivar Bahia, enxertados nos limoeiros 'Cravo' e 'Rugoso da Flórida', observaram maior crescimento das plantas sobre o 'Rugoso'. O limoeiro 'Rugoso da Flórida' teve produção mais elevada por planta, enquanto o 'Cravo' produziu mais por unidade de volume de copa. Os dois porta-enxertos manifestaram lesões de podridão causada por *Phytophthora*, especialmente quando a copa era de origem nucelar. Enxertado com a laranjeira 'Pera', o limoeiro 'Rugoso da Flórida' determinou uma copa mais volumosa, observando-se que, nesse caso, o clone nucelar teve copa mais desenvolvida que o clone velho em ambos os porta-enxertos. O limoeiro 'Rugoso' possibilitou maior produção de frutos, em quilos por planta, que o 'Cravo', e no limoeiro 'Rugoso' o clone nucelar produziu mais que o clone velho. O clone velho, porém, induziu maior produção de frutos por unidade de volume de copa que o nucelar, acontecendo o mesmo quando o porta-enxerto foi o limoeiro 'Cravo'. Denotando a influência da copa, ou da interação copa x porta-enxerto, a incidência de *Phytophthora* foi menor nas combinações com laranjeira 'Pera', cujo clone velho teve menor desenvolvimento, conforme já mencionado. As plantas sobre limoeiro 'Rugoso' apresentaram incompatibilidade, que, contudo, não influenciou negativamente o crescimento vegetativo ou a produtividade.

Trindade et al. (1973) encontraram sintomas de incompatibilidade em diversas outras laranjeiras doces sobre o limoeiro 'Rugoso da Flórida', com incidência incomparavelmente menor que na cultivar Pera, constatando também não haver sintomas em algumas tangerineiras sobre esse porta-enxerto. Nesse estado, Silva et al. (1987) relataram resultados experimentais obtidos em um ensaio combinando a copa de laranjeira 'Bahia' com diversos porta-enxertos, a maioria destes constituída de seleções e híbridos de *P. trifoliata*, cujo desenvolvimento vegetativo e produção de frutos por hectare foram sempre menores que os dos limoeiros 'Rugoso Nacional', 'Cravo', 'Rugoso Mazoe' e 'Rugoso da Flórida'.

Por outro lado, considerando-se a produção por metro cúbico de copa, o citrange 'Savage', o citrumelo 'Swingle' e as seleções de *P. trifoliata* 'Rubidoux' e 'Pomeroy' induziram maior produção de frutos às copas. Esses resultados confirmam o bom desenvolvimento e a produtividade do limoeiro 'Rugoso' nos Tabuleiros Costeiros da região Nordeste, conforme mencionado anteriormente em relação ao Estado da Bahia. A influência do porta-enxerto sobre a qualidade do fruto foi considerada muito pequena, podendo-se atribuir efeito maior às condições ambientais. Com pequenas diferenças, de uma maneira geral, as seleções e os híbridos de *P. trifoliata* produziram maiores teores de sólidos solúveis totais. Embora não tenha havido inoculação experimental, o citrange 'Troyer' e as seleções de trifoliata 'Rubidoux' e 'Pomeroy' não apresentaram lesões causadas por *Phytophthora*. O solo da área onde foram desenvolvidos os trabalhos está classificado como Argissolo Vermelho Amarelo, areno-argiloso, e o clima é do tipo As, segundo a classificação de Köppen, com chuvas de março a agosto. Os dados climáticos do período foram os seguintes: temperatura média anual de 23,7 °C, umidade relativa do ar de 81,6% e precipitação pluvial de 1.244,5 mm anuais.

Ainda nos Tabuleiros Costeiros de Sergipe, no Município de Umbaúba, Prudente et al. (2004), estudando a combinação da laranjeira 'Pera' com cinco porta-enxertos, concluíram que o limoeiro

'Volkameriano', seleções 'Palermo' e 'Catânia II', os limoeiros 'Cravo' e 'Rugoso da Flórida' e a tangerineira 'Cleópatra' tiveram comportamento semelhante quanto à produtividade de frutos, aos teores de suco e de sólidos solúveis totais. Não foi constatada incompatibilidade entre o 'Volkameriano' e a laranja 'Pera'. Também nos Tabuleiros Costeiros, esses autores avaliaram dez porta-enxertos sob copa de 'Pera', constatando maior produtividade no limoeiro 'Cravo', seguido dos híbridos tangerineira 'Sunki' x trifoliata 'English' 63/256 (citrandarin 'Índio'), 'Sunki' x trifoliata 'Swingle' 63/314 (citrandarin 'San Diego') e da tangerineira 'Cleópatra'. O porta-enxerto 'Sunki' x trifoliata 'Swingle' 63/314 relacionou-se a uma maior precocidade de produção, vindo a seguir o limoeiro 'Cravo', o híbrido 'Sunki' x trifoliata 'English' 63/264 (citrandarin 'Riverside') e a tangerineira 'Cleópatra' (PRUDENTE et al., 2006).

Embora os limoeiros 'Cravo' e 'Rugoso da Flórida' sejam os porta-enxertos mais utilizados nas regiões citrícolas de Sergipe, há atualmente uma clara tendência de predomínio de uso do 'Cravo'. No litoral norte da Bahia, onde, no passado, o limoeiro 'Rugoso' foi bastante empregado, observa-se nos dias atuais um claro predomínio do limoeiro 'Cravo'. A procura por novos porta-enxertos, todavia, tem se intensificado ultimamente, tanto na citricultura baiana como na sergipana, principalmente em decorrência da suscetibilidade ao declínio apresentada pelo limoeiro 'Cravo', limitação igualmente constatada nos limoeiros 'Rugoso' e 'Volkameriano'.

No Estado do Acre, em trabalho desenvolvido pela Embrapa Acre, Ledo et al. (1999), estudando o comportamento de sete laranjeiras doces sobre quatro porta-enxertos, constataram que o citrange 'Carrizo', o limoeiro 'Cravo' e a tangerineira 'Cleópatra' podem ser recomendados para combinação com a laranja doce 'Aquiri', uma seleção local, e que o limoeiro 'Cravo' pode ser usado como porta-enxerto das laranjeiras doces 'Natal', 'Valência' e 'Pera', levando-se em consideração a produção de frutos. O citrange 'Carrizo' e as tangerineiras 'Sunki' e 'Cleópatra' induziram a produção de frutos com teores mais elevados de sólidos solúveis totais e acidez total que o limoeiro 'Cravo', que mostrou tendência de produção de frutos mais pesados. Os referidos autores verificaram efeito significativo da interação copa x porta-enxerto sobre o volume médio da copa e produção por planta e efeito do porta-enxerto sobre o peso médio do fruto, sólidos solúveis totais e acidez total, havendo influência da copa sobre o teor de sólidos solúveis totais. Independentemente do efeito do porta-enxerto, três seleções de laranjeiras 'Bahia' e 'Baianinha' mostraram má adaptação às condições edafoclimáticas das vizinhanças de Rio Branco, capital do estado.

Relativamente às combinações de cultivares de tangerineiras e híbridos tipo tangerineira com os porta-enxertos citados, verificou-se efeito da interação desses com as copas sobre a produção de frutos – número, peso total e peso médio. O tangor 'Murcott' e a tangerineira 'Cravo' (*C. reticulata*) destacaram-se pela produção mais elevada sobre o limoeiro 'Cravo', que também foi o mais produtivo com os tangelos 'Page' (tangerineira 'Clementina' x tangelo 'Minneola') e 'Lee' (tangerineira 'Clementina' x tangelo 'Orlando'), embora a tangerineira 'Cleópatra' tenha sido igualmente produtiva com a copa de 'Page'. O limoeiro 'Cravo' mostrou tendência de produção de frutos mais pesados, não sendo observado efeito da interação copa x porta-enxerto sobre o conteúdo de suco,

sólidos solúveis totais e acidez total, verificado apenas entre as variedades copa. Os mesmos porta-enxertos foram estudados em combinação com as limeiras ácidas 'Tahiti' e 'Galego' [*C. aurantiifolia* (Christm.) Swingle], constatando-se maior volume de copa e produção mais elevada de frutos da primeira enxertada na tangerineira 'Sunki'. O maior volume de copa da limeira 'Galego' foi verificado nos porta-enxertos 'Carrizo', 'Cleópatra' e 'Cravo' e maior produtividade neste último (EMBRAPA, 1998a). O solo da área experimental era coberto por floresta primária, apresentava fertilidade média, baixos teores de alumínio, acidez média, teores médios de cálcio e magnésio, baixo teor de fósforo e alto de potássio (LEDO et al., 1999). O clima da região é quente e úmido, com estações seca e chuvosa bem definidas, temperatura média anual de 25,1 °C, precipitação pluvial anual de 1.889,7 mm, 84,0% de umidade relativa do ar e 1.748,5 horas de insolação (EMBRAPA, 1990; LEDO et al., 1999).

Resultados obtidos em experimentos conduzidos em áreas de terra firme do Estado do Pará, onde foram testadas diversas cultivares de laranjeiras doces, pomeleiros (*C. paradisi*), tangerineiras e de híbridos tipo tangerineira enxertados nos limoeiros 'Cravo' e 'Rugoso da Flórida', permitiram concluir que este último pode ser usado como porta-enxerto alternativo, juntamente com o 'Cravo', em pomares da região (EMBRAPA, 1998c).

Em ensaio avaliando a produção inicial das combinações de sete cultivares copa com cinco porta-enxertos – limoeiros 'Cravo', 'Rugoso da Flórida' e 'Volkameriano', tangerineira 'Cleópatra' e citrange 'Troyer' – em área próxima a Manaus, constatou-se menor precocidade de produção na tangerineira e no citrange. Os frutos mais pesados foram produzidos pelo limoeiro 'Volkameriano' enxertado com as copas de laranjeira 'Valência' e limeira ácida 'Tahiti'. Nesse mesmo ensaio, foi verificado que o limoeiro 'Cravo' teve o maior número de plantas atacadas pela podridão causada por *Phytophthora*, seguido do 'Volkameriano'. A podridão causada por *Phytophthora* é, provavelmente, o mais grave problema fitossanitário dos citros na região Amazônica (EMBRAPA, 1998b).

## Finalidades dos porta-enxertos

As plantas cítricas são propagadas por enxertia na grande maioria dos pomares do mundo em razão de certas vantagens que essa técnica oferece, combinando características favoráveis da copa e do porta-enxerto. Os porta-enxertos cítricos influenciam diversos atributos hortícolas e fitopatológicos da planta e do fruto, induzindo alterações no crescimento, no vigor e no tamanho da copa, na precocidade de produção, na produtividade, na época de maturação dos frutos, no peso e na coloração da casca do fruto e do suco, nos teores de açúcares e de acidez do fruto, na conservação do fruto na planta e na fase pós-colheita, na transpiração e na composição da folha, na capacidade de absorção de água, na absorção, na síntese e na utilização de nutrientes, na adaptação a condições adversas do solo, como a escassez ou o excesso de água, na salinidade, na toxidez de alumínio, nas condições desfavoráveis de pH, na tolerância a geadas, na resistência ou tolerância a

pragas (CARLOS et al., 1997; CASTLE et al., 1993; DAVIES; ALBRIGO, 1999; DORNELLES, 1988; POMPEU JUNIOR, 1991).

Castle et al. (1993) citaram três aspectos de caráter geral, referindo-se às finalidades do uso do porta-enxerto que, por oportuno, estão relacionados abaixo:

- Redução da juvenilidade – Plantas formadas a partir da semente (pés-francos ou *seedlings*) começam a frutificar tardiamente, têm crescimento ereto e vigoroso e possuem muitos espinhos. Essas características são evitadas nas plantas enxertadas, porque, embora sejam usados *seedlings* do porta-enxerto, eles são enxertados com gemas de plantas adultas, já em fase de frutificação. Dessa forma, as plantas enxertadas frutificam bem mais cedo, com maior regularidade e uniformidade que aquelas obtidas de sementes.
- Adaptação ao ambiente – Os porta-enxertos cítricos diferem em sua reação a estresses, tanto de natureza biótica como abiótica. Essa variação entre porta-enxertos condiciona a expansão ou limitação das áreas onde os citros podem ser cultivados.
- Desempenho horticultural – As interações do porta-enxerto com a copa e o ambiente influenciam as relações planta-água, nutrição mineral, crescimento, produtividade e vários aspectos da qualidade do fruto.

## Importância do porta-enxerto

Entre outros aspectos, em conformidade com o que se pretende produzir, o mais importante em fruticultura é a escolha correta da variedade copa e da variedade porta-enxerto, associada à garantia de sua identidade genética e qualidade fitossanitária – ausência de pragas. Segundo Finardi (1998), a escolha da copa é mais fácil que a do porta-enxerto, porque a escolha deste último envolve interações entre a parte aérea e as raízes da planta, nem sempre conhecidas. Segundo esse autor, embora a escolha das cultivares copa e porta-enxerto seja feita, frequentemente, como se estes fossem indivíduos distintos e independentes, o que deve ser considerado é o comportamento da combinação copa-porta-enxerto, ou seja, da resposta conjunta dos genótipos nela envolvidos em interação com o meio ambiente. O citricultor brasileiro, de maneira geral, não adota esse procedimento; prova disso é que, com poucas exceções, todas as variedades-copa, em todas as regiões do País, em diferentes tipos de clima e de solo, vêm sendo enxertadas em ‘Cravo’. Apesar da rusticidade e capacidade de adaptação desse limoeiro, Pompeu Junior (1991) acredita que, nessas condições, sabidamente diversas, utilizando-se um único porta-enxerto, a copa fica impedida de manifestar todo seu potencial produtivo.

Embora o porta-enxerto seja a parte escondida da planta, sua importância deve estar em nível de igualdade ao daquele atribuído à variedade copa. Esse fato é ressaltado na frase de Jasper Joiner (1955 citado por CASTLE et al., 1993, p. V), proferida em 1955, e que continua tão atual hoje

quanto àquela época: “O porta-enxerto pode significar a diferença entre o sucesso e o fracasso do pomar”.

## Características de um bom porta-enxerto

O porta-enxerto deve reunir um mínimo de características desejáveis, capazes de propiciar um bom desempenho de sua combinação com a copa nele propagada, em determinado ambiente. Dentre essas características tem-se:

- Produção de sementes com alta taxa de poliembrião.
- Elevado número de sementes por fruto.
- Capacidade de adaptação às condições de clima e solo.
- Resistência ou tolerância a vírus e a outros organismos destrutivos, a exemplo da tristeza-dos-citros e da podridão causada por *Phytophthora* spp.
- Indução de produção precoce de frutos às copas.
- Compatibilidade com copas de alta produtividade.
- Tolerância à seca.
- Tolerância ao alumínio.
- Tolerância à salinidade.
- Tolerância ao frio (geadas).
- Indução de produção de frutos de boa qualidade.
- Determinação de longevidade à combinação copa-porta-enxerto.

Embora todas essas características sejam importantes, algumas se destacam, ressaltando-se as seguintes: a) a taxa de poliembrião deve ser alta, a fim de propiciar a obtenção de um grande número de descendentes de origem nucelar, portanto uniformes e com as mesmas características da planta-mãe; b) produção de um grande número de sementes por fruto, favorecendo a obtenção de um elevado número de *seedlings* nucleares a serem enxertados; e c) resistência-tolerância a doenças, tais como tristeza, exocorte, xiloporose e podridão causada por *Phytophthora* spp. No Brasil, no que tange ao declínio-dos-citros, um distúrbio bastante sério, tem-se constatado variações de tolerância entre os porta-enxertos utilizados, fato que tem forçado a procura de novas combinações (CARLOS et al., 1997; POMPEU JUNIOR, 1991). Nessa linha de pensamento, também se destaca a busca de novos porta-enxertos resistentes-tolerantes à morte-súbita-dos-citros (MSC), problema de etiologia ainda desconhecida que já comprometeu a vida produtiva de plantas cítricas enxertadas em limoeiro ‘Cravo’ no norte do Estado de São Paulo e no sudoeste do Estado de Minas Gerais (SANTOS FILHO,

2004). Relativamente ao *huanglongbing* (HLB, *ex-greening*), objetiva-se a identificação de porta-enxertos que apresentem em seus tecidos baixa titulação da bactéria *Candidatus Liberibacter spp.*, causadora dessa seríssima enfermidade, e que, em relação ao seu inseto-vetor, o psilídio *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), sejam menos atrativos e, preferencialmente, possuam efeitos de antibiose sobre este inseto.

## A escolha do porta-enxerto

Partindo-se do pressuposto de que não existe um porta-enxerto perfeito, sequer para uma situação particular, Davies e Albrigo (1999) recomendam que na sua escolha devam ser levados em conta os principais fatores limitantes da produção em cada área citrícola, as condições climáticas e de solo, as cultivares copa e o destino da produção – indústria ou mercado de fruta fresca. Como exemplos de que o clima e o solo são os primeiros condicionantes na definição do porta-enxerto a ser utilizado, podem ser citados: a) os riscos do uso do limoeiro ‘Rugoso’ e da limeira doce ‘da Pérsia’ em áreas sujeitas a geadas nos Estados Unidos da América; b) a tolerância à seca do limoeiro ‘Rugoso’, utilizado nos solos arenosos da África do Sul e Austrália; c) o emprego da laranjeira ‘Azeda’ em solos salinos e alcalinos do Texas; e d) os baixos rendimentos determinados pelo *P. trifoliata* e muitos de seus híbridos em solos de pH alto (DAVIES; ALBRIGO, 1999). Diversos outros exemplos podem ser constatados em todo o mundo citrícola, como a ampla adaptação do limoeiro ‘Cravo’ a diferentes tipos de clima e solo no Brasil.

Dentre os porta-enxertos que induzem a produção de frutos com baixos teores de sólidos solúveis e acidez, mais indicados para a indústria, estão os limoeiros ‘Rugoso’, ‘Cravo’ e ‘Volkameriano’, enquanto outros, como a laranjeira ‘Azeda’, o *P. trifoliata* e alguns de seus híbridos e as laranjeiras doces, por determinarem a produção de frutos de boa qualidade, são recomendados tanto para o mercado de fruta fresca quanto para a indústria.

Sem dúvida alguma, as circunstâncias mais relacionadas a substituições de porta-enxertos referem-se ao surgimento de doenças, destacando-se no Brasil a restrição do uso da laranjeira ‘Azeda’, um excelente porta-enxerto, em virtude da ocorrência do vírus-da-tristeza, presente também em outros países de citricultura expressiva. Outros casos devem ser lembrados, como o *blight*, na Flórida, dificultando o emprego do limoeiro ‘Rugoso’, além do *declínio de Misiones*, na Argentina, o *marchitamiento repentino*, no Uruguai, e o *dieback*, na Austrália, causando declínio e morte de plantas enxertadas em trifoliata (SALIBE, 1991). Nas últimas décadas, o declínio-dos-citros e a morte-súbita-dos-citros, esta de ocorrência mais recente, têm estimulado os citricultores brasileiros a pensar em diversificar porta-enxertos. Apesar da existência de todos esses fatores que condicionam a seleção das combinações, sua escolha, na maioria das regiões citrícolas, é feita de acordo com a tradição local, havendo ainda a tendência generalizada de utilização de um só porta-enxerto.

## Efeitos do porta-enxerto sobre a qualidade dos frutos

Este assunto é abordado de forma destacada em virtude das regiões Norte e Nordeste brasileiras serem tipicamente tropicais e estarem fora da faixa considerada nobre para a produção de frutas cítricas, localizada entre os paralelos de 20° e 40° de Latitude Norte e Sul, produtoras de frutos de alta qualidade, que atendem às exigências de mercados consumidores com alto nível de sofisticação. Sobre o assunto, Cassin (1984) afirmou que é fato único na arboricultura frutícola uma cultivar cítrica poder ser utilizada tanto a 42° de Latitude Norte como em Belém, no Brasil, nas vizinhanças do Equador. Contudo, a diversidade das condições climáticas dessas regiões influencia de maneira marcante as características externas e internas dos frutos cítricos.

Sabe-se que os frutos destinados ao mercado de frutas frescas devem ter boa qualidade interna, porém sua aparência (tamanho, forma, coloração e espessura da casca, coloração da polpa) é tão importante quanto o conteúdo de sólidos solúveis totais e acidez total, enquanto para a indústria o fundamental é a quantidade de sólidos solúveis totais por hectare (WUTSCHER, 1988). Os frutos cítricos, embora mantenham as características que são próprias da variedade, sofrem influência do porta-enxerto quanto à expressão quantitativa de certos caracteres, da mesma forma que são afetados pelo meio ambiente, sendo essa influência decorrente da interação copa x porta-enxerto, e não da influência isolada deste último. Reuther (1972) referiu-se ao clima como o mais importante dentre os fatores mesológicos que influenciam a qualidade dos frutos, e, dentre os fatores climáticos, Jones (1961) considerou a temperatura como o de maior expressão, destacando os efeitos das temperaturas mínima e máxima e da soma total de calor.

Nauer et al. (1974) apontaram como um dos maiores problemas no estudo do efeito do clima sobre a maturação e qualidade do fruto o fato de, frequentemente, ser difícil ou impossível distinguir os efeitos climáticos dos efeitos em razão das diferenças de solo, da qualidade da água de irrigação, das práticas culturais, das pragas, dos porta-enxertos e da idade da planta. Segundo Stuchi et al. (1996), uma cultivar de alta qualidade, como a Valência, mantém suas características, qualquer que seja o porta-enxerto, enquanto variedades inferiores comportam-se de maneira diferente.

Ainda que as diferenças determinadas pelos porta-enxertos sejam menores que as induzidas pelas condições do meio ambiente, as primeiras são importantes no ato de selecionar combinações copa-porta-enxerto mais apropriadas. Pesquisas iniciais com porta-enxertos já evidenciavam sua influência sobre a composição e qualidade dos frutos. Moreira et al. (1965) afirmaram ter sido demonstrado em vários países que as características dos frutos cítricos podem sofrer variações de certa importância por influência das diferenças ecológicas, bem como dos porta-enxertos. Esses autores observaram a influência da localidade e de porta-enxertos sobre as características de frutos da laranjeira 'Baianinha'. Constatações semelhantes fizeram Salibe e Mischán (1978), que observaram

seu efeito no peso e tamanho do fruto, na coloração e espessura da casca, no número de gomos e de sementes, no conteúdo de suco e nos teores de acidez e sólidos solúveis totais, concluindo que o ambiente exerce maior influência que o porta-enxerto.

Nauer et al. (1974) afirmaram que os padrões de qualidade de maior importância, como tamanho do fruto, coloração da casca e maturação, são determinados em larga escala pelo clima. Wutscher (1988) referiu-se às influências que a copa e o porta-enxerto impõem um sobre o outro, afirmando que pelo menos 15 caracteres do fruto são influenciados pelo porta-enxerto – tamanho e peso, coloração e espessura da casca, teores de suco, sólidos solúveis totais, acidez total e de ácido ascórbico, coloração do suco, conteúdo de óleo da casca, amargor, teor de minerais, granulação, teor de ácidos graxos e conservação pós-colheita.

Não se sabe como o porta-enxerto influencia a qualidade do fruto da copa enxertada nele, ainda que essa influência seja exercida de maneira marcante. Segundo Gardner (1969), o que existe são apenas conjecturas sobre a base fisiológica desse fenômeno. Esse autor colheu ramos com frutos jovens de laranja 'Valência' enxertada sobre laranja 'Azeda' e enxertou-os em limoeiro 'Rugoso', enquanto ramos com frutos jovens da mesma cultivar enxertada em limoeiro 'Rugoso' foram colhidos e enxertados em laranja 'Azeda'. Ao final do ensaio, ficou constatado que os frutos amadureceram com o teor de sólidos solúveis totais característico do porta-enxerto no qual eles completaram seu desenvolvimento e sua maturação. Concluiu o referido autor, então, que o porta-enxerto original não havia predeterminado, até a data da nova enxertia, o curso da acumulação de sólidos solúveis totais.

Enxertado com todas as copas, o limoeiro 'Rugoso' produz boas safras, mas os frutos produzidos têm baixo teor de suco, com pequeno conteúdo de sólidos solúveis totais e de acidez total, enquanto, no outro extremo, *P. trifoliata* e alguns de seus híbridos produzem safras pequenas, porém com frutos de alto teor de suco e também alto conteúdo de sólidos solúveis totais e acidez total, ficando, de uma maneira geral, as laranjas doces em posição intermediária (KEFFORD; CHANDLER, 1970).

A variação do tamanho dos frutos é decorrente da natureza genética das variedades e de outros fatores, inclusive porta-enxertos. Bitters (1961) fez referência à influência dos porta-enxertos, citando trabalhos nos quais foi constatado que frutos de laranja 'Valência' enxertada em *P. trifoliata* eram maiores, em comparação com aqueles em que o porta-enxerto era a laranja doce, ficando em posição intermediária frutos produzidos tendo como cavalos a tangerineira 'Cleópatra', o limoeiro 'Rugoso', o pomeleiro e a laranja 'Azeda', em ordem decrescente de tamanho, verificando-se apenas uma correlação parcial negativa entre tamanho do fruto e número de frutos produzidos. Os frutos de laranja 'Bahia' foram maiores quando produzidos em combinação com a laranja 'Azeda', sendo menores quando o porta-enxerto era a laranja doce, seguindo-se, nesse sentido, *P. trifoliata*, limoeiro 'Rugoso', tangerineira 'Cleópatra' e pomeleiro. A influência do porta-enxerto foi menos evidente nos anos em que houve um maior estímulo à produção de frutos de maior tamanho, em relação aos anos em que o tamanho dos frutos tendeu a ser menor.

## Reação de porta-enxertos à podridão causada por *Phytophthora*

A principal doença fúngica relacionada ao porta-enxerto é a podridão causada por *Phytophthora* spp., que pode ocorrer no colo da planta, causando exudação de goma, ou atacar as raízes fibrosas, problema muito sério em solos argilosos e em áreas de precipitação pluvial elevada. Ao se referir ao ataque dos fungos causadores da podridão causada por *Phytophthora* spp., também conhecida como podridão-do-pé ou podridão-das-raízes, focaliza-se principalmente as reações do porta-enxerto, porém, em realidade, o que ocorre é uma reação da combinação copa-porta-enxerto. Segundo Feichtenberger (1990), está sobejamente comprovado que há um efeito pronunciado da variedade-copa sobre o comportamento do porta-enxerto em relação a essa doença, que desaconselha levar em conta isoladamente a reação ao patógeno de somente um dos indivíduos que formam a planta cítrica.

Castle et al. (1993) consideram resistentes à podridão-do-pé *P. trifoliata*, limoeiro 'Alemow' (*C. macrophylla* Wester) e alguns citrumelos, incluindo o 'Swingle'. A laranjeira 'Azeda', considerada resistente no Brasil, é classificada por esses autores como tolerante, estando nessa categoria também o citrange 'Carrizo', enquanto a tangerineira 'Cleópatra', limoeiros 'Rugoso' (inclusive a seleção 'Milan'), 'Cravo' e 'Volkameriano' e a limeira 'da Pérsia' variam de tolerantes a suscetíveis. As laranjeiras doces são as variedades mais suscetíveis, tanto na condição de copa como na de porta-enxerto. Com muita propriedade, esses autores afirmaram ser essa classificação baseada em experiência obtida em ensaios controlados e em observações de campo, mas que isso é uma generalização, existindo exceções e inconsistências, dando, como exemplo, a existência de muitos pomares enxertados em limoeiro 'Rugoso' com pouca ou nenhuma perda causada pela podridão-do-pé, havendo, por outro lado, diversos pomares assentados em porta-enxertos mais tolerantes que apresentam muitos problemas.

Fatores que podem explicar essa inconsistência aparente são a idade da planta, as práticas culturais e o nível de inóculo de *Phytophthora* spp., existindo ainda variações até mesmo dentro da fonte de sementes dos porta-enxertos. Castle et al. (1993) afirmaram ser completamente diferentes os danos causados pelos fungos do gênero *Phytophthora* no tronco (podridão-do-pé) e nas raízes fibrosas (podridão-das-raízes). A laranjeira doce 'Caipira', bastante suscetível a esses fungos, tem bom comportamento no Rio Grande do Sul, embora o clima desse estado seja favorável à incidência da podridão causada por *Phytophthora* (DORNELLES, 1988). Atualmente, no Brasil, essa doença é um problema bastante sério na combinação limeira ácida 'Tahiti'-limoeiro 'Cravo', o que tem obrigado os citricultores a procurar outros porta-enxertos.

Chiacchio (1978) inoculou, experimentalmente, *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* em pés-francos e plantas enxertadas de diferentes copas sobre os porta-enxertos laranjeira 'Caipira', limoeiro 'Cravo', *P. trifoliata* e tangelo 'Orlando', obtendo os seguintes resultados:

- As lesões produzidas pelos patógenos foram significativamente maiores nos pés-francos que nas plantas enxertadas com as cultivares limoeiro Siciliano, laranja Pera e tangerineira Ponkan (*C. reticulata*), indicando que a copa influenciou a reação do porta-enxerto.
- As lesões no limoeiro 'Cravo' enxertado com o limoeiro 'Siciliano' foram significativamente maiores que as lesões nesse porta-enxerto sob as outras copas.
- A reação dos porta-enxertos como pés-francos demonstrou ser a laranja 'Caipira' mais suscetível ou menos resistente que os demais.

Em trabalho também experimental, Santos Filho et al. (1979) inocularam com *Phytophthora* diferentes espécies e híbridos de porta-enxertos cítricos sob copa de laranja 'Pera'. As menores lesões provocadas pela *P. citrophthora* foram observadas no híbrido tangerineira 'Cleópatra' x citrange 'Carrizo' 63/226 e as maiores nos limoeiros 'Cravo' e 'Rugoso Nacional', ficando em posição intermediária os híbridos tangerineira 'Sunki' x *P. trifoliata* seleção 'Swingle' 63/309 e 63/314 e tangerineira 'Cleópatra' x *P. trifoliata* 63/205 e 63/287, além dos limoeiros 'Rugoso Vermelho' e 'Alemow'.

Rossetti (2001), estudando alguns porta-enxertos, relacionou-os segundo sua suscetibilidade à podridão causada por *Phytophthora*, como segue – suscetibilidade muito alta: laranjeiras doces e limoeiros rugosos; moderada: tangerineiras 'Sunki' e 'Cleópatra', limoeiros 'Volkameriano' e 'Cravo', tangelo 'Orlando', citranges 'Troyer' e 'Carrizo'; baixa: laranja 'Azeda'; e muito baixa: *P. trifoliata*, citrumelo 'Swingle' e limoeiro 'Alemow'.

## Vírus-da-tristeza-dos-citros

A doença causada por vírus de maior importância econômica na citricultura mundial é a tristeza (CTV), que afeta diversas espécies e variedades cítricas enxertadas, principalmente, em laranja 'Azeda', sendo responsável pela morte de milhões de plantas em todo o mundo citrícola.

Segundo a insigne pesquisadora Veridiana Victoria Rossetti (ROSSETTI, 2001), essa doença foi observada no Brasil a partir de 1937. A ação do vírus-da-tristeza foi muito acentuada e rápida à época de sua entrada no País, em virtude da grande maioria dos pomares ter como porta-enxerto a cultivar Azeda e existirem raças fortes do vírus, transmissíveis com facilidade por borbulha e pelo pulgão-preto *Toxoptera citricida* (Kirk), afídeo transmissor muito eficiente nas condições ambientais brasileiras de cultivo dos citros.

Espalhada por todos os países citrícolas, a tristeza pode ser transmitida por pulgões menos eficientes, como *Aphis gossypii* (Glov.), *A. spiraecola* (Patch), *Mizus persicae* (Sulz), *Toxoptera aurantii* (Boyer de Fonscolombe), entre outros. Dessa forma, a citricultura mundial perdeu excelente porta-enxerto, excluído em nosso País, onde foi substituído por porta-enxertos tolerantes, como o limoeiro 'Cravo'. Existem diversas raças do vírus, podendo-se destacar em São Paulo a variante capão-bonito, que causa caneluras em porta-enxertos tolerantes a outras raças, como o limoeiro 'Cravo', as

tangerineiras 'Cleópatra' e 'Oneco' e *P. trifoliata*. As plantas afetadas por essa variante têm redução de crescimento, folhas miúdas, deficiências nutricionais de zinco e manganês, especialmente, e os ramos quebradiços (POMPEU JUNIOR, 2005; ROSSETTI, 2001). A tangerineira 'Sunki' tem demonstrado tolerância a essa estirpe, segundo Müller et al. (1968 citados por POMPEU JUNIOR, 2005).

A laranjeira 'Azeda' pode ser utilizada apenas como porta-enxerto de cultivares hipersensíveis ao vírus-da-tristeza, como os limoeiros verdadeiros e a própria laranjeira 'Azeda', cujas células morrem logo após serem infectadas, impedindo a multiplicação do patógeno, o que permite o cultivo desta última cultivar como pé-franco, enxertada nela mesma ou em qualquer outra espécie.

## Exocorte

A exocorte (*Citrus exocortis viroid*, CEVd) é uma doença causada por um viroide, cuja presença no Brasil foi constatada na década de 1940, ocasionando escamações em porta-enxertos intolerantes, como o limoeiro 'Cravo', *P. trifoliata* e alguns citranges. A transmissibilidade da doença por borbulha foi demonstrada somente por volta de 1950, na Austrália, onde era chamada de *scaly butt*, nome em virtude da escamação de plantas infectadas sobre *P. trifoliata*. Mais tarde foi chamada de *Rangpur lime disease*, por ocorrer em plantas sobre esse limoeiro, o 'Cravo', em certas regiões dos Estados Unidos da América, mesmo nome que recebeu no Brasil: doença-do-limoeiro-'Cravo'. É facilmente transmitida de plantas infectadas para sadias, mediante borbulhas infectadas, pela sobre-enxertia de plantas doentes ou uso de ferramentas de poda e enxertia que não foram desinfetadas (CASTLE et al., 1993; ROSSETTI, 2001).

Normalmente aparece em plantas com quatro ou mais anos de idade, causando redução no crescimento, tamanho e produção das plantas, o que ocorre também, em menor intensidade, em plantas consideradas tolerantes, assim chamadas por não mostrarem as escamações características da exocorte. Não são conhecidos insetos-vetores do distúrbio; ele não se transmite pela semente, e seu controle é feito apenas pelo uso de borbulhas sadias e desinfecção de ferramentas de poda e enxertia. Plantas com sintomas no porta-enxerto podem ser recuperadas parcialmente, pela subenxertia com variedades menos suscetíveis, como a tangerineira 'Sunki' e o citrumelo 'Swingle' (POMPEU JUNIOR et al., 1979 citados por POMPEU JUNIOR, 2005; POMPEU JUNIOR; SALIBE, 2002 citados por POMPEU JUNIOR, 2005).

É fundamental utilizar gemas de matrizes livres dos viroides causadores da exocorte e da xiloporose (*Hot stunt viroid*, HSVa), quando forem usados porta-enxertos como os citranges 'Troyer' e 'Carrizo', limoeiro 'Cravo' e *P. trifoliata* e certos citrumelos. Algumas estirpes do viroide da exocorte, que apenas reduzem o vigor das plantas, sem causar efeitos maléficos, têm sido usadas no controle do tamanho das plantas (CASTLE et al., 1993), permitindo plantios mais adensados.

## Xiloporose

A xiloporose é outra doença infecciosa causada por viroide, ocasionando amarelecimento das folhas, forte nanismo das plantas e redução da produção de frutos. Os sintomas no tronco de porta-enxertos suscetíveis são depressões arredondadas, com correspondentes saliências na face interna da casca, podendo ocorrer o inverso, e formação de goma na casca, observada raspando-se sua parte externa. A formação de goma na casca é vista em tangerineiras, limeiras doces (*C. limettioides*), limoeiros 'Rugoso' e 'Cravo'. No Brasil, são frequentes em limoeiro 'Cravo', em tangerineira 'Clementina', tangelos, tangores (híbridos de tangerineiras com laranjeiras doces) e limeira ácida 'Galego' (ROSSETTI, 2001).

Dentre os porta-enxertos comumente utilizados, são suscetíveis à xiloporose diversas seleções de limoeiro 'Cravo', a tangerineira 'Oneco' e o tangelo 'Orlando', enquanto as tangerineiras 'Cleópatra' e 'Sunki', *P. trifoliata*, citranges 'Troyer' e 'Carrizo' e o citrumelo 'Swingle' não manifestam sintomas da doença (SALIBE; MOREIRA, 1965; MOREIRA; ROESSING, 1965 citados por POMPEU JUNIOR, 2005).

Geralmente, laranjeiras doces e pomeleiros como copa são tolerantes, expressando poucos sintomas, ou mesmo ausência destes, enquanto seleções de tangerineiras, tangelos e tangores como copas são muito suscetíveis e severamente afetadas pelo viroide, independentemente do porta-enxerto, enquanto certos tipos de tangerineiras são bem menos afetados que outros (CASTLE et al., 1993).

Não se conhecem vetores dessa doença, e seu controle é feito pelo uso de gemas sadias e desinfecção de ferramentas de poda e enxertia. Como na exocorte, a subenxertia com porta-enxerto tolerante pode minimizar os danos causados por esse distúrbio. No Brasil, assim como em outras regiões citrícolas do globo, a utilização de clones nucelares e gemas de plantas sadias, provenientes de programas de certificação de mudas livres de vírus e viroides, tornou possível o emprego de porta-enxertos suscetíveis a doenças causadas por viroides.

## Declínio-dos-citros

Esse distúrbio foi detectado na década de 1970, em diversas regiões citrícolas do Brasil, em laranjeiras doces enxertadas em limoeiro 'Cravo' e em trifoliata. Os sintomas caracterizam-se por um definhamento acentuado, paralisação do crescimento da planta, murcha e queda das folhas, que se tornam opacas, oliváceas e enroladas. Apesar da morte de ramos e das brotações fracas, que não se desenvolvem, o sistema radicular permanece normal. O desfolhamento intensifica-se, e, em dois ou três anos após o surgimento dos sintomas, a planta morre. Essas características assemelham-se a sintomas apresentados por outras doenças: *blight*, *young-tree decline*, na Flórida (EUA), *marchitamiento repentino*, no Uruguai, *declinamiento*, *fruta bolita*, na Argentina e em outros países como Venezuela, Cuba, África do Sul e Suazilândia, não tendo sido observado em áreas citrícolas do Mediterrâneo.

Laranjeiras doces sobre os limoeiros 'Cravo', 'Rugoso' e 'Volkameriano' e em trifoliata são suscetíveis à doença, que ocorre com menor incidência no citrange 'Carrizo', enquanto copas sobre as tangerineiras 'Cleópatra' e 'Sunki' e sobre a laranjeira 'Caipira' mostram maior sobrevivência em pomares afetados (ROSSETTI, 2001; SANTOS FILHO, 2004,).

Na Flórida, segundo Castle et al. (1993), de maneira geral, parece que porta-enxertos que induzem maior vigor e produção são mais suscetíveis ao *blight*. Estão situados nesse grupo os limoeiros rugosos, incluindo a seleção 'Milan', 'Cravo', 'Volkameriano' e 'Alemow', além da limeira doce 'da Pérsia'. O *P. trifoliata* poderia também estar entre esses, e o citrange 'Carrizo' é considerado bastante suscetível, embora a incidência da doença nas plantas sobre ele seja variável. As laranjeiras doces e 'Azeda' e a tangerineira 'Cleópatra' são aparentemente menos suscetíveis, destacando-se nesse aspecto a laranjeira doce. Alta incidência de *blight* foi detectada em plantas de 15 a 20 anos sobre tangerineira 'Cleópatra'.

Apesar de ser distúrbio de causa desconhecida, acredita-se que ocorra um bloqueio do fluxo da seiva que circula no lenho da planta. Recomenda-se o arranquio das plantas afetadas, substituindo-as por combinações copa-porta-enxerto com histórico de maior sobrevivência. Na ausência de outras opções, a utilização de porta-enxertos tolerantes é a única escolha viável ao citricultor, a fim de minimizar as perdas (CASTLE et al., 1993; SANTOS FILHO, 2004). No Brasil, é esse o controle recomendado, indicando-se para tal fim porta-enxertos considerados tolerantes, como o citrumelo 'Swingle', a laranjeira 'Caipira' e as tangerineiras 'Cleópatra' e 'Sunki'.

## Nematoides

Diversos nematoides têm sido observados no sistema radicular dos citros, embora muitas espécies desses vermes asquelmintos ainda não tenham tido sua patogenicidade e seus níveis de dano conhecidos. Dentre as espécies prejudiciais associadas ao sistema radicular dos citros, destacam-se *Tylenchulus semipenetrans* (Cobb) e *Pratylenchus* spp., como as mais importantes e disseminadas no Brasil. *T. semipenetrans*, conhecida como nematoide-dos-citros, é a mais importante das espécies que atacam os citros e é encontrada na maioria das áreas cítricas do mundo, sob diferentes condições edafoclimáticas. Essa espécie é causadora do distúrbio chamado de declínio-lento-dos-citros, cujos sintomas e danos tornam-se mais evidentes quando as plantas atingem de oito a dez anos de idade, resultando na redução da produção e da qualidade dos frutos. A disseminação desses fitonematoides dá-se pelo uso de mudas infectadas, solo aderente a ferramentas e a máquinas agrícolas, enxurradas e água de irrigação (RITZINGER; DUNCAN, 2004; ROSSETTI, 2001).

Campos e Ferraz (1980) e Salibe (1996), citados por Pompeu Junior (2005), relacionaram como muito resistentes ao nematoide-dos-citros a espécie *P. trifoliata* e o citrumelo 'Swingle', com resistência média o citrange 'Troyer', e como pouco resistentes os limoeiros 'Cravo', 'Volkameriano' e 'Rugoso da Flórida', as tangerineiras 'Cleópatra', 'Sunki' e 'Sun Chu Sha Kat' (*C. reticulata*) e a laranjeira 'Hamlin'.

Na Flórida, Duncan (1999) relacionou o trifoliata e alguns de seus híbridos como altamente resistentes a *T. semipenetrans*, o limoeiro 'Milan' e a laranjeira 'Ridge Pineapple' (*C. sinensis*) como resistentes a *Radopholus* spp., e a tangerineira 'Cleópatra' tolerante a *Pratylenchus coffeae* [(Zimmermann, 1898) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941].

O controle dos fitonematoides é feito com o plantio de mudas sadias e utilização de porta-enxertos resistentes.

## Associação do porta-enxerto com fungos micorrízicos

A importância das associações de fungos micorrízicos vesicular-arbusculares (MVA) no desenvolvimento das plantas tem sido evidenciada em inúmeros trabalhos, assumindo essa simbiose papel tão relevante que algumas espécies vegetais, em sua ausência, não respondem satisfatoriamente à adubação fosfatada (OLIVEIRA; JESUS, 1987; ZAMBOLIM; SIQUEIRA, 1985). Gerdemann (1975) definiu a dependência a esses fungos como o grau em que a planta necessita deles para atingir níveis máximos de crescimento e produção, em dada condição de fertilidade do solo. Embora várias espécies de fungos micorrízicos estejam associadas às raízes dos citros, sua maioria pertence ao gênero *Glomus* (NEMEC, 1978).

Os porta-enxertos cítricos diferem em sua dependência das micorrizas relativamente ao desenvolvimento vegetativo ótimo, o que se pode afirmar comparando-se a habilidade de plantas micorrizadas e não micorrizadas em absorver fósforo (P) de solos com deficiência desse elemento. A constatação de plantas enfezadas, em viveiros e em vasos que não continham micorrizas, sugere a existência de diferenças substanciais entre porta-enxertos comerciais quanto a essa habilidade (CASTLE et al., 1993). Conforme Nemeç (1978), a laranjeira 'Azeda' e a tangerineira 'Cleópatra' estão entre os porta-enxertos mais dependentes, os limoeiros 'Rugoso' e 'Cravo' têm dependência intermediária, e o citrange 'Carrizo' é menos dependente, considerando-se esse grupo de variedades. Menge et al. (1979a) encontraram maior resposta aos estímulos dos fungos MVA em laranjeira 'Azeda' e limoeiro 'Rugoso', verificando que *C. macrophylla*, *P. trifoliata* e o citrange 'Troyer' também responderam com crescimento vegetativo. Nemeç (1978), estudando a associação entre fungos micorrízicos e porta-enxertos, na Flórida, concluiu que as cultivares comportam-se de maneira variável em sua dependência aos MVA e que essa dependência pode ser alterada pelo tipo de solo, pela fonte das sementes e por outros fatores. Segundo Castle et al. (1993), nunca foi demonstrado se a adição de micorrizas é essencial ou mesmo benéfica ao desenvolvimento máximo de plantas em viveiros ou pomares, e, além disso, eles afirmaram que as micorrizas nunca suprirão a falta de fósforo disponível em um pomar comercial.

Menge et al. (1979b) informaram que a associação desses fungos com as raízes dos citros foi reconhecida desde o ano de 1922. Segundo esses autores, foram encontrados fungos MVA em 78 de 79 pomares e viveiros cítricos na Califórnia e em 63 de 65 pomares e em viveiros visitados na Flórida. Zambolim e Siqueira (1985) afirmaram que o crescimento de porta-enxertos em viveiros é influenciado tremendamente por fungos micorrízicos vesicular-arbusculares, que chegam a promover, em solos previamente fumigados, aumentos de 20% a 2.600% nesse parâmetro. Cardoso et al. (1986) observaram influência significativa de fungos micorrízicos sobre o desenvolvimento de *seedlings* nucelares de porta-enxertos cítricos, constatando aumentos de 500% na altura desses e de 1.680% na produção de matéria seca da parte aérea, concluindo que diferentes fungos apresentam variações na eficiência com que aumentam a absorção de P e de potássio (K). Os fungos mais eficientes aumentaram a absorção de P em até 5.070% e a de K em 2.680%, acumulados na parte aérea das plantas. As técnicas de aplicação de micorrizas são bastante efetivas sob condições controladas, mas seu uso prático é difícil e custoso, porque não existe nenhum sistema de cultivo *in vitro* e, em virtude também de outras dificuldades, não é muito utilizado em viveiros comerciais (DAVIES; ALBRIGO, 1999). Como a eficiência dos fungos MVA é maior em solos com baixos teores de nutrientes, principalmente P, solos com baixa fertilidade, como os que ocorrem no Brasil, são indicados para estudos de aplicação prática desses organismos.

## Compatibilidade copa-porta-enxerto

Quando duas plantas, com genótipos distintos, se unem por enxertia, cria-se uma combinação na qual cada um de seus componentes conserva suas características próprias, coadjuvando a vida do conjunto. Estabelece-se uma espécie de simbiose, na qual cada parte integrante influencia, em maior ou menor grau, as funções e o desenvolvimento da outra. Essa influência mútua tem características particulares, assim como se dá com reações provocadas pelo meio ambiente nessa combinação de indivíduos. Assim, a planta enxertada é o conjunto de dois indivíduos geneticamente diferentes, com reações diversas em relação ao clima, ao solo e a pragas.

Nos citros, existe ocorrência de vírus e outros patógenos, cujas manifestações dependem da copa ou do porta-enxerto, ou, ainda, da interação dos dois, obrigando, na escolha do porta-enxerto, a considerar esses fatores. Esse relacionamento, chamado de afinidade ou compatibilidade, é de fundamental importância para que a planta criada pela enxertia seja produtiva e longeva. Diz-se que a união é compatível quando se estabelece com rapidez, e a planta cresce e desenvolve-se sem dificuldade. É interessante assinalar que nem todas as espécies de citros são compatíveis entre si ou com espécies de outros gêneros, podendo-se dizer que, de uma maneira geral, plantas que se hibridam com facilidade são, também, compatíveis quando enxertadas. O grau de compatibilidade, portanto, está relacionado de alguma forma à proximidade do relacionamento genético (DORNELLES, 1988; GONZÁLEZ-SICILIA, 1960; POMPEU JUNIOR, 1991).

González-Sicilia (1960) já alertava para o fato de todas as espécies do gênero *Citrus* (L.) poderem ser enxertadas umas nas outras, com resultados satisfatórios do ponto de vista botânico, podendo não acontecer o mesmo do ponto de vista prático ou comercial, uma vez que determinadas combinações resultam em pomares antieconômicos. Castle et al. (1993) salientaram que muitos problemas relativos à compatibilidade somente se manifestam quando as plantas têm vários anos de idade, sendo imprudente plantar áreas extensas com combinações de comportamento desconhecido. Castle et al. (1993) lembraram, ainda, que, na Flórida, laranjeiras doces, pomeleiros e

Foto: Almir Pinto da Cunha Sobrinho



Figura 2. Sintoma de incompatibilidade entre porta-enxerto e copa, com esta apresentando menor diâmetro do tronco.

tangerineiras são compatíveis com a maioria dos porta-enxertos, podendo também ser enxertados em algumas espécies de gêneros afins a *Citrus*, mas que as cultivares de laranjeiras doces, por exemplo, quando enxertadas em *P. trifoliata* e em alguns de seus híbridos, ficam com o diâmetro do tronco menor que o dos porta-enxertos. O menor diâmetro do tronco da copa sugere não ser a combinação totalmente compatível (Figura 2).

Ocasionalmente, plantas de tangor 'Murcott' enxertadas em citrange 'Carrizo' declinam e morrem antes de atingirem os dez anos de idade, podendo esse declínio ser causado pelo *Citrangue stunt virus* (vírus-do-enfezamento-do-citrangue). Todos esses fatos levam à conclusão de que se devem plantar única e exclusivamente mudas certificadas de matrizes registradas.

Algumas combinações copa-porta-enxerto apresentam uma depressão externa na casca, na linha de enxertia. Correspondendo a essa depressão ocorre, internamente, uma linha de goma de coloração pardo-amarelada, com projeções na face interna da casca e orifícios no lenho correspondentes a essas projeções. Esses sintomas são típicos da reação de tecidos incompatíveis, chamada em inglês de *bud union crease* (Figura 3). As plantas que apresentam esses sintomas mostram deficiências nutricionais, crescimento lento e pequena produção; frequentemente declinam e morrem, ou permanecem atrofiadas (POMPEU JUNIOR, 1991; SALIBE, 1965). Provavelmente, as primeiras observações sobre a incompatibilidade de tecidos de citros, no Brasil, foram feitas na linha de enxertia de plantas das laranjeiras doces 'Pera' e 'Seleta de Itaboraí' enxertadas em laranjeira 'Azeda', no Estado de São Paulo.

Posteriormente, Sylvio Moreira constatou sintomas de incompatibilidade em plantas de laranjeira doce ‘Lue Gim Gong’ sobre tangerineira ‘Cleópatra’, na Argentina, semelhantes aos observados por Grimm e Grant, em laranjeiras doces enxertadas em limoeiro ‘Rugoso da Flórida’ (SALIBE, 1965). Moreira (1965) demonstrou que o viroide da xiloporose não é o agente causal do *bud union crease*, embora tenha conseguido produzir sintomas semelhantes em plantas de tangelo ‘Orlando’ enxertadas em limeira doce, inoculando raças severas desse patógeno. Estudando combinações de laranjeiras doces, tangerineiras, limoeiros verdadeiros, limeiras ácidas e doces e cidreiras (*C. medica* L.) com diferentes porta-enxertos, no Estado de São Paulo, Salibe (1965) obteve resultados que podem ser resumidos assim: as laranjeiras ‘Pera’ e ‘Seleta de Itaboraí’ apresentaram sintomas de incompatibilidade nas combinações com *P. trifoliata* e com o limoeiro ‘Rugoso da Flórida’, enquanto o limoeiro verdadeiro ‘Eureka’ mostrou os mesmos sintomas apenas em *P. trifoliata*; nas combinações com a tangerineira ‘Cleópatra’ não foi encontrada nenhuma soldadura anormal, enquanto as limeiras ácidas enxertadas em *P. trifoliata* e no citrange ‘Troyer’ apresentaram sintomas mais severos quando no primeiro; em plantas de ‘Calamondin’ (*Citrus madurensis* Loureiro) sobre os limoeiros ‘Rugoso Nacional’ e ‘Rugoso da Flórida’, foram observados sintomas fortes do distúrbio apenas naquelas sobre o ‘Rugoso Nacional’.



Foto: Almir Pinto da Cunha Sobrinho

**Figura 3.** Sintoma de incompatibilidade entre porta-enxerto e copa (*bud union crease*), tendo como porta-enxerto o citrumelo [*Citrus paradisi* Macfad. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] ‘Swingle’.

Salibe e Roessing (1963) encontraram sintomas de incompatibilidade em plantas de certas variedades enxertadas em *P. trifoliata*, caracterizados por um anel de goma, de natureza desconhecida, acreditando tratar-se de uma verdadeira incompatibilidade fisiológica entre os tecidos da copa e do porta-enxerto. Salibe (1965) citou como exemplos típicos de incompatibilidade as combinações de limoeiro ‘Eureka’ com citrange ‘Troyer’ e com *P. trifoliata*, informando ainda ter constatado sintomas da anomalia em pomeleiro ‘Red’ sobre limeira doce de ‘Umbigo’ (*C. limetta* Risso), em laranjeira ‘Tarocco’ (*C. sinensis*) sobre limoeiro ‘Volkameriano’ e em pomeleiro ‘Marsh Seedless’ enxertado em laranjeira ‘Azeda’, na Flórida, na Itália e em Israel, respectivamente.

As viroses estão associadas ao aparecimento de diferentes sintomas de incompatibilidade. Outra causa apontada é uma verdadeira incompatibilidade herdada geneticamente (FERNÁNDEZ

VALIELA et al., 1965). No Japão, Miyakawa e Matsui (1976) observaram uma anomalia na linha de enxertia de plantas de tangerineira ‘Satsuma’ (*C. unshiu* Marcow.) sobre *P. trifoliata*, causada por patógeno transmissível por enxertia, similar à determinada pelo vírus do *tatter leaf citrange virus*. Hoje, acredita-se ser de natureza fisiológica a maioria dos casos de incompatibilidade (POMPEU JUNIOR, 1991).

Ortiz Marcide (1990), na Espanha, fez referência a um maior crescimento do diâmetro do tronco do limoeiro ‘Verna’ (*C. limon*) enxertado em laranjeira ‘Azeda’, afirmando que esse crescimento dificulta a circulação de seiva em plantas adultas e que tipos selecionados desse porta-enxerto são esperados para solucionar o problema. Na Tabela 1, são apresentados exemplos de casos de incompatibilidade copa-porta-enxerto constatados na citricultura baiana.

**Tabela 1.** Sintomas de incompatibilidade de laranjeira ‘Pera’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] sobre diferentes porta-enxertos, em Rio Real, BA, 2005.

Variedade porta-enxerto	Sintoma de incompatibilidade (%) <sup>(1)</sup>			
	0	1	2	3
Citrumelo Swingle B <sup>(2)</sup>	25	25	25	25
Citrumelo Swingle <sup>(2)</sup>	16	0	44	42
Tangerineira Sunki x trifoliata English 264 <sup>(3)</sup>	100	0	0	0
Limoeiro Cravo x tangerineira Cleópatra <sup>(4)</sup>	100	0	0	0
Tangerineira Sunki x trifoliata Swingle 314 <sup>(5)</sup>	100	0	0	0
Limoeiro Cravo	100	0	0	0
Limoeiro Volkameriano <sup>(6)</sup>	0	0	50	50
Tangerineira Sunki Maravilha	58	42	0	0
Tangerineira Sunki x trifoliata English 256 <sup>(3)</sup>	42	50	8	0
Limoeiro Rugoso Mazoe <sup>(7)</sup>	0	0	0	100

<sup>(1)</sup> 0 – Nenhum; 1 – fraco; 2 – médio; 3 – forte; <sup>(2)</sup> *C. paradisi* Macfad. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.; <sup>(3)</sup> *C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka x *P. trifoliata* seleção ‘English’; <sup>(4)</sup> *C. limonia* Osbeck x *C. reshni* hort. ex Tanaka; <sup>(5)</sup> *C. sunki* x *P. trifoliata* seleção ‘Swingle’; <sup>(6)</sup> *C. volkameriana* V. Ten. & Pasq.; <sup>(7)</sup> *C. jambhiri* Lush.

Fonte: Passos et al. (2005).

## Reação de porta-enxertos à morte-súbita-dos-citros

Constatada em 1999, no sudoeste de Minas Gerais e norte de São Paulo, uma nova anomalia denominada morte-súbita-dos-citros (MSC) tem afetado laranjeiras e tangerineiras sobre os porta-enxertos limoeiros ‘Cravo’ e ‘Volkameriano’, enquanto plantas enxertadas em tangerineiras ‘Cleópatra’ e ‘Sunki’, citrumelo ‘Swingle’ e *P. trifoliata* não mostram sintomas. Esse novo distúrbio obrigou os citricultores a pensar em diversificação, comprovada por levantamento feito pelo Fundecitrus em 2003, evidenciando queda na utilização do limoeiro ‘Cravo’, de uso predominante, e

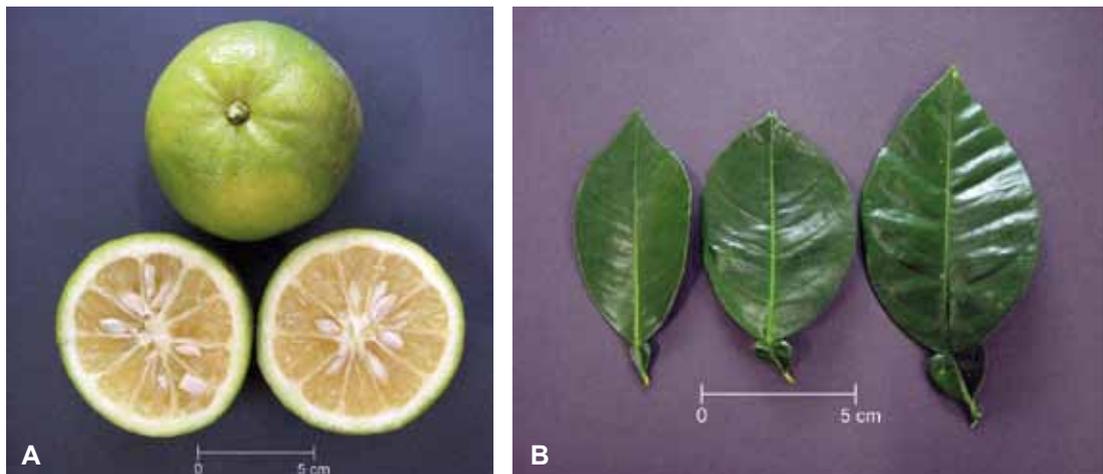
aumento na enxertia em tangerineira 'Cleópatra', tangerineira 'Sunki' e citrumelo 'Swingle' (POMPEU JUNIOR, 2005).

Os sintomas iniciais do distúrbio são a perda de brilho das folhas, poucas brotações, ausência de brotações internas e desfolha parcial. O sistema radicular apresenta grande quantidade de raízes podres e mortas, com poucas radículas. O sintoma característico da possível doença é o amarelimento dos tecidos internos da casca do porta-enxerto, que podem ficar alaranjados, em contraste com a coloração creme normal da casca da copa. As plantas podem morrer seis meses após o aparecimento dos sintomas. A MSC já foi vista em plantas com dois anos de idade, sendo mais frequente naquelas com mais de seis anos. Sua causa permanece desconhecida, havendo, contudo, evidência de que seja provocada por vírus e transmitida por borbulhas. Embora seu agente causal não seja conhecido, supõe-se que ele seja uma variante do vírus-da-tristeza-dos-citros (YAMAMOTO et al., 2003 citados por POMPEU JUNIOR, 2005; SANTOS FILHO, 2004; TERCENIO et al., 2006).

## Características dos principais porta-enxertos

### Laranjeira 'Azeda'

A laranjeira 'Azeda' (Figura 4) foi o porta-enxerto mais importante em quase todas as regiões citrícolas do mundo e, ainda hoje, é um dos mais amplamente difundidos, a despeito de sua suscetibilidade à tristeza. A ampla disseminação dessa cultivar deve-se à boa produtividade, à excelente qualidade de frutos e à tolerância à gomose-de-*Phytophthora* e ao frio que ela propicia às copas nela enxertadas. Dentre as várias boas qualidades desse porta-enxerto está, ainda, a tolerância ao declínio e aos viroides da exocorte e xiloporose.



Fotos: Nilton Friztons Sanches

**Figura 4.** Frutos (A) e folhas (B) de laranjeira 'Azeda' (*Citrus aurantium* L.). Banco ativo de germoplasma de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.

A tristeza tem se disseminado e, por isso, reduzido ou eliminado o uso da laranja 'Azeda'. Contudo, considerando a excelência de suas qualidades hortícolas, recomenda-se sua utilização em áreas onde não existe a doença ou onde ela é considerada um risco menor (CASTLE; GMITTER JUNIOR, 1999), ou como porta-enxerto de limoeiros verdadeiros, que resulta em combinações tolerantes. Sua suscetibilidade à doença verrugosa dificulta o desenvolvimento das plantas e os trabalhos no viveiro.

A laranja 'Azeda' adapta-se a diferentes tipos de solos, comportando-se particularmente bem em solos com valores altos de pH e salinidade (WUTSCHER, 1990), além disso, desenvolve-se melhor em solos argilosos férteis que nos arenosos profundos. Nestes últimos, a planta desenvolve bastante o sistema radicular, de forma que se torna menos sensível à seca. As copas sobre ela são as menos injuriadas por geadas em áreas onde estas acontecem com frequência, e o tamanho da planta é de médio a grande. Seu vigor é moderado e independe do tipo de solo.

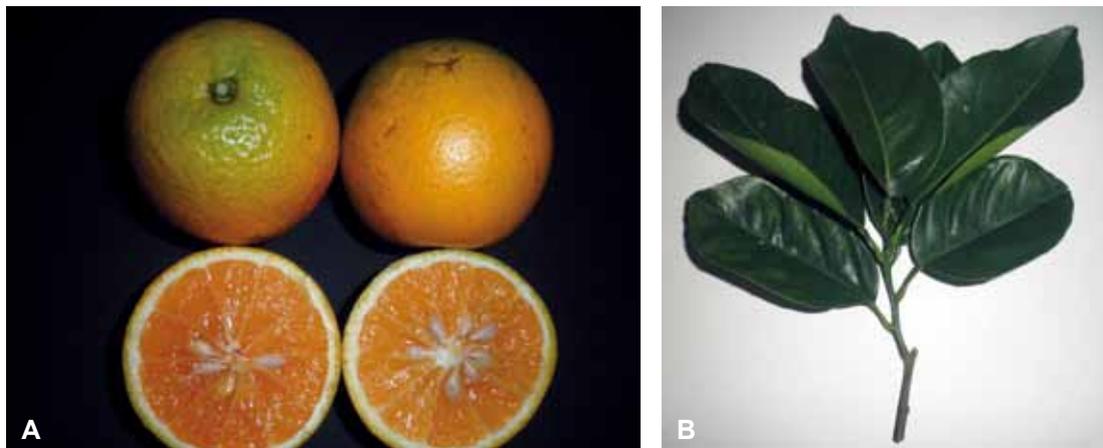
Algumas cultivares sobre a laranja 'Azeda' têm a maturação de frutos retardada, em virtude do alto teor de ácidos, mas essa alta acidez resulta em melhor armazenamento do fruto na planta e melhor comportamento pós-colheita. Cultivares de maturação mais tardia, ao contrário, quando sobre esse porta-enxerto, têm a maturação apressada, face à alta concentração de sólidos solúveis totais (CASTLE; GMITTER JUNIOR, 1999).

A suscetibilidade da laranja 'Azeda' ao vírus-da-tristeza despertou o interesse por outros porta-enxertos, como possíveis substitutos. Existem numerosas seleções de laranja 'Azeda' de comportamento variável, o que sugere serem híbridos ou mutantes, fenotipicamente semelhantes, e algumas dessas são consideradas promissoras como porta-enxertos (POMPEU JUNIOR, 2005). Castle e Gmitter Junior (1999) relacionaram entre elas as seguintes: laranja 'Bittersweet' e *C. taiwanica* Tanaka & Y. Shimada, de características similares à laranja 'Azeda', inclusive suscetíveis à tristeza, não apresentam vantagens; as variedades Smooth Flat Seville, Kinkoji (*C. obovoidea* hort. ex I. Takah.), Gou Tou Chen e Zhu Luan, provavelmente combinações híbridas de toranja [*C. maxima* (Burm.) Merr.], laranjas doces e azedas, despertaram interesse, principalmente na Flórida. Conforme esses autores, 'Smooth Flat Seville' induz menores produções de frutos, de qualidade inferior aos produzidos pela 'Azeda' e populações desuniformes de *seedlings*; 'Gou Tou Chen' aparenta tolerância a raças das mais severas do CTV, determina bom vigor às plantas e mostra tolerância à salinização e desempenho inferior ao da 'Azeda' no viveiro; a variedade Kinkoji manifesta desempenho excelente no viveiro e demonstra tolerância a *strains* severos de CTV no campo; 'Zhu Luan' é menos conhecida que as outras.

## Laranja 'Caipira'

A laranja 'Caipira' (Figura 5) foi o primeiro porta-enxerto empregado em escala comercial no Brasil, tendo sido substituída pela laranja 'Azeda' em virtude de sua intolerância à seca e, especialmente, sua suscetibilidade à podridão causada por *Phytophthora*. No Rio Grande do Sul,

onde ainda é utilizada como cavalo, não tem mostrado essa suscetibilidade, seu principal defeito (DORNELLES, 1988). Em contrapartida a esses defeitos, ela é tolerante à tristeza, exocorte, xiloporose e ao declínio. As qualidades das laranjeiras doces, de maneira geral, afora sua sensibilidade à seca e à podridão do pé e das raízes, conferem a essas cultivares características de excelentes porta-enxertos. Muitas variedades de laranjeiras doces têm sido testadas como porta-enxertos, mas todas com suscetibilidade à podridão causada por *Phytophthora* spp. e intolerância à seca (CASTLE; GMITTER JUNIOR, 1999).



Fotos: Nilton Fritzon Sanches

**Figura 5.** Frutos (A) e folhas (B) de laranjeira ‘Caipira’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. Banco ativo de germoplasma de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.

Variedades copa em combinação com a laranjeira ‘Caipira’ atingem bom tamanho, apresentando pequena produção inicial, mas, com o avançar da idade, podem se igualar ou até mesmo superar porta-enxertos produtivos. Embora sensível à seca, sua produtividade pode ser satisfatória, desde o início de produção do pomar, se for utilizada irrigação. Os frutos produzidos pelas copas, em combinação com esse porta-enxerto, são grandes e de boa qualidade, comportamento esse semelhante ao da laranjeira ‘Azeda’.

Segundo Castle et al. (1993), os porta-enxertos de laranjeiras doces são compatíveis com as principais cultivares de laranjas doces, com pomeleiros e com tangerineiras. Esses autores informaram que tem aumentado o interesse por esses porta-enxertos na Flórida, especialmente por sua tolerância ao *blight* e à tristeza.

## Limoeiro ‘Cravo’

O limoeiro ‘Cravo’ (Figura 6) é considerado um híbrido tipo tangerina (CASTLE; GMITTER JUNIOR, 1999), tendo sido classificado no passado como *C. reticulata* var. *austera* Swingle. No Brasil, onde é o principal porta-enxerto, recebe os nomes de limoeiro ‘Rosa’, ‘Francês’, ‘Vinagre’, ‘Galego’,

'Bergamota', dentre outros. Em outras partes do mundo, é chamado de limeira 'Rangpur', limeira 'Kusaie', limoeiro de 'Cantão', limoeiro 'Hime' (HODGSON, 1967; ORTIZ MARCIDE, 1986). A grande preferência pelo 'Cravo' no Brasil é explicada, especialmente, por sua tolerância à tristeza e à seca, excelente produtividade e precocidade de produção. Além dessas características, apresenta facilidade de obtenção de sementes, bom vigor no viveiro, bom pegamento de enxertos e das mudas no campo, onde crescem rapidamente. Considerado tolerante à tristeza-dos-citros, apresenta caneluras quando infestado por estirpes fortes do vírus (MÜLLER et al., 1968 citados por POMPEU JUNIOR, 2005). No Vale do São Francisco, Bahia, foram observadas caneluras muito fortes em plantas desse porta-enxerto, após a morte da copa de pomeleiro. Suscetível ao declínio, à exocorte e à xiloporose, deve ser enxertado apenas com borbulhas de matrizes sadias, livres, principalmente, dos viroides causadores destas duas últimas doenças. Suscetível à podridão causada por *Phytophthora* spp. e à verrugose, apresenta também, segundo Davies e Albrigo (1999), sensibilidade aos nematoides cavernícola [*Radopholus similis* (Cobb) Thorne] e dos citros (*Tylenchulus semipenetrans*). Laranjeiras das principais variedades copas, assim como as tangerineiras 'Cravo' e 'Ponkan', enxertadas sobre o limoeiro 'Cravo', são suscetíveis à morte-súbita-dos-citros (BASSANEZI et al., 2002 citados por POMPEU JUNIOR, 2005). Considerado um dos porta-enxertos mais tolerantes a solos salinos, tolera bem os solos calcários e pode ser plantado em solos arenosos e argilosos.



**Figura 6.** Frutos e sementes (A) e folhas (B) do limoeiro 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck). Banco ativo de germoplasma de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.

Pompeu Junior (1991, 2001) fez referência ao bom desempenho desse porta-enxerto, afirmando que ele está sempre entre os mais produtivos em experimentos no Estado de São Paulo, evidenciando sua capacidade de combinação com diferentes copas e de adaptação a diversos tipos de clima e solo, destacando como mais produtivos e tolerantes à podridão causada por *Phytophthora* spp. os clones 'Cravo Santa Bárbara', 'Phylippine Red Lime' e 'Rangpur Otaheite'.

Segundo Castle et al. (1993), o limoeiro ‘Cravo’ é semelhante ao limoeiro ‘Rugoso’ em vários aspectos, tais como vigor e tamanho das plantas, pequena tolerância ao frio e alta produtividade. O grande tamanho de frutos que induz às copas e a qualidade do suco são apenas ligeiramente melhores que daqueles produzidos no ‘Rugoso’.

Davies e Albrigo (1999) afirmaram que, embora as laranjeiras doces enxertadas no limoeiro ‘Cravo’ tenham uma série de características favoráveis, é improvável que essa cultivar chegue a ser um porta-enxerto de importância fora do Brasil.

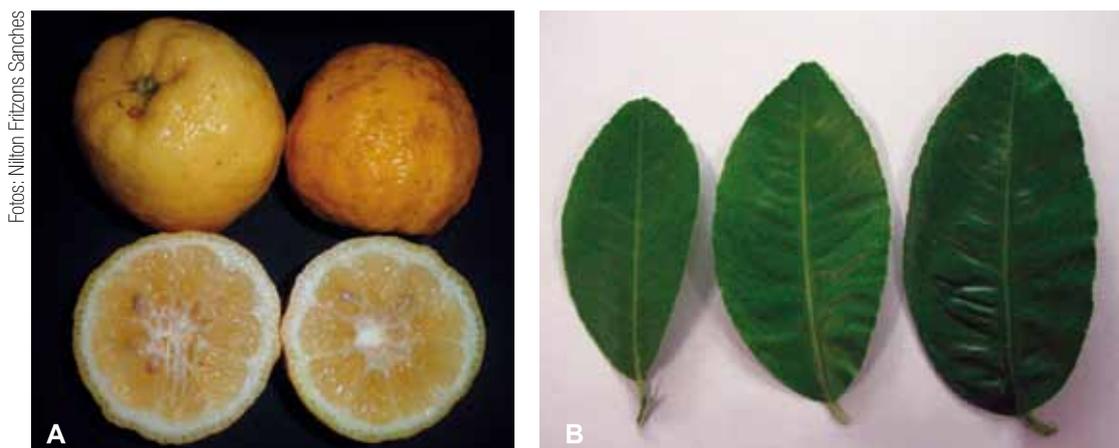
Soares Filho et al. (1999), comparando a seleção ‘Santa Cruz’, de limoeiro ‘Cravo’, identificada como variação de gema do limoeiro ‘Cravo Santa Bárbara’, obtida na Embrapa Mandioca e Fruticultura, com outras três seleções dessa cultivar, constataram ser o ‘Cravo Santa Cruz’ produtor de maior número de sementes por fruto, cerca de 17, e de poliembrionia relativamente mais elevada, o que lhe confere um bom potencial de emprego em viveiros comerciais de citros. Além disso, a expressiva porcentagem de embriões de tamanho grande presente nessa seleção qualifica-a como bom parental feminino em programas de melhoramento genético dirigidos à obtenção de novos porta-enxertos. Os embriões grandes favorecem a germinação daqueles de origem sexuada e posterior sobrevivência dos *seedlings* híbridos. Além disso, Soares Filho et al. (2011) observaram que copas de laranjeira ‘Valência’, enxertadas nessa seleção de limoeiro ‘Cravo’, apresentam porte mais reduzido em comparação com outras seleções desse porta-enxerto.

## Limoeiro ‘Rugoso’

O limoeiro ‘Rugoso’ (Figura 7) também é considerado um híbrido natural. Embora existam diversos tipos e variantes dessa cultivar, no Brasil são mais conhecidos três deles, o ‘Rugoso da Flórida’, o ‘Rugoso Nacional’ e o ‘Mazoe’, também chamado de ‘Rugoso da África’. O limoeiro ‘Rugoso’ já foi um dos porta-enxertos mais utilizados em todo o mundo citrícola, mas é pouco plantado hoje. Uma das causas de sua aceitação é a adaptação a solos arenosos profundos, onde outros porta-enxertos desenvolvem-se mal, além da boa produtividade e do grande tamanho dos frutos induzidos por ele às copas (CASTLE; GMITTER JUNIOR, 1999; DAVIES; ALBRIGO, 1999).

O sistema radicular do limoeiro ‘Rugoso’ é extenso, chegando a atingir mais de 4 m de profundidade em solos arenosos profundos, propiciando boa tolerância à seca às combinações cítricas de que participa. É um porta-enxerto considerado moderadamente tolerante à salinidade alta (DAVIES; ALBRIGO, 1999). As plantas sobre o ‘Rugoso’ atingem grande volume de copa e alta produtividade, mas os frutos são de baixa qualidade, o que não chega a ser fator limitante, desde que os padrões mínimos de maturação de frutas frescas sejam atingidos. Nesse caso, são levados em consideração o tamanho, a qualidade externa do fruto e a produtividade (CASTLE; GMITTER JUNIOR, 1999).

Segundo Pompeu Junior (1991), os limoeiros rugosos ‘Nacional’ e ‘da Flórida’ não devem ser usados no Estado de São Paulo, porque induzem baixa produção, má qualidade do fruto e vida



**Figura 7.** Frutos (A) e folhas (B) do limoeiro 'Rugoso' (*Citrus jambhiri* Lush.). Banco ativo de germoplasma de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.

curta à planta, sendo ainda incompatíveis com a laranjeira 'Pera'. No Brasil, à exceção do Estado de Sergipe, que utiliza o limoeiro 'Rugoso da Flórida' em boa proporção ao lado do limoeiro 'Cravo', esses porta-enxertos têm sido mais usados em caráter experimental. Nesse estado, Trindade et al. (1973, 1987) verificaram a ocorrência de incompatibilidade em pequeno número de plantas de diversas cultivares de laranjeiras doces, constatando ser o problema mais sério na cultivar Pera, sem, contudo, influenciar o crescimento vegetativo das plantas e a produção de frutos, podendo-se dizer também que, na Bahia, apesar da incompatibilidade verificada na combinação 'Pera'-'Rugoso da Flórida', essas variáveis não sofreram influência maior do distúrbio (CUNHA SOBRINHO et al., 1980).

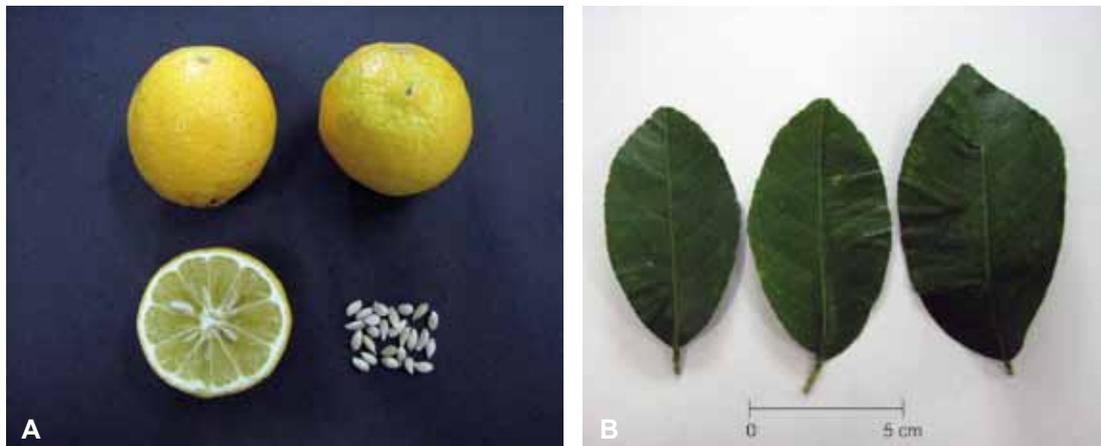
Segundo Dornelles (1988), em ensaios no Rio Grande do Sul, o 'Rugoso da Flórida' tem se destacado dos demais. Em experimentos conduzidos na Bahia, em solo areno-argiloso, de textura média, o limoeiro 'Rugoso da Flórida' suplantou o 'Cravo' em produtividade, em combinação com copas das laranjeiras 'Baianinha' e 'Natal' (CUNHA SOBRINHO, 1992).

O limoeiro 'Rugoso' é tolerante à tristeza, à exocorte e à xiloporose, porém é altamente suscetível à podridão causada por *Phytophthora* spp. e ao declínio, o que limita seu uso.

## Limoeiro 'Volkameriano'

O limoeiro 'Volkameriano' (Figura 8), a exemplo dos limoeiros 'Cravo' e 'Rugoso', é considerado um híbrido natural (AGUSTÍ, 2000), provavelmente de cruzamento entre limoeiro 'Rugoso' e laranjeira 'Azeda' (POMPEU JUNIOR, 2001). Na Espanha, as plantas sobre esse porta-enxerto são grandes e vigorosas, com boa tolerância a solos calcários, tolerância moderada ao frio e à salinidade e bom comportamento em combinação com limoeiros verdadeiros, com os quais não apresenta incompatibilidade (AGUSTÍ, 2000), o que também se verifica quando o porta-enxerto é a laranjeira

'Azeda'. Na Flórida, as plantas sobre ele são muito vigorosas e produtivas nos primeiros anos de vida do pomar, e a qualidade dos frutos é relativamente pobre, mas ligeiramente melhor que a dos frutos produzidos no 'Rugoso' e no 'Cravo'; é considerado mais tolerante ao frio e à podridão-das-raízes que o 'Rugoso' e tão suscetível ao *blight* quanto este (CASTLE et al., 1993). No Brasil, determina a formação de copas de tamanho médio, de boa produtividade, com início precoce de produção e frutos com características semelhantes às dos produzidos sobre o 'Cravo', sendo indicado para plantio em solos arenosos e argilosos. Tem mostrado incompatibilidade com a laranjeira 'Pera', cuja combinação é pouco produtiva e de vida curta; é suscetível à doença galha-lenhosa (*woody gall*) quando enxertado com limoeiros verdadeiros portadores dessa enfermidade (POMPEU JUNIOR, 1991). É tolerante à tristeza, xiloporose e, por ser também tolerante à exocorte, pode ser empregado como porta-enxerto da limeira 'Tahiti', clone 'Quebra Galho', originalmente portador da doença. É suscetível ao declínio e à morte-súbita-dos-citros (SANTOS FILHO, 2004).



Fotos: Nilton Fritzon Sanches

**Figura 8.** Frutos e sementes (A) e folhas (B) do limoeiro 'Volkameriano' (*Citrus volkameriana* V. Ten. & Pasq.). Banco ativo de germoplasma de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.

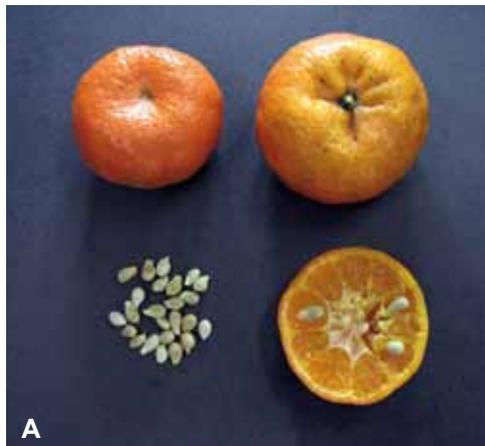
Davies e Albrigo (1999) afirmaram que essa cultivar, pouco utilizada hoje como porta-enxerto, não chegará, também, a ser empregada de maneira generalizada em futuro próximo. Castle e Gmitter Junior (1999) informaram que o limoeiro 'Volkameriano' é um porta-enxerto sem importância na Flórida, onde é usado para laranjeiras doces; na Itália e África do Sul, é enxertado com limoeiros verdadeiros; e, na Venezuela e outras regiões do Caribe, tem substituído a laranjeira 'Azeda', afetada pelo vírus-da-tristeza. Esses autores consideram o limoeiro 'Volkameriano' mais indicado que o 'Rugoso' como porta-enxerto de laranjeiras doces destinadas à indústria de suco, salientando, ainda, que ele é a melhor alternativa nos locais onde a podridão-das-raízes é um problema.

## Tangerineira ‘Cleópatra’

A ‘Cleópatra’ (Figura 9), dentre as tangerineiras, é o porta-enxerto mais conhecido e mais amplamente utilizado como suporte de copas de cultivares de citros. Considerando-se, porém, o conjunto total de porta-enxertos comercialmente empregados, seu uso dá-se apenas em pequena escala, com copas de pomeleiros e laranjeiras doces, a não ser em casos particulares de produção de frutos de menor tamanho, destinados a certos mercados, ou quando se visa à maturação mais tardia, proporcionada pela alta concentração de ácidos e sólidos solúveis totais. Como vantagens de caráter geral, incluem-se a tolerância a doenças transmissíveis por enxertia, tolerância ao frio semelhante à da laranjeira ‘Azeda’, à salinidade (está entre os porta-enxertos de maior tolerância à salinidade) e a solos com pH alto. Como desvantagens, são apontados o grande tamanho das plantas e início tardio de produção de frutos. O início tardio de produção de laranjeiras doces é considerado uma característica intimamente relacionada às copas. As tangerineiras induzem a produção de frutos pequenos, de casca fina sujeita a rachaduras depois da colheita, embora de maior permanência na planta e suco de excelente qualidade (CASTLE et al., 1993; CASTLE; GMITTER JUNIOR, 1999).

Na Flórida, a tangerineira ‘Cleópatra’ é considerada tolerante à podridão-do-pé, em solos arenosos e bem drenados, mas suscetível em solos de drenagem pobre, e altamente suscetível à podridão-das-raízes. A doença chamada *blight* afeta as plantas sobre esse porta-enxerto, que, no

Fotos: Nilton Fritzon Sanches



**Figura 9.** Frutos e sementes (A) e folhas (B) da tangerineira ‘Cleópatra’ (*Citrus reshni* hort. ex Tanaka). Banco ativo de germoplasma de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.

entanto, é dos mais tolerantes, juntamente com a laranjeira 'Azeda' e laranjeiras doces, começando a declinar somente quando as plantas estão entre os 15 e 20 anos de idade (CASTLE et al., 1993). No Estado de São Paulo, é tida como de tolerância média ao declínio das plantas cítricas, tendo sido observado o distúrbio a partir dos 14 anos (BERETTA; ROSSETTI, 1990; POMPEU JUNIOR, 1990, 1991).

Pompeu Junior (1991) considera esse porta-enxerto tão produtivo quanto o limoeiro 'Cravo', quando em solo argiloso, e menos produtivo que este em solos arenosos, com menor produção nos dois ou três primeiros anos do plantio. Os frutos, apesar de menores, têm melhor aparência e qualidade de suco e são de maturação mais lenta, permitindo colheita mais tardia. Sob as condições tropicais do Recôncavo Baiano, em Latossolo Amarelo de textura argilosa, Cunha Sobrinho et al. (1980) observaram maior produção em plantas de laranjeira 'Pera' sobre tangerineira 'Cleópatra' que sobre o limoeiro 'Cravo', mais produtivo apenas no primeiro ano de colheita, aos três anos de idade do pomar. Em solo coeso de Tabuleiro Costeiro, no Estado de Sergipe, Cintra et al. (2000) observaram maior volume e ligeira tendência de aprofundamento do sistema radicular da tangerineira 'Cleópatra', constatando, contudo, maior intolerância à seca que o limoeiro 'Cravo' (CINTRA et al., 2000).

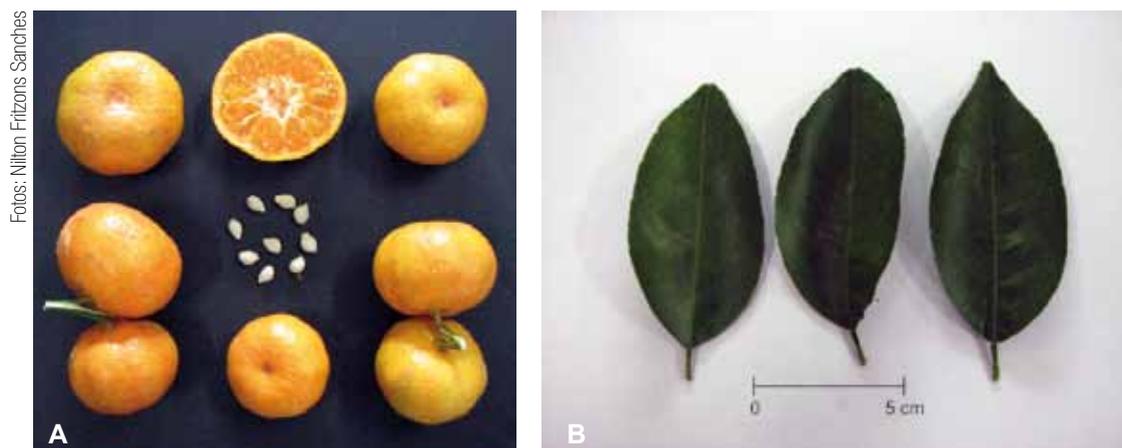
A experiência tem demonstrado que essa tangerineira é um excelente porta-enxerto para cultivares de tangerina que têm frutos grandes, o bastante para que a redução do seu tamanho, determinada por esse porta-enxerto, não seja considerável. Apesar do uso limitado, com base em sua tolerância ao frio, à tristeza e ao *blight*, a 'Cleópatra' pode ser considerada uma das melhores escolhas dentre os porta-enxertos comerciais para várias cultivares (CASTLE et al., 1993).

Além da tolerância à tristeza, à exocorte e à xiloporose, é das mais tolerantes ao declínio. As tangerineiras 'Cleópatra' e 'Sunki', em razão da tolerância ao declínio e à morte-súbita-dos-citros, são indicadas como bons porta-enxertos para a laranjeira 'Pera' (POMPEU JUNIOR, 2005).

## Tangerineira 'Sunki'

A tangerineira 'Sunki' (Figura 10) é supostamente originária da China (HODGSON, 1967) e é utilizada amplamente como porta-enxerto naquele país, assumindo interesse no Brasil por sua tolerância ao declínio-dos-citros e à produção superior de frutos, especialmente em solos argilosos (CASTLE; GMITTER JUNIOR, 1999; TEÓFILO SOBRINHO et al., 1986, 1987). Beretta et al. (1986) fizeram referência à sua tolerância ao declínio, e Pompeu Junior (2005) informou que o interesse por essa cultivar no Estado de São Paulo é motivado por sua tolerância ao declínio e produção de frutos geralmente superiores aos relacionados à tangerineira 'Cleópatra', acrescentando que as plantas sobre esse porta-enxerto não são afetadas pela morte-súbita-dos-citros, o que motivou o aumento de sua participação nos viveiros.

Esse autor (POMPEU JUNIOR, 1991) afirmou que, em solos argilosos, as tangerineiras 'Sunki' e 'Cleópatra' induzem produção semelhante à do limoeiro 'Cravo', mas em solos arenosos apresentam menor produção que este, e, nos dois tipos de solo, a 'Sunki' é mais produtiva que a 'Cleópatra'. Ambas



**Figura 10.** Frutos e sementes (A) e folhas (B) da tangerineira 'Sunki' [*Citros sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka]. Banco ativo de germoplasma de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.

produzem menos que o limoeiro 'Cravo' nas duas ou três primeiras safras. Os frutos são menores e de maturação mais tardia que no 'Cravo', mas a qualidade do suco é superior. A planta é tolerante à tristeza e aos sais, embora intolerante à exocorte.

Trabalhos de pesquisa, realizados em São Paulo (BERETTA; ROSSETTI, 1990; POMPEU JUNIOR, 1990), demonstraram que a tangerineira 'Sunki' e a laranja 'Caipira' estão entre os porta-enxertos mais tolerantes ao declínio. Duas novas seleções dessa cultivar, ambas provavelmente de origem nucelar, foram obtidas na Embrapa Mandioca e Fruticultura: a 'Sunki Maravilha', que tem número médio de sementes por fruto relativamente alto (cerca de oito), comparado ao número de sementes da cultivar original, que é de três, e tem tolerância à podridão causada por *Phytophthora* superior à dos clones comuns de 'Sunki'; e a 'Sunki Tropical', que tem número médio de sementes por fruto especialmente elevado (superior a 18) e boa tolerância à seca e resistência à podridão causada por *Phytophthora*. Ao lado do bom número de sementes, ambas produzem *seedlings* uniformes, decorrentes de sua elevada porcentagem de poliembrião, de cerca de 100%, características altamente interessantes em porta-enxertos. Têm bom potencial de uso em programas de diversificação de porta-enxertos, nas condições em que apresentam boa adaptação (SOARES FILHO et al., 2002, 2003, 2004), especialmente a 'Sunki Tropical', que já vem sendo utilizada comercialmente nos estados de São Paulo, Bahia e Sergipe.

## *Poncirus trifoliata*

A espécie *P. trifoliata* (Figura 11), comumente chamada de trifoliata no Brasil, apesar de não pertencer ao gênero *Citrus*, produz frutos considerados como frutos cítricos verdadeiros. O trifoliata é um porta-enxerto de uso disseminado no mundo citrícola, especialmente no Japão, na China, na

Austrália, na Argentina e no Uruguai. Pouco utilizado no Brasil, à exceção do Estado do Rio Grande do Sul, onde tem participação altamente expressiva, apresenta várias seleções, essas definidas com base no tamanho da flor e no hábito de crescimento. Esse porta-enxerto era considerado ananicante, até os efeitos do viroide da exocorte e das condições ambientais serem melhor entendidas. Normalmente, as plantas sobre ele crescem menos que sobre porta-enxertos tipo limoeiro e em solos arenosos, inférteis, embora em solos férteis determine bom desenvolvimento às combinações copa-porta-enxerto de que participa, donde se depreende que seu nanismo é ambiental e não genético. Em áreas de clima subtropical, o trifoliata não é precoce, mas em climas mais frios as plantas produzem abundantemente já aos dois anos de idade. Em todos os tipos de clima os frutos são de qualidade superior (CASTLE et al., 1993; CASTLE; GMITTER JUNIOR, 1999; DAVIES; ALBRIGO, 1999; DORNELLES, 1988; ORTIZ MARCIDE, 1990).



**Figura 11.** Frutos e sementes (A) e folhas (B) do *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Banco ativo de germoplasma de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.

Fotos: Nilton Fritzon Sanches

Normalmente, as copas sobre trifoliata têm diâmetro de tronco menor que o do porta-enxerto, o que não significa incompatibilidade, embora em algumas combinações esse distúrbio manifeste-se, afetando a produção e encurtando a vida da planta, como com a laranja 'Pera' e com o tangor 'Murcott'. Diversas outras cultivares copa são também incompatíveis com *P. trifoliata* (CARLOS et al., 1997).

As plantas enxertadas nesse porta-enxerto produzem bem, considerando-se o seu tamanho. Bastante exigente em fertilidade, o *Poncirus* tem pequeno crescimento e inicia tardiamente a produ-

ção de frutos em solos pobres e ácidos (DORNELLES, 1988). Desenvolve-se bem em solos argilosos e limosos e não se adapta bem a solos salinos e calcários. Em solos arenosos, sua produtividade é menor que a de outras cultivares melhor adaptadas. Sem expandir o sistema radicular em profundidade e nem lateralmente, esse porta-enxerto adapta-se bem a solos rasos e úmidos, por sua resistência à podridão-do-pé (AMORÓS, 1999; CARLOS et al., 1997; CASTLE et al., 1993; CASTLE; GMITTER JUNIOR, 1999; DAVIES; ALBRIGO, 1999).

Os frutos produzidos sobre o trifoliata são de excelente qualidade, com altos teores de sólidos solúveis totais e acidez total. De casca fina e lisa, permanecem na planta depois de maduros, e a coloração do suco é excelente (CARLOS et al., 1997; CASTLE et al., 1993; CASTLE; GMITTER JUNIOR, 1999; DAVIES; ALBRIGO, 1999; DORNELLES, 1988). O trifoliata é tolerante ao frio, às doenças tristeza e xiloporose, a nematoides, além de ser resistente a fungos do gênero *Phytophthora*, sendo, porém, bastante suscetível à exocorte. Segundo Pompeu Junior (1991), não deve ser plantado em regiões onde ocorre o declínio-dos-citros. As laranjeiras doces enxertadas em trifoliata têm mostrado tolerância à morte-súbita-dos-citros (BASSANEZI et al., 2003 citados por POMPEU JUNIOR, 2005). Até pouco tempo, *Poncirus* (Raf.) era considerado um gênero monoespecífico. Hoje, sabe-se da ocorrência de uma segunda espécie, *P. polyandra* S. Q. Ding et al., originária da província chinesa de Yunnan (GMITTER JUNIOR; HU, 1990).

*P. trifoliata* (L.) Raf. var. *monstrosa* (T. Itô) Swingle, comumente conhecida como 'Flying Dragon', imprime forte nanismo às plantas nela enxertadas, em virtude dessa característica ser de natureza genética nessa variedade, diferentemente do que normalmente ocorre na espécie que lhe deu origem. Levando em conta o grande vigor e a baixa produtividade dos citros nos trópicos, Mademba-Sy et al. (1999) são favoráveis ao uso da seleção 'Flying Dragon' nessas latitudes, comentando que ela, além de induzir nanismo, estimula frutificação precoce às copas nela enxertadas. Os referidos autores basearam-se em dados de ensaio irrigado na Nova Caledônia, onde esse porta-enxerto permitiu densidades de plantio de 800 a 1.400 plantas por hectare, em conformidade com as variedades estudadas (limoeiro verdadeiro, limeira ácida, laranjeiras doces, pomeleiro, tangerineira, tangor e tangelo). Stuchi et al. (2003) acreditam que, nas condições subtropicais do Estado de São Paulo, onde o limoeiro 'Cravo' propicia à limeira 'Tahiti' grande vigor, baixa produtividade e alta suscetibilidade às espécies de *Phytophthora*, a utilização da seleção 'Flying Dragon' resultaria em plantas anãs e de alto rendimento. Nesse estado, Figueiredo e Stuchi (2003) relataram maior desenvolvimento vegetativo e produção, resultantes de irrigação empregada em ensaio conduzido na Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro (EECB), inclusive no segundo semestre, época em que normalmente ocorrem menor frutificação e preços de frutos mais elevados. Segundo Pompeu Junior (2005), a variedade Flying Dragon vem sendo utilizada como porta-enxerto da limeira ácida 'Tahiti', clone Quebra Galho.

## Híbridos de *Poncirus trifoliata*

### Citranges 'Troyer' e 'Carrizo'

Citranges são híbridos entre laranjeiras doces e trifoliata. Entre os citranges, os mais importantes em uso comercial são 'Troyer' (Figura 12) e 'Carrizo', que têm como parental feminino a laranjeira 'Bahia'. Embora a maioria dos citranges tenha *P. trifoliata* como parental masculino, alguns têm essa espécie como parental feminino (ORTIZ MARCIDE, 1986). 'Troyer' é amplamente utilizado na Califórnia e na Espanha, enquanto que 'Carrizo' tem sido muito usado na Flórida, onde a alta incidência de *blight* tem aumentado o interesse por porta-enxertos tolerantes (CASTLE; GMITTER JUNIOR, 1999).

Segundo Castle et al. (1993), esses dois híbridos são indistinguíveis e de interesse considerável como porta-enxertos, em virtude de sua tolerância à tristeza e à podridão-do-pé. Na Bahia, foram constatadas caneluras fortes restritas ao porta-enxerto, sob copa de laranjeira 'Pera', em 15 plantas de 'Carrizo' e em apenas uma de 'Troyer', em um ensaio experimental (CUNHA SOBRINHO et al., 1980; PASSOS et al., 1976a). Davies e Albrigo (1999) consideram 'Troyer' e 'Carrizo' plantas muito semelhantes, ressaltando diferenças em algumas características agrônômicas, como a maior tolerância do 'Carrizo' ao nematoide-cavernícola. Agustí (2000) e Amorós (1999) apontaram diferenças como a menor sensibilidade à salinidade, maior produtividade e melhor qualidade dos frutos de combinações com o citrange 'Carrizo', embora este último autor considere que ambos produzam excelentes colheitas, de ótima qualidade. Os frutos produzidos têm tamanho médio a grande, e a qualidade do suco está entre as melhores.



Fotos: Nilton Fritzon Sanches

**Figura 12.** Frutos e sementes (A) e folhas (B) do citrange (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*) 'Troyer'. Banco ativo de germoplasma de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.

As plantas sobre citrange são moderadamente vigorosas a vigorosas, em certa medida similares àquelas sobre laranjeira 'Azeda' e geralmente menores que sobre porta-enxertos vigorosos, como o limoeiro 'Rugoso'. Segundo Castle e Gmitter Junior (1999), plantas jovens sobre 'Carrizo' têm bom crescimento e boa produção de frutos; na Flórida, plantas sobre esse citrange mostram-se vigorosas e atingem um bom tamanho, comparável ao de plantas sobre o limoeiro 'Rugoso' e a tangerineira 'Cleópatra', desenvolvendo-se muito bem em diversos tipos de solos, exceto naqueles com níveis altos de cálcio trocável. Como o *P. trifoliata*, um de seus parentais, não se adapta a solos altamente calcários e não tolera bem os solos salinos, que devem ser evitados (CASTLE et al., 1993). Na Espanha, o citrange 'Troyer' exige solos profundos, com menos de 30% de carbonatos; tem elevada resistência ao frio, maior que a da laranjeira 'Azeda', porém menor que a de *P. trifoliata* (AMORÓS, 1999). Young (1979) considerou a resistência a geadas de plantas sobre citrange 'Carrizo' menor que sobre laranjeira 'Azeda', tangerineira 'Cleópatra' e citrumelo 'Swingle', porém maior que a daquelas sobre porta-enxertos tipo limoeiro.

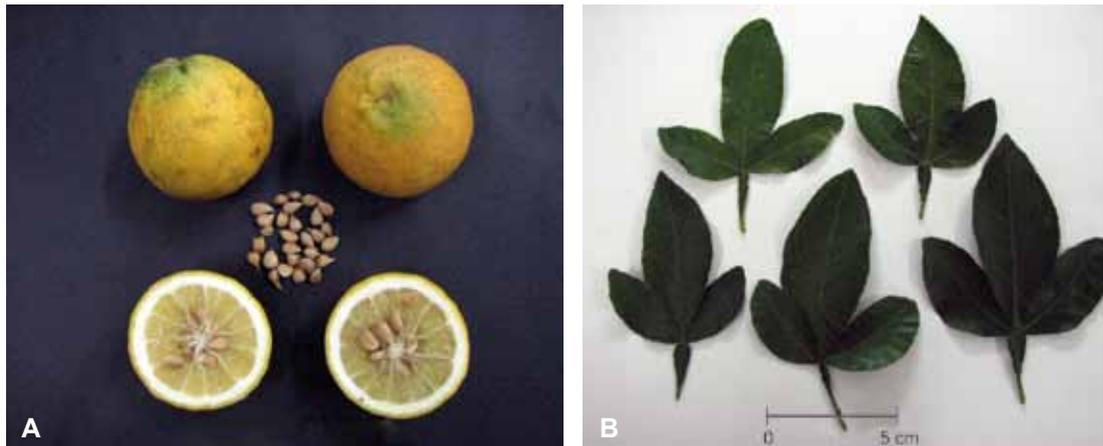
Os citranges são compatíveis com todas as variedades de laranjeira doce, tangerineira e pomeleiro cultivadas na Espanha, apresentando incompatibilidade apenas com limoeiros verdadeiros, especialmente o 'Eureka' (AGUSTÍ, 2000). Cunha Sobrinho et al. (1980) e Passos et al. (1976a) relataram a ocorrência de sintomas de incompatibilidade em plantas de laranjeira 'Pera' sobre 'Troyer'. Castle et al. (1993) consideram o citrange 'Carrizo' excelente porta-enxerto de laranjeiras doces, pomeleiros e alguns híbridos de tangerineira, manifestando algum declínio acompanhado de *bud union crease* em combinação com algumas tangerineiras e híbridos destas. Os citranges, assim como o trifoliata e citrumelo, apresentam diâmetro do porta-enxerto maior que o do tronco das variedades neles enxertadas.

De maneira geral, os citranges são tolerantes ao nematoide-dos-citros, a fungos do gênero *Phytophthora* e aos vírus transmissíveis por enxertia, mas sensíveis ao viroide-da-exocorte. São suscetíveis ao declínio, e não há informação sobre seu desempenho em relação à morte-súbita-dos-citros.

## Citrumelo 'Swingle'

Os citrumelos são híbridos entre pomeleiros e trifoliatas, e dentre eles o mais conhecido e mais usado comercialmente é o 'Swingle' (Figura 13), híbrido entre pomeleiro 'Duncan', como parental feminino, e *P. trifoliata*. O citrumelo 'Swingle' expandiu-se bastante pelo mundo citrícola desde sua liberação, em 1974, por algumas características muito interessantes. No Brasil, tem sido bastante empregado no Estado de São Paulo, notadamente em áreas sujeitas à morte-súbita-dos-citros, podendo-se dizer, conforme Pompeu Junior (1991), que induz boa produtividade de frutos às principais cultivares, que é tolerante ao declínio e incompatível com o limoeiro 'Siciliano' e com a laranjeira 'Pera'.

Resultados de ensaios estudando porta-enxertos, instalados em dois locais do Estado de São Paulo, com copa de limeira ácida 'Tahiti', destacaram o citrumelo 'Swingle' como o melhor



Fotos: Nilton Fritzons Sanches

**Figura 13.** Frutos e sementes (A) e folhas (B) do citrumelo [*Citrus paradisi* Macfad. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] Swingle. Banco ativo de germoplasma de citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.

porta-enxerto para essa cultivar, sugerindo seu grande potencial de uso nesse estado (FIGUEIREDO; STUCHI, 2003). Atualmente, segundo mencionado, sua procura tem aumentado consideravelmente, em virtude da ocorrência do mal conhecido como morte-súbita-dos-citros, que, aparentemente, esse porta-enxerto tolera. Na Flórida, vinha dominando o plantio por volta da década de 1990, em razão da sua tolerância ao frio, ao nematoide-dos-citros, a espécies de *Phytophthora*, ao vírus-da-tristeza, aos viroides da exocorte e da xiloporose, além de apresentar baixos níveis de incidência de *blight* (CASTLE; GMITTER JUNIOR, 1999).

Segundo Davies e Albrigo (1999), é contraditória a informação a respeito do vigor proporcionado por esse porta-enxerto, que tem, segundo Wutscher e Shull (1975), efeito semiananizante sobre as plantas de laranjeiras doces, enquanto os pomeleiros sobre ele são bastante vigorosos. De acordo com os primeiros autores, o citrumelo ‘Swingle’ imprime maior vigor que as tangerineiras e laranjeira ‘Azeda’, diferenças que podem ser atribuídas à presença ou ausência de vírus, apesar de o ‘Swingle’ ser tolerante ao vírus-da-tristeza e aos viroides da exocorte e xiloporose.

A escolha do local de plantio é muito importante, e o solo é particularmente crítico, porque nos solos arenosos o sistema radicular do ‘Swingle’ não se expande, e as raízes fibrosas não são tão densas quanto no citrange ‘Carrizo’ ou no limoeiro ‘Rugoso’; e, assim, as plantas requerem manejo cuidadoso a fim de se evitar estresse hídrico e nutricional (CASTLE; GMITTER JUNIOR, 1999).

O citrumelo ‘Swingle’ adapta-se a diferentes tipos de solo, exceto argilas pesadas e condições altamente calcárias, bem como a solos com pH alto ou drenagem deficiente e tem tolerância moderada à salinidade e à seca (AGUSTÍ, 2000; CASTLE et al. 1993; WUTSCHER, 1979). Castle e Gmitter Junior (1999) afirmaram que, em locais adequados, esse porta-enxerto é excelente para pomeleiros – as plantas são vigorosas, com boa produtividade, e os frutos produzidos são grandes e de excelente qualidade.

Em complemento às informações expostas, na Tabela 2 são apresentadas algumas características de diferentes porta-enxertos, com referência a sementes e frutos. As Figuras 4 a 9 mostram fotos de cultivares porta-enxerto descritas neste capítulo.

**Tabela 2.** Número de sementes por fruto, porcentagem de germinação (40 dias após a semeadura, em Cruz das Almas, Bahia), porcentagem de poliembrião e época de maturação de frutos de diferentes porta-enxertos, colhidos em Cruz das Almas, Bahia, e em Cordeirópolis, SP.

Porta-enxerto <sup>(1)</sup>	Semente por fruto <sup>(2)</sup>	Germinação <sup>(2)</sup> (%)	Poliembrião (%)	Maturação do fruto
LCRC	14	72	43	Mar. a Jun.
LCRSTC	17	-	60	Mar. a Jun.
LRF	26	71	96	Mar. a Jun.
LRN	21	87	-	Mar. a Jun.
LVK	13	-	53	Abr. a Maio
LCA	14	20	-	Maio a Ago.
LAZ	25	-	-	Maio a Ago.
CLEO	18	22	98	Abr. a Maio
TSKC	6	70	17	Abr. a Maio
TSKTR	18	-	98	Maio a Jul.
TSKMA	8	-	100	Mar. a Maio
TR	31	0	10	Fev. a Maio
CTTR	17	37	67	Abr. a Maio
CTCZ	6	12	68	Abr. a Maio
CTSW	27	30	65	Abr. a Maio

<sup>(1)</sup> LCRC: limoeiro 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck) comum; LCRSTC: limoeiro 'Cravo Santa Cruz'; LRF: limoeiro 'Rugoso' (*C. jambhiri* Lush.) 'da Flórida'; LRN: limoeiro 'Rugoso Nacional'; LVK: limoeiro 'Volkameriano' (*C. volkameriana* V. Ten. & Pasq.); LCA: laranja 'Caipira' [*C. sinensis* (L.) Osbeck]; LAZ: laranja 'Azeda' (*C. aurantium* L.); CLEO: tangerineira 'Cleópatra' (*C. reshni* hort. ex Tanaka); TSKC: tangerineira 'Sunki' [*C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka] comum; TSKTR: tangerineira 'Sunki Tropical'; TSKMA: tangerineira 'Sunki Maravilha'; TR: *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.; CTTR: citrange (*C. sinensis* x *P. trifoliata*) 'Troyer'; CTCZ: citrange 'Carrizo'; CTSW: citrumelo (*C. paradisi* Macfad. x *P. trifoliata*) 'Swingle'.

<sup>(2)</sup> Médias de 2 anos de observação.

Fonte: Passos et al. (1977), Passos et al. (2005), Pompeu Júnior (2005); Soares Filho et al. (1999, 2002, 2003, 2004, 2009).

## Outros porta-enxertos

Numerosos porta-enxertos, pouco conhecidos, podem ser citados, porém de emprego restrito a determinados países ou regiões, segundo situações particulares e tradições de uso; outros, ainda, são utilizados em caráter experimental, em pequenos pomares e até como suporte de plantas ornamentais. Dentre esses, estão incluídos tangerineiras, seleções e híbridos de *P. trifoliata*, pomeleiros, toranjeiras e outros. A um número expressivo de híbridos provenientes de polinização con-

trolada, somam-se atualmente híbridos somáticos, obtidos pela fusão de protoplastos, e também porta-enxertos modificados geneticamente, especialmente em países de citricultura mais avançada.

Castle et al. (1993) relacionaram diversos porta-enxertos recomendáveis para testes em pequenos pomares experimentais, contemplando tangerineiras, seleções e híbridos de trifoliata e outros, como: 'Nasnanan' [*C. amblycarpa* (Hassk.) Ochse], 'Sun Chu Sha' e 'Changsha' (*C. reticulata*); seleção 'Flying Dragon' de trifoliata; alguns citranges, como 'Benton', 'C-32', 'C-35', 'Morton' e 'Norton'; citrumelos da série F80; os híbridos limeira 'Rangpur' x citrange 'Troyer' e tangerineira 'Changsha' x trifoliata 'English Large'; os prováveis híbridos de laranjeira 'Azeda', 'Gou Tou Chen' e 'Smooth Flat Seville'; tangelo 'Orlando' e tangor 'Murcott'.

Pompeu Junior (2005) fez referência a diferentes porta-enxertos de pouca expressão, utilizados em alguns países segundo condições e tradições locais, citando entre esses: 'Yuzu' (*C. junos* Siebold ex Tanaka), empregado no Japão, 'Shekwasha' (*C. depressa* Hayata; *C. pectinifera* Tanaka) e 'Gajanima' [*C. pennivesiculata* (Lush.) Tanaka]. Este autor lembra, ainda, trabalhos de avaliação de outras espécies e gêneros, além do *Citrus*, como porta-enxertos: *Clymenia* (Swingle), *Citropsis* [(Engl.) Swingle & M. Kellerm.], *Hesperethusa* (M. Roem.), *Swinglea* (Merr.), *Fortunella* (Swingle), *Eremocitrus* (Swingle) e *Microcitrus* (Swingle), cujos resultados foram sempre negativos, especialmente em decorrência de sua suscetibilidade à tristeza e incompatibilidade com as principais cultivares copa.

Diversos outros autores, em diferentes países, reportam-se a programas de melhoramento genético tradicionais, visando à produção de híbridos mediante polinização controlada (FOGUET; BLANCO, 2002; FORNER; FORNER-GINER, 2002; MUIÑOS; SÁNCHEZ, 2002; POMPEU JUNIOR, 2005; SOARES FILHO et al., 2002). Outros pesquisadores comentam programas que empregam modernas técnicas de biotecnologia, com o objetivo de obter porta-enxertos híbridos pela fusão de protoplastos ou cultivares modificadas geneticamente (GROSSER et al., 2000; GROSSER; CHANDLER, 2002; MACHADO et al., 2005; MOURÃO FILHO; MENDES, 2002).

Oliveira et al. (2008) relacionaram várias seleções de porta-enxertos portadoras de características distintas, capazes de atender a diferentes condições de cultivo. Além das cultivares de uso tradicional no Brasil, por demais conhecidas de citricultores e viveiristas, diversas seleções são indicadas a seguir: do limoeiro 'Cravo' – 'D.22-30', 'EEL', 'Limeira', 'Santa Bárbara', 'Santa Cruz', 'Taquaritinga' e 'Taquari'; do limoeiro rugoso – 'Rugoso da Flórida', 'da Flórida FM', 'Rugoso Nacional', 'Mazoe' ('da África'), 'Limoneira', 'CR-67', 'Estes' e 'Milan'; do limoeiro 'Volkameriano' – 'Palermo', 'Acireale', 'Catânia 1', 'Catânia 2' e 'Citrolima'; da tangerineira 'Sunki' – 'Sunki' comum, 'Sunki de Tietê', 'Sunki Maravilha', 'Sunki Tropical'; do citrumelo 'Swingle' – citrumelo '4475'; do citrange 'Carrizo' a seleção 'CZ33'; do trifoliata, as seleções 'Flying Dragon', 'Davis A', 'Limeira', 'Rubidoux', 'Pomeroy', 'Argentina', 'Tucuman', 'Rich 12.2', 'Rich 21.3' e 'Rich 22.2', CT4, CT32, CT33, CT34, CT35, 'Kryder 8.5', 'Jacobsen', 'Barnes', 'Towne', 'English Large' e 'English Small'. Os referidos autores enumeraram ainda outros porta-enxertos de possível uso no País: tangerineiras 'Oneco' e 'Sun Chu Sha'; citranges 'C 32', 'C 35' e 'Benton'; citrandarin 'X-639' (tangerineira 'Cleópatra' x *P. trifoliata*) e *C. macrophylla*.

## Melhoramento genético de porta-enxertos

Espécies do gênero *Citrus* e de gêneros afins cruzam-se com relativa facilidade, sendo os híbridos obtidos em geral férteis, especialmente quando as espécies parentais são próximas entre si relativamente à sua filogenia. Apesar disso, poucas instituições têm se dedicado ao melhoramento genético dos citros face aos fatores biológicos e genéticos que dificultam a obtenção de híbridos (OLIVEIRA et al., 2008; SOARES FILHO et al., 2003).

Os trabalhos de melhoramento genético têm visado especialmente à obtenção de porta-enxertos tolerantes ao vírus-da-tristeza-dos-citros, à podridão causada por *Phytophthora* spp., ao frio, a declínios, a nematoides, que sejam indutores de nanismo, de alta produtividade de frutos de boa qualidade, tolerantes à salinidade e à alcalinidade. No Brasil, além desses objetivos, busca-se a tolerância à morte-súbita-dos citros (MSC), e o Programa de Melhoramento Genético de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura contempla ainda a tolerância à seca e ao alumínio, além do desenvolvimento de porta-enxertos adaptados ao convívio com o HLB (ex-greening).

Os primeiros programas de melhoramento genético dos citros foram conduzidos nos Estados Unidos da América e na França, no século 19, e visavam ao controle de doenças e à tolerância ao frio. Na França, foram obtidos alguns citranges tolerantes ao frio; e, nos trabalhos pioneiros nos Estados Unidos da América, foram criados, dentre outros, os citranges 'Troyer' e 'Carrizo' e o citrume-lo 'Swingle', três dos porta-enxertos mais importantes na citricultura mundial (HUTCHINSON, 1974; MOREIRA; PIO, 1991; OLIVEIRA et al., 2008). A obtenção de híbridos tendo o *P. trifoliata* como um dos parentais baseia-se especialmente em suas características de tolerância/resistência à tristeza e podridão causada por *Phytophthora*, formação de plantas de menor porte e produção de frutos de alta qualidade.

No Brasil, há relativamente pouco tempo, vêm sendo desenvolvidos programas de melhoramento genético utilizando hibridações controladas nas seguintes instituições: Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas, Bahia; Instituto Agrônomo, Campinas, São Paulo; Centro Apta Citros 'Sylvio Moreira', Cordeirópolis, São Paulo; Centro de Energia Nuclear na Agricultura (Cena) e Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Esalq/USP), em Piracicaba, São Paulo; Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (Fepagro) e Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em Taquari e Porto Alegre, RS, respectivamente (OLIVEIRA et al., 2008; POMPEU JUNIOR, 2005).

Provavelmente, os primeiros porta-enxertos híbridos produzidos no Brasil foram obtidos pelo engenheiro-agrônomo Carlos Modesto Motta Dornelles, na década de 1950, na então Estação Experimental Fitotécnica de Taquari (EEFT), no Rio Grande do Sul.

A partir da década de 1950, começaram a ser implantados diversos trabalhos de pesquisa na EEFT, citada acima, quando foram obtidos vários híbridos promissores de *Poncirus trifoliata* x laranjeiras doces *C. sinensis*, chamados de citrangeiros, dentre os quais se destacaram os híbridos 'C-13', 'C-20', 'C-37' e 'C-41' (PORTO et al., 1995 citados por OLIVEIRA et al., 2008).

A Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas, Bahia, iniciou seu programa de melhoramento genético dos citros em 1988, visando à criação de novas variedades melhor adaptadas aos trópicos, especialmente porta-enxertos resistentes/tolerantes à tristeza-dos-citros, podridão-de-*Phytophthora*, seca, salinidade e ao alumínio, além de adaptados a altas densidades de plantio. Como primeiros resultados desse programa, foram obtidos e liberados o limoeiro 'Cravo Santa Cruz' e as tangerineiras 'Sunki Maravilha' e 'Sunki Tropical' (SOARES FILHO et al., 1999, 2003, 2004). Além desses porta-enxertos, cerca de duas centenas de novos híbridos estão sendo avaliados em diferentes ecossistemas do País, do extremo Norte ao extremo Sul.

Soares Filho et al. (2002) comentaram avaliações feitas no campo, contemplando mais de 400 *seedlings* híbridos obtidos de polinização controlada, que permitiram a identificação, naquela ocasião, de 60 indivíduos que se destacaram pelo vigor, desempenho fitossanitário e por menor sensibilidade ao estresse hídrico. Nesse grupo, 19 híbridos mostraram-se promissores em razão da taxa de poliembrião e número de sementes julgados adequados, tendo em vista sua utilização como porta-enxertos. Esses 19 indivíduos são resultantes de cruzamentos dos limoeiros 'Cravo', 'Volkameriano', *P. trifoliata*, tangerineira 'Sunki' e citrangeres 'Troyer' e 'Yuma'. No Instituto Agrônomo, Campinas, foram criados híbridos entre o limoeiro 'Cravo', laranja 'Azeda', tangerineira 'Sunki' e trifoliata. Um bom número desses apresentou tolerância à tristeza, e vários outros determinaram maior produção de frutos às copas neles enxertadas, em relação à tangerineira 'Sunki' e ao limoeiro 'Cravo' (BORDIGNON et al., 2003 citados por POMPEU JUNIOR, 2005).

Forner e Forner-Giner (2002) relataram trabalhos de melhoramento genético convencional desenvolvidos no Instituto Valenciano de Investigaciones Agrárias (Ivia), em Valência, Espanha, a partir dos quais foram obtidos mais de 500 híbridos, e, desses, quatro foram liberados para os viveiros espanhóis. Dos quatro, dois são do cruzamento de tangerineira 'Cleópatra' x *P. trifoliata*, um de citrange 'Troyer' x tangerineira 'Mexerica' e outro de tangerineira 'King' x *P. trifoliata*, batizados com o nome de Forner-Alcaide, seguido de um número.

Técnicas modernas têm permitido a utilização da hibridação somática por fusão de protoplastos, desenvolvida em alguns países citrícolas, inclusive no Brasil. Na Embrapa Mandioca e Fruticultura, além dos híbridos obtidos por polinização controlada, a hibridação somática prevê a criação de porta-enxertos oriundos de cultivares portadoras de características de interesse agrônomo, dentre as quais se incluem os limoeiros 'Cravo', clones Comum e 'Santa Cruz', 'Volkameriano Catânia 2' e 'Rugoso Mazoe'; laranjeiras 'Azeda', clones comum, Jacarandá, 'Narrow Leaf' e 'Hamlin', clones CNPMF 04 e CNPMF 20; tangerineiras 'Sunki', clones 'Maravilha', 'Tropical' e comum, e 'Cleópatra'; *C. macrophylla*; *C. ichangensis*; *P. trifoliata*; citrangeres 'C-35', 'Troyer' e 'Carrizo'; citrumelo 'Swingle'; *Eremocitrus*, *Fortunella* e *Microcitrus*. Diversos híbridos obtidos pelo Programa de Melhoramento Genético de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura também estão incluídos no trabalho, envolvendo os limoeiros 'Cravo', *P. trifoliata* e híbridos e tangerineira 'Sunki' (SOARES FILHO et al., 2003).

No Centro de Energia Nuclear na Agricultura foram produzidos, por fusão de protoplastos, híbridos de tangerineira 'Cleópatra' com limoeiro 'Cravo' ou com laranja 'Caipira' (LATADO et al., 2002).

Mourão Filho e Mendes (2002) fizeram referência à obtenção de híbridos somáticos na Esalq/USP, cujos parentais foram os limoeiros 'Cravo', 'Volkameriano' e 'Rugoso', laranjeiras doces e 'Azeda', tangerineiras 'Cleópatra' e 'Sunki' e o *kumquat* 'Changshou' (*Fortunella* × *obovata* hort ex Tanaka), visando principalmente à tolerância ao declínio e à morte-súbita-dos-citros. Os referidos autores mencionaram a futura produção de híbridos dessa natureza, cujos parentais seriam tangerineiras da espécie *C. reticulata* e toranjeiras.

O melhoramento genético pela obtenção de plantas transgênicas ou plantas modificadas geneticamente vem sendo realizado em diversos países. Esse método oferece vantagens sobre os métodos convencionais de melhoramento genético. Machado et al. (2005) e Oliveira et al. (2008) fazem referência a trabalhos direcionados à resistência ao vírus-da-tristeza-dos-citros e a seu vetor; resistência a fungos e a bactérias; tolerância a solos salinos, dentre outros fatores.

Espera-se que as modernas técnicas de biotecnologia, como a fusão de protoplastos e a transgenia, capazes de contornar as dificuldades do melhoramento genético tradicional, possam proporcionar a obtenção de porta-enxertos aptos a superar os obstáculos que se têm manifestado ao longo dos tempos, vários e de natureza diversa e que, provavelmente, continuarão surgindo.

## Referências

- AGUSTÍ, M. **Citricultura**. Madrid, ES: Ediciones Mundi-Prensa, 2000. 416 p.
- ALMEIDA, C. O. Agronegócio citrícola no Brasil. **Bahia Agrícola**, Salvador, v. 6, n. 3, p. 23-33, 2004.
- AMARO, A. A.; BAPTISTELLA, S. da S. L. **Viveiros de citros**: uma visão econômica. Disponível em: <[http://www.fundecitrus.com.br/ImageBank/FCKEditor/file/pdf/artigo\\_viveiros.pdf](http://www.fundecitrus.com.br/ImageBank/FCKEditor/file/pdf/artigo_viveiros.pdf)>. Acesso em: 29 nov. 2010.
- AMORÓS, M. **Producción de agrios**. 2. ed. Madrid, ES: Ediciones Mundi-Prensa, 1999. 318 p.
- BERETTA, M. J. G.; ROSSETTI, V. Declínio dos citros - uma doença transmissível. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS: PORTA-ENXERTOS, 1., 1990, Bebedouro. **Anais...** Jaboticabal: FUNEP, 1990. p. 211-221.
- BERETTA, M. J. G.; ROSSETTI, V.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; POMPEU JUNIOR, J.; FOGAÇA, M.; JACON, J. R. Incidência do declínio de plantas cítricas em diversos porta-enxertos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 8., 1986, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1986. v. 1, p. 237-241.
- BITTERS, W. P. Physical characters and chemical composition as affected by scions and rootstocks. In: SINCLAIR, W. B. (Ed.). **The orange**: its biochemistry and physiology. California: University of California, 1961. p. 56-95.
- CARDOSO, E. J. B. N.; ANTUNES, V.; SILVEIRA, A. P. D. da; OLIVEIRA, M. H. A. de. Influência de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em porta-enxertos de citros. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 10, n. 1, p. 25-30, 1986.
- CARLOS, E. F.; STUCHI, E. S.; DONADIO, L. C. **Porta-enxertos para a citricultura paulista**. Jaboticabal: FUNEP, 1997. 47 p. (Boletim Citrícola, 1).
- CASSIN, P. J. Comportement des variétés d'agrumes dans les différentes régions de production. **Fruits d'Outre-mer**, Paris, FR, v. 39, n. 4, p. 263-276, 1984.
- CASTLE, W. S.; GMITTER JUNIOR, F. G. Rootstock and scion selection. In: TIMMER, L. W.; DUNCAN, L. W. (Ed.). **Citrus health management**. Lake Alfred: University of Florida, 1999. p. 21-34.

CASTLE, W.; TUCKER, D. P. H.; KREZDORN, A. H.; YOUTSEY, C. O. **Rootstocks for Florida citrus**. 2. ed. Gainesville: University of Florida, 1993. 91 p.

CHIACCHIO, F. P. B. **Produção de esporângios em *Phytophthora parasitica* Dastur e *P. citrophthora* (Sm. & Sm.) Leonian, e influência da copa e do vigor das plantas sobre o comportamento do porta-enxerto em relação a esses patógenos**. 1978. 58 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia)–Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

CINTRA, F. L. D.; LIBARDI, P. L.; JORGE, L. A. de C. Distribuição do sistema radicular de porta-enxertos de citros em ecossistema de Tabuleiro Costeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 21, n. 3, p. 313-317, 1999.

CINTRA, F. L. D.; LIBARDI, P. L.; SAAD, A. M. Balanço hídrico no solo para porta-enxertos de citros em ecossistema de Tabuleiro Costeiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 23-28, 2000.

CUNHA SOBRINHO, A. P. da. **Comportamento de porta-enxertos cítricos sob as condições tropicais do Recôncavo Baiano**. 1992. 89 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)–Escola de Agronomia, Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas.

CUNHA SOBRINHO, A. P. da; PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. dos S. Diversificação de porta-enxertos na citricultura do Nordeste. In: SEMINÁRIO DE TECNOLOGIA AGROPECUÁRIA INOVADORA PARA O NORDESTE, 1986, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: BNB-ETENE, 1986. p. 228-234.

CUNHA SOBRINHO, A. P. da; SOARES FILHO, W. dos S.; PASSOS, O. S. Porta-enxertos para laranja ‘Pera’ (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) na região de Cruz das Almas, Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 2, n. 3, p. 21-32, 1980.

DAVIES, F. S.; ALBRIGO, L. G. **Cítricos**. Zaragoza: Acribias, 1999. 283 p.

DIAMANTINO, M. S. A. S. **Reação de porta-enxertos híbridos ao vírus da tristeza dos citros**. 2001. 87 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas.

DORNELLES, C. M. M. **Introdução à citricultura**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1988. 96 p. (Mundo Rural, 2).

DUNCAN, L. W. Nematode diseases of citrus. In: TIMMER, I. W.; DUNCAN, L. W. (Ed.). **Citrus health management**. Lake Alfred: University of Florida, 1999. p. 136-148.

EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agroflorestal do Acre. **Relatório final**. Brasília, DF, 1998a. (Embrapa Programa 17 - Frutas Subprojeto 17.094.037.04).

EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Ocidental. **Relatório final**. Brasília, DF, 1998b. (Embrapa Programa 17 - Frutas Subprojeto 17.094.037.03).

EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental. **Relatório final**. Brasília, DF, 1998c. (Embrapa Programa 17 - Frutas Subprojeto 17.094.037.12).

EMBRAPA. Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos (Rio de Janeiro). **Levantamento detalhado dos solos do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA**. Rio de Janeiro, 1991. 129 p. (EMBRAPA-SNLCS. Boletim de Pesquisa, 42).

EMBRAPA. Unidade de Execução de Pesquisa de Âmbito Estadual de Rio Branco (AC). **Boletim Agrometeorológico 1988 e 1989**. Rio Branco: EMBRAPA-UEPAE Rio Branco, 1990. 66 p. (EMBRAPA-UEPAE Rio Branco. Boletim Agrometeorológico, 4).

FEICHTENBERGER, E. Gomose de *Phytophthora* dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 1, n. 11, p. 97-122, 1990.

FERNÁNDEZ VALIELA, M. V.; FORTUGNO, C.; CORIZZI, F. Incidence of bud-union crease in citrus trees grafted on trifoliata rootstock in the Delta del Paraná and San Pedro areas of Argentina. In: CONFERENCE OF INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 3., 1963, Campinas. **Proceedings...** Gainesville: University of Florida Press, 1965. p. 182-186.

FIGUEIREDO, J. O.; STUCHI, E. S. Copas e porta-enxertos. In: MATTOS JUNIOR, D. de; DE NEGRI, J. D.; FIGUEIREDO, J. (Ed.). **Lima ácida Tahiti**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2003. p. 32-46.

FINARDI, N. L. Método de propagação e descrição de porta-enxertos. In: MEDEIROS, C. A.; RASEIRA, M. do C. B. (Ed.). **A cultura do pessegueiro**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI; Pelotas: EMBRAPA-CPACT, 1998. p. 100-129.

FOGUET, J. L.; BLANCO, A. S. Melhoramento de porta-enxertos na Argentina: seleção de novos híbridos de *Poncirus trifoliata* como porta-enxertos para limão Lisboa Limoneira 8-A. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS: MELHORAMENTO, 7., 2002, Bebedouro. **Anais...** Bebedouro: Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro, 2002. p. 109-113.

- FORNER, J. B.; FORNER-GINER, M. A. Programa de melhoramento de porta-enxertos cítricos na Espanha. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS: MELHORAMENTO, 7., 2002, Bebedouro. **Anais...** Bebedouro: Estação Experimental de Bebedouro, 2002. p. 82-95.
- GARDNER, F. E. A study of rootstock influence on citrus quality by fruit grafting. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1968, Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1969. v. 1, p. 359-364.
- GERDEMANN, J. W. Vesicular-arbuscular mycorrhizae. In: TORREY, J. G.; CLARKSON, T. (Ed.). **The development and functions of roots**. London, GB: Academic Press, 1975. p. 575- 591.
- GMITTER JUNIOR, F. G.; HU, X. The possible role of Yunnan, China, in the origin of contemporary *Citrus* species (Rutaceae). **Economy Botany**, New York, v. 44, n. 2, p. 267-277, 1990.
- GONZÁLEZ-SICILIA, E. **El cultivo de los agrios**. 3. ed. Valencia: Editorial Bello, 1960. 814 p.
- GROSSER, J. W.; CHANDLER, J. L. Hibridação somática no melhoramento de porta-enxertos para citros. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS: MELHORAMENTO, 7., 2002, Bebedouro. **Anais...** Bebedouro: Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro, 2002. p. 141-147.
- GROSSER, J. W.; OLLITRAULT, P.; OLIVARES-FUSTER, O. Somatic hybridization in citrus: an effective tool to facilitate variety improvement. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 36, p. 434-449, 2000.
- HODGSON, R. W. Horticultural varieties of citrus. In: REUTHER, W.; WEBBER, H. J.; BATCHELOR, L. D. (Ed.). **The citrus industry**. Riverside: University of Califórnia, 1967. v. 1, p. 431-591.
- HUTCHINSON, D. J. Swingle citrumello: a promising rootstock hybrid. **Proceedings of the Florida State for Horticultural Society**, Tallahassee, v. 87, p. 89-91, 1974.
- JONES, W. W. Environmental and cultural factors influencing the chemical composition and physical characters. In: SINCLAIR, W. B. **The orange: its biochemistry and physiology**. California: University of California, 1961. p. 25-55.
- KEFFORD, J. F.; CHANDLER, B. V. General composition of citrus fruits. In: CHICHESTER, C. O.; MRAK, E. M.; STEWART, G. F. (Ed.). **The chemical constituents of citrus fruits**. New York: Academic Press, 1970. p. 5-22.
- LATADO, R. R.; DERBYSHIRE, M. T. V. de C.; TSAI, S. M.; TULMANN NETO, A. Obtenção de híbridos somáticos de limão 'Cravo' e tangerina 'Cleópatra'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, n. 12, p. 1735-1741, 2002.
- LEDO, A. da S.; LEDO, A. F. J. S.; RITZINGER, R.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da. Porta-enxertos para laranjeiras doces (*Citrus sinensis* (L.) em Rio Branco, Acre. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 34, n. 7, p. 1211-1216, 1999.
- MACHADO, M. A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A. M.; OLIVEIRA, A. C. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônomo: FUNDAG, 2005. p. 223-277.
- MADEMBA-SY, F.; LEBEGIN, S.; LEMERRE-DESPREZ, Z. Use of the *Poncirus trifoliata* Flying Dragon as dwarfing rootstock for citrus under tropical climatic conditions. **Fruits**, Montpellier, v. 54, n. 5, p. 299-310, 1999.
- MENGE, J. A.; LEMBRIGHT, H.; JONHSON, E. L. V. Utilization of mycorrhizal fungi in citrus nurseries. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 3., 1977, Orlando. **Proceedings...** Orlando: International Society of Citriculture, 1979a. v. 1, p. 129-131.
- MENGE, J. A.; NEMEC, S.; DAVIS, R. M.; MINASSIAN, V. Micorrhizal fungi associated with citrus and their possible interactions with pathogens. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 3., 1977, Orlando. **Proceedings...** Orlando: International Citrus Society, 1979b. p. 872-876.
- MIYAKAWA, T.; MATSUI, C. A bud-union abnormality of Satsuma mandarin on *Poncirus trifoliata* rootstock in Japan. In: CONFERENCE OF INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 7., 1976, Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1976. p. 125-131.
- MOREIRA, C. S.; MOREIRA, S. História da citricultura no Brasil. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A. A. (Ed.). **Citricultura brasileira**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. p. 1-21.
- MOREIRA, C. S.; PIO, R. M. Melhoramento de citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A. A. **Citricultura brasileira**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. p. 116-152.
- MOREIRA, S. Cachexia and xiloporosis: are they caused by the same virus? In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRUS VIROLOGISTS, 3., 1963, Campinas. **Proceedings...** Gainesville: University of Florida Press, 1965. p. 56-60.
- MOREIRA, S.; SALIBE, A. A.; RODRIGUEZ, O.; NERY, J. P.; ABRAMIDES, E. Influência da localidade e do porta-enxerto sobre as características da laranja baianinha. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 188-189, 1965.

- MOURÃO FILHO, F. A. A.; MENDES, B. M. J. Hibridação somática para melhoramento de citros em São Paulo. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS: MELHORAMENTO, 7., 2002, Bebedouro. **Anais...** Bebedouro: Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro, 2002. p. 134-140.
- MUIÑOS, L. B.; SÁNCHEZ, G. S. Novos híbridos cítricos em Cuba. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS: MELHORAMENTO, 7., 2002, Bebedouro. **Anais...** Bebedouro: Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro, 2002. p. 156-163.
- NAUER, E. M.; GOODALE, J. H.; SUMMERS, L. L. Climate effects on mandarin and Valencias. **California Citrograph**, Los Angeles, v. 59, n. 3, p. 81-86, 1974.
- NEMEC, S. Responses of six rootstocks to three species of *Glomus*, a mycorrhizal fungus. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Gainesville, v. 91, p. 10-14, 1978.
- OLIVEIRA, A. A. R.; JESUS, I. S. de. Efeito de infecção por fungos micorrízicos vesicular-arbuscular sobre o desenvolvimento de porta-enxertos de citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9., 1984, Campinas. **Anais...** Campinas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1987. v. 1, p. 319-325.
- OLIVEIRA, A. A. R.; SOARES FILHO, W. dos S. Reação de híbridos à infecção natural por gomose de *Phytophthora*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, n. 3, p. 367-371, 2000.
- OLIVEIRA, R. P. de; SOARES FILHO, W. dos S.; PASSOS, O. S.; SCIVITTARO, W. B.; ROCHA, P. S. G. da. **Porta-enxertos para citros**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008. 45 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 226).
- ORTIZ MARCIDE, J. M. Nomenclatura botánica de los cítricos. **Fruits**, Montpellier, v. 41, n. 3, p. 199-209, 1986.
- ORTIZ MARCIDE, J. M. Porta-enxertos para citros na Espanha: presente e tendências futuras. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS: PORTA-ENXERTOS, 1., 1990, Bebedouro. **Anais...** Jaboticabal: FUNEP, 1990. p. 49-77.
- PASSOS, O. S.; COELHO, Y. da S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da. Variedades copa e porta-enxertos de citros. ENCONTRO NACIONAL DE CITRICULTURA, 4, 1977, Aracaju. **Anais...** Aracaju: Superintendência da Agricultura e Produção; Cruz das Almas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1977. p. 21-42.
- PASSOS, O. S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; COELHO, Y. da S. Comportamento de híbridos e seleções de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. e de outros porta-enxertos no Estado da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 3., 1975, Rio de Janeiro. **Anais...** Campinas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1976b. v. 1, p. 77-90.
- PASSOS, O. S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; COELHO, Y. da S. Porta-enxertos para laranja Pera *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 3., 1975, Rio de Janeiro. **Anais...** Campinas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1976a. p. 91-98.
- PASSOS, O. S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; RODRIGUES, E. M. Observações sobre o comportamento de porta-enxertos no Estado da Bahia. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 22., 1970, Salvador. **Resumos...** São Paulo: Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 1970. p. 200.
- PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. dos S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da. **Citrândarin 'Índio'**: nova opção de porta-enxerto para a citricultura brasileira. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011a. 1 folder.
- PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. dos S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da. **Citrândarin 'Riverside'**: nova opção de porta-enxerto para a citricultura brasileira. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011b. 1 folder.
- PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. dos S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da. **Citrândarin 'San Diego'**: nova opção de porta-enxerto para a citricultura brasileira. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011c. 1 folder.
- PASSOS, O. S.; SOUZA, C. A. F. de; SOARES FILHO, W. dos S.; PEIXOUTO, L. S. **Alternativas de porta-enxertos de citros no Nordeste do Brasil**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2005. 1 folder.
- PEIXOUTO, C. A. B.; SOUZA, L. da S.; PASSOS, O. S.; SOUZA, L. D.; ABREU, E. A. S. Distribuição do sistema radicular de diferentes porta-enxertos de citros, sob copa de laranjeira Pera, em argissolo acinzentado de Tabuleiro Costeiro do Estado da Bahia. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE MANEJO E CONSERVAÇÃO DO SOLO E ÁGUA, 16., 2006, Aracaju. **Resumos e palestras...** Aracaju: Universidade Federal de Sergipe: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. 1 CD-ROM.
- POMPEU JUNIOR, J. Os "limões" como porta-enxertos. **Informativo Vivecitros**, Cordeirópolis, v. 1, n. 4, p. 4, 2001.
- POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico: Fundag, 2005. p. 63-93.
- POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A. A. (Ed.). **Citricultura brasileira**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. p. 265-280.

- POMPEU JUNIOR, J. Rootstocks and scions in the citriculture of the Sao Paulo State. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF CITRUS NURSERYMEN, 6., 2001, Ribeirão Preto. **Proceedings...** Ribeirão Preto: International Society of Citrus Nurserymen, 2001. p. 75-82.
- POMPEU JUNIOR, 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.
- POMPEU JUNIOR, J.; BLUMER, S. Laranjeiras e seus porta-enxertos nos viveiros de mudas cítricas do Estado de São Paulo. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 29, n. 1-2, p. 35-50, 2008.
- PORTA-ENXERTO para citros: C 13, C 37 e C 41. Porto Alegre: FEPAGRO, [199?]. 1 folder.
- PRUDENTE, R. M.; SILVA, L. M. S. da; CUNHA SOBRINHO, A. P. da. Produção da laranja 'Pera' sobre dez porta-enxertos em ecossistemas de Tabuleiros Costeiros de Sergipe. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 19., 2006, Cabo Frio. **Frutas do Brasil: saúde para o mundo: palestras e Resumos.** Cabo Frio: SBF: UENF: UFRRJ, 2006. p. 395.
- PRUDENTE, R. M.; SILVA, L. M. S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da. Comportamento da laranja 'Pera' D6 sobre cinco porta-enxertos em ecossistema de tabuleiro costeiro, Umbaúba - SE. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 110-112, 2004.
- REUTHER, W. Temperature effects on citrus fruit growth and development. In: INTERNATIONAL HORTICULTURAL CONGRESS, 18., 1970, Tel Aviv. **Proceedings...** Tel Aviv: International Society of Horticultural Science: Ministry of Agriculture, 1972. v. 4, p. 271-291.
- REZENDE, J. de O.; MAGALHÃES, A. F. de J.; SHIBATA, R. T.; ROCHA, E. S.; FERNANDES, J. C.; BRANDÃO, F. J. C.; REZENDE, V. J. R. P. **Citricultura nos solos coesos dos Tabuleiros Costeiros: análise e sugestões.** Salvador: SEAGRI-SPA, 2002. 97 p. (Série Estudos Agrícolas, 3).
- RITZINGER, C. H. S. P.; DUNCAN, L. W. Nematoides e seu controle. In: MAGALHÃES, A. F. de J. (Ed.). **Cultivo dos citros.** Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2004. p. 153-158.
- ROSSETTI, V. V. **Manual ilustrado de doenças dos citros.** Piracicaba: FEALQ: FUNDECITRUS, 2001. 270 p.
- SALIBE, A. A. Citricultura: problemas importantes em outros países. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A. A. (Ed.). **Citricultura brasileira.** 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. p. 923-941.
- SALIBE, A. A. Studies on bud-union crease of citrus trees. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 3., 1963, Campinas. **Proceedings...** Gainesville: University of Florida Press, 1965. p. 187-191.
- SALIBE, A. A.; MISCHAN, M. M. Efeito do porta-enxerto e da localidade nas características de cinco variedades de laranja doce (*Citrus sinensis* (L) Osbeck). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 4., 1977, Salvador. **Anais...** Cruz das Almas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1978. p. 93-104.
- SALIBE, A. A.; MOREIRA, S. Reaction of types of citrus as scion and as rootstocks to xyloporosis virus. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 3., São Paulo, 1963. **Proceedings...** Riverside: International Organization of Citrus Virologists, 1965. p. 70-75.
- SALIBE, A. A.; ROESSING, C. Limitações no uso de *Poncirus trifoliata* como porta-enxertos para citros. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 230-231, 1963.
- SALVA, R. A. Citrus tree production in Brazil. In: WORLD CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRUS NURSERYMEN, 6., 2001, Ribeirão Preto. **Proceedings...** Ribeirão Preto: International Society of Citrus Nurserymen, 2001. p. 9-13.
- SANTOS FILHO, H. P. Doenças de causas desconhecidas. In: MAGALHÃES, A. F. de J. (Ed.). **Cultivo dos citros.** Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2004. p. 140-147.
- SANTOS FILHO, H. P. dos; CALDAS, R. C.; CHIACCHIO, F. P. B.; SILVA, M. J. Reação de porta-enxertos com copa de laranja 'Pera' a *Phytophthora citrophthora* (Sm. & Sm.) Leonian. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5., 1979, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1979. v. 1, p. 237-245.
- SILVA, L. M. S.; TRINDADE, J.; PASSOS, O. S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; SILVA, J. U. B. Influence of rootstocks upon the growth and yield of Bahia orange (*Citrus sinensis* L.) Osbeck at Brazil Northeast conditions. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 5., 1984, São Paulo. **Proceedings...** Piracicaba: International Society of Citriculture, 1987. v. 1, p. 53-54.
- SOARES FILHO, W. dos S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; PASSOS, O. S. Estudo de cinco porta-enxertos para laranja 'Natal' *Citrus sinensis* (L.) Osbeck na Bahia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 15, n. 4, p. 471-474, 1980.

- SOARES FILHO, W. dos S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; PASSOS, O. S. Porta-enxertos para laranja 'Bahia' na região de Cruz das Almas, Bahia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 16, n. 4, p. 501-505, 1981.
- SOARES FILHO, W. dos S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; PASSOS, O. S. **Tangerineira 'Sunki Maravilha'**: nova opção para a diversificação do uso de porta-enxertos no Brasil. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 1 folder.
- SOARES FILHO, W. dos S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; PASSOS, O. S. **Tangerineira 'Sunki Tropical'**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2003. 1 folder.
- SOARES FILHO, W. dos S.; DIAMANTINO, M. S. A. S.; MOITINHO, E. D. B.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; PASSOS, O. S. 'Tropical': uma nova seleção de tangerina 'Sunki'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 127-132, 2002.
- SOARES FILHO, W. dos S.; MORAIS, L. S.; CUNHA SOBRINHO, A. P.; DIAMANTINO, M. S. A. S.; PASSOS, O. S. 'Santa Cruz': uma nova seleção de limão 'Cravo'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 21, n. 2, p. 222-225, 1999.
- SOARES FILHO, W. dos S.; SOUZA, U.; OLIVEIRA, C. R. de C.; SANTOS, M. G.; LEDO, C. A. da S.; SANTANA, L. G. L.; ROCHA, J. da S.; PISSINATO, A. G. V.; SILVA, J. S. S. da; SOUZA, A. da S.; PASSOS, O. S. Poliembrionia e potencial de obtenção de híbridos em citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 5., 2009, Guarapari. **O melhoramento e os novos cenários da agricultura**: anais. Vitória: Incaper, 2009. Seção Trabalhos Técnico-Científicos. 1 CD-ROM. (Incaper. Documentos, 11).
- SOARES FILHO, W. dos S.; STUCHI, E. S.; RAMOS, Y. C.; GIRARDI, E. A.; GESTEIRA, A. da S.; PASSOS, O. S. Porta-enxertos semiananizantes para laranja 'Valência'. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 6., 2011, Búzios. **Panorama atual e perspectivas do melhoramento de plantas no Brasil**: anais. Búzios: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2011. 1 CD-ROM.
- STUCHI, E. Incompatibilidade: uma questão importante na escolha do porta-enxerto. **Citricultura Atual**, Cordeirópolis, v. 26, p. 8-9, 2002.
- STUCHI, E. S.; CYRILLO, F. L. L. **Lima ácida Tahiti**. Jaboticabal: FUNEP, 1998. 35 p. (FUNEP. Boletim Citrícola, 6).
- STUCHI, E. S.; DONADIO, L. C.; SEMPIONATO, O. R. Performance of Tahiti lime on *Poncirus trifoliata* var. monstrosa Flying Dragon in four densities. **Fruits**, Montpellier, v. 58, n. 1, p. 13-17, 2003.
- STUCHI, E. S.; SEMPIONATO, O. R.; SILVA, J. A. A. da. Influência do porta-enxertos na qualidade dos frutos cítricos. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 17, n. 1, p. 159-178, 1996.
- TEÓFILO SOBRINHO, J.; POMPEU JUNIOR, J.; FIGUEIREDO, J. O. de; JACON, J. R.; BARBIN, D.; DEMÉTRIO, C. G. B. Competição de oito porta-enxertos para laranja Rubi *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 8., 1986, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1986. v. 1, p. 127-131.
- TEÓFILO SOBRINHO, J.; POMPEU JUNIOR, J.; FIGUEIREDO, J. O.; BARBIN, D.; DEMÉTRIO, C. G. B. Fourteen-year study of rootstocks for 'Valência' and 'Natal' sweet oranges in Brazil. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 4., 1984, São Paulo. **Proceedings...** Piracicaba: International Society of Citriculture, 1987. v. 1, p. 27-28.
- TERENCIO, J. C. C.; MILORI, D. M. B. P.; JORGE, L. A. de C.; MARTIN NETO, L. **Diagnóstico da Morte Súbita dos Citros (MSC) utilizando fluorescência das folhas**. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2006. 16 p. (Embrapa Instrumentação Agropecuária. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 15).
- TRINDADE, J.; SILVA, L. M. S.; PASSOS, O. S. Incompatibilidade dos citros ('bud union crease') em Sergipe. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2., 1972, Viçosa. **Anais...** Campinas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1973. v. 1, p. 211-215.
- TRINDADE, J.; SILVA, L. M. S.; SILVA, J. B. U. Behavior of sweet orange clones grafted on Rangpur lime *C. limonia* Osb. and Florida's rough lemon *C. jambhiri* Lush. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 5., 1984, São Paulo. **Proceedings...** Piracicaba: International Society of Citriculture, 1987. v. 1, p. 45-47.
- WREGE, M. S.; OLIVEIRA, R. P.; JOÃO, P. L.; HERTER, F. G.; STEIMETZ, S.; CARLOS JUNIOR, R.; MATZENAUER, R.; MALUF, J. R. T.; FERREIRA, J. S. A.; PEREIRA, I. dos S. **Zoneamento agroclimático para a cultura dos citros no Rio Grande do Sul**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. 23 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 117).
- WUTSCHER, H. K. Citrus rootstocks. **Horticultural Review**, Westport, v. 1, p. 237-269, 1979.
- WUTSCHER, H. K. Porta-enxertos para citros na Flórida. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS: PORTA-ENXERTOS, 1., 1990, Bebedouro. **Anais...** Jaboticabal: FUNEP, 1990. p. 11-20.
- WUTSCHER, H. K. Rootstocks effects on fruit quality. In: FERGUSON, J. J.; WARDOWSKI, W. F. (Ed.). **Factors affecting fruit quality**. Lake Alfred: University of Florida, 1988. p. 24-34.
- WUTSCHER, H. K.; SHULL, A. V. Yield, fruit quality, growth, and leaf nutrients levels of 14- year-old grapefruit *Citrus paradisi* Macf. Trees on 21 rootstocks. **Journal of American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 100, n. 3, p. 290-294, 1975.

YOUNG, R. H. Influence of rootstocks on citrus hardiness. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE CONGRESS, 1., 1977, Orlando. **Proceedings...** Orlando: International Society of Citriculture, 1979. v. 2, p. 518-522.

ZAMBOLIM, L.; SIQUEIRA, J. O. **Importância e potencial das associações micorrízicas para a agricultura.** Belo Horizonte: Epamig, 1985. 36 p. (Epamig. Documentos, 26).

# Cultivares copa

Orlando Sampaio Passos  
Almir Pinto da Cunha Sobrinho  
Walter dos Santos Soares Filho

## Introdução

A escolha da espécie ou cultivar é a decisão sobre a qual se fundamenta o êxito de qualquer empreendimento agrícola. A evidência desse fato é ainda maior nos dias atuais, em que, por conta da globalização dos mercados e do uso de tecnologias modernas, a competitividade impõe-se como condição necessária à própria sobrevivência da agricultura comercial. Em cultivos permanentes, como o dos citros, essa situação é ainda mais crítica, tendo em vista os elevados custos das fases de planejamento e instalação do pomar, além do tempo exigido para atingir seu equilíbrio econômico, o qual, com base na relação despesa-receita, dá-se após o sexto ano.

Considerando a especificidade das espécies cítricas em relação ao clima, há que se proceder a escolha da cultivar de acordo com os padrões climáticos requeridos. Para a produção de frutos de laranja [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] e tangerina (diversas espécies e híbridos tipo tangerina) para mesa, por exemplo, há que se optar por áreas de altitude elevada ou mais distantes da linha do equador, enquanto que limas ácidas [*C. aurantiifolia* (Christm.) Swingle e *C. latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka], limões [*C. limon* (L.) Burm. f.] e pomelos (*C. paradisi* Macfad.) apresentam melhor qualidade em regiões tropicais semiáridas. Não se pode conceber um empreendimento agrícola sem uma noção prévia e o mais exata possível do que ocorrerá com o produto final.

Quando se focaliza o papel da variedade no pomar cítrico, o estudo de mercado aparece em primeiro plano. Almeida (1999, p. 33) assim se expressa em relação ao assunto: “Em épocas de mudanças rápidas na economia, o conhecimento e o monitoramento do mercado são questões de sobrevivência, imprescindíveis na identificação de ameaças e oportunidades”. Esse autor comenta, também, a relevância das tendências de consumo, tendo em vista as eventuais alterações nas preferências dos consumidores.

Conhecer a forma de comercialização e as vias de consumo são premissas básicas na exploração citrícola, principalmente se levada em conta a especificidade das cultivares em relação ao mercado. Nesse sentido, o citricultor deve ter um conhecimento prévio das possibilidades de utilização das cultivares que lhe são disponíveis, seja em relação ao mercado in natura, interno e externo, seja no tocante ao seu aproveitamento pela indústria de processamento. Consequências danosas

no plano econômico poderão advir caso não se observem essas particularidades. Nesse contexto, a diversificação de variedades vem se tornando medida imperativa, haja vista as constantes oscilações do mercado em função da lei de oferta e procura (CUNHA SOBRINHO et al., 2000).

A citricultura baiana, em particular, tem apresentado situações que evidenciam os malefícios da adoção exclusiva de uma variedade: na década de 1960, predominava a laranja 'Bahia' (*C. sinensis*), que foi substituída pela laranja 'Pera'. A laranja 'Bahia' ou de "umbigo", originada de uma mutação somática da laranja 'Seleta' no final do século 18, ocorrida no bairro do Cabula, Salvador, BA, é um dos fatos históricos mais relevantes da citricultura brasileira. Até 1900, a citricultura no Brasil não ostentava nenhuma importância econômica. Do Estado da Bahia, a laranja 'Bahia' foi introduzida nos estados do Rio de Janeiro e de São Paulo, onde a citricultura já estava se desenvolvendo. Nos anos 1930, o Brasil dispunha de aproximadamente 20 milhões de árvores cítricas, metade no Estado de São Paulo, sendo a exportação concentrada quase que exclusivamente na laranja 'Bahia'.

A citricultura brasileira continuou se expandindo até 1940, quando o vírus-da-tristeza-dos-citros (*Citrus tristeza virus* – CTV) destruiu mais de 10 milhões de árvores. Nos estados da Bahia e de Sergipe, a laranja 'Bahia' ocupava quase 100% dos pomares. No período pós-tristeza, a laranja 'Pera', variedade de maturação mais tardia e mais produtiva do que a 'Bahia', ganhou a preferência dos citricultores. Em virtude do redirecionamento da citricultura para processamento de suco concentrado e congelado nos anos 1960, a laranja 'Pera' passou a predominar nos quatro estados maiores produtores: São Paulo, Bahia, Sergipe e Minas Gerais, enquanto que a laranja 'Bahia' não atingia 5% dos plantios.

Nos anos 1970, quando o Brasil assumiu o primeiro lugar como exportador de suco concentrado, outras variedades de laranjeiras doces (*C. sinensis*), como Valência, Natal e Hamlin, passaram a ser consideradas, em detrimento da laranja 'Bahia', quase eliminada dos pomares brasileiros, à exceção de São Paulo e do Rio Grande do Sul. O número restrito de espécies e variedades em uso de forma predominante no Brasil, que não ultrapassa a cinco, coloca a citricultura brasileira em posição vulnerável, principalmente se levada em conta a diversidade ecológica e a disponibilidade de área no País (PASSOS et al., 2005b).

As áreas produtoras de citros no Nordeste brasileiro estão, em sua maioria, localizadas próximas ao litoral, sob condições climáticas pouco distintas entre si, caracterizadas pela presença de chuvas abundantes de outono e inverno, precipitação pluvial anual acima de 1.000 mm, temperatura média anual em torno de 25 °C e elevada umidade relativa do ar (na casa dos 80%), situando-se entre 2° e 18° de latitude Sul e entre 35° e 50° de longitude Oeste. O clima é subúmido quente (tropical), com médias anuais de temperatura e precipitação pluvial variando de 20 °C a 28 °C e de 300 mm a 2.000 mm, respectivamente. O número de horas de sol oscila entre 2.300 por ano, nas áreas úmidas, e 3.000, nas semiáridas. A maior parte desta região encontra-se no Polígono das Secas (precipitações pluviais inferiores a 750 mm), que compreende os estados do Maranhão, do Piauí, do Ceará, do Rio

Grande do Norte, da Paraíba, de Pernambuco, de Alagoas, de Sergipe e da Bahia, além do norte de Minas Gerais, ocupando 18,2% da superfície do território nacional (Figura 1).

A Embrapa Mandioca e Fruticultura localiza-se no Recôncavo Baiano, Município de Cruz das Almas, a 12°40'39" de latitude Sul, 39°06'23" de longitude Oeste de Greenwich e a 2.256 m de altitude. O clima da região, segundo a classificação de Köppen, é uma transição entre as zonas Am e Aw, enquanto pela classificação de Thornthwaite é do tipo C, seco e subúmido. Com uma precipitação pluvial média anual de 1.224 mm, tem nos meses de junho a agosto o período mais chuvoso, e, nos meses de novembro a março, o período mais seco do ano. A temperatura é de aproximadamente 24 °C, e a umidade relativa

do ar é de 82 %, médias anuais. Sob essa influência climática, em áreas tropicais úmidas, as diversas cultivares cítricas apresentam, em geral, um comportamento similar àquele observado em Cruz das Almas. O solo é do tipo Latossolo Amarelo distrófico A moderado, textura franco argilo-arenosa. Os dados a seguir apresentados foram tomados nesse município e em Ibicoara, Chapada Diamantina, em quadra experimental para avaliação de variedades copa, em que o porta-enxerto utilizado foi o limoeiro 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck). Em Ibicoara, a área de estudo situa-se a 13°17'03" de latitude Sul e 41°24'10" de longitude Oeste, numa altitude de 1.100 m, temperatura média anual de 20 °C, variando entre as médias máxima de 25 °C e mínima de 15 °C, com período mais frio de maio a agosto e regime pluviométrico de 746 mm, concentrando-se as chuvas nos meses de novembro a abril. Os solos Latossolos Vermelho-Amarelos e Amarelos são predominantes, sendo os de maior potencial para agricultura os Vermelho-Escuros e Cambissolos (PASSOS et al., 2005a). Nas condições do Recôncavo Sul e da Chapada Diamantina, a floração ocorre principalmente em setembro, havendo outras temporãs, variando em função das estiagens e chuvas de verão. Os frutos de laranja e tangerina, embora apresentem coloração da polpa intensamente alaranjada, têm a coloração da casca amarelo-claro desuniforme, salvo os produzidos em áreas de altitude mais elevada. A superfície da casca é ligeiramente rugosa no grupo das laranjas doces e lisa nas tangerinas, limas ácidas e pomelos.



Figura 1. Mapa do Nordeste brasileiro mostrando o Polígono das Secas, os estados e a localização geográfica. Fonte: Pareja (2010).

# Cultivares tradicionais

## Laranjeiras doces

### ‘Bahia’

Origem: Salvador, Bahia, provavelmente no final do século 18.

Planta adulta (Figura 2) de porte alto<sup>1</sup>, copa arredondada e frondosa. Fruto grande<sup>2</sup>, esférico, ligeiramente achatado, com umbigo proeminente, sem sementes, de sabor doce. Maturação meia-estação, de maio a julho, com safra temporã variando de janeiro a abril. Embora oriunda de região tropical, a laranjeira ‘Bahia’ tem mostrado comportamento superior em condições subtropicais, como na Califórnia, Espanha, Austrália e África do Sul, onde são cultivados diferentes clones, denominados ‘Navel’. Pela excelência de seus frutos, tem se destacado como cultivar predominante no mercado de exportação de frutos in natura, ao lado da laranjeira ‘Valência’, esta mais direcionada ao processamento industrial. A laranjeira ‘Bahia’, batizada, quando de sua introdução nos EUA, como “Washington Navel” (Figura 3), cabe salientar, foi considerada como um dos principais fatores de desenvolvimento da citricultura nos cinco continentes (PASSOS et al., 1980).

<sup>1</sup> Porte alto: acima de 5,0 m.

<sup>2</sup> Fruto grande: acima de 250 g.



Foto: Oriando Sampaio Passos

Figura 2. Laranjeira ‘Bahia’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. Ibicoara, BA.



Foto: Oriando Sampaio Passos

Figura 3. Laranjeira ‘Washington Navel’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. Riverside, Califórnia, Estados Unidos da América.

## ‘Baianinha’

Origem: Piracicaba, São Paulo.

Planta adulta (Figura 4) de porte alto, copa arredondada e frondosa. Fruto de tamanho médio<sup>3</sup>, sem sementes, esférico, com umbigo pequeno ou quase imperceptível, sabor doce. Maturação meia-estação, de maio a julho, com uma safra temporã variando de janeiro a abril, principal em setembro, e outra temporã, variando em função das chuvas de trovoada. Com características semelhantes às da laranja ‘Bahia’, à exceção do umbigo menos proeminente, a laranja ‘Baianinha’ apresenta vantagens sobre aquela no que diz respeito à produtividade.



Foto: Orlando Sampallo Passos

Figura 4. Laranjeira ‘Baianinha’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. Ibicoara, BA.

## ‘Pera’

Origem: desconhecida.

Planta adulta (Figura 5) de porte médio, copa ereta. Fruto de tamanho médio, ovalado, sabor doce quando colhido de julho a setembro, com média de seis sementes. Maturação tardia, de julho a setembro, com produções temporãs ao longo do ano. É a cultivar mais difundida no País, chegando a ser quase exclusiva em alguns estados, como Bahia e Sergipe. É intolerante ao vírus-da-tristeza-dos-citros, embora mostre predominância de estirpes fracas, devendo ser premunida quando forem obtidos novos clones.



Foto: Orlando Sampallo Passos

Figura 5. Laranjeira ‘Pera CNPMF D-6’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. Ibicoara, BA.

<sup>3</sup> Fruto médio: de 150 g a 230 g.

## ‘Natal’

Origem: desconhecida.

Planta adulta (Figura 6) de porte médio<sup>4</sup> a alto, copa achatada no topo. Fruto de tamanho médio, formato esférico, sabor ácido, com número médio de quatro sementes. Maturação muito tardia, de setembro a novembro, com produções temporãs de dezembro a março. É tida como uma ‘Valência’ brasileira, tais são as semelhanças entre as duas cultivares.

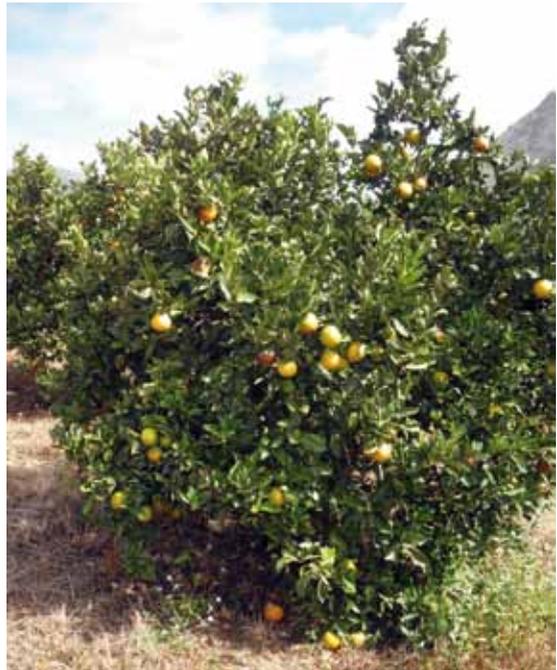


Foto: Orlando Sampato Passos

Figura 6. Laranjeira ‘Natal’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck].  
Rio de Contas, BA.

## ‘Valência’

Origem: provavelmente de Portugal ou Espanha.

Planta adulta (Figura 7) de porte alto, copa avantajada. Fruto de tamanho médio, esférico, sabor ácido, média de cinco sementes por fruto. Maturação muito tardia, de setembro a novembro, com safras temporãs de dezembro a março. Trata-se da cultivar mais difundida no mundo. No Brasil, é mais cultivada em São Paulo, onde passou recentemente ser a cultivar preferida entre as laranjeiras doces, e no Rio Grande do Sul, pela adaptação climática.



Foto: Orlando Sampato Passos

Figura 7. Laranjeira ‘Valência’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck].  
Ibicoara, BA.

<sup>4</sup> Porte médio: de 3 m a 5 m.

## ‘Hamlin’

Origem: Flórida, EUA.

Planta adulta (Figura 8) de porte alto, copa arredondada. Fruto de tamanho pequeno a médio, relativamente esférico, tendendo a achatado, com cerca de três sementes; casca lisa. Maturação precoce, de abril a junho, com produções temporãs de dezembro a março. É considerada como a cultivar mais produtiva dentre aquelas do grupo das laranjeiras doces, apresentando, no entanto, a desvantagem de produzir suco com pouca aceitação industrial.



Foto: Orlando Sampão Passos

Figura 8. Laranjeira ‘Hamlin’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. Ibicoara, BA.

## ‘Lima’

Origem: desconhecida.

Planta adulta (Figura 9) de porte médio, copa arredondada. Fruto pequeno, esférico, sem acidez, com cerca de quatro sementes. Maturação meia-estação, de maio a junho, com produções temporãs de dezembro a março. A cultivar Lima, embora com mercado limitado, tem boa aceitação no Nordeste pela ausência praticamente total de acidez nos frutos. O Estado de Alagoas é, talvez, o maior produtor nacional dessa variedade.



Foto: Orlando Sampão Passos

Figura 9. Laranjeira ‘Lima’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. Ibicoara, BA.

## ‘De russas’

Origem: Vale do Jaguaribe, Ceará.

Planta adulta (Figura 10) de porte alto, copa arredondada. Fruto médio, esférico, com teor baixo de acidez e cerca de 15 sementes; casca rugosa/lisa. Maturação meia-estação, de maio a junho, com produções temporãs de dezembro a março. A laranjeira ‘de Russas’ é uma cultivar tradicional, bastante apreciada pelo consumidor cearense por causa do sabor adocicado dos frutos, como se fora um híbrido da laranjeira ‘Baianinha’ com a laranjeira ‘Lima’. Sua desvantagem está no elevado número de sementes do fruto.



Fotos: Orlando Sampaio Passos

Figura 10. Laranjeira ‘de Russas’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] enxertada (A) e pé-franco (B). Russas, CE.

## ‘Flor’

Origem: Chapada Diamantina, Bahia.

Planta adulta (Figura 11) de porte médio, copa arredondada. Fruto pequeno, esférico, com teor baixo de acidez e número elevado de sementes; casca rugosa/lisa. Maturação meia-estação, de maio a junho, com produções temporãs de dezembro a março.



Foto: Orlando Sampaio Passos

Figura 11. Laranjeira ‘Flor’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. Rio de Contas, BA.

## ‘Melrosa’

Origem: Piauí.

Planta adulta (Figura 12) de porte médio, copa arredondada. Fruto pequeno, esférico, com cerca de dez sementes e baixo teor de acidez, embora a casca ainda esteja esverdeada. Maturação meia-estação, de maio a junho, com produções temporãs de dezembro a março.



Foto: Orlando Sampaio Passos

Figura 12. Laranjeira ‘Melrosa’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. Russas, CE.

## Tangerineiras

### ‘Ponkan’ (*C. reticulata* Blanco)

Origem: Japão.

Planta adulta (Figura 13) de porte alto, copa cônica. Fruto de tamanho grande, achatado, com número médio de dez sementes; casca solta e rugosa. Maturação meia-estação, de maio a junho, com safras temporãs de dezembro a março. Apesar de ter boa aceitação comercial e ser a preferida entre os citricultores, pelo tamanho e pela qualidade do fruto, a casca pouco aderente leva a expressivas perdas pós-colheita no transporte aos mercados consumidores.



Foto: Orlando Sampaio Passos

Figura 13. Tangerineira ‘Ponkan’ (*Citrus reticulata* Blanco). Rio de Contas, BA.

### 'Cravo' (*C. reticulata*)

Origem: desconhecida, podendo ter surgido no Brasil ou introduzida de Portugal.

Planta adulta (Figura 14) de porte médio, copa cônica. Fruto de tamanho médio, forma achatada, com cerca de 16 sementes; casca solta e rugosa. Maturação meia-estação, de maio a junho, com safras temporãs de dezembro a março. Foi a variedade de tangerina mais cultivada no Brasil até a introdução da 'Ponkan'.



Foto: Orlando Sampaio Passos

Figura 14. Tangerineira 'Cravo' (*Citrus reticulata* Blanco). Cruz das Almas, BA.

### 'Dancy' (*C. tangerina hort. ex Tanaka*)

Origem: Flórida, EUA.

Planta adulta (Figura 15) de porte médio, copa com crescimento ereto. Fruto de tamanho médio, forma achatada, sabor doce e média de 16 sementes; casca lisa e semia-derente. Maturação meia-estação à tardia, de junho a setembro, com safras temporãs de dezembro a março. É a principal variedade cultivada no Estado da Paraíba, maior produtor nordestino dessa tangerina, quiçá do Brasil.



Foto: Orlando Sampaio Passos

Figura 15. Tangerineira 'Dancy' (*Citrus tangerina hort. ex Tanaka*). Ibicoara, BA.

### 'Mexeriqueira' (*C. deliciosa* Ten.)

Origem: provavelmente Mediterrâneo.

Planta adulta (Figura 16) de porte médio, copa arredondada. Fruto de tamanho pequeno<sup>5</sup> a médio, com numerosas sementes, de sabor doce, casca rugosa/lisa, pouco aderente (fácil de descascar). Maturação meia-estação, de maio a junho, com produções temporãs de dezembro a março. Bastante difundida no País, é conhecida também como 'Mexerica do Rio'. O manejo inadequado dessa variedade, no que

<sup>5</sup> Pequeno: abaixo de 150 g.

tange à poda e ao raleio de frutos, tem contribuído para que seja substituída pela 'Ponkan' e 'Murcott'.



Foto: Orlando Sampato Passos

Figura 16. Tangerina 'Mexerica' (*Citrus deliciosa* Ten.). Ibicoara, BA.

## Tangor 'Murcott'

Origem: Flórida, EUA. Híbrido resultante, possivelmente, de cruzamento entre tangerineira e laranjeira doce.

Planta adulta (Figura 17) de porte médio, copa arredondada. Fruto de tamanho médio, achatado, sabor agridoce, com cerca de 20 sementes; casca lisa, aderente, esta influência da laranjeira doce, e polpa de tangerina. Maturação tardia, de junho a setembro, com produções temporais de dezembro a março. O número excessivo de sementes, no entanto, representa desvantagem em sua comercialização como fruta fresca.



Foto: Orlando Sampato Passos

Figura 17. Tangor [*Citrus reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osbeck] 'Murcott'. Rio de Contas, BA.

## Limeiras ácidas

### 'Tahiti' (*C. latifolia*)

Origem: duas hipóteses são conhecidas, o surgimento na Pérsia, hoje Irã, ou na Ilha de Tahiti.

Planta adulta (Figura 18) de porte alto, copa arredondada. Fruto pequeno, ovalado, sabor ácido, sem sementes; casca lisa, com coloração de um verde intenso e uniforme, polpa citrina. Maturação o

ano todo, com concentração da safra no primeiro semestre. No grupo das limeiras ácidas (*C. latifolia* e *C. aurantiifolia*) e dos limoeiros verdadeiros (*C. limon*), é a cultivar mais difundida no País, estando em fase de expansão no Nordeste dada à sua boa adaptação às condições climáticas dessa região. Apresenta intolerância ao vírus-da-tristeza-dos-citros.



Foto: Orlando Sampaio Passos

**Figura 18.** Limeira ácida 'Tahiti' [*Citrus latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka]. Juazeiro, BA.

### 'Galego' (*C. aurantiifolia*)

Origem: Índia.

Planta adulta (Figura 19) de porte médio, copa arredondada. Fruto muito pequeno, esférico, sabor ácido e cerca de seis a dez sementes; casca lisa, de coloração verde intenso e uniforme, polpa citrina. Maturação o ano todo. É cultivada na região Nordeste, principalmente nos estados do Ceará e de Sergipe.



Foto: Orlando Sampaio Passos

**Figura 19.** Limeira ácida 'Galego' [*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle] (acima) e detalhe dos frutos na planta (à esquerda). Bom Jesus da Lapa, BA.

Foto: Orlando Sampaio Passos



## Limeiras doces (*C. limettioides* Tanaka)

### ‘Da pérsia’

Origem: desconhecida.

Planta adulta (Figura 20) de porte alto, copa arredondada. Fruto de tamanho médio, sabor doce, sem acidez, com número médio de quatro sementes; casca lisa, com coloração verde clara, uniforme, polpa amarela pálida. Maturação variável, com concentração nos meses de junho e julho. Mercado limitado à região Nordeste.



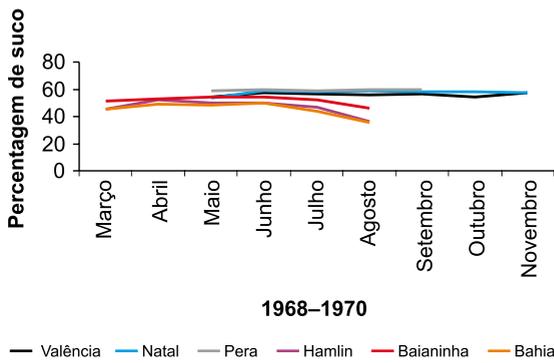
Foto: Orlando Sampato Passos

Figura 20. Limeira ‘da Pérsia’ (*Citrus limettioides* Tanaka). Ibicoara, BA.

No intuito de identificar o potencial da grande unidade de paisagem de Tabuleiros Costeiros para a produção de citros destinada ao processamento industrial e consumo in natura, visando tanto ao mercado interno como ao externo, foram estabelecidas, no Estado da Bahia, município de Cruz das Almas, nos meses de março a novembro, no período de 1968 a 1970, curvas de maturação de diversas variedades de laranjeiras doces, compreendendo Bahia, Baianinha, Hamlin, Pera, Natal e Valência. Os resultados obtidos, referentes ao conteúdo de suco, sólidos solúveis totais (SST), acidez total titulável (ATT) e relação SST-ATT (*ratio*) (Figuras 21, 22, 23 e 24), permitiram concluir sobre a viabilidade de processamento de sucos cítricos no Nordeste, com base na laranja ‘Pera’, associados aos de frutas tropicais, especialmente nos meses de verão (PASSOS et al., 1977).

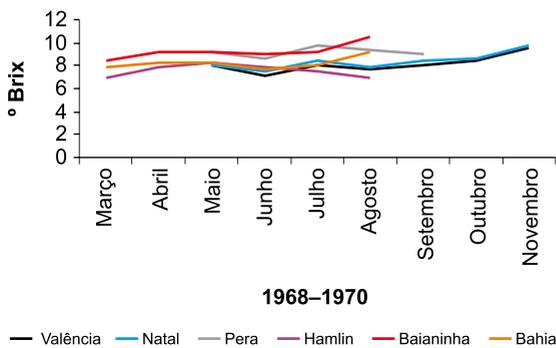
Com relação à produção de frutos de laranjeiras doces para consumo in natura, reconhece-se não haver no Nordeste brasileiro as condições ideais. A coloração da casca, especialmente, raramente alcança um nível aceitável pelos mercados, notadamente o externo. O efeito mais marcante do clima na qualidade do fruto está na coloração da casca e na relação SST-ATT. Em condições subtropicais, a ocorrência de temperaturas baixas durante o outono e inverno, quando a maioria das cultivares está aumentando o conteúdo de suco e de sólidos solúveis, causa alterações na casca que aceleram a degradação da clorofila e a síntese de pigmentos carotenoides.

Nos trópicos, e principalmente em áreas de baixa altitude, no entanto, a reduzida amplitude de temperaturas e a ausência de temperaturas baixas ocasionam uma lenta degradação da clorofila e síntese de carotenoides, fazendo com que o fruto da laranjeira não apresente a coloração típica da espécie ao atingir o ponto de colheita (REUTHER, 1973). O plantio em áreas de altitude, como a Chapada Diamantina, BA, poderia contornar essa deficiência, permitindo que frutos produzidos no Nordeste, como os das tangerinas e laranjas, alcançassem o mercado do Sudeste brasileiro em con-



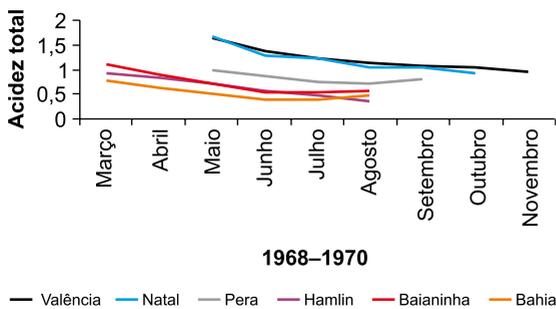
**Figura 21.** Percentagem de suco das variedades de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] Hamlin, Baianinha, Bahia, Pera, Natal e Valência, nos meses de março a novembro, nos anos de 1968 a 1970.

Fonte: Passos et al. (1977).



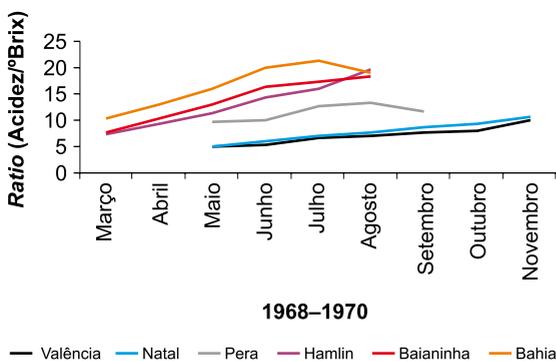
**Figura 22.** Sólidos solúveis totais (SST) das variedades de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] Hamlin, Baianinha, Bahia, Pera, Natal e Valência, nos meses de março a novembro, nos anos de 1968 a 1970.

Fonte: Passos et al. (1977).



**Figura 23.** Acidez total titulável (ATT) das variedades de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] Hamlin, Baianinha, Bahia, Pera, Natal e Valência, nos meses de março a novembro, nos anos 1968 a 1970.

Fonte: Passos et al. (1977).



**Figura 24.** Relação ATT-SST das variedades de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] Hamlin, Baianinha, Bahia, Pera, Natal e Valência, nos meses de março a novembro, no período de 1968 a 1970.

Fonte: Passos et al. (1977).

dições de competir com os frutos produzidos nessa região. Espécies melhor adaptadas às condições tropicais, todavia, deveriam ter prioridade de utilização no Nordeste brasileiro, com destaque para aquelas relacionadas às tangerineiras, aos pomeleiros, às limeiras ácidas e doces, além dos limoeiros verdadeiros.

## Cultivares não tradicionais

Como cultivares com potencial de uso no Nordeste do Brasil, pode-se mencionar diversas laranjeiras doces:

### ‘Salustiana’

Origem: Valência, Espanha.

Planta adulta (Figura 25) de porte alto, copa arredondada, com ramos sobressaindo no topo. Fruto de tamanho médio a grande, sucoso, esférico, sem sementes. Maturação meia-estação, de maio a julho. Em razão de ser considerada sem sementes, a ‘Salustiana’ tem bom potencial tanto para o mercado de fruta fresca como processamento de suco. A alternância de produção, no entanto, é uma desvantagem.



Foto: Orlando Sampato Passos

Figura 25. Laranjeira ‘Salustiana’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. Rio Real, BA.

### ‘Pineapple’

Origem: Flórida, EUA.

Planta adulta (Figura 26) de porte alto, copa arredondada. Fruto de tamanho médio, esférico e número médio de 16 sementes. Maturação meia-estação, de maio a julho. Variedade tradicionalmente cultivada na Flórida, apresenta elevada produtividade e excelente qualidade de suco, porém frutos com número excessivo de sementes.



Foto: Orlando Sampato Passos

Figura 26. Laranjeira ‘Pineapple’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. Ibicoara, BA.

## ‘Rubi’

Origem: desconhecida.

Planta adulta (Figura 27) de porte alto, copa arredondada. Fruto de tamanho médio, esférico, com poucas sementes, uma a duas em média; casca ligeiramente rugosa, de coloração alaranjada, desuniforme, polpa fortemente alaranjada. Maturação meia-estação, de maio a julho. Em razão de ser considerada sem sementes e apresentar suco colorido, a ‘Rubi’ tem bom potencial para o mercado de fruta fresca e possivelmente em misturas (*blend*) para melhorar a coloração do suco produzido na região.



Foto: Orlando Sampato Passos

Figura 27. Laranjeira ‘Rubi’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck].  
Ibicoara, BA.

## ‘Westin’

Origem: Estado do Rio Grande do Sul.

O nome vem de uma homenagem, em Piracicaba (SP), ao Professor Felipe Cabral Westin de Vasconcelos. Planta adulta (Figura 28) de porte baixo, galhos mais ou menos eretos. Fruto de tamanho médio, arredondado, sucoso e com zero a seis sementes. Maturação precoce a meia-estação (maio a julho). Tem mostrado ser mais uma opção à citricultura de mesa tanto em áreas de altitude como em outras no Nordeste.



Foto: Orlando Sampato Passos

Figura 28. Laranjeira ‘Westin’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck].  
Ibicoara, BA.

## ‘Valência Tuxpan’

Origem: México.

Planta adulta (Figura 29) de porte alto e copa arredondada. Fruto de tamanho médio, esférico e de zero a seis sementes. Maturação muito tardia, de julho a setembro. Além de produzir após a ‘Pera’, apresenta elevada produtividade, com bom potencial tanto para o processamento industrial como para o mercado de fruta fresca.



Foto: Orlando Sampato Passos

Figura 29. Laranjeira ‘Valência Tuxpan’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. Rio de Contas, BA.

## ‘Sincorá’

Origem: China.

Planta adulta (Figura 30) de porte alto, copa ereta, semelhante à da laranjeira ‘Pera’. Fruto de tamanho médio, esférico, com seis sementes. Maturação meia-estação, de maio a julho, à tardia, de maio a setembro. Bastante semelhante à ‘Pera’, tem como vantagem sobre esta a melhor tolerância à tristeza (CTV); menor incidência de caneluras.



Foto: Orlando Sampato Passos

Figura 30. Laranjeira ‘Sincorá’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. Ibicoara, BA.

## ‘Sunstar’

Origem: Flórida, EUA.

Planta adulta (Figura 31) de porte alto, copa arredondada. Fruto de tamanho médio e cerca de nove sementes. Maturação meia-estação, de maio a julho. Proveniente de semente obtida de polinização aberta da variedade Berna, a ‘Sunstar’ apresenta elevada produtividade, porém frutos com número excessivo de sementes.



Foto: Orlando Sampato Passos

Figura 31. Laranjeira ‘Sunstar’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. Rio de Contas, BA.

## 'Midsweet'

Origem: Flórida, EUA.

Planta adulta (Figura 32) de porte alto, copa arredondada. Fruto de tamanho médio, esférico e média de 14 sementes. Maturação meia-estação, de maio a julho. Proveniente de semente obtida de polinização aberta da variedade Homosassa. Plantios dessa cultivar encontram-se em expansão na Flórida, dada sua alta produtividade e maturação de frutos mais precoce que a da laranjeira 'Valência'.

Além das mencionadas laranjeiras doces, cabe destacar também a possibilidade de uso, no Nordeste brasileiro, de diversos híbridos produtores de frutos tipo tangerina, entre outros.



Foto: Orlando Sampalo Passos

Figura 32. Laranjeira 'Midsweet' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. Ibicoara, BA.

## Tangelo 'Page'

Origem: Flórida, EUA. Obtido do cruzamento tangerineira 'Clementina' (*C. clementina* hort. ex Tanaka) x tangelo 'Minneola' (pomeloiro 'Duncan' x tangerineira 'Dancy').

Planta adulta (Figura 33) de porte pequeno<sup>6</sup>, copa arredondada. Fruto de tamanho pequeno, forma arredondada, sem sementes (se plantada isoladamente); casca lisa e aderente, de cor alaranjada intensa, uniforme, polpa fortemente alaranjada. Maturação precoce à meia-estação, de abril a julho. Apesar do fruto pequeno, esse híbrido apresenta potencial mesmo em áreas de baixa altitude em razão da qualidade do suco, tanto em relação à coloração quanto ao sabor. Esses híbridos possuem, em sua constituição genética,  $\frac{3}{4}$  de tangerineira e  $\frac{1}{4}$  de pomeloiro, espécies que encontram no Nordeste boas condições para seu cultivo, especialmente o pomelo, mesmo em área de menor altitude. Sob temperaturas baixas, essa cultivar apresenta intolerância ao vírus-da-tristeza, podendo exibir fortes caneluras no tronco.

<sup>6</sup> Porte pequeno: abaixo de 1,50 m.



Fotos: Orlando Sampaio Passos

Figura 33. Tangelo 'Page' (à esquerda), com flores em destaque (à direita). Ibicoara, BA.

## Tangelo 'Piemonte'

Origem: Califórnia, EUA. Obtido do cruzamento tangerineira 'Clementina' x tangor 'Murcott'.

Planta adulta (Figura 34) de porte pequeno a médio, copa arredondada. Fruto de tamanho médio, forma achatada, média de 20 sementes; casca lisa e aderente, coloração externa e polpa laranja avermelhada. Maturação tardia, a partir de agosto. Essa característica, aliada à excelente coloração do fruto e facilidade no transporte, faz com que essa cultivar apresente-se como real opção à citricultura de mesa, não somente no Nordeste brasileiro.



Foto: Orlando Sampaio Passos

Figura 34. Tangelo 'Piemonte'. Ibicoara, BA.

## Tangelo 'Nova'

Origem: Flórida, EUA. Obtido do cruzamento tangerineira 'Clementina' x tangelo 'Orlando' (pomeleiro 'Duncan' x tangerineira 'Dancy').

Planta adulta (Figura 35) de porte pequeno a médio, copa arredondada. Fruto de tamanho médio, forma achatada, sem sementes quando planta isoladamente; casca lisa, medianamente aderente, de cor intensamente alaranjada, uniforme e polpa fortemente alaranjada. Maturação precoce à meia-estação, de abril a julho. A colheita tem que ser feita de imediato, a fim de se evitar a granulação dos frutos.



Foto: Orlando Sampaio Passos

Figura 35. Tangelo 'Nova'. Ibicoara, BA.

## Tangelo 'Lee'

Origem: Flórida, EUA. Obtido do cruzamento tangerineira 'Clementina' x tangelo 'Orlando'.

Planta adulta (Figura 36) de porte alto, copa globosa, atípica de tangerineira. Fruto de tamanho médio, de forma arredondada à oblata, casca lisa e aderente, coloração externa e polpa laranja-avermelhada, com média de 18 sementes. Maturação precoce, de abril a junho, com produções temporãs de dezembro a março.



Foto: Orlando Sampaio Passos

Figura 36. Tangelo 'Lee'. Rio de Contas, BA.

## Tangelo 'Robinson'

Origem: Flórida, EUA. Obtido do cruzamento tangerineira 'Clementina' x tangeleiro 'Orlando'.

Planta adulta (Figura 37) de porte alto, copa globosa, não típica de tangerineira. Fruto de tamanho médio, casca lisa e aderente, coloração externa e polpa laranja-avermelhada, com média de 17 sementes. Maturação precoce (abril a junho), sendo uma das primeiras a ser colhidas no pomar, o que recomendaria o seu uso, apesar do número elevado de sementes por fruto.



Foto: Orlando Sampato Passos

Figura 37. Tangelo 'Robinson'. Rio de Contas, BA.

## Pomeleiro 'Flame'

Origem: Flórida, EUA.

Planta adulta (Figura 38) de porte alto, copa arredondada. Fruto de tamanho grande, formato arredondado, média de cinco sementes; casca lisa, polpa avermelhada em razão da presença de licopeno. Maturação meia-estação, de maio a julho. Essa espécie encontra no Semiárido brasileiro as melhores condições para seu cultivo, como tem sido evidenciado em quadra experimental da Embrapa, em Juazeiro, BA.



Foto: Orlando Sampato Passos

Figura 38. Pomeleiro 'Flame'. Juazeiro, BA.

## Limoeiro 'Fino' (*C. limon*)

Origem: Espanha.

Planta adulta (Figura 39) de porte alto, copa arredondada. Fruto de tamanho médio, formato ovoide, média de zero a seis sementes; casca rugosa, de cor amarela e polpa esbranquiçada. Maturação meia-estação, de maio a julho. A exemplo do pomeleiro 'Flame', essa espécie também encontra no Semiárido brasileiro as melhores condições para seu cultivo, como tem sido mostrado em quadra experimental da Embrapa, no município de Juazeiro, BA.



Foto: Orlando Sampato Passos

## Citros ornamentais

Fruteiras ornamentais constituem importante alternativa no mercado da floricultura e do paisagismo, em razão de sua beleza diferenciada e multiplicidade de uso (SOUZA et al., 2005). Diversas espécies de citros (Figuras 40 a 47) caracterizam-se por seus frutos pequenos, com valor ornamental, os quais podem ser aplicados em diferentes arranjos, como o 'Calamondin' (*C. madurensis* Lour.), *C. amblycarpa* (Hassk.) Ochse, *Fortunella* spp. (kumquat), *Poncirus*, *Microcitrus* spp., *Severinia buxifolia* [(Poir.) Ten.], *Triphasia trifolia* (Burm. f.) P. Wilson (limoeiro de jardim), além de tipos híbridos, a exemplo dos limequat [limeira (doces e ácidas) x *Fortunella* spp.]. Espécies cítricas ornamentais já eram utilizadas em jardins chineses em 1000 a.C. Na Europa, por volta do século 12, eram também exploradas (DONADIO et al., 2005), notadamente na Itália, particularmente na metade do século 15 (CONTINELLA et al., 1994).

Há, contudo, um inconveniente no uso dos citros como plantas ornamentais, em razão da dificuldade que esse tipo de exploração comercial incorrerá em relação ao controle de pragas, com destaque, na atualidade, para o *huaglongbing* (HLB, *ex-greening*), terrível doença que vem trazendo sérios prejuízos à citricultura.



Foto: Orlando Sampato Passos

Figura 40. *Citrus madurensis* Lour. ('Calamondin'). Cruz das Almas, BA.



Foto: Fernância Virgíal Duarte Souza

Figura 41. *Citrus amblycarpa* (Hassk.) Ochse. Cruz das Almas, BA.



Foto: Orlando Sampaio Passos

Figura 42. *Fortunella* spp. (kumquat).  
Cruz das Almas, BA.

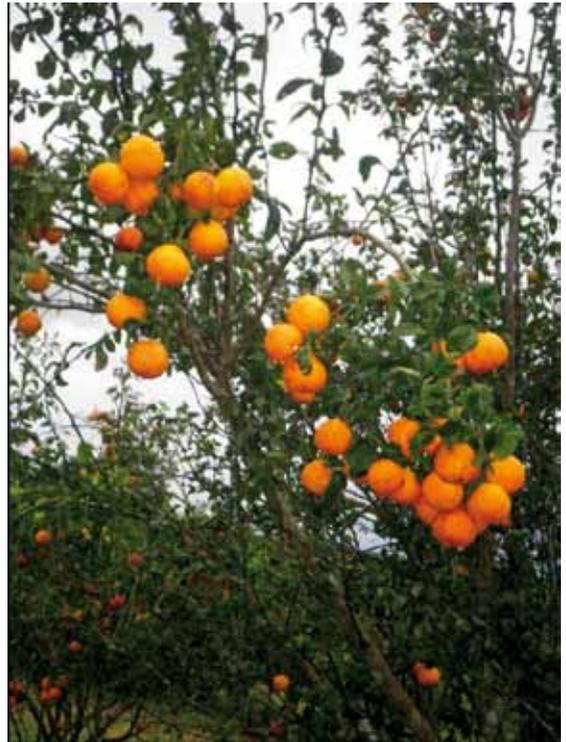


Foto: Orlando Sampalo Passos

**Figura 43.** Citrandarin 'Riverside' {híbrido de tangerineira 'Sunki' [*Citrus sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka] x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. seleção 'English'}, Cruz das Almas, BA.

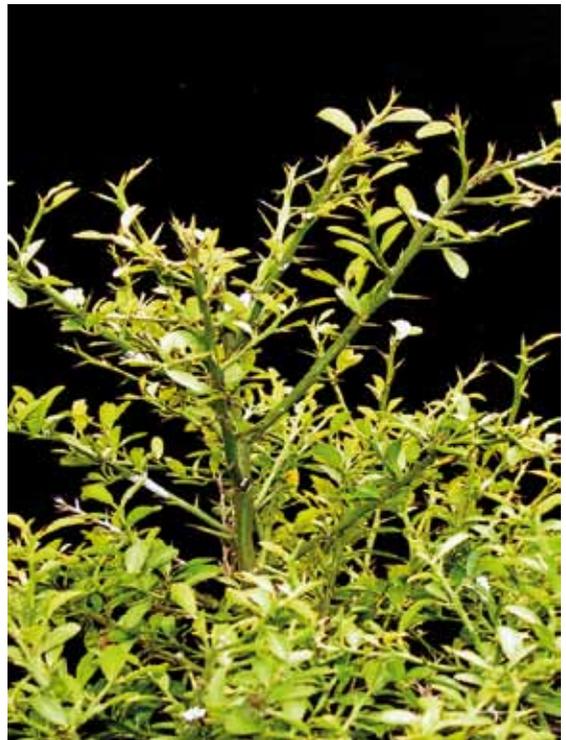


Foto: Fernanda Vidigal Duarte Souza

**Figura 44.** *Microcitrus* spp. Cruz das Almas, BA.



Foto: Orlando Sampato Passos

Figura 45. *Severinia buxifolia* [(Poir.) Ten.], Cruz das Almas, BA.



Foto: Orlando Sampato Passos

Figura 46. *Triphasia trifolia* (Burm. f.) P. Wilson (limoeiro 'de Jardim'), Cruz das Almas, BA.



Foto: Orlando Sampaio Passos

**Figura 47.** Tangerineira 'Sunki' [*Citrus sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka], Cruz das Almas, BA.

## Considerações finais

As informações contidas, neste capítulo, além de enfatizar o comportamento das cultivares nas condições tropicais, mostram a possibilidade de uma melhor diversificação da citricultura brasileira, conforme pode ser observado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Cultivares copa de citros predominantes no Brasil.

Estado	Copa
São Paulo	Laranja 'Pera' Tangerina 'Ponkan'
Bahia	Laranja 'Pera' Lima ácida 'Tahiti'
Sergipe	Laranja 'Pera'
Minas Gerais	Laranja 'Pera'
Rio Grande do Sul	Laranja 'Valência'
Paraná	Laranja 'Pera'
Pará	Laranja 'Pera'
Rio de Janeiro	Laranja 'Pera'

## Referências

- ALMEIDA, C. O. de. Oferta: ao sabor do mercado. **Agroanalysis**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 9, p. 33-35, 1999.
- CONTINELLA, G.; LA MALTA, G.; ROMANO, D. The utilization of citrus as ornamental plants in Italy. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 7., 1992, Acireale. **Proceedings...** Acireale: International Society of Citriculture, 1994. v. 1, p. 232-234.
- CUNHA SOBRINHO, A. P. da; PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. dos S. **Citricultura brasileira**: a necessidade de diversificar. Disponível em: <<http://w.w.agrocast.com.br/rumos/index.frm>>. Acesso em: 12 jan. 2000.
- DONADIO, L. C.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MOREIRA, C. S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e história da citricultura no Brasil. In: MATTOS JÚNIOR, D.; NEGRI, J. D. de; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico: Fundag, 2005. p. 1-18.
- PAREJA, L. C. **Polígono das secas**. Disponível em: <<http://n.i.uol.com.br/licaodecasa/ensfundamental/geografia/secaNE1.jpg>>. Acesso em: 26 out. 2010.
- PASSOS, O. S.; ALMEIDA, C. O. de; PEIXOUTO, L. S. Potencialidade da Chapada Diamantina para citricultura. **Bahia Agrícola**, Salvador, v. 7, n. 1, p. 32-36, 2005a.
- PASSOS, O. S.; CALDAS, R. C.; SANTANA, A. M.; RODRIGUES, E. M. Maturação das frutas cítricas no Estado da Bahia. In: CITROS: coletânea de pesquisas realizadas no Estado da Bahia. Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMPF, 1977. p. 3-20.
- PASSOS, O. S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da; SOARES FILHO, W. dos S. The Bahia orange and its place in the international citrus industry. **California Citrograph**, Riverside, v. 65, n. 1, p. 7-9, 1980.
- PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. dos S.; PEIXOUTO, L. S. **Variedades copa de citros para mesa**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2005b. 20 p (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Documentos, 154).
- REUTHER, W. Climate and citrus behavior. In: REUTHER, W.; WEBBER, H. J.; BATCHERLOR, L. D. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1973. v. 1, p. 280-337.
- SOUZA, F. V. D.; CABRAL, J. R. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; CASTELLAN, M. S.; RITZINGER, R.; PASSOS, O. S. Pesquisas em andamento com fruteiras ornamentais. In: SEMANA INTERNACIONAL DA FRUTICULTURA, FLORICULTURA E AGROINDÚSTRIA, 12.; FEIRA INTERNACIONAL DE FLORES & PLANTAS ORNAMENTAIS, 2005, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Instituto Frutal, 2005. 1 CD-ROM.



# Propagação

Almir Pinto da Cunha Sobrinho

Orlando Sampaio Passos

Walter dos Santos Soares Filho

Eduardo Augusto Girardi

## Introdução

Os citros vêm sendo cultivados desde épocas muito antigas, encontrando-se as primeiras referências às plantas cítricas na literatura chinesa, por volta de 2200 a.C. (DORNELLES, 1988). Uma versão romana da lenda de Hércules, da mitologia grega, faz alusão às maçãs ou pomos de ouro guardados por um dragão, que o herói deveria vencer no Jardim das Hespérides, frutos estes que, na verdade, referiam-se à cidra (*Citrus medica* L.) (COOPER, 1982). Essa espécie foi a primeira a ser conhecida pelos europeus, sendo citada já em 310 a.C. por Theophrastus (WEBBER et al., 1967).

Apesar da antiguidade do cultivo dos citros, sua propagação pela enxertia é prática relativamente recente. A propagação por semente predominou em todo o mundo até meados do século 19, quando a situação começou a mudar, principalmente em razão da ocorrência da doença fúngica conhecida como gomose ou podridão causada por *Phytophthora*, que forçou a utilização de porta-enxertos resistentes. No Brasil, somente no século 20 é que as plantas enxertadas tiveram seu uso generalizado (MOREIRA; MOREIRA, 1991).

Embora algumas espécies, como as laranjeiras doces [*C. sinensis* (L.) Osbeck] e os pomeleiros (*C. paradisi* Macfad.), multiplicadas por sementes resultem em populações com uniformidade razoável, apresentando indivíduos que reproduzem fielmente as plantas que lhes deram origem, em virtude da embriogenia nucelar, mutações importantes, como a da polpa de coloração vermelha dos pomelos, ocorrem com relativa frequência, podendo ser perdidas caso não identificadas e preservadas mediante a prática da enxertia. Por outro lado, espécies como as toranjeiras [*C. maxima* (Burm.) Merr.] e algumas tangerineiras, a exemplo da 'Clementina' (*C. clementina* hort. ex Tanaka), são monoembriônicas, e, dessa forma, o único embrião sexuado produzido deixa de reproduzir todas as características desejáveis da planta-mãe. Há que se considerar ainda a suscetibilidade de alguns pés-francos (plantas oriundas de sementes ou *seedlings*), especialmente de laranjeiras doces, aos fungos de solo causadores da podridão do pé e das raízes (*Phytophthora* spp.) e a certos nematoides (CASTLE; GMITTER JUNIOR, 1999). Esses fatos evidenciam ainda mais a importância da enxertia na propagação das plantas cítricas.

## Métodos de propagação

As plantas cítricas podem ser multiplicadas por sementes, alporquia, estaquia e enxertia.

**Sementes** – A multiplicação por sementes tem várias desvantagens, além das já citadas, e que são: os pés-francos apresentam início de produção tardio, implicando em um maior espaço de tempo para que se obtenha o retorno econômico do capital investido na implantação do pomar; a produção de frutos pode ser menor e errática; as plantas têm muitos espinhos e crescem bastante, dificultando a colheita e os tratos culturais.

**Alporquia** – Consiste na formação de uma planta forçando-se um ramo, que continua unido à planta-mãe, a emitir raízes mediante seu contato com solo ou outro substrato que estimule seu enraizamento, protegendo-se esse conjunto, de solo, substrato e ramo, com um invólucro, separando o ramo da planta-mãe após a formação de um sistema radicular capaz de prover a vida da nova planta.

**Estaquia** – É o processo em que se provoca a formação de raízes adventícias em qualquer parte do vegetal, quando esta é separada da planta original e colocada em um meio apropriado ao enraizamento. A cidreira, as limeiras ácidas [*C. aurantiifolia* (Christm.) Swingle; *C. latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka] e doces (*C. limettioides* Tanaka; *C. limetta* Risso), e os limoeiros verdadeiros [*C. limon* (L.) Burm. f.] enraízam com facilidade, porém o mesmo não acontece com as laranjeiras doces, os pomeleiros e as tangerineiras (diversas espécies).

Esses dois métodos, alporquia e estaquia, embora reproduzam fielmente as plantas originais e induzam frutificação precoce, têm como principal desvantagem a suscetibilidade da planta à podridão-do-pé e das raízes.

**Enxertia** – É o método de multiplicação que consiste em justapor tecidos de duas plantas, provocando sua soldadura com a finalidade de formar um novo e único indivíduo. Uma das plantas, o porta-enxerto, oferece o sistema radicular e a parte basal do tronco, enquanto a outra forma a parte aérea. A parte aérea, desenvolvida a partir de um fragmento (garfo, borbulha), é geneticamente idêntica à planta que se quer reproduzir, produzindo frutos com as mesmas características desta. Cabe, porém, fazer uma ressalva quanto à influência que a copa sofre do porta-enxerto e este da copa, além da importante interferência relacionada ao clima, ao solo, a pragas (termo genérico aplicado tanto a artrópodes-praga, como a doenças e plantas infestantes) e manejo do pomar sobre a combinação copa-porta-enxerto.

As técnicas de enxertia resumem-se a três – garfagem, encostia e borbulhia – das quais apenas a última é usada comercialmente na citricultura de todo o mundo. Nesse processo, faz-se a soldadura de um pedaço de casca com uma gema da variedade que se quer multiplicar em um porta-enxerto já enraizado.

## Importância da muda

Por razões diversas, a muda é o principal insumo na implantação de um pomar cítrico, embora, de uma maneira geral, essa importância seja relegada a um segundo plano em parte expressiva da citricultura brasileira. Somente nos últimos anos, com o recrudescimento de algumas doenças já existentes e o surgimento de novas, como a clorose-variegada-dos-citros (CVC) e o *huanglongbing* (HLB) (*ex-greening*), é que órgãos governamentais, citricultores e viveiristas estão dando a importância devida à produção e certificação da muda. As gemas (propagação de copas) e sementes (propagação de porta-enxertos) eram colhidas sem os devidos cuidados, não havendo nenhuma preocupação relativa à idoneidade genética das plantas fornecedoras desses propágulos, no tocante às variedades que estavam representando e tampouco de suas condições fitossanitárias. Aqui, a figura do viveirista credenciado, qualificado no sentido de garantir a produção de mudas com a qualidade exigida por uma citricultura de excelência, era desconsiderada. É recomendável, portanto, que as gemas e sementes sejam originárias de plantas-matrizes registradas, ou, na inexistência destas, de plantas reconhecidamente sadias, produtivas, com as características da cultivar que se deseja propagar.

Em passado não muito distante, o trânsito desse material propagativo era livre e especialmente as mudas eram comercializadas sem nenhuma fiscalização, situação esta que ainda se verifica em algumas regiões brasileiras. O cancro-cítrico foi introduzido no País por meio de mudas trazidas por imigrantes que aqui entraram pelo porto de Santos, em São Paulo. A leprose tem sido disseminada pelos estados das regiões Norte e Nordeste, antes livres dessa doença, em mudas procedentes da região Sudeste, comercializadas livremente, cabendo também destacar a aquisição, por órgãos governamentais, de mudas produzidas por viveiristas inidôneos, existindo até um caso extremo de introdução de leprose envolvendo convênio entre instituições governamentais do Nordeste e do Sudeste.

Na formação do pomar, deve-se levar em conta não apenas a boa qualidade genética e fitossanitária da muda, mas também o caráter permanente da cultura, que torna os erros cometidos de correção difícil ou impossível, já que as plantas demoram alguns anos para produzir e mostrar sua produtividade máxima e qualidade do fruto. Quanto à sanidade, inúmeros são os exemplos de doenças que as mudas podem disseminar, como a gomose causada por *Phytophthora* e outras, transmitidas pela enxertia, como a sorose, exocorte, xiloporose, tristeza, CVC, morte-súbita e HLB, este de introdução mais recente no País, agentes patogênicos que têm na muda um meio muito eficiente de disseminação.

## Escolha do porta-enxerto

Apesar de seu destacado papel, o porta-enxerto ainda não é admitido com a mesma importância da variedade copa, em virtude de, especialmente, ser esta a produtora dos frutos, finalidade

dos pomares, comerciais ou domésticos. A seleção do cavalo é complexa, envolvendo interações entre a parte aérea e as raízes da planta. Essa importância foi ressaltada por Finardi (1998), afirmando ele que, embora frequentemente a escolha da copa e do porta-enxerto seja feita como se ambos fossem constituir dois indivíduos separados e independentes, o comportamento da combinação é uma resposta conjunta de seus genótipos componentes e de suas interações, tanto entre si como com o meio ambiente. É fundamental o conhecimento desse comportamento antes da implantação do pomar, recomendando-se empregar mais de um porta-enxerto, especialmente se forem utilizadas diversas copas. Os porta-enxertos devem ser adaptados às condições de clima e solo da área e compatíveis com as cultivares a serem exploradas comercialmente.

## Origem e colheita das sementes

As sementes dos porta-enxertos devem ser colhidas de frutos totalmente desenvolvidos, que propiciam boa germinação, especialmente se forem de trifoliata e de seus híbridos, ser originárias de plantas sadias, vigorosas e típicas da variedade. Recomenda-se não utilizar frutos próximos ao chão, nem caídos ao solo, a fim de evitar a contaminação por fungos causadores de doenças na sementeira (tombamento, mela, *damping-off*) e problemas na conservação das sementes.

O corte do fruto para retirada das sementes pode ser manual ou mecânico. O manual, usado quando o número de frutos é pequeno, é feito cortando-se o fruto ao meio sem atingir as sementes, completando-se a separação das metades com uma torção das mãos. No mecânico, utiliza-se debulhadeira de milho ou picadora de cana-de-açúcar, neste caso trocando-se a faca por lâmina dentada. Existem máquinas apropriadas para extração das sementes, de alto rendimento e que causam pequeno ou nenhum dano a elas. As sementes não devem sofrer ferimentos e ser lavadas em água corrente ou por solução com cal para retirada da mucilagem que as envolve. A seguir, deve-se colocá-las para secar em camadas finas, preferentemente sobre pedaços de pano limpo e seco ou papel de jornal, em local ventilado e à sombra (BORGES et al., 2000; LEE; ROXBURGH, 1993; MEDINA, 1986; TEÓFILO SOBRINHO, 1991).

A Tabela 1 traz informações sobre alguns dos principais porta-enxertos comerciais.

## Tratamento e armazenamento das sementes

Quando a semeadura é feita logo após a retirada das sementes, basta tratá-las termicamente com água a 52 °C por 10 minutos, sendo a germinação neste caso uniforme e de quase 100%. Se for necessário armazená-las, recomenda-se seu tratamento com água quente, conforme já descrito, ou com fungicidas, embalando-as a seguir em sacos plásticos e conservando-as em local seco e fresco por curto período de tempo. Se for necessário armazená-las por maior período de tempo, deve-se guardá-las em geladeira, onde poderão permanecer por cerca de seis meses, ou melhor ainda em câmara fria, onde poderão ficar por mais de um ano, apesar da perda gradativa de poder germinativo.

**Tabela 1.** Número de sementes por fruto, quilograma ou litro de sementes de porta-enxertos de citros.

Porta-enxerto	Número de sementes		
	Por fruto	Por quilograma	Por litro
Limoeiro Cravo	9 a 15	16.000 a 18.000	8.500
Limoeiro Rugoso da Flórida	15 a 26	12.000	6.000
Laranjeira Azeda	25	6.500	2.500
Laranjeira Caipira	13 a 14	6.000 a 11.000	2.800 a 3.000
Tangerineira Cleópatra	9 a 18	9.000 a 12.000	5.800 a 6.000
Tangerineira Sunki	1 a 6	13.000 a 27.000	8.000
<i>Poncirus trifoliata</i>	31 a 40	5.000 a 5.500	3.500
Citrumelo Swingle	20 a 27	7.000	3.500
Citrango Troyer	15 a 17	5.000	2.500
Limoeiro Volkameriano	10 a 19	12.000	6.000
Limoeiro Cravo Santa Cruz	10 a 18	17.600 a 18.300	7.700 a 8.400
Tangerineira Sunki Tropical	10 a 17	9.600 a 11.300	4.200 a 5.000
Citrândarin Índio	20 a 24	7.000 a 8.800	3.000 a 4.000
Citrândarin Riverside	23 a 26	5.600 a 7.000	2.800 a 3.400
Citrândarin San Diego	12 a 18	8.400 a 9.700	4.000 a 4.200

Fonte: Carvalho (2001), Passos et al. (1977), Soares Filho (2002) e Teófilo Sobrinho (1991).

Durante o armazenamento, é conveniente efetuar inspeções periódicas e, se for constatado o início de proliferação de fungos, repetir toda a operação de tratamento, lavando e secando novamente as sementes, aplicando-lhes os fungicidas e, finalmente, embalando-as em sacos plásticos, antes de seu retorno à geladeira ou câmara fria.

## Viveiros em ambiente protegido

Nas regiões citrícolas mais avançadas do mundo, em áreas de ocorrência de doenças e de seus vetores, já há algum tempo os viveiros vêm sendo conduzidos, obrigatoriamente, em ambientes protegidos (telados e estufas plásticas), utilizando recipientes com substrato esterilizado, água de irrigação desinfestada e um rigoroso controle de pragas, visando à produção de mudas de alta qualidade genética e fitossanitária. A diversidade de pragas nas áreas citrícolas, em nível global, justifica a preocupação em mudar os sistemas de produção de mudas, mesmo que eles se tornem mais caros, porque as mudas são um veículo muito eficiente na disseminação de doenças na cultura dos citros. O uso de mudas sadias é medida imprescindível ao controle de doenças em novos plantios. O surgimento da CVC e do HLB no Brasil e sua rápida disseminação em áreas citrícolas do

território nacional foram e continuam sendo fatores determinantes para a implantação do sistema de produção de mudas em ambiente protegido (BRASIL, 2008).

## Localização

O local do viveiro deve ser de acesso controlado, próximo a fontes de água de boa qualidade para irrigação, evitando-se áreas onde existiam pomares ou hortas, em virtude da possibilidade de ocorrência de fungos causadores da gomose-de-*Phytophthora* e de nematoides prejudiciais aos citros. O solo deve ser profundo e bem drenado, areno-argiloso, plano, de modo a facilitar a instalação da infraestrutura do viveiro.

Apesar de protegidos, recomenda-se instalar os viveiros a certa distância de pomares cítricos e estradas movimentadas. No Rio Grande do Sul, segundo Oliveira et al. (2001), a distância mínima para produção de mudas certificadas é de 100 m, sempre a mais de 50 m de estradas públicas. Em São Paulo, a legislação estadual prevê distância mínima de 20 m de plantas cítricas (CARVALHO, 1998a). Sempionato et al. (1997) fizeram referência à instalação de viveiros à distância de 50 m de pomares e estradas públicas, em solo pouco declivoso, de preferência de exposição norte, evitando os ventos sul, frios.

## Estrutura

Os telados devem ter forma retangular, com os lados maiores na direção leste-oeste. É recomendável a instalação de quebra-ventos barrando os ventos dominantes, podendo-se usar espécies como a *Gliricidea* spp., sabiá ou sansão-do-campo (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.), *Calliandra* spp., *Grevillea* spp., *Casuarina* spp., *Pinus* spp. e jambolão (*Syzygium cumini* L.). Os quebra-ventos servem ainda como barreira mecânica de prevenção ao cancro-cítrico, nas regiões onde há ocorrência dessa doença. É interessante que toda a infraestrutura do viveiro esteja protegida também com cercas vivas. Os telados devem ter antecâmaras com duas portas, abrindo-se a interna apenas quando a externa estiver fechada, para dificultar a entrada de insetos-vetores de doenças. A antecâmara deve dispor de pedilúvio (local destinado ao banho dos pés calçados) contendo cal, oxiclreto de cobre ou amônia quaternária para desinfestação dos calçados. Em viveiros onde o controle da qualidade fitossanitária das mudas é mais rigoroso, existem vestiários com macacões e botas, que podem ser descartáveis, para uso de funcionários e visitantes. A utilização de cobertura plástica, além de facilitar o manejo fitossanitário e da irrigação, propicia o aumento da temperatura dentro do telado nos meses mais frios, favorecendo o desenvolvimento vegetativo das plantas (BORGES et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2001; SEMPIONATO et al., 1997).

Na construção das estufas, recomenda-se o emprego de estruturas que resistam a ventos fortes. No Brasil, têm sido usadas estruturas de vigas de aço galvanizado, consideradas mais práticas e econômicas, levando em consideração sua vida útil, de cerca de 25 anos (OLIVEIRA et al., 2001).

Alguns viveiristas estão optando por materiais mais baratos, como madeira, e outros ainda podem ser pesquisados, como tubos de aço galvanizado. A altura do pé-direito tem grande importância no controle da temperatura interna do telado, especialmente em regiões mais quentes, recomendando-se o mínimo de 4 m. O uso de sombrite (tela de sombreamento que tem como função principal a proteção das plantas contra o sol; são classificadas segundo a porcentagem de luz que bloqueiam) ou de outros materiais no teto pode amenizar os efeitos das altas temperaturas, sendo indicado especialmente em sementeiras na fase de germinação, quando as plântulas são mais sensíveis.

É interessante observar a existência de limites de temperatura máxima (a partir de 39 °C), que podem paralisar ou diminuir sensivelmente o desenvolvimento vegetativo dos citros, cuidado que devem ter, especialmente, os viveiristas de regiões mais quentes. Do mesmo modo, temperaturas abaixo de 13 °C podem exigir o uso de aquecedores ou cortinas laterais nas regiões de inverno frio. No Brasil, a malha das telas antiafídeos tem as dimensões de 0,87 mm x 0,30 mm, recobrando as laterais dos viveiros, sendo sua cobertura de polietileno transparente de 150 µm de espessura (Figura 1). A tela e a cobertura, se tratadas contra raios ultravioleta, podem durar até 5 e 3 anos, respectivamente, dependendo das condições climáticas e do manuseio das instalações (OLIVEIRA et al., 2001). A proteção com tela é necessária contra as cigarrinhas vetoras da bactéria causadora da CVC e o psílido *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), vetor das bactérias causadoras do HLB, e ainda contra pulgões. Para evitar a entrada de água de chuva, devem ser construídas muretas laterais de 30 cm a 50 cm de altura, onde a tela é afixada. O piso interior pode ser de pedra britada ou similar, em camada de pelo menos 5 cm de espessura, além da possibilidade de cobertura por rafia ou concreto.



Foto: Orlando Sampaio Passos

Figura 1. Viveiro com telado antiafídeos para produção de porta-enxertos e mudas de citros.

## Matrizes

A utilização de matrizes reconhecidas por sua qualidade genética e sanidade vegetal, como já comentado no item *Importância da muda*, vinha sendo negligenciada em virtude da inexistência de programas estaduais de certificação de mudas que exigissem o seu registro, como também pela falta de fiscalização de trânsito de material propagativo. Até o surgimento da clorose-variegada-dos-citros e do recrudescimento do cancro-cítrico em São Paulo, esse era o único estado que já havia feito uma tentativa de estabelecer um programa dessa natureza na década de 1960, mas que se tornou obsoleto com o decorrer dos anos. Vale ressaltar que a situação, em relação à qualidade

genética e fitossanitária dos pomares cítricos das principais áreas citrícolas brasileiras, não é ainda pior em virtude do predomínio de emprego de clones nucelares, livres das principais viroses transmissíveis pela enxertia.

Segundo Borges et al. (2000), nas condições brasileiras, as matrizes devem ser avaliadas visando à presença das doenças exocorte, sorose, xiloporose, declínio e CVC, destacando que as plantas microenxertadas, comprovadamente livres de patógenos e premunizadas contra estirpes fortes do vírus-da-tristeza, são o material mais confiável para estabelecimento de um programa adequado de matrizes de citros. Mais recentemente, essa avaliação passou a incluir o HLB. A sanidade carece de proteção para ser mantida, devendo as matrizes ficarem isoladas por telas à prova de afídeos, de modo a livrá-las dos vetores da tristeza, da CVC e do HLB (Figura 2). Essa exigência também se aplica em razão da ocorrência da morte-súbita-dos-citros, em áreas citrícolas dos estados de São Paulo e Minas Gerais, problema este provavelmente causado por vírus do complexo da tristeza, transmissíveis por pulgões.

Como nos demais telados, a estrutura de proteção das plantas-matrizes também deve ter uma antecâmara preventiva da entrada de insetos-vetores, com pedilúvio para desinfestação dos calçados, sendo recomendável a instalação de quebra-ventos para proteção de adversidades climáticas e ainda como uma barreira contra a entrada do cancro-cítrico, nas áreas onde há ocorrência da doença. Nesses casos, recomenda-se observar distância de 1.000 m entre os telados de matrizes e pomares de citros próximos, distância esta, portanto, maior que o raio mínimo de 200 m indicado na erradicação de focos de cancro-cítrico.

A fim de acompanhar a sanidade das matrizes, são feitas inspeções rotineiras com tomada de amostras para análise de material suspeito de contaminação por doenças, inclusive cancro-cítrico onde ele é endêmico. A avaliação e tomada de amostras para análise de CVC são efetuadas anualmente. Preferencialmente, o porta-enxerto utilizado deve ser o limoeiro 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck), para facilidade de comparação de características da planta e de frutos da copa, ainda servindo esse cavalo como indicador de exocorte, em casos de contaminação com esse viroide.



Foto: Orlando Sampaio Passos

Figura 2. Árvores matrizes de citros mantidas sob telado antiáfidos.

As matrizes destinadas à produção de sementes de porta-enxertos podem ser mantidas a céu aberto, devendo, contudo, ser submetidas periodicamente à indexação de viroses, declínio e CVC e avaliação de HLB. Em razão das vantagens do uso de porta-enxertos, como indução de início precoce de produção de frutos, resistência-tolerância a fatores bióticos e abióticos, deve-se evitar a produção de plantas-matrizes com base em pés-francos. Os cavalos empregados devem ter boa afinidade com as matrizes das cultivares porta-enxerto que sustentarão, além de adaptação ao ambiente em que serão cultivados. Castle et al. (1993) recomendam o uso de cavalos distintos das cultivares porta-enxerto a ser enxertadas para a formação de plantas-matrizes, de modo a permitir identificar, caso a copa seja danificada, se as brotações que surgirem são do cavalo.

## Blocos de gemas ou borbulheiras

Os blocos de gemas ou borbulheiras são uma espécie de viveiro onde as gemas ou borbulhas são produzidas, com a finalidade de multiplicar consideravelmente seu número, na menor área possível, e poupar as plantas-matrizes de um desgaste maior. Esses blocos devem também ser protegidos com telas antiáfideos, de modo a evitar a entrada de insetos-vetores e possuir antecâmara com pedilúvio, como os demais telados.

Os espaçamentos adotados variam em função da condução das mudas fornecedoras dos ramos de borbulhas – número de pernadas, uso de filas simples ou duplas, vigor do porta-enxerto e manejo. Deve-se atentar também para os benefícios da fertilização ou fertirrigação adequadas e das temperaturas, dentro de limites convenientes, sempre mais altas, favorecendo o desenvolvimento das plantas nessas estufas. Os primeiros blocos de borbulhas instalados na Espanha utilizaram o espaçamento de 0,70 m x 0,20 m, com bons resultados. Em São Paulo, Borges et al. (2000) referem-se a espaçamentos entre 0,30 m e 0,40 m em sistemas de filas simples ou duplas, separadas de 0,70 m a 1,0 m, visando à condução de plantas com dois ou três ramos, possibilitando a produção de até 200 borbulhas planta<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>, quando o bloco atinge o ponto de produção máxima. Segundo esses autores, plantas de haste única em espaçamentos mais adensados podem oferecer vantagens, propiciando produção máxima de gemas já no primeiro corte e colheitas a cada 80 dias. Na Bahia, a Embrapa Mandioca e Fruticultura tem empregado o espaçamento de 0,80 m x 0,40 m x 0,40 m, testando três, quatro e cinco pernadas, cujos resultados ainda estão sendo avaliados.

O porta-enxerto empregado dever ser preferencialmente resistente à gomose-de *Phytophthora*, porque o ambiente fechado e úmido pode favorecer o desenvolvimento desta e de outras doenças, em caso de introdução accidental. As plantas podem também ser mantidas em recipientes com substrato, variando de 4 L a 20 L, exigindo nesse caso maiores cuidados com a nutrição e irrigação. O emprego de material multiplicativo sadio, o uso de armadilhas e monitoramento constante, as pulverizações preventivas contra pragas no viveiro, ao lado de amostragens periódicas de material para análise em laboratório, relativamente à CVC e, em casos de suspeita, ao HLB e cancro-cítrico, em áreas de ocorrência dessas doenças, devem ser práticas rotineiras para

garantia de sanidade das gemas. O Programa de Plantas Matrizes de Citros do Estado de São Paulo exige a distância mínima de 1.000 m de focos do cancro-cítrico (CARVALHO, 1998a, 2001).

## Estágio de sementeira

As sementes devem ser de procedência conhecida, de plantas reconhecidamente sadias e produtivas e, no caso de mudas certificadas, provenientes de plantas-matrizes registradas. Essas matrizes podem ser mantidas a céu aberto, mas, quando estabelecidas no campo, no caso de mudas certificadas, devem ser indexadas para viroses e declínio a cada cinco anos e anualmente para CVC, além de inspecionadas para HLB e cancro-cítrico, antes da retirada das sementes (BORGES et al., 2000).

O viveirista poderá produzir suas sementes, o que é preferível, por medida de segurança, formando campos com material multiplicativo proveniente de material básico de instituições de pesquisa. Mais detalhes sobre a origem e retirada, tratamento e armazenamento das sementes são vistos em itens específicos, no início do capítulo.

O viveirista pode optar por adquirir os porta-enxertos de viveiros idôneos, exigindo, neste caso, os documentos regulamentados que comprovem a procedência e origem do material, variedades e número de plantas, além da idoneidade fitossanitária.

A semeadura pode ser feita em bandejas de isopor, nas embalagens definitivas, sendo mais utilizados atualmente tubetes de forma cônica, de 50 cm<sup>3</sup>, com estrias paralelas longitudinais, a fim de orientar as raízes para o fundo, que é aberto. Essa abertura ocasiona a morte do meristema da raiz pivotante e a conseqüente poda aérea dessa raiz, já que os tubetes estão suspensos acima do solo, e as extremidades das raízes expostas ao ar, o que força a emissão de raízes secundárias, propiciando maior desenvolvimento do sistema radicular que as sementeiras tradicionais no solo (CARVALHO, 2001). Os tubetes são os recipientes mais utilizados em virtude das facilidades de manuseio, permitindo uma melhor seleção e uniformização dos lotes de *seedlings*. Os tubetes são dispostos em bandejas plásticas perfuradas, suspensas sobre cabos com esticadores ou em telas de metal galvanizado, fixadas em estacas de madeira ou concreto (CARVALHO, 1998b) (Figura 3). Após o uso, as bandejas e os tubetes devem ser



Foto: Orlando Sampaio Passos

Figura 3. Produção de porta-enxertos de citros em tubetes sob telado antiafídeos.

desinfestados por tratamento térmico ou com produtos químicos, sendo que Feichtenberger (1998)

recomenda hipoclorito de sódio a 1%, enquanto Sempionato et al. (1997) aconselham oxiclureto de cobre e fungicidas.

Deve-se semear de uma a três sementes, em função da cultivar, da taxa de poliembrionia e da porcentagem de germinação, que depende do tempo da colheita e de armazenamento da semente. A profundidade de semeadura pode variar de 1,5 cm a 3,0 cm. A sementeira pode ser conduzida no mesmo telado onde são formadas as mudas ou em outro utilizado exclusivamente para tal finalidade, o que é considerado mais indicado, por separar e facilitar as tarefas.

Recomenda-se utilizar de três a quatro vezes mais sementes que o número de mudas que se pretende formar, a fim de propiciar a germinação do maior número possível de sementes, de modo a permitir uma boa seleção de cavaleiros adequados à enxertia, elegendo-se aqueles típicos da cultivar porta-enxerto, eliminando-se os *seedlings* atípicos, em geral de origem zigótica, e aqueles pouco desenvolvidos. Essas variações dependem do porta-enxerto utilizado e são de ocorrência maior naqueles com taxa de poliembrionia mais baixa, como o limoeiro 'Cravo', em relação ao qual o descarte de cavaleiros pode chegar a 60%. Uma técnica que acelera a germinação, favorecendo também sua uniformidade, consiste na retirada manual do tegumento externo da semente (testa), após o tratamento com produtos abrasivos ou cáusticos. Essa prática é empregada na ocasião da semeadura, e deve-se levar em conta que é uma operação trabalhosa (BORGES et al., 2000; GIRARDI et al., 2007; TOLLEY, 1981). Nesse caso, pode-se fazer uso de panos de algodão e materiais abrasivos, como fubá, para a compressão das sementes de modo a descascá-las mais facilmente.

## Condução dos *seedlings*

Cerca de 20 dias após a emergência dos *seedlings* é feita a primeira seleção, descartando-se o excesso de plantinhas e aquelas que não apresentem as características da variedade, devendo-se também retirar os tubetes cujas sementes não germinaram, conforme Sempionato et al. (1997). Esses autores recomendam que seja iniciada a fertilização dos porta-enxertos logo após essa seleção, com adubações foliares de NPK e micronutrientes. Uma segunda seleção deve ser realizada por volta de 30 dias depois da primeira, quando se tem a oportunidade de agrupar os porta-enxertos por tamanho, descartando-se os que estiverem fora do padrão. Como já foi dito, os tubetes podem ser reutilizados após desinfestação, enquanto algum substrato restante deve ser encaminhado a outras finalidades que não incluam a produção de mudas de citros. Os *seedlings* devem ser conduzidos com haste única, realizando-se desbrotas laterais constantes.

## Substratos e fertilização

Os substratos devem possuir certas características físicas e químicas, como porosidade, leveza, capacidade de retenção de água, boa drenagem, boa consistência e ausência de patógenos do solo, especialmente fungos causadores da gomose-de-*Phytophthora* e de fitonematoides dos

citros. Não podem conter, também, componentes sujeitos à fermentação, sementes ou propágulos de ervas daninhas. O substrato deve ser ainda relativamente livre de sais, já que a salinização, proveniente da água de má qualidade, lixiviação inadequada ou aplicação excessiva de fertilizantes, é um dos maiores problemas nos viveiros. Quando não é usada a fertirrigação, deve-se tamponar o substrato de forma a evitar mudanças do pH que insolubilizem os nutrientes; o substrato necessita ter também alta capacidade de troca de cátions, a fim de manter os nutrientes em nível satisfatório por um período razoável de tempo (CARVALHO, 2001; LEE; ROXBURGH, 1993; OLIVEIRA et al., 2001). O manejo do substrato, especialmente no que se refere à irrigação, deverá estar de acordo com as características dos materiais utilizados em sua composição.

No Brasil, a maioria dos viveiros tem utilizado substratos existentes no comércio, constituídos de casca de *Pinus* spp., fibra de coco, palha de arroz, bagaço de cana-de-açúcar, serragem, vermiculita, perlita, argila expandida, húmus e turfa, embora o viveirista possa produzir seu próprio substrato, tendo sempre o cuidado com a qualidade, o custo e a facilidade de obtenção do material. Antes da distribuição do substrato nos recipientes, é aconselhável que se faça a análise de sua fertilidade, seguida de eventual correção, essencial ao desenvolvimento das plantas. A aplicação de nitrogênio (N), fósforo (P) e cálcio (Ca) é necessária na fase de sementeira, devendo-se empregar o P antes da semeadura, e os outros em cobertura, com formulações de liberação lenta, ou via fertirrigação, semanalmente. A suplementação com fertilizantes fosfatados contendo Ca, como o superfosfato simples ou fosfato natural, tem mostrado efeito positivo no desenvolvimento de porta-enxertos em tubetes (CARVALHO, 2001; OLIVEIRA et al., 2001).

Segundo Carvalho (2001), resultados de pesquisa comprovam a necessidade de adubação nitrogenada para que seja atingido mais rapidamente o ponto de repicagem dos *seedlings*. A aplicação desse nutriente, sob diferentes formas, com maior frequência e em pequenas doses, demonstrou ser mais efetiva, repondo as perdas por lixiviação provocada pelas regas frequentes. Nesse caso, as doses e a frequência de sua aplicação dependem do tipo de fertilizante usado, podendo ser empregados o nitrato de potássio, nitrato de cálcio, monoamônio fosfato e outros fertilizantes solúveis mais completos, em aplicações semanais de 1 g L<sup>-1</sup> a 3 g L<sup>-1</sup> em sistema de fertirrigação. Conforme esse autor, fertilizantes de liberação lenta são muito interessantes, existindo diferentes formulações e períodos de liberação dos nutrientes às plantas. Durante o crescimento das plantas, esses fertilizantes propiciam menores perdas por lixiviação e maior concentração de N nos tecidos das plantas, em relação aos adubos de alta solubilidade, podendo resultar em maior crescimento dos porta-enxertos.

## Irrigação

A germinação das sementes e o desenvolvimento inicial dos *seedlings* requerem regas que podem ser feitas com regadores de chuva fino, mangueiras com bico tipo chuva ou aspersores, tomando-se o cuidado de não descobrir as sementes. Quando as folhas começam a se sobrepor,

deve-se ter o cuidado de regar as plantinhas de modo a molhar o substrato, operação que pode ser dificultada por essa sobreposição. A água deve ser proveniente de poço artesiano, avaliando-se a presença e o teor de sais, ou tratada com cloro ativo, na concentração de 3 mg L<sup>-1</sup> a 5 mg L<sup>-1</sup>, de modo a inativar possíveis zoósporos de *Phytophthora*, fungo causador de gomose que pode ocorrer no colo da planta, causando exudação de goma, ou atacar as raízes fibrosas (CARVALHO, 1998b; FEICHTENBERGER, 1998). Como o cloro é tóxico, deve-se evitar sua concentração excessiva.

Recomenda-se regar os tubetes diariamente ou sempre que necessário, procurando-se não encharcá-los. A fim de proporcionar o desenvolvimento ótimo das plantas no viveiro, é essencial estabelecer um programa bem balanceado de fertilização. A fertilização insuficiente pode resultar na falta de crescimento das plantas, enquanto que em excesso causa salinização, paralisação do crescimento e até mesmo a morte (LEE; ROXBURGH, 1993).

## Pragas

Dentre os artrópodes-praga de ocorrência na sementeira e no viveiro, encontram-se ácaros e cochonilhas. O minador-das-folhas (*Phyllocnistis citrella* Stainton) interfere significativamente no crescimento normal da planta e, por isso, exige cuidado especial. Quanto às doenças, as mais comuns na sementeira são o tombamento ou mela (*damping-off*), verrugose e alternária. A gomose-de-*Phytophthora* deve ser manejada de forma preventiva em viveiros. Informações específicas sobre pragas e seu controle são vistas nos capítulos referentes à fitossanidade.

## Seleção e classificação dos cavaleiros

Em ambiente preferencialmente sombreado, os porta-enxertos são separados em grupos, segundo o tamanho e vigor. Os fora de padrão, ou seja, menores, mal formados e raquíticos, com folhas de formato diferente da variedade, devem ser eliminados. O plantio apenas dos indivíduos maiores e médios, separadamente, permite a uniformização do viveiro e racionaliza operações posteriores, como a enxertia e seleção de mudas. Preferencialmente, deve-se manter o substrato aderido ao sistema radicular dos porta-enxertos para reduzir o estresse da transplantação.

## Toalete das raízes

Teófilo Sobrinho (1991) recomenda, no caso de transplantação de porta-enxertos cujos caules tenham de 10 cm a 20 cm de comprimento, podar apenas as raízes, reunindo-os em feixes e cortando as pontas destas com tesoura bem afiada, evitando assim que as raízes se dobrem ou se enrolem dentro da cova na sacola, o que resultaria em mudas defeituosas.

## Transplantação

Os porta-enxertos podem ser transplantados dos tubetes para os recipientes definitivos, onde será completada a formação da muda, quando atingirem 10 cm a 15 cm de altura mínima, o que pode ocorrer entre 3 e 5 meses da sementeira, a depender da cultivar, época do ano e dos tratamentos culturais empregados (Figura 4). A transplantação deve ser efetuada com o substrato aderido, a fim de manter a integridade do sistema radicular, o que propiciará melhor desenvolvimento dos cavaleiros em função de um menor estresse de transplantação. Contudo, as plantas com colos (colo: zona de transição entre a raiz e o caule da planta) defeituosos, a exemplo daqueles excessivamente curvados com aspecto de cadeirinha, devem ser eliminadas.

O recipiente definitivo das mudas cítricas deve ter as dimensões mínimas de 10 cm de largura por 30 cm de altura, podendo ser de polietileno ou de plástico rígido. Os recipientes rígidos, com cerca de 14 cm de diâmetro por 35 cm de altura, são comercialmente conhecidos como citrovasos e citropotes, podendo apresentar vantagens em relação aos sacos plásticos ou sacolas, por possuírem estrias longitudinais que orientam o crescimento das raízes em direção ao fundo do vaso, evitando seu enovelamento.

Para que ocorra a poda aérea da raiz pivotante e conseqüente maior desenvolvimento de raízes laterais, é necessário que os vasos permaneçam sobre bancadas com altura mínima de 40 cm e ventilação na parte inferior. As chamadas sacolas plásticas, sanfonadas e perfuradas, têm custo menor que os vasos, são descartáveis e, portanto, após sua utilização, não exigem lavagem ou desinfestação, podendo, contudo, rasgar com certa facilidade, além de sujeitar as mudas ao enovelamento de raízes, especialmente se as plantas permanecerem por tempo demasiado no recipiente (CARVALHO, 2001; GRAF, 1999; OLIVEIRA et al., 2001). Nesse caso, é aconselhável podar o fundo das sacolas em cerca de 2 cm, antes do plantio em campo, de modo a eliminar possíveis raízes defeituosas. Sacolas de polietileno, com 25 cm de largura por 40 cm de comprimento, perfuradas para drenagem da água, são as mais comumente utilizadas, embora recipientes com diferentes volumes (3 L a 10 L) sejam empregados.

Conforme já mencionado, as bancadas onde são dispostos os recipientes devem ficar no mínimo a 40 cm de altura do solo, podendo essa altura estender-se a 60 cm, situação esta que melhor



Foto: Orlando Sampallo Passos

Figura 4. Porta-enxerto de citros adequado para transplantação em sacolas.

protegerá as mudas de respingos do solo, facilitando também o trabalho dos funcionários. Podem ser construídas com aço galvanizado, madeira, ferro, cimento, usando-se blocos e vigas de lajes pré-moldadas. Estas podem constituir excelentes bancadas para a arrumação dos recipientes em filas. Geralmente, recomenda-se arrumar os recipientes em grupos de quatro, seis, oito ou dez filas ao longo das bancadas, cabendo ao viveirista eleger o número que mais lhe facilite os trabalhos, ventilação e irrigação. O espaçamento entre bancadas, para melhor manuseio das mudas, deve ser de 40 cm a 60 cm; áreas de circulação cimentadas facilitam a movimentação de pessoas e operações de limpeza. Levando-se em conta essas áreas, o tamanho e número de linhas dos vasos por bloco, podem ser produzidas de 25 mudas a 35 mudas por m<sup>2</sup> de viveiro (CARVALHO, 2001; OLIVEIRA et al., 2001).

## Estágio de viveiro

Na transplantação dos cavalinhos para os recipientes definitivos, o colo das plantas deve ficar ao nível da superfície do substrato, procurando manter a distribuição de suas raízes segundo a forma como estavam nos tubetes, completando-se o enchimento das sacolas ou vasos com substrato, comprimindo-o suavemente com um chuçó, entre as raízes e ao seu redor, evitando assim a formação de bolhas de ar e dando firmeza às plantas. A transplantação nas sacolas deve ser cuidadosa, de modo a evitar deformações no sistema radicular dos porta-enxertos. Recomenda-se molhar abundantemente o viveiro nos primeiros dias após essa operação (Figura 5).



Foto: Otávio Sampaio Passos

Figura 5. Porta-enxertos de citros após transplantação em sacolas sob telado antiáfídeos. Notar o uso de bancadas suspensas e brita sobre o piso.

## Substratos

O que foi dito no item *Estágio de sementeira* relativamente aos substratos é válido também para a fase de viveiro. Carvalho (2001) afirmou que a suplementação do substrato, com fertilizantes fosfatados contendo fósforo e cálcio, também é importante para a formação de mudas cítricas enxertadas em vasos, da mesma forma que influencia o desenvolvimento dos *seedlings* em tubetes. Esse autor comentou, também, que formulações mais completas, assim como os fertilizantes de liberação lenta ou controlada, podem ser utilizados no manejo dos porta-enxertos e de mudas nos vasos. A fibra de coco e a casca de *Pinus* spp. decomposta são as principais matérias-primas utilizadas na formulação de substratos no Brasil,

embora haja outros materiais aptos a essa finalidade, conforme a localidade do viveiro. No caso da casca de *Pinus* spp., deve-se atentar para o estado de compostagem e de hidratação do substrato a fim de evitar efeitos deletérios sobre as mudas, pois esse material está sujeito à decomposição no recipiente, caso o processo não tenha sido bem conduzido durante sua fabricação, e à dificuldade de retenção de água, caso seja submetido à secagem excessiva.

## Irrigação

Alguns tipos de irrigação podem ser empregados, como aquele com mangueira, considerado mais trabalhoso, porém que proporciona controle versátil do volume de água, dosado em função do porte da planta. A irrigação por aspersão deve ser realizada com cuidado, procurando-se molhar devidamente o substrato, o que pode ser dificultado pelo sombreamento causado pelas próprias mudas. A localizada, por gotejo, vaso a vaso, é tida como mais vantajosa, porque evita o excesso de umidade na parte aérea da planta, e a lavagem de defensivos, permitindo ainda a adição de fertilizantes solúveis à água de irrigação (fertirrigação), barateando as operações, embora seja a modalidade de irrigação que exige maiores investimentos iniciais. A irrigação por gotejo também evita o respingo e a contaminação dos vasos vizinhos por eventuais esporos de fungos. É interessante monitorar frequentemente a qualidade da água, recomendando-se seu tratamento com cloro a  $5 \text{ mg L}^{-1}$  (CARVALHO, 2001; OLIVEIRA et al., 2001).

As modernas práticas de irrigação buscam a aplicação controlada da água, evitando-se excesso de umidade no substrato e no viveiro como um todo, uma vez que as plantas cítricas toleram bem a deficiência hídrica moderada. Contudo, no manejo da água, em momentos críticos do ciclo de produção, como durante a enxertia e a transplantação, deve-se evitar que seu suprimento se dê em níveis aquém do ideal.

## Adubação

A fim de proporcionar o desenvolvimento ótimo das plantas nos recipientes, é essencial estabelecer um programa adequado de fertilização. Esta, quando insuficiente, resulta em crescimento pobre, enquanto a excessiva causa salinização, podendo levar à paralisação do crescimento, à manifestação de clorose e, até mesmo, à morte das plantas (LEE; ROXBURGH, 1993).

A aplicação de nutrientes deve ter início após a verificação da pega dos cavaleiros, levando-se em conta a composição do substrato e o comportamento das cultivares nos recipientes. Alguns autores recomendam a aplicação semanal de formulações líquidas de macro e micronutrientes via foliar, até a enxertia (SEMPIONATO et al., 1997). É aconselhável efetuar análises foliares e do substrato, que propiciarão adubação mais equilibrada, de acordo com as necessidades das plantas, essencial a um programa balanceado de fertilização.

Em substratos inertes, cabe à adubação fornecer todos os nutrientes necessários ao crescimento das mudas de citros (MILNER, 2002). A fertilização com N, Ca, P, K, B e Cu, quando aplicada adequadamente, tem efeitos positivos significativos sobre a nutrição e o crescimento (BERNARDI et al., 2000; REZENDE et al., 1995; SOPRANO; BRITO, 1997). Atualmente, há muitas pesquisas acerca da nutrição mineral e níveis de adubação, dirigidas ao cultivo de variedades cítricas em recipientes, sendo os resultados bastante variáveis de acordo com espécie cultivada, tipo de substrato, características climáticas, práticas culturais no viveiro e tipo de fertilizante aplicado (BATAGLIA et al., 2008; CARVALHO et al., 2000; DECARLOS NETO et al., 2002; ESPOSTI; SIQUEIRA, 2004; GIRARDI et al., 2005).

Bernardi et al. (2000) observaram que melhores respostas para produção de mudas de laranja 'Valência' (*C. sinensis*) sobre limoeiro 'Cravo' foram obtidas com a aplicação manual em cobertura de, respectivamente, 9,85 g, 2,86 g e 7,99 g por planta de N, P e K, ao longo de um ciclo de produção de 300 dias, utilizando nitrato de amônio, superfosfato triplo e cloreto de potássio como fontes de nutrientes. Bataglia et al. (2008) recomendam uma solução nutritiva genérica compreendendo N (200 mg L<sup>-1</sup>), P (18 mg L<sup>-1</sup>), K (152 mg L<sup>-1</sup>), Ca (140 mg L<sup>-1</sup>), Mg (29 mg L<sup>-1</sup>) e S (21 mg L<sup>-1</sup>), considerando-a adequada à obtenção de mudas de citros em substrato, baseando-se na análise Sistema Integrado de Diagnóstico e Recomendação (Dris) e na composição mineral de populações de referência. A composição do substrato também deve ser levada em conta para ajustes dessas concentrações.

## Condução dos porta-enxertos

O cavalinho deve crescer com haste única; e, para que isso ocorra, a eliminação de brotações laterais deve ser feita sempre que necessário, em estágio inicial, que permita sua retirada manualmente, evitando que engrossem e dificultem sua eliminação, provocando ferimentos e deixando cicatrizes que consomem energia da planta.

A eliminação de folhas e espinhos até cerca de 30 cm do colo da planta, para facilidade de execução da enxertia, deve ser feita no mesmo dia dessa operação, porque, se efetuada antes, pode haver uma reação do porta-enxerto, dificultando o desprendimento de sua casca. As desbrotas no porta-enxerto devem ter continuidade, realizando-as, conforme já indicado, logo após seu surgimento, a fim de que sua haste cresça lisa e ereta. As brotações, vale repetir, devem ser retiradas manualmente e quando ainda tenras, a fim de que não fiquem cicatrizes; brotações laterais causam perdas de nutrientes e energia, retardando o melhor desenvolvimento dos porta-enxertos.

## Enxertia

A enxertia pode ser efetuada quando os porta-enxertos atingirem o diâmetro de um lápis (diâmetro superior a 0,5 cm) e estejam dando casca, isto é, quando a casca se destaca com facilidade do lenho. Para que isso aconteça, é necessário que o viveiro seja irrigado. O tempo para que esse

diâmetro seja alcançado depende de vários fatores, como época do ano, além das espécies utilizadas e especialmente do manejo que é dispensado ao viveiro, desde a sementeira. Estima-se que três a cinco meses sejam suficientes para os cavalos alcançarem essa medida, tempo que pode ser encurtado se forem dispensados os cuidados necessários, mediante irrigação eficiente, controle de pragas e, especialmente, se forem utilizados substratos e fertilização ou fertirrigação apropriados.

## Origem da borbulha

As borbulhas, ou gemas, devem provir de plantas-matrizes ou borbulheiras sadias e indexadas, vigorosas, de alta produtividade e com frutos característicos da cultivar. As plantas-matrizes e borbulheiras devem ser mantidas sob ambiente protegido, adotando-se cuidados similares ou até mesmo mais rigorosos que aqueles despendidos às mudas enxertadas (Figura 6). As borbulhas podem ser obtidas de ramos roliços ou de ramos angulosos, em ambos os casos propiciando o mesmo desenvolvimento e vigor às mudas, desde que maduros.



Foto: Oriando Sampaio Passos

Figura 6. Borbulheira de citros mantida sob telado antiaáfídeos.

## Tratamento e armazenamento da borbulha

Depois de cortados e desfolhados, os ramos que fornecerão as borbulhas devem ser envolvidos em pano ou papel de jornal e acondicionados em local fresco ou caixas térmicas, com camadas umedecidas de pó de serra ou areia esterilizada. Assim tratadas, as gemas permanecem viáveis por cerca de oito dias. Se for necessário um maior tempo de armazenagem, os ramos envolvidos da maneira descrita devem ser guardados em geladeira, dentro de sacos plásticos bem fechados. Maior tempo de armazenamento é possível em câmaras frias, devendo os ramos ser tratados previamente com fungicidas. Nesse processo, devem-se fazer inspeções periódicas dos pacotes; e, caso constatada a proliferação de fungos, os ramos devem ser lavados, tratados e guardados novamente, em geral por três a seis meses. Em geral, cabe acrescentar, borbulhas frescas, recém-coletadas da planta-matriz, resultam em pegamento da enxertia mais elevado.

## Execução da enxertia (borbulhia)

A borbulhia consiste na justaposição de uma gema sobre o porta-enxerto, processo este mais usado em todo o mundo na propagação dos citros (Figura 7).



Fotos: Orlando Sampalo Passos

Figura 7. Coleta de borbulha (A) e operação de enxertia (B) em citros.

Dois tipos semelhantes podem ser empregados, os chamados T normal e T invertido, descritos sumariamente a seguir:

**T normal** – Com um canivete de enxertia bem afiado, faz-se uma incisão transversal de cerca de 1 cm a 2 cm e outra, perpendicular a esta, de 2 cm a 3 cm, formando um T. A borbulha é retirada do ramo em sua posição invertida e introduzida no corte de cima para baixo, segura pelos lados ou pelo pecíolo, cortando-se o excesso, e fazendo-se a amarração com fita plástica também de cima para baixo, firmemente.

**T invertido** – O método difere na posição do corte horizontal, que fica na base do longitudinal, na posição normal do ramo para retirada da gema, na introdução da gema e na amarração da fita, feitas de baixo para cima. Esse método tem a vantagem de dificultar a penetração da água de irrigação e facilitar a operação.

O corte da fita é feito passados 15 a 20 dias da enxertia, reconhecendo-se as gemas pegadas pela cor verde natural e as mortas pela coloração marrom. Podem-se utilizar fitas degradáveis, que dispensam sua retirada. Caso as gemas estejam mortas, repete-se a enxertia no lado oposto, abaixo ou acima da anterior. A altura da enxertia vai de 10 cm a 30 cm do colo da planta, recomendando-se as enxertias mais altas quando as variedades são mais suscetíveis à gomose-de-*Phytophthora*, como a limeira ácida 'Tahiti' [*C. latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka] e os limoeiros verdadeiros ('Siciliano', 'Eureka')

e outros). Embora nos trópicos não existam estações bem definidas e a enxertia possa ser feita em qualquer ocasião, desde que haja circulação de seiva no porta-enxerto, a época mais recomendada para essa operação é a primavera, período de maior brotação das plantas. Sua realização em dias com temperaturas muito elevadas pode resultar em menor taxa de pegamento.

## Forçamento da brotação do enxerto

São usados diferentes processos para acelerar a brotação do enxerto, descritos a seguir, empregados três a cinco dias após a retirada da fita ou mesmo logo após a enxertia e amarração:

**Corte total ou decotamento** – O porta-enxerto é cortado de 5 cm a 8 cm acima da borbulha, servindo o toco remanescente como primeiro tutor da brotação. Esse processo resulta em elevada porcentagem de brotação do enxerto, porém seu crescimento é menor.

**Curvamento do porta-enxerto, sem corte** – A haste é curvada, amarrando-a à haste do porta-enxerto à sua frente ou a seu próprio colo, tendo-se o cuidado de permitir que a gema fique próxima ao topo da curvatura. Esse método, por não ser traumático, no sentido de não impedir a continuação da translocação de fotoassimilados do porta-enxerto encurvado ao enxerto, pode antecipar a formação da muda em um ou dois meses (Figuras 8 e 9).

Foto: Orlando Sampaio Passos



Foto: Orlando Sampaio Passos

**Figura 8.** Proteção da enxertia com fita plástica e encurvamento do porta-enxerto de citros.

**Figura 9.** Desenvolvimento do enxerto da variedade copa e encurvamento do porta-enxerto de citros.

**Curvamento do porta-enxerto, com corte** – Faz-se um corte 5 cm acima do enxerto e do mesmo lado dele, tombando-se a seguir a haste para o lado oposto. Quando se realiza o curvamento do porta-enxerto, com ou sem corte, em geral a parte aérea do porta-enxerto é podada logo acima da brotação do enxerto, imediatamente após a maturação do seu primeiro fluxo de crescimento, cerca de 60 dias após a enxertia, tratando-se o corte com fungicida.

Teófilo Sobrinho (1991) fez referência a um anelamento em toda a circunferência do cavalo, 2 cm acima do ponto de enxertia, como sendo um processo de forçamento utilizado em alguns viveiros do Estado de São Paulo, aplicado em mudas com dificuldade de brotação da enxertia. As orientações para a desbrota do porta-enxerto curvado ou decotado são similares às descritas anteriormente, sendo as primeiras semanas após a enxertia período crítico para essa operação.

## Condução da brotação do enxerto, tutoramento e padrão da muda

Quando o broto do enxerto atinge cerca de 5 cm, deve-se amarrá-lo à parte remanescente do porta-enxerto (toco) acima do enxerto, podendo-se também já utilizar o tutor, ao invés de usá-lo apenas quando a brotação atingir um tamanho maior, por volta de 20 cm. Os tutores podem ser feitos de varas finas e taquara, de tiras finas de bambu, de metal ou de outro material que possa substituí-los. O tutor deve ter 90 cm de comprimento e ficar com 50 cm a 60 cm fora do substrato, marcando a altura de desponte de cultivares de laranja, limão e pomelo, e 40 cm a 50 cm para desponte de cultivares de tangerina. À medida que cresce, a brotação vai sendo amarrada ao tutor para que se desenvolva verticalmente, fazendo-se as desbrotas laterais necessárias a uma condução em haste única, até 60 cm ou 70 cm do solo (Figura 10). Essas desbrotas são feitas até que a haste esteja madura e sofra o corte (desponte) para formação da copa, se for o caso, ou para formar a muda sem copa, tipo vareta ou palito.



Foto: Orlando Sampaio Passos

Figura 10. Tutoramento de enxertos em mudas de citros sob telado antiáfídeos.

Após o primeiro fluxo de brotação do enxerto, cerca de 90 dias após a enxertia, é comum a prática de seleção de mudas por tamanho nas bancadas, para fins de uniformização das plantas. Espera-se que ao menos 75% das mudas de um mesmo lote atinjam tamanho suficiente para o plantio em campo com apenas um fluxo de brotação, embora a seleção possa ser repetida adiante se necessário.

A muda pode ser plantada com haste única (muda vareta) ou com a copa tradicional, apresentando três a cinco pernadas. O enxerto e o porta-enxerto devem constituir haste única e ereta, com o menor desvio possível. Os programas de certificação de mudas de São Paulo e do Rio Grande do Sul preveem um diâmetro mínimo de 0,5 cm acima da enxertia nas mudas varetas de tangerineiras e de 0,7 cm nas demais cultivares. Enquanto em São Paulo o corte da haste é feito a, no mínimo, 30 cm do colo da planta nas tangerineiras e 40 cm nas laranjeiras e demais espécies, no Rio Grande do Sul a haste das tangerineiras é podada de 30 cm a 50 cm, de 50 cm a 60 cm nas laranjeiras e de 50 cm a 70 cm nas limeiras e limoeiros, com o tecido amadurecido e idade máxima de 15 e 18 meses, respectivamente em cada estado. A muda de haste única exige menor tempo de permanência na sacola ou vaso plástico, de 10 a 15 meses após a sementeira, enquanto a muda com copa necessita de mais tempo para amadurecer, de 18 a 24 meses. É fundamental que esses prazos não sejam excedidos, a fim de evitar o envelhecimento de raízes, principalmente se os recipientes forem os sacos plásticos (CARVALHO, 1998a; OLIVEIRA et al., 2001). Mudanças com pernadas exigem também maior espaçamento no viveiro.

Plantas que não atendam às exigências dos programas de certificação poderão ser comercializadas como mudas fiscalizadas, desde que respeitem as normas específicas à sua produção, ou simplesmente como fora do padrão, contanto que satisfaçam a qualidade genética e fitossanitária que devem possuir.

## Poda de formação da copa

Estando a haste madura e ultrapassando a extremidade do tutor, faz-se seu corte com tesoura de poda, na altura desejada, de acordo com as espécies enxertadas, conforme visto anteriormente. Várias brotações sucedem-se ao corte da haste, devendo-se selecionar três ou quatro de melhor conformação e vigor, situadas em alturas diferentes e opostas, formando uma espiral, de modo a constituir a base da futura copa da planta cítrica. Visando diminuir o tempo de formação da muda, pode-se fazer o desponte e plantá-la no local definitivo sem a copa, que é formada naturalmente no campo. Esse tipo de muda, sem as pernadas, chamada de vareta, além do menor custo de produção, facilita seu transporte e plantio, podendo até dispensar o uso de tutores no campo. Cerca de 15 dias antes do plantio em campo, corta-se o porta-enxerto que foi dobrado ou o pedaço remanescente do corte total do cavalo, caso isso ainda não tenha sido feito no viveiro, fazendo-se também o desponte, tratando-se os cortes com fungicida cúprico (SEMPIONATO et al., 1997) ou tinta látex.

Antes da comercialização das mudas, deve-se fazer uma seleção pelo tamanho, vigor e diâmetro da haste, descartando-se aquelas raquíticas ou com a copa mal formada. Somente são aprovadas mudas consideradas de primeira ou de segunda classe, eliminando-se as de terceira (lembrar a seleção inicial feita na sementeira). Ao final da produção de um lote de mudas, espera-se que

a porcentagem total de plantas descartadas, em função de má formação do enxerto ou de outras perdas, seja de no máximo 5%, a depender das variedades e condições de cultivo.

## Desinfestação das ferramentas e estruturas

As tesouras de poda, os canivetes de enxertia e outras ferramentas devem ser de uso exclusivo de cada telado e desinfestados antes e após sua utilização, a fim de evitar a transmissão de doenças, especialmente as causadas por vírus e viroides. Algumas fórmulas simples podem ser empregadas, como solução aquosa à base de hipoclorito de sódio, vulgarmente conhecida como água sanitária, a 5% (50 mL do produto comercial para 1 L de solução), formalina de 2,5% a 5,0%, ou álcool iodado. Recomenda-se a desinfestação de pisos, paredes, telas e bancadas com hipoclorito de sódio a 5% ou formaldeído a 1% após a retirada de cada lote de mudas, devendo ainda ser restringido o acesso de pessoas estranhas ao viveiro, cuja área deve estar sempre limpa de detritos vegetais (FEICHTENBERGER, 1998).

## Controle de pragas

O viveirista deve estar atento ao aparecimento de pragas no viveiro, combatendo focos iniciais. A doença mais comum e prejudicial ao viveiro, no caso de espécies suscetíveis, é a verrugose. Deve-se também ter cuidado especial com a gomose causada por *Phytophthora*, que é levada nas mudas para os pomares, sendo este um meio muito eficiente de disseminação da doença. Medidas preventivas, como o uso de rodolúvio (termo criado a partir da palavra pedilúvio, designando local destinado ao banho de veículos com produtos que realizam a desinfestação de pragas) e pedilúvio, controle da entrada de materiais, desinfestação de sementes por tratamento térmico e uso de calçados apropriados, são fundamentais no controle de pragas.

O manejo de pragas deve ser feito preventivamente, pulverizando-se as mudas a cada 15 dias com misturas de inseticidas, acaricidas e fungicidas, alternando-se os ingredientes ativos a fim de evitar a multiplicação de organismos resistentes (GRAF, 1999). Embora telas de 0,87 mm x 0,30 mm impeçam a entrada da maioria dos insetos (insetos-praga e vetores de doenças), fungos e ácaros podem entrar pelos orifícios do telado, assim como cochonilhas e o minador-das-folhas-dos-citros, implicando na necessidade de inspeções frequentes e pulverizações adicionais. O emprego de armadilhas amarelas com cola, na antecâmara e no interior do telado, é interessante no monitoramento e controle de insetos (OLIVEIRA et al., 2001). A manutenção das telas laterais e da cobertura plástica deve ser constante para evitar a presença de furos e rasgos.

As mudas, uma vez formadas, estarão prontas para comercialização somente após as inspeções oficiais e dos próprios viveiristas, feitas periodicamente, a fim de que, constatada a presença de algum patógeno, a planta ou lotes de plantas sejam eliminados, evitando-se a contaminação dos

demais. As inspeções são feitas visualmente, devendo, contudo, ser efetuadas análises laboratoriais de amostras do substrato, visando à constatação da presença de fungos do gênero *Phytophthora* e de fitonematoides dos citros. Nas áreas de ocorrência de CVC, devem ser colhidas folhas para análises da presença ou ausência de seu agente causal, e, em locais onde se verifica o cancro-cítrico, colhem-se folhas e ramos de material suspeito para análise. Nos viveiros de mudas certificadas no Estado de São Paulo, são previstas seis inspeções: antes da instalação e operação do viveiro; inspeção de pós-semeadura; inspeção para liberação de porta-enxertos; inspeção de pós-transplantação do porta-enxerto; inspeções de pós-enxertia e liberação de mudas (CARVALHO, 1998a). Cuidados adicionais devem ser dedicados a casos de suspeita de pinta-preta ou mancha-preta-dos-citros, também passível de disseminação por mudas contaminadas.

O solo em torno do viveiro deve estar sempre livre de ervas daninhas, efetuando-se capinas manuais, mecânicas (com cultivador), ou empregando-se herbicidas que não sejam voláteis. Plantas espontâneas que surjam no substrato das sacolas devem ser constantemente eliminadas manualmente e retiradas do viveiro.

## Identificação e transporte da muda

As mudas ou lotes homogêneos de mudas ou de porta-enxertos devem ser identificados com etiquetas apropriadas, contendo nome, endereço e número de registro do viveiro, número do Certificado Fitossanitário de Origem (CFO) e estar acompanhados dos laudos laboratoriais, registro do responsável técnico, Permissão de Trânsito Vegetal (PTV), além da identificação do porta-enxerto e da copa (Figura 11). Nessa identificação, pode-se utilizar um código de cores, pintando-se faixas acima e abaixo da linha de enxertia, com cores que possibilitem o reconhecimento da copa e do porta-enxerto. A aplicação das tintas pode ser feita sobre o corte de desponte das mudas, com a mesma finalidade, além de proteger a área do corte.



Foto: Orlando Sampalo Passos

Figura 11. Muda de citros adequada para transplantação em campo.

O transporte de mudas deve ser realizado em veículos adequados, fechados ou cobertos por telas, com a total proteção das mudas, evitando-se ainda compactá-las no deslocamento. No manuseio das mudas, durante o transporte, recomenda-se não segurá-las pela haste, mas pelo torrão, para evitar traumas à planta. Antes da retirada do viveiro, as mudas devem ser tratadas com inseticidas sistêmicos contra vetores de doenças para garantir o plantio seguro em regiões de ocorrência desses agentes bióticos (SANCHES et al., 2009; YAMAMOTO et al., 2002).

# Vantagens e desvantagens dos sistemas de produção a céu aberto e protegido

O sistema convencional de produção de mudas em viveiros no solo e a céu aberto não foi abordado neste livro, apesar de apresentar vantagens principalmente de ordem financeira imediata, resultando em mudas de custo de produção mais baixo. O que se deve levar em consideração, contudo, não se limita a esses custos – o que se discute é a própria sobrevivência da atividade citrícola no País. Embora formadas a um custo de produção mais alto, as mudas produzidas em ambientes protegidos ficam prontas na metade do tempo da muda de campo e, mais importante ainda, com garantia de sanidade no momento da transplantação. Citricultores e viveiristas de diferentes regiões do País têm manifestado essa compreensão, prova disso são as normas atuais para produção obrigatória de mudas em viveiros protegidos presentes em vários estados brasileiros e a pujança da cadeia viveirista nessas regiões, com milhões de mudas obtidas anualmente sob telado, empregando-se avançada tecnologia de produção. A sustentabilidade da citricultura nacional depende em parte dessa condição, face à ocorrência de doenças devastadoras como a CVC e o HLB.

## Referências

- BATAGLIA, O. C.; FURLANI, P. R.; FERRAREZI, R. S.; MEDINA, C. L. **Padrão nutricional de mudas de citros**. Araraquara: Vivecitrus: Conplant, 2008. 40 p.
- BERNARDI, A. C. C.; CARMELLO, Q. A. C.; CARVALHO, S. A. Development of citrus nursery trees grown in pots in response to NPK fertilization. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 4, p. 733-738, 2000.
- BORGES, R. S.; ALMEIDA, F. J.; SCARANARI, C.; MACHADO, M. A.; CARVALHO, S. A.; COLETTA, F. H. D.; VILDOSO, C. I. A. Programa IAC/EMBRAPA/CNPq de incentivo à produção e difusão de mudas de citros isentas de clorose variegada dos citros e outras doenças. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 21, n. 1, p. 205-224, 2000.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 53 de 16 de outubro de 2008. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 17 out. 2008. Seção 1, p. 2.
- CARVALHO, S. A. de. Propagação dos citros. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 22, n. 209, p. 21-25, 2001.
- CARVALHO, S. A. Estratégias para estabelecimento e manutenção de matrizes, borbulheiras e viveiro de citros em ambiente protegido. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS - TRATOS CULTURAIS, 5., 1998, Bebedouro. **Anais...** Bebedouro: Fundação Cargill, 1998a. p. 67-101.
- CARVALHO, S. A. Reestruturação do programa de registro de matrizes e revisão das normas para produção de mudas certificadas de citros no Estado de São Paulo. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 19, n. 2, p. 399-402, 1998b.
- CARVALHO, S. A.; MATTOS JUNIOR, D.; SOUZA, M. Efeito do KNO<sub>3</sub> nos teores de macronutrientes na matéria seca total de porta-enxertos cítricos produzidos em bandejas. **Bragantia**, Campinas, v. 59, n. 1, p. 89-94, 2000.
- CASTLE, W. S.; GMITTER JUNIOR, F. G. Rootstock and scion selection. In: TIMMER, L. W.; DUNCAN, L. W. (Ed.). **Citrus health management**. Lake Alfred: University of Florida, 1999. p. 21-34.
- CASTLE, W. S.; TUCKER, D. P. H.; KREZDORN, A. H.; YOUTSEY, C. O. **Rootstocks for Florida citrus**. Gainesville: University of Florida, 1993. 92 p.
- COOPER, W. C. **In search of the golden apple**. New York: Vantage Press, 1982. 291 p.

- DECARLOS NETO, A.; SIQUEIRA, D. L.; PEREIRA, P. R. G.; ALVAREZ, V. H. Diagnóstico do estado nutricional de N em porta-enxertos de citros, utilizando-se de teores foliares de clorofila. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 204-207, 2002.
- DORNELLES, C. M. M. **Introdução à citricultura**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1988. 96 p.
- ESPOSTI, M. D. D.; SIQUEIRA, D. L. Doses de uréia no crescimento de porta-enxertos de citros produzidos em recipientes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 136-139, 2004.
- FEICHTENBERGER, E. Manejo ecológico das principais doenças fúngicas e bacteriológicas dos citros no Brasil. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS - TRATOS CULTURAIS, 5., 1998, Bebedouro. **Anais...** Bebedouro: Fundação Cargill, 1998. p. 23-65.
- FINARDI, N. L. Método de propagação e descrição de porta-enxertos. In: MEDEIROS, C. A. B.; RASEIRA, M. do C. (Ed.). **A cultura do pessegueiro**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI; Pelotas: EMBRAPA-CFACT, 1998. p. 100-129.
- GIRARDI, E. A.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; GRAF, C. C. D.; OLIC, F. B. Influence of soluble and slow-release fertilizers on vegetative growth of containerized citrus nursery trees. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 28, n. 9, p. 1465-1480, 2005.
- GIRARDI, E. A.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; KLUGE, R. A. Effect of seed coat removal and controlled-release fertilizer application on plant emergence and vegetative growth of two citrus rootstocks. **Fruits**, Paris, FR, v. 62, n. 1, p. 1-7, 2007.
- GRAF, C. C. Produção de mudas sadias. In: EPAMIG. **Citricultura do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba**. Uberaba, 1999. p. 37-40.
- LEE, A. T. C.; ROXBURGH, K. **Guidelines for the production of container-grown citrus nursery trees in Southern Africa**. Port Elizabeth: Outspan Publication, 1993. 53 p.
- MEDINA, V. M. **Instruções práticas para a produção da muda cítrica**. 2. ed. Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMPF, 1986. 26 p. (EMBRAPA-CNPMPF. Circular Técnica, 8).
- MILNER, L. Manejo de irrigação e fertirrigação em substratos. In: FURLANI, A. M. C.; BATAGLIA, O. C.; ABREU, C. A.; FURLANI, P. R.; QUAGGIO, J. A.; MINAMI, K. **Caracterização, manejo e qualidade de substratos para produção de plantas**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2002. p. 45-51 (IAC. Documentos, 70).
- MOREIRA, C. S.; MOREIRA, S. História da citricultura no Brasil. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A. A. **Citricultura brasileira**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. p. 1-21.
- OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B.; BORGES, R. S.; NAKASU, B. H. **Mudas de citros**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2001. 32 p. (Embrapa Clima Temperado. Sistemas de Produção, 1).
- PASSOS, O. S.; COELHO, Y. da S.; CUNHA SOBRINHO, A. P. da. Variedades copa e porta-enxertos de citros. In: ENCONTRO NACIONAL DE CITRICULTURA, 4., 1977, Aracaju. **Anais...** Aracaju: Sociedade Brasileira de Fruticultura: Superintendência da Agricultura e Produção, 1977. p. 21-42.
- REZENDE, L. P.; AMARAL, A. M.; CARVALHO, S. A.; SOUZA, M. Volume de substrato e superfosfato simples na formação do limoeiro 'Cravo' em vasos: I. Efeitos no crescimento vegetativo. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 16, n. 2, p. 165-177, 1995.
- SANCHES, A. L.; FELIPPE, M. R.; CARMO, A. U.; RUGNO, G. R.; YAMAMOTO, P. T. Eficiência de inseticidas sistêmicos, aplicados em mudas cítricas, em pré-plantio, no controle de *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae). **BioAssay**, Santo Antônio de Goiás, v. 4, n. 6, p. 1-7, 2009.
- SEMPIONATO, O. R.; STUCHI, E. S.; DONADIO, L. C. **Viveiros de citros**. Jaboticabal: EECB, 1997. 37 p.
- SOARES FILHO, W. dos S. **Relatório do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2002. Não paginado.
- SOPRANO, E.; BRITO, C. J. F. A. **Caracterização de deficiências nutricionais em mudas cítricas**. Itajaí: EPAGRI, 1997. 4 p. (EPAGRI, Boletim Técnico).
- TEÓFILO SOBRINHO, J. Propagação dos citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A. A. (Ed.). **Citricultura brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1991. p. 281-301.
- TOLLEY, I. S. **Technical problems of citrus nursery propagation**. In: CITRUS nursery propagation course. California: [s.n.], 1981. 10 p.
- WEBBER, H. J.; REUTHER, W.; LAWTON, H. W. History and development of the citrus industry. In: REUTHER, W.; WEBBER, H. J.; BATCHELOR, L. D. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1967. v. 1, p. 1-39.
- YAMAMOTO, P. T.; FELIPPE, M. R.; CAETANO, A. C.; SANCHES, A. L.; ALMEIDA, E. J.; NOCITI, L. A. S. Eficiência de inseticidas neonicotinóides aplicados via tronco no controle de *Oncometopia facialis* (Signoret) (Hemiptera, Cicadellidae) em mudas de laranja 'Pera'. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 23, n. 1, p. 101-114, 2002.

# Processamento

Fernando César Akira Urbano Matsuura  
Marília Ieda da Silveira Folegatti Matsuura

## Introdução

A rápida expansão da produção de frutas cítricas nos Estados Unidos e no Brasil foi resultado do desenvolvimento de tecnologias para seu processamento. Com a introdução do suco concentrado congelado de laranja, nos Estados Unidos na década de 1940, e no Brasil na década de 1960, o consumo de produtos cítricos cresceu bastante (DARROS-BARBOSA; CURTOLO, 2005; TING; ROUSEFF, 1986). No Brasil, recentemente, observa-se o crescimento do consumo de suco in natura e de sucos pasteurizados com a atuação de diversas novas empresas no mercado.

Frutas cítricas são consumidas, principalmente, pelo seu valor nutricional e suas características sensoriais. Os citros e seus produtos e o tomate suprem a maior parte dos requerimentos em vitamina C das populações de países desenvolvidos (TING, 1983).

A laranja é a fruta industrializada em maior quantidade no Brasil, sendo que cerca de 70% dos frutos produzidos são processados na forma de suco (NEVES et al., 2010). As variedades Pera, Valência e Natal, da espécie *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, são bastante plantadas e usadas para a industrialização no Brasil (OLIVA, 2002; POZZAN; TRIBONI, 2005).

Os principais produtos industrializados obtidos a partir de frutas cítricas são os sucos, apresentados em diferentes níveis de concentração, e os subprodutos desse processamento, como óleos, aromas e polpa. Diversos outros produtos podem ser obtidos a partir das frutas cítricas, embora menos expressivos comercialmente, como pectina, gomos de fruta em calda, albedo em calda, albedo cristalizado, geleias, doces em massa, xaropes, licores, etc.

O Brasil participa com cerca de 50% da produção mundial de suco de laranja, que é exportada em quase sua totalidade (NEVES et al., 2010).

Neste capítulo, o processamento dos sucos cítricos será descrito mais detalhadamente, em virtude da sua importância. Outros produtos de importância secundária também serão descritos, como alternativas de processamento para frutas cítricas.

## Composição

O suco de frutos cítricos está contido em sacos de suco que são envolvidos por uma membrana e constituem o segmento ou gomo, que contém as sementes. Os gomos, dispostos radialmente no fruto, são envolvidos por uma camada branca e esponjosa, o albedo, por sua vez envolvido por uma camada externa, o flavedo. Essa camada externa contém pigmentos e bolsas de óleo. O suco corresponde de 50% a 55% dos constituintes físicos da laranja, o albedo e o flavedo correspondem de 40% a 50%, a polpa de 5% a 10% e as sementes de 0% a 4% (VIÉGAS, 1991).

A composição das frutas cítricas varia em função de uma série de fatores, como variedade, porta-enxerto, clima, solo, tratos culturais, estágio de maturação, armazenamento, dentre outros. A Tabela 1 apresenta a composição química da laranja.

Os açúcares – glicose, frutose e sacarose – correspondem a aproximadamente 70% a 75% dos sólidos solúveis da laranja e estão presentes inclusive na casca (TING; DESZYCK, 1961). São os principais componentes a determinar o valor energético e o gosto doce dessa fruta. O teor de açúcares pode variar em até 2,7% em um único fruto (AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE, 1962). As frutas cítricas também possuem carboidratos complexos, como pectina, celulose e hemicelulose, que são importantes como fibras dietéticas, que têm efeitos benéficos à saúde humana, como os metabólicos, envolvendo, por exemplo, a absorção de lipídeos e colesterol, e os de diminuição do trânsito intestinal (GARICA-DIEZ et al., 1996; OHR, 2004; STARK et al., 1994; TING, 1983).

**Tabela 1.** Composição química aproximada da laranja.

Constituinte	Teor (%)
Umidade	86–92
Açúcares	5–8
Pectina	1–2
Compostos nitrogenados	0,7–0,8
Lipídios	0,2–0,5
Óleos essenciais	0,2–0,5
Minerais	0,5–0,9

Fonte: Viégas (1991).

O ácido cítrico e o málico são os principais ácidos componentes das frutas cítricas. Outros, como tartárico, benzoico, succínico, malônico e quínico, são encontrados em pequenas quantidades ou traços (AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE, 1962; TING; VINES, 1966). A acidez tem um importante papel no gosto, na característica de refrescância e na conservação dos sucos cítricos, uma vez que inibe o crescimento microbiano.

O teor de sólidos solúveis totais é um parâmetro utilizado para a avaliação do grau de maturação dos frutos e como base de cálculo do rendimento de processamento. A relação entre o teor de sólidos solúveis totais (em Brix) e a acidez, ratio, usada para determinar o ponto ideal de maturação do fruto, pode variar entre 6 e 20, sendo a ideal entre 11 e 16 (VIÉGAS, 1991).

Os componentes nitrogenados dos sucos cítricos, como as proteínas, constituintes estruturais do fruto, e os aminoácidos, são encontrados em concentrações variando entre 5% e 10% dos sólidos. As interações entre açúcares e aminoácidos são importantes no escurecimento e no desenvolvimento de *off-flavors* em produtos cítricos (AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE, 1962).

Os principais minerais presentes em frutas cítricas são potássio (K), sódio (Na), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e fósforo (P). Os frutos cítricos são boas fontes de potássio (LIU et al., 2012; TING, 1983).

As frutas cítricas são ricas em vitamina C, contendo, ainda, outras vitaminas e seus precursores, como tiamina, riboflavina, piridoxina, ácido fólico, ácido pantotênico, niacina e  $\beta$ -caroteno. A vitamina C é um nutriente muito estável às condições de processamento de sucos. Quando o produto é devidamente acondicionado e armazenado (a temperaturas iguais ou inferiores a  $-18^{\circ}\text{C}$ ), não apresenta perda considerável desse nutriente por até um ano. O uso da refrigeração para a conservação do suco de laranja, fresco ou processado, aberto para consumo é muito importante para a redução de perdas de quantidade de vitamina C, tornando-as pequenas para curtos períodos (AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE, 1962; BUSLIG, 1991a; HORTON; DICKMAN, 1977; SMOOT; NAGY, 1980; STEWART, 1977; TING et al., 1974; VIÉGAS, 1991). A elevada quantidade de vitamina C em frutos cítricos é, provavelmente, a contribuição mais significativa para a saúde e nutrição do ser humano (LIU et al., 2012). A concentração dessa vitamina nos frutos varia de 23 mg 100 g<sup>-1</sup> a 83 mg 100 g<sup>-1</sup> de peso fresco (LEE; KADER, 2000).

Do ponto de vista tecnológico, alguns componentes dos citros, como flavonoides e enzimas, devem ser considerados, uma vez que interferem no processamento e na qualidade dos produtos finais.

Os principais flavonoides encontrados nas frutas cítricas são a hesperidina e a naringina. A hesperidina apresenta-se em maior quantidade na laranja doce (*C. sinensis*) e tangerina (*C. reticulata* Blanco), enquanto a naringina em pomelo (*C. paradisi* Macfad.) e toranja [*C. maxima* (Burm.) Merr.] (TING, 1983). A hesperidina é um componente que, ao se depositar nos trocadores de calor de pasteurizadores ou evaporadores, reduz o fluxo de suco e provoca queimas, ocasionando defeitos como sabor queimado e presença de partículas escuras no produto. A naringina, quando presente no suco, causa amargor (VIÉGAS, 1991). Por outro lado, tanto a hesperidina como a naringina podem ser benéficas à saúde humana. A hesperidina está relacionada a ações contra doenças cardiovasculares e anti-inflamatórias e a naringina, que pode se transformar em naringenina no corpo humano por ação das bactérias do intestino, apresenta ação antioxidante e prevenção de osteoporose (MANTHEY et al., 2001; MORAND et al., 2011; WANG et al., 2011).

As enzimas presentes nas frutas cítricas podem causar alterações no suco, como a clarificação e a degradação de compostos aromáticos. A pectinesterase é a principal causadora da clarificação em sucos não tratados termicamente (AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE, 1962). Os ácidos pectínicos formados pela ação dessa enzima precipitam e arrastam o material colorido, o que confere a característica de turbidez ao suco. Outras enzimas encontradas são fosfatases, proteinases, peroxidases, citocromo-oxidases e decarboxilases (AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE, 1962).

Os constituintes voláteis estão presentes, principalmente, nos óleos essenciais do flavedo, responsáveis pelo aroma e sabor característicos das frutas cítricas. Os óleos essenciais são constituídos por mais de uma centena de compostos, como ácidos, álcoois, aldeídos, ésteres, hidrocarbonetos e cetonas, sendo o D-limoneno o principal composto encontrado (TING, 1983).

A indústria de sucos cítricos determina um padrão de qualidade para os frutos recebidos como matéria-prima. Esse padrão envolve parâmetros de qualidade como teor de sólidos solúveis, acidez, *ratio*, sabor, teor de compostos amargos e cor (BUSLIG, 1991a).

Alguns fatores relacionados ao cultivo dos citros podem afetar a qualidade do suco, como porta-enxerto, irrigação, fertilização, idade da planta, posição e carregamento de frutas na árvore e pré-tratamentos (SANDHU; MINHAS, 2006).

## Produtos

### Sucos cítricos

O desenvolvimento da indústria de sucos cítricos no mundo teve um grande impulso durante o período da Segunda Guerra Mundial. Em 1940, já era produzido comercialmente o suco concentrado embalado a quente (*hot pack*), e, em 1944, iniciou-se a produção de suco concentrado congelado, que, dentre outros, minimizou perdas e reduziu o custo do transporte, contribuindo para um aumento significativo no uso de frutas cítricas (AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE, 1962; LIU et al., 2012; VIÉGAS, 1991).

Algumas importantes inovações tecnológicas causaram impacto na indústria de processamento de sucos a partir da década de 1950. A primeira foi o desenvolvimento do processo de liofilização no início da década de 1960, com o surgimento de uma grande variedade de bases de frutas desidratadas. A segunda importante inovação tecnológica foi o processamento asséptico, tecnologia adotada em larga escala no início da década de 1970. Outra tecnologia inovadora foi o desenvolvimento dos sucos resfriados prontos para beber, conseqüente da demanda crescente por produtos de qualidade e convenientes. Dentro da categoria dos sucos resfriados prontos para beber, os sucos processados a partir de produtos não concentrados e os sucos frescos têm crescido em popularidade desde a década de 1980 (NAGY et al., 1993). Atualmente, há um crescimento no

consumo de sucos pasteurizados por questões de qualidade, relacionadas, principalmente, aos aspectos sensoriais (sabor, aroma e cor) e segurança (SANDHU; MINHAS, 2006).

Os principais tipos de sucos cítricos são o suco fresco, o suco pasteurizado (reconstituído ou não) e o suco concentrado congelado (CRUPI; RISPOLI, 2002; DARROS-BARBOSA; CURTOLO, 2005; SANDHU; MINHAS, 2006). O suco fresco, apesar das desejáveis características de aroma e sabor, apresenta inconvenientes relacionados à estrutura e à operação para o processamento, extremamente limpa e sanitizada, à pequena vida-de-prateleira, à perda de turbidez, à instabilidade de cor e sabor e aos riscos de crescimento microbiano (SANDHU; MINHAS, 2006).

A indústria de sucos cítricos, no Brasil, foi implantada na década de 1960 e cresceu substancialmente a partir da década de 1980, como consequência das geadas ocorridas na Flórida (VIÉGAS, 1991) e da expansão do mercado mundial, principalmente europeu, o que estimulou o aumento da área cultivada e a exportação de suco concentrado. A expansão dos mercados japonês e do Pacífico ofereceu novas oportunidades para os exportadores de suco de laranja (NAGY et al., 1993).

O principal produto processado pela indústria brasileira de sucos cítricos é o suco de laranja concentrado congelado (*Frozen concentrated orange juice – FCOJ*), exportado para a Europa, os Estados Unidos e outros países desenvolvidos, cujas principais etapas de processamento serão descritas a seguir.

O suco de laranja concentrado congelado, ofertado diretamente para o consumidor final, tem se tornado um produto de importância secundária no Brasil, enquanto o suco de laranja pasteurizado tem crescido em consumo. Grande parte da produção de suco concentrado congelado é reconstituída e comercializada como néctar ou suco pasteurizado. Nesse processo de reconstituição, o suco é novamente pasteurizado (CRUPI; RISPOLI, 2002).

## Etapas envolvidas no processamento de suco de laranja

Os principais sucos cítricos produzidos, no Brasil, são o concentrado congelado e o pasteurizado (reconstituído ou não), sendo o de laranja (*Citrus sinensis*) o de maior produção e comercialização. De uma forma geral, as etapas de processamento envolvem o preparo dos frutos, a extração, o acabamento, o tratamento térmico, a concentração, o resfriamento, a embalagem e o armazenamento.

## Recepção, lavagem e seleção dos frutos

Os frutos para o processamento podem vir diretamente do campo, que é o mais comum, ou de um galpão de embalagem (*packing house*). Os frutos destinados à indústria de processamento são normalmente transportados a granel, exceto as tangerinas (transporte dentro de caixas plásticas), em caminhões ou carretas.

Antes de serem descarregados, os frutos são avaliados quanto aos padrões exigidos pela indústria, relacionados com o aspecto das frutas, resistência física, teor de sólidos solúveis, acidez, rendimento, estágio de maturação, etc. (DARROS-BARBOSA; CURTOLO, 2005; SANDHU; MINHAS, 2006). Podem ser descarregados diretamente na planta para processamento imediato ou armazenados em silos. Nessa etapa, ocorre uma seleção dos frutos, feita em mesas, para a retirada dos inaptos – estragados e danificados. O uso de silos proporciona o fornecimento constante de frutos, que permite que a planta trabalhe ininterruptamente e de forma mais eficiente. Os silos mais modernos são metálicos, o que facilita o processo de limpeza e sanitização.

A lavagem remove a sujidade dos frutos e parte da cera, dos frutos provenientes de *packing houses*, facilitando, também, o transporte. Para a lavagem dos frutos, realizada em lavadoras, normalmente são usadas escovas rotativas, jatos de água e detergente (KIMBALL, 1996a, 1999; TING, 1983). A água usada na lavagem é, comumente, o vapor de água condensado da evaporação, adicionada de agente sanitizante – cloro ou ácido, por exemplo (DARROS-BARBOSA; CURTOLO, 2005). A lavagem deve ser feita, preferencialmente, fora da planta de processamento, de forma que os frutos se apresentem limpos e livres de detritos, contaminantes e níveis excessivos de microrganismos ao entrarem na planta.

Os frutos lavados são, a seguir, novamente selecionados. Essa etapa corresponde à última checagem da qualidade dos frutos que entram na área de processamento. Nela, são separados frutos danificados e deteriorados (TING, 1983). Antes da operação de extração, os frutos são separados por tamanho em classificadores para otimizar a eficiência do processo. Essa separação é crítica para o rendimento e a qualidade do suco, obtidos na etapa de extração (CORCUERA et al., 2012).

## Extração

Nessa importante etapa do processamento, busca-se obter um máximo de rendimento de suco extraído dos frutos e, por outro lado, um mínimo de adição de óleo essencial e outros compostos da casca no suco. Essa operação é realizada por equipamentos denominados extratores, que são um dos maiores avanços para o progresso da indústria de sucos cítricos (SANDHU; MINHAS, 2006).

Há dois tipos de extratores comumente utilizados. Um deles é composto por conjuntos de copos, cortadores, tubos coadores (pré-acabamento) e tubos de orifício (evacuação).

No processo de extração com esse tipo de equipamento, o fruto colocado no copo inferior é pressionado pela descida do copo superior. Os copos superior e inferior suportam o exterior do fruto durante o ciclo de esmagamento, evitando seu rompimento. Cortes (orifícios) realizados pelos copos na parte superior e inferior do fruto proporcionam a separação da casca das porções internas (suco, polpa, membranas e sementes). As porções internas são forçadas para o interior de um tubo perfurado com orifícios, de pré-acabamento (tubo coador). O suco passa pelos orifícios, é recebido em conjuntos de tubos coletores e transportado para o *finisher*, enquanto a membrana e as semen-

tes permanecem no interior do tubo de pré-acabamento. A casca é descartada por uma abertura entre o copo superior e o cortador, e a membrana e as sementes através de uma abertura no tubo de evacuação. Jatos de água retiram o óleo de bolsas rompidas da casca no processo de extração, que segue para equipamento de recuperação de óleo (DARROS-BARBOSA; CURTOLO, 2005; CORCUERA et al., 2012; KIMBALL, 1996a, 1999; NAGY et al., 1993).

No tipo de extrator, os frutos são lavados e separados por tamanho, alimentados numa sequência de copos semiesféricos, dispostos no formato de um carrossel, cortados em metades e têm sua parte interna removida por um mandril (espremedor). O suco escoo para uma depressão, e a casca é descartada em um transportador tipo rosca. O suco é então transportado para um *finisher*, que remove a polpa antes da evaporação ou do tratamento térmico (CORCUERA et al., 2012; KIMBALL, 1999; NAGY et al., 1993). De acordo com a forma e intensidade de extração e a variedade de citros, o suco extraído pode conter uma quantidade excessiva de óleo essencial. Nesse caso, devem ser realizados ajustes nos extratores ou utilizados equipamentos para a remoção de parte do óleo do suco (KIMBALL, 1999; NISIDA, 2000).

A escolha dos equipamentos para extração depende, dentre outros fatores, da capacidade de produção, do rendimento e da qualidade do produto final desejado (SANDHU; MINHAS, 2006).

## Acabamento

Essa etapa relaciona-se com a filtração do suco e envolve a remoção de sólidos e a estabilização e padronização da quantidade de polpa. Essa operação foi realizada inicialmente com o auxílio de centrífugas, que removiam de forma bastante satisfatória os sólidos (polpa e outros), entretanto, consistia num ponto crítico à eficiência do processo de obtenção de suco e provocava uma alteração de sabor do produto. Posteriormente, passou-se a utilizar os equipamentos denominados de *finisher*, filtros dotados de prensa e tela, e turbofiltros.

O *finisher* consiste numa prensa de rosca ou de palhetas que pressiona o suco e a polpa contra uma peneira (tela) de acabamento. Nesse processo, comumente, o suco é submetido a duas operações de acabamento. Os turbofiltros são filtros semelhantes ao *finisher*, entretanto, possuem malhas sintéticas de diferentes diâmetros, proporcionando melhor sabor do suco extraído (DARROS-BARBOSA; CURTOLO, 2005).

O tamanho do orifício da peneira, a distância entre a peneira e a rosca ou palheta, a tela da peneira e a pressão aplicada no *finisher* também podem alterar a quantidade de suco retida pela polpa e a de constituintes solúveis da polpa incorporada ao suco, afetando seu sabor (CORCUERA et al., 2012; TING, 1983). Os níveis de polpa, o rendimento e a qualidade do suco devem ser monitorados para que o padrão de acabamento seja mantido (KIMBALL, 1999). O teor de polpa que permanece no suco depois da segunda operação de acabamento varia, comumente compreendido entre 10%

e 25%, e tem efeito sobre a viscosidade dos sucos cítricos (BRADDOCK, 1999; CORCUERA et al., 2012; KIMBALL, 1999).

## Clarificação

O alto teor de polpa no suco pode causar alguns problemas no processamento de sucos cítricos, como, por exemplo, nas operações envolvendo trocadores de calor de placas e resinas de troca iônica (KIMBALL, 1999).

A redução do teor de polpa de sucos pode ser feito envolvendo processos como os de centrifugação, separação por membranas, tratamento enzimático ou homogeneização (BAKER; BRUEMER, 1971; CRUPI; RISPOLI, 2002; KIMBALL, 1999; PALLET et al. , 2005; SWIENTEK, 1990).

Vaillant et al. (2001) citam que uma grande variedade de novos produtos apresenta características de transparência e homogeneidade, baseando-se no uso de sucos de frutas clarificados. A produção de sucos cítricos clarificados é mais relevante para os sucos de limão e de lima (CRUPI; RISPOLI, 2002).

## Remoção do amargor e acidez

O amargor no suco é característico em algumas variedades e espécies de citros, como, por exemplo, algumas do grupo Navel e do tipo Blood de *Citrus sinensis* (L.), causado pela limonina – gerada a partir do ácido limônico ou da monolactona de limonina, presentes nas sementes e membranas dos frutos cítricos (SANDHU; MINHAS, 2006). Quando elas são utilizadas para a produção de suco, a diminuição ou remoção desse amargor é importante, o que pode ocorrer pela mistura (*blending*) de sucos ou pela retirada da limonina.

A redução do amargor do suco pode ser realizada por ação enzimática (microbiana ou não; imobilizada ou não) ou por adsorção (SANDHU; MINHAS, 2006). Normalmente, a remoção da limonina dos sucos cítricos é feita pelo uso de colunas com resinas de adsorção. Alguns sistemas podem ser usados e diferem na forma de preparo do suco e nos tipos de resina (COUTURE; ROUSEFF, 1992; KIMBALL, 1999).

O excesso de acidez dos sucos cítricos normalmente pode ser ajustado pela mistura (*blending*) de sucos ou com o uso de troca aniônica (SANDHU; MINHAS, 2006; VARSEL, 1980).

## Concentração

A produção de suco concentrado é uma das opções de processamento de frutos cítricos. A concentração do suco permite vantagens econômicas na embalagem, no armazenamento e na distribuição, contribuindo, também, para a utilização dos frutos no período de pico de colheita (SANDHU; MINHAS, 2006).

O processo de concentração abrange o aumento do teor de sólidos solúveis do suco pela remoção da água de sua composição. Essa remoção pode ser feita com o uso de calor (ou por evaporação), que é a forma comum utilizada nas indústrias, por congelamento ou por osmose com o suco de membranas (CRUPI; RISPOLI, 2002).

Antes da concentração, o suco é pasteurizado, comumente em trocadores de calor tubular ou de placas, para a destruição de microrganismos e para a inativação de enzimas clarificantes e gelificantes (DARROS-BARBOSA; CURTOLO, 2005). As propriedades do suco e seus compostos voláteis são afetados pela pasteurização.

### Concentração por calor ou evaporação

A evaporação permite a concentração do suco cítrico de 12 °Brix para até 65 °Brix a 68 °Brix em poucos minutos (TING, 1983). Esse processo também pasteuriza o suco e inativa enzimas, prevenindo deteriorações e prolongando sua vida de prateleira; entretanto, em virtude do tempo entre a extração e essa etapa, comumente a pasteurização se realiza anteriormente. A concentração reduz o espaço requerido para armazenamento e os custos com transporte do produto, além de possibilitar a absorção de toda a matéria-prima disponível e a oferta do produto por todo o ano (TING; ROUSEFF, 1986). Por outro lado, uma das desvantagens do processo relaciona-se com a perda de compostos aromáticos voláteis, que podem ser repostos, por exemplo, pela adição de soluções aromáticas recuperadas pelo condensador do evaporador (TING; ROUSEFF, 1986).

O evaporador mais comum e um dos mais eficientes é o evaporador de tempo curto termicamente acelerado, ou evaporador *thermally accelerated short time evaporator* (TASTE), que se enquadra nos evaporadores térmicos que aplicam alta temperatura e curto tempo, *high temperature short time* (HTST) no processo de concentração. Esse evaporador baseia-se no princípio da nebulização turbulenta descendente – *descending turbulent mist* (DMT) e possui múltiplos efeitos, em geral, sete, de filme descendente. Cada efeito consiste em um trocador de calor tubular, com vácuo, que, exceto o primeiro, usa o vapor gerado pela evaporação de um outro efeito como fonte de calor (KIMBALL, 1999). O fluxo do suco e a temperatura dos efeitos são controlados para otimizar a evaporação e reduzir a exposição do suco ao calor (BUSLIG, 1991a).

No trocador, o suco a ser concentrado é alimentado e desce pelos tubos do trocador, absorvendo calor e evaporando água. A água evaporada no primeiro efeito é transportada para o segundo efeito, em que age como fonte de calor e, assim, continua por quantos efeitos contiver o evaporador. A movimentação de descida do produto nos tubos provoca um lapso de pressão (vácuo). O condensado do último efeito é processado no sistema de recuperação de compostos aromáticos voláteis (DARROS-BARBOSA; CURTOLO, 2005; KIMBALL, 1999; NAGY et al., 1993).

Trocadores de calor a placas são usados para volumes menores, empregando menos efeitos. Esses equipamentos alternam compartimentos de produto e vapor, como nos pasteurizados a placas, com distância entre placas suficiente para garantir a turbulência do suco e a adequada troca

térmica (CRUPI; RISPOLI, 2002). O vapor transfere seu calor ao produto do compartimento seguinte. O produto aquecido é destinado a uma câmara de separação, onde o vapor e o concentrado são separados por vácuo. Esses trocadores também podem dispor de unidades de recuperação de aromas. O tempo limitado de residência do produto permite o uso para a concentração de sucos mais sensíveis ao calor (BUSLIG, 1991a; KIMBALL, 1996a, 1999; NAGY et al., 1993).

### Concentração por congelamento

A concentração por congelamento possui a vantagem de maior preservação das características sensoriais do suco natural, pois não provoca perdas de compostos aromáticos voláteis no processo. Por outro lado, é necessária uma avaliação detalhada de custo-benefício para o uso dessa forma de concentração de sucos cítricos.

Nesse processo, busca-se promover o congelamento da água do suco e separá-lo dos sólidos, empregando-se, comumente, um trocador de calor/resfriador de superfície raspada e um tanque para maturação dos cristais de gelo (KIMBALL, 1999). A separação do concentrado ocorre por filtração e depende de alguns fatores, como viscosidade e diâmetro dos cristais de gelo (CRUPI; RISPOLI, 2002; KIMBALL, 1999). O andamento do processo vai provocando uma elevação da viscosidade e a diminuição cada vez maior do ponto de congelamento, não permitindo altas concentrações finais do suco. A viscosidade é uma das principais dificuldades da separação do produto concentrado dos cristais de gelo (CRUPI; RISPOLI, 2002).

### Concentração por uso de membranas

Como a concentração por congelamento, o processo de separação por membranas pode realizar a concentração de sucos minimizando alterações em seus atributos sensoriais e nutricionais quando comparado aos processos com aplicação exclusiva de calor.

O uso da tecnologia de membranas também tem sido estudado para a eliminação de microrganismos patogênicos e clarificação (PALLET et al., 2005; CASSANO et al., 2007; ONGARATTO; VIOTTO, 2009). Economia no processo, rendimento, qualidade do produto, uso de subprodutos e solução para problemas ambientais podem ser relacionados ao uso de membranas (RAGHAVARAO et al., 2005).

O processo com o uso de membranas permite a separação e a concentração de macromoléculas e micromoléculas baseadas, principalmente, no tamanho, na massa e configuração molecular, nas interações com a membrana e outros componentes do produto. Alguns dos principais processos por membranas são a ultrafiltração, a nanofiltração e a osmose reversa. Novos processos com o uso de membranas têm sido avaliados e mostram-se com potencial como a osmose direta e a destilação osmótica, envolvendo tentativas de superar alguns fatores relacionados com o fluxo do permeado e/ou limitantes do processo, como polarização da concentração, incrustação da membrana, dano

por cisalhamento e concentração máxima. Na aplicação da tecnologia de membranas, é comum o uso de mais de um processo conjuntamente, como, por exemplo, ultrafiltração e osmose reversa, e, também, no caso de sucos, o emprego de tratamento enzimático (CIANCI et al., 2005; RAGHAVARAO et al., 2005; SÁ et al., 2003; SILVA et al., 1998, 2005).

Dois métodos podem ser utilizados no processo de separação por membranas, um por passagem da solução de forma perpendicular à membrana e outro na direção tangencial. O transporte através da membrana ocorre por um gradiente de potencial químico e/ou gradiente elétrico, por mecanismos de convecção e/ou difusão. As membranas podem ser poliméricas ou cerâmicas, como, por exemplo, as de poliamidas, poliacrilonitrilas, polisulfonas e policarbonatos, dentre outras. Em escala industrial, os processos podem ser tubular, placas e quadro (*plate and frame*), espiral (*spiral wound*) e fibras ocas (*hollow fiber*) (ARAÚJO, 2007; HABERT et al., 2006; MALDONADO, 1991).

Estudos com o uso da tecnologia por membranas na concentração do suco de laranja foram realizados, apresentando diferentes níveis de concentração do produto final e mostrando sucos com melhores características de aroma e sabor em relação aos concentrados com a aplicação de calor (ALVES; COELHO et al., 2006; ARAÚJO; MACIEL, 2005; CROSS, 1989; JESUS et al., 2007; KOSEOGLU et al., 1990; SILVA et al., 1998).

### Mistura (*blending*)

O *blending*, ou mistura, busca uma padronização da composição dos sucos produzidos. Há variações de cor, de aroma e de sabor das frutas usadas como matéria-prima, em virtude, principalmente, das variedades, dos períodos de safra e das épocas de colheita. Nesse processo de mistura, outros parâmetros, como, por exemplo, o teor de sólidos solúveis, a acidez e o teor de polpa, precisam ser considerados (KIMBALL, 1999; SANDHU; MINHAS, 2006). De acordo com a concentração final desejada, sucos obtidos por concentração por membranas podem ser utilizados nessa etapa, por contribuir para melhorar as características sensoriais do produto final, principalmente de aroma e sabor (CRUPI; RISPOLI, 2002).

### Outros métodos de conservação

Além da concentração, outros métodos normalmente empregados na conservação de sucos cítricos são a pasteurização e refrigeração. Este último, quando usado em temperaturas superiores às de congelamento, é considerado um método auxiliar. O método de conservação do suco depende da legislação local e da preferência do consumidor.

## Pasteurização

Esse processo é utilizado como método principal de conservação na elaboração de suco reconstituído e suco pasteurizado – *pasteurized orange juice* (POJ), também conhecido como *not from concentrate* – não de concentrado (NFC).

Esse tratamento térmico é utilizado para a eliminação de microrganismos patogênicos, diminuição dos microrganismos deterioradores e inativação de enzimas (pectinases) dos sucos cítricos. A hidrólise da pectina altera a aparência do suco, separando-o em duas camadas (soro e polpa) (CRUPI; RISPOLI, 2002). As indústrias empregam, comumente, temperaturas de 85 °C a 99 °C por 5 a 15 segundos na pasteurização do suco (DARROS-BARBOSA; CURTOLO, 2005; CORCUERA et al., 2012). Os trocadores de calor utilizados são os tubulares, mais comum para uso com suco integral, e os de placas (DARROS-BARBOSA; CURTOLO, 2005; NISIDA, 2000; OLIVA, 2002). Após a pasteurização e o acondicionamento, o suco, normalmente, é armazenado em temperaturas de refrigeração (CRUPI; RISPOLI, 2002).

### **Suco de laranja pasteurizado e reconstituído**

O consumo de suco pasteurizado tem aumentado nos últimos anos, devido as suas características sensoriais, principalmente de aroma e sabor, mais próximas ao suco natural, em virtude de menor aplicação de calor durante todo o processo de fabricação.

A produção de suco pasteurizado é bastante criteriosa, desde a seleção dos frutos para o processamento, passando pelas condições da planta de processo e a pasteurização, até o transporte e o armazenamento. Além disso, o suco antes de ser submetido à pasteurização, normalmente, passa por uma operação de desaeração para diminuir os processos oxidativos no produto, relacionados à alteração das características sensoriais e a perda de vitamina C (CRUPI; RISPOLI, 2002; DARROS-BARBOSA; CURTOLO, 2005).

Observando-se os aspectos econômicos relacionados ao transporte e armazenamento e a praticidade para o consumidor, o suco de laranja integral pode ser obtido pela readição de água ao suco concentrado. Esse processo geralmente é realizado próximo ao mercado consumidor. A água é adicionada para reduzir o teor de sólidos solúveis para cerca de 12 °Brix, variável de acordo com os padrões de identidade do produto. As propriedades da água utilizada são muito importantes e afetam bastante a qualidade do produto final, alterando suas características físicas e químicas (TING; ROUSEFF, 1986). Cuidados devem ser tomados para evitar a incorporação de ar ao suco, que acelera a perda de qualidade de aroma, sabor e vitamina C. Normalmente, são adicionadas pequenas quantidades de óleo essencial ao suco reconstituído para fortalecer seu aroma e sabor. Uma nova pasteurização do suco reconstituído deve ser realizada para evitar o desenvolvimento de microrganismos (TING, 1983). O sabor e aroma do suco reconstituído não são comparáveis ao do suco

pasteurizado, pois ele passou por dois processos térmicos de pasteurização e pela concentração (SANDHU; MINHAS, 2006).

### Tratamentos com tecnologias emergentes – alta pressão

O estudo e a aplicação de novas tecnologias no processamento de alimentos têm se ampliado nos últimos anos. Dentre essas tecnologias, podem-se citar a alta pressão, o pulso elétrico, os aquecimentos ôhmico, por micro-ondas e por infravermelho, e o ultrassom (CHEFTEL, 1995; QIU et al., 1998; SUN, 2005).

O processamento de alimentos busca obter produtos seguros do ponto de vista microbiológico e químico e com características sensoriais aceitas pelo consumidor. Atualmente, a qualidade e a segurança dos produtos alimentícios são os fatores que mais influenciam as escolhas do consumidor (HOGAN et al., 2005). No caso dos atributos sensoriais, os processos envolvendo o uso de calor na produção de sucos, como a pasteurização e a concentração, alteram suas características de aroma, cor e sabor. Assim, ressalta-se a importância dos estudos de tecnologias de tratamentos não térmicos, como a alta pressão e o pulso elétrico.

Estudo de Laboissière et al. (2007) mostrou semelhança nos atributos sensoriais de suco fresco de maracujá amarelo e suco submetido ao processo de alta pressão hidrostática, indicando que o tratamento nas condições de 300 Mpa por 5 minutos a 25 °C não provocou alterações significativas nos componentes responsáveis pelo aroma, sabor e consistência do produto.

A tecnologia de alta pressão tem apresentado avanços, e, atualmente, há várias plantas de processamento, de diferentes níveis e tamanhos, no mundo. No caso de sucos, já há disponibilidade de produtos comerciais processados por alta pressão nos Estados Unidos, na França e no Japão, e existem plantas industriais no México e no Japão produzindo suco de laranja e de uva, respectivamente, por emprego dessa tecnologia (CORCUERA et al., 2012; HOGAN et al., 2005).

O processamento por alta pressão (*high-pressure processing* – HPP) para a conservação de alimentos atua, principalmente, na pasteurização dos produtos, destruindo microrganismos, e na estabilização de enzimas (HOGAN et al., 2005). Essa tecnologia ainda não é totalmente efetiva para destruir esporos de bactérias e algumas enzimas; entretanto, combinações com temperaturas no armazenamento, energia térmica e aplicação de CO<sub>2</sub> podem resultar em efeitos desejáveis (BARBOSA-CÁNOVAS; JULIANO, 2008; MOR-MUR; YUSTE, 2005; SANDHU; MINHAS, 2006). *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* O157:H7 são bastante resistentes a esse tratamento (MOR-MUR; YUSTE, 2005).

A aplicação de alta pressão provoca modificações irreversíveis na morfologia de microrganismos, destruindo suas células vegetativas, e na estrutura de enzimas. A velocidade da eliminação dos microrganismos depende de vários fatores, como a concentração do produto, a concentração de açúcar, o pH e o tempo, além da pressão aplicada e do tempo de processo; enquanto a modificação das enzimas depende, por exemplo, do tipo de enzima, da temperatura e da quantidade de

substâncias dissolvidas (CRUPI; RISPOLI, 2012). A inativação da enzima pectina-metil-esterase em sucos de laranja e *grapefruit* é obtida com pressões de 500 MPa a 900 MPa (CRUPI; RISPOLI, 2012). Tratamentos oscilatórios são, geralmente, mais efetivos que os tratamentos contínuos (FERREIRA et al., 2009; MOR-MUR; YUSTE, 2005).

Um estudo realizado por Takahashi et al. (1998) mostrou que o suco de laranja tratado com alta pressão apresentou características químicas e sensoriais semelhantes às do produto não tratado, conservando-se por 20 semanas a 0 °C e 12 semanas a 10 °C. Outro estudo, realizado por Goodner et al. (1999), mostrou que tratamentos com altas pressões, como 700 MPa por 1 minuto, foram efetivos na manutenção da turbidez e na estabilidade microbiológica do suco de laranja, conservando-o por 90 dias em condições de refrigeração.

No processamento por alta pressão, o produto a ser tratado é inserido num recipiente dentro de uma câmara capaz de suportar a pressão do processo, a pressão é aplicada por pistões, por exemplo, e mantida pelo tempo necessário ao tratamento. Após esse tempo, cessa-se a pressão, e o produto tratado é retirado. O processo industrial de tratamento por alta pressão pode ser em batelada ou por sistema semicontínuo (HOGAN et al., 2005).

Estudo de Cardello et al. (2007) sobre a percepção dos consumidores quanto aos alimentos processados com as tecnologias emergentes mostrou um efeito positivo em relação à percepção do risco associado ao processamento por altas pressões, ao contrário do ocorrido com a irradiação e a modificação genética. Deliza et al. (2003) concluíram que a apresentação de informações sobre o uso da tecnologia de alta pressão na embalagem do produto pode ser útil na sua promoção, levando a um maior consumo.

## Resfriamento

A diminuição da temperatura durante o processo de produção dos sucos cítricos concentrados ou pasteurizados é importante para reduzir a velocidade das reações químicas e do crescimento de microrganismos. O suco concentrado é resfriado rapidamente em resfriadores do tipo *flash* (*flash coolers*) e, em seguida, em trocadores tubulares ou de placas com solução refrigerante, resultando no produto congelado (CRUPI; RISPOLI, 2002; DARROS-BARBOSA; CURTOLO, 2005). Os sucos pasteurizados são normalmente resfriados no próprio equipamento pasteurizador, após o tratamento térmico (KIMBALL, 1999).

## Acondicionamento ou embalagem

O acondicionamento do suco depende do fim a que se destina. Os sucos podem ser acondicionados para transporte ou armazenamento, ou embalados para comercialização final (atacado ou varejo).

Para transporte ou armazenamento, o suco é comumente acondicionado em tanques diversos (como tanques de navios, tanques portáteis e caminhões-tanque), sacos de polietileno contidos em tambores metálicos de 200 L ou caixas de madeira e recipientes de plástico. Nesse caso, o produto costuma ser destinado às indústrias para novo processamento. O acondicionamento e bombeamento do suco para os tanques normalmente ocorrem de forma asséptica. Da mesma forma, o acondicionamento do produto final também pode ser feito de forma asséptica. Embalagens laminadas, garrafas, latas e recipientes plásticos são bastante utilizados para comercialização final dos produtos (DARROS-BARBOSA; CURTOLO, 2005; LIU; FLOROS, 2012; KIMBALL, 1999; NISIDA et al., 2002; VIÉGAS, 1991).

## Armazenamento

As indústrias de processamento de sucos cítricos, principalmente as de suco concentrado, não produzem ou produzem apenas uma pequena quantidade de sucos destinados diretamente ao consumidor final. Nesse caso, o armazenamento do produto, comumente, é realizado pelo emprego de baixas temperaturas, variando conforme o tipo de suco, a concentração e o destino, dentre outros. Em algumas situações, os sucos também podem ser conservados com o uso de aditivos químicos, como, por exemplo, ácido benzóico e seus derivados e dióxido de enxofre (CRUPI; RISPOLI, 2002).

A condição de armazenamento dos sucos cítricos está relacionada com o processamento realizado. Sucos concentrados congelados são armazenados em temperaturas de -25 °C (mínima de -15 °C). Sucos pasteurizados podem ser estocados a temperatura de refrigeração (4 °C) ou ambiente, de acordo com algumas variáveis do processo realizado, como, por exemplo, a forma de acondicionamento (asséptico ou não) e o tipo de embalagem (LIU; FLOROS, 2012; OLIVA, 2002; VIÉGAS, 1991).

## Alguns subprodutos da produção de suco

### Óleos e aromas

Óleos cítricos correspondem a diversos produtos extraídos do fruto. A maior parte dos óleos essenciais encontra-se em bolsas de óleo no flavedo, e outras pequenas quantidades de óleo podem ser encontradas em outras partes do fruto. Nos óleos essenciais cítricos, há uma mistura de terpenos e seus derivados, aldeídos, cetonas, ésteres, alcoóis e ácidos, e o maior componente é o d-limoneno (CORCUERA et al., 2012; JOHNSON; VORA, 1983). Do fruto pode-se obter cerca de 0,2% a 0,5% de óleo essencial (COHN; COHN, 1996; KIMBALL, 1996a, 1999; SANDHU; MINHAS, 2006).

O óleo da casca da laranja é coletado como uma emulsão durante a extração do suco, antes da extração ou após a extração (por prensagem dos resíduos) (BUSLIG, 1991a). Num dos sistemas, o extrator realiza a retirada do suco e do óleo ao mesmo tempo.

Os produtos mais comuns recuperados durante o processamento de suco são os óleos de prensagem a frio (*cold pressed oil*), que são os de maior qualidade (SANDHU; MINHAS, 2006). Outros produtos incluem os óleos destilados por vapor (*folded oils*) e aqueles associados à fase aquosa do aroma e óleos de suco (KIMBALL, 1999). Alguns mercados para os óleos essenciais são as indústrias de aromatizantes, de bebidas e farmacêutica (COHN; COHN, 1996; SANDHU; MINHAS, 2006).

Os óleos de prensagem a frio (*cold pressed oil*) são provenientes do processo de extração do suco. Num outro sistema de extração, os frutos precisam ser processados por um extrator de óleo antes da extração do suco. Nesse processo de prensagem a frio, o extrator de óleo é composto por hastes rotativas imersas em um tanque de água; as hastes contêm agulhas de aço inoxidável que perfuram a casca dos frutos, liberando o óleo. O material (borra de óleo) obtido passa por um *finisher* ou uma peneira vibratória, que remove o excesso de material sólido, e por centrífugas, que separam a emulsão rica em óleo. Os óleos prensados a frio podem ser posteriormente destilados (*folded oils*) para remover o d-limoneno e concentrar os componentes aromáticos menos voláteis, que podem ser reincorporados aos sucos cítricos para melhora do sabor (KIMBALL, 1999).

As características de aroma e sabor natural e fresco do suco recém-extraído são em grande parte perdidos durante a evaporação. Óleos essenciais são recuperados a partir do condensado dos evaporadores no primeiro efeito e, em alguns casos, também no segundo efeito (KIMBALL, 1999) e podem ser readicionados ao suco.

## Polpa

Nos últimos anos, tem ocorrido um crescimento do mercado de polpas cítricas, gerado, principalmente, pela ampliação do uso desse subproduto no segmento de bebidas.

A polpa separada em algumas etapas do processo de fabricação de sucos cítricos contém suco, que é extraído, produzindo o suco de lavagem da polpa expelida pelos *finishers* (*pulp wash*) e o suco de lavagem da polpa expelida pelos tubos de evacuação (de orifício) dos extratores (*core wash*).

Esses sucos são obtidos por lavagens sucessivas da polpa (multiestágio) e acabamento do produto. O suco *pulp wash* é de qualidade inferior ao extraído da fruta, com um teor de limonina até duas vezes superior, e contém maiores quantidades de pectina, que aumentam a viscosidade e necessitam de tratamento prévio (centrifugação ou enzimático) para concentração. O suco *core wash* contém altas concentrações de limonina, pois o material usado também possui membranas e sementes, e, por isso, a lavagem para sua obtenção é pouco vigorosa, evitando-se quebras de sementes e a liberação de maiores quantidades de limonina (KIMBALL, 1999). Esses sucos também podem ser usados como fonte de carboidratos, melhora da aparência, agente de “corpo” e turbidez em bebidas (BUSLIG, 1991a; COHN; COHN, 1996; KIMBALL, 1999).

A polpa é separada do suco e de sementes embrionárias com o uso de hidrociclones e *finishers* e, em seguida, é pasteurizada, embalada e, comumente, congelada (CORCUERA et al., 2012).

Além do uso da polpa para a fabricação de outros produtos alimentícios, ela pode ser readicionada ao suco para a produção de produtos com alto teor de polpa e/ou com características mais próximas ao suco fresco (DARROS-BARBOSA; CURTOLO, 2005).

## Pectina

As cascas contendo o albedo da laranja, do limão e do *grapefruit* são matérias-primas para a extração comercial de pectina (TING, 1983). O albedo da laranja possui aproximadamente 3% de pectina. O grau da pectina obtido do albedo de laranja, entre 150 e 200 em condições ótimas, é menor que o obtido do de limão e *grapefruit* (SANDHU; MINHAS, 2006). A pectina pode ser utilizada na fabricação de geleias, sobremesas, molhos de salada e em produtos farmacêuticos, dentre outros (BRADDOCK, 1999).

A fabricação da pectina cítrica envolve uma série de operações, o emprego de substâncias químicas corrosivas e solventes caros, e processos de filtração de soluções bastante viscosas.

As principais etapas de processamento incluem a preparação da casca para a extração, remoção de açúcares e glicosídeos amargos, extração, conversão da protopectina em pectina, filtração do extrato com pectina, precipitação, purificação, desidratação, moagem e embalagem (AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE, 1962; KIMBALL, 1996b). Caso a casca contendo albedo não seja utilizada imediatamente, necessita-se realizar um tratamento térmico para inativação das enzimas pécticas (SANDHU; MINHAS, 2006).

Na preparação da casca, são feitas a remoção de óleos e a trituração, para facilitar a lavagem e extração. A casca triturada é lavada com água suficiente para a remoção completa dos açúcares e glicosídeos amargos. Ocorre pequena perda de pectina solúvel nessa etapa (geralmente, a pectina perdida nessa operação é de baixo grau de geleificação).

A extração da pectina é feita colocando-se a casca preparada em tanques de água, onde é aquecida até a ebulição e adicionada de ácido sulfúrico ou clorídrico, ajustando-se o pH para 2,0. O material acidificado é aquecido, por exemplo, de 94 °C a 100 °C por 45 a 60 minutos. Durante esse tempo, a protopectina é hidrolisada à pectina, que é extraída na solução. Extrações muito ácidas ou por longo período podem promover a degradação da pectina. O extrato obtido pode conter aproximadamente 1% de pectina e ser concentrado por evaporação em baixa temperatura até o teor de 3% a 4%. Assim, as condições de pH, tempo e temperatura do processo devem ser cuidadosamente controladas.

O extrato é submetido à filtração, e a purificação do extrato filtrado é feita por precipitação e lavagem cuidadosa. O filtrado é misturado em tanques contendo um ou mais solventes orgânicos (como etanol ou isobutanol), onde a pectina precipita como uma massa gelatinosa. Após a retirada de parte do solvente da massa por prensagem, o precipitado sofre uma série de lavagens para eliminar o resíduo de solvente.

A pectina lavada é drenada, prensada e desidratada até umidade de 6% a 10%. A pectina seca é moída e embalada (AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE, 1962). Para padronização do produto, pode-se utilizar sacarose ou dextrose (BRADDOCK, 1999).

## Gomos de frutas cítricas em calda

Esse tipo de produto é geralmente elaborado com gomos de *grapefruit*, sendo que algumas tangerinas também podem ser processadas dessa forma.

As condições dos frutos usados como matéria-prima são fundamentais para a qualidade do produto final. Os frutos devem ser maduros, porém bastante firmes, de tamanho uniforme e livres de manchas.

As etapas do processamento são seleção e classificação dos frutos, lavagem em água clorada, descascamento, remoção das membranas, separação dos gomos, acondicionamento dos gomos nas embalagens, adição de xarope, exaustão, esterilização e resfriamento (BERK, 1969; BRAVERMAN, 1949; TING; ROUSEFF, 1986).

O descascamento pode ser feito manualmente, com um pré-aquecimento dos frutos em água fervente ou vapor de água por curto tempo (por exemplo, 2 a 3 minutos, para a penetração do calor apenas no flavedo e albedo), que facilita a remoção da casca, ou mecanicamente, sendo muito importante não provocar injúrias à parte interna do fruto. Essa operação pode ser realizada também por meio de tratamento com enzimas pécnicas (BUSLIG, 1991b).

A remoção das membranas é uma etapa que exige bastante cuidado e pode ser realizada manualmente, com o auxílio de facas, ou por equipamentos denominados de peladores, nos quais os frutos descascados são imersos em uma solução de hidróxido de sódio 1,5%, quente (90 °C), por 10 a 20 segundos, lavados com água e neutralizados com solução diluída de ácido cítrico. Porções de membrana que permanecerem aderidas devem ser retiradas manualmente; se presentes, podem conferir sabor amargo ao produto (em razão, principalmente, da naringina). Tratamentos com sais de cálcio podem ser realizados para aumentar a firmeza dos gomos (BUSLIG, 1991b), por exemplo, aplicando-se pequena quantidade de cloreto de cálcio na água de lavagem (TING, 1983).

A separação dos gomos, mantendo-se as vesículas de suco intactas, pode ser feita manualmente, em mesas, ou mecanicamente (TING; ROUSEFF, 1986). Essa é uma etapa crítica do processo para a obtenção de um produto de qualidade. Gomos injuriados podem ser separados para a elaboração de produtos de segunda linha (BRAVERMAN, 1949).

No caso das tangerinas, praticamente todas as etapas de preparo dos gomos antes do acondicionamento são realizadas de forma manual, em virtude da fragilidade da fruta (TING, 1983). Os gomos e o xarope quente são acondicionados nas embalagens. A concentração do xarope é variável e depende da concentração final de sólidos solúveis que se deseja no produto. Pode-se usar, por

exemplo, xaropes de açúcar com 18 °Brix (TING; ROUSEFF, 1986) ou mais concentrados, com 40 °Brix a 50 °Brix (BRAVERMAN, 1949). As embalagens utilizadas podem ser latas ou potes de vidro com tampas metálicas.

Após o acondicionamento, as embalagens são submetidas ao processo de exaustão, que pode ser térmico ou mecânico, e fechamento.

As embalagens fechadas são esterilizadas em água fervente. Ting (1983) sugere o uso de temperaturas mais baixas (75 °C a 85 °C) para o tratamento térmico. O tempo de tratamento depende do tamanho da embalagem. Por fim, realiza-se o resfriamento em água.

O manuseio dos produtos acabados deve ser muito cuidadoso logo após o processamento, pois os gomos são bastante frágeis durante alguns dias depois da fabricação (BERK, 1969).

## Geleia

Esse produto pode ser elaborado a partir de suco clarificado, suco com polpa ou suco com polpa e pedaços de albedo (BRAVERMAN, 1949).

As etapas para o processamento da geleia são a lavagem dos frutos em água clorada, extração e preparação do suco, formulação, concentração, acondicionamento, fechamento e resfriamento (AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE, 1962; BRAVERMAN, 1949; JACKIX, 1988).

A preparação do suco consiste na clarificação ou na adição de pedaços de frutos com albedo (podem ser usados de 25% a 50% de albedo, em relação à massa total de frutos). Quando os frutos com albedo são utilizados, estes são aquecidos para seu amolecimento, antes da etapa de formulação.

A proporção de fruta e açúcar utilizada na formulação é variável, podendo ser de, por exemplo, 40:60 ou 50:50. Quando necessário, são adicionados pectina (para garantir a formação de um gel firme) e ácido cítrico (para a redução do pH para 3,0 a 3,2).

A mistura é concentrada em tachos abertos ou a vácuo até uma concentração final próxima a 67,5 °Brix. A adição da pectina deve ser, preferencialmente, parcelada. Cerca de 50% da pectina devem ser adicionados no início da concentração, e o restante da pectina e o ácido cítrico devem ser adicionados no final do processo, para minimizar a hidrólise da pectina.

Após a concentração, a geleia é acondicionada ainda quente nas embalagens, que podem ser copos ou potes de vidro com tampa metálica, estas são fechadas, invertidas e submetidas ao resfriamento.

## Albedo cristalizado

No Brasil, o albedo cristalizado é fabricado por empresas de pequena escala. Geralmente são utilizados albedos de laranja e de pomelo.

Esse produto é obtido pela impregnação do albedo com xarope de sacarose e glicose até uma concentração de açúcares suficientemente alta para garantir sua conservação.

As operações para a fabricação do albedo cristalizado são: lavagem dos frutos em água clorada, preparo do albedo (corte e remoção do suco, polpa, membranas e casca, cozimento ou fermentação e lavagem), saturação com xarope, drenagem, lavagem, secagem e embalagem (AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE, 1962; BERK, 1969; JACKIX, 1988). Opcionalmente, pode ser realizada a prensagem do albedo, antes da etapa de saturação (AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE, 1962).

No preparo do albedo, as operações de corte e limpeza podem ser feitas manualmente, sendo a remoção da casca efetuada por raspagem ou descascamento químico.

As operações de cozimento e lavagem são realizadas alternadas, sucessivas vezes, para eliminar o sabor amargo do albedo. A fermentação em salmoura, por 4 a 7 dias, também pode ser realizada com essa finalidade.

A saturação do albedo com açúcares é feita pela imersão em xarope de 30 °Brix, seguida de cozimento por 3 a 5 minutos e repouso por 24 horas. O xarope é concentrado em 10 °Brix a cada 24 horas, e o cozimento é repetido, até que se atinja um teor de sólidos solúveis final de 70 °Brix. O xarope também pode conter 0,05% de ácido cítrico. A seguir, o albedo saturado é imerso em água fervente por 20 segundos, drenado e seco até uma umidade final próxima a 20%. Opcionalmente, pode ser aplicada uma camada de açúcar finamente granulado à superfície do produto .

Podem ser usados como embalagem potes ou sacos de plástico e papel celofane e, como embalagem secundária, caixas de papel.

## Referências

AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE. **Chemistry and technology of citrus, citrus products, and byproducts**. Washington, DC: United States-Department of Agriculture, 1962. 99 p. (USA/DA. Agriculture Handbook, 98).

ALVES, V. D.; COELHO, I. M. Orange juice concentration by osmotic evaporation and membrane distillation: A comparative study. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 74, n. 1, p. 125-133, 2006.

ARAÚJO, W. A. **Avaliação do processo de osmose inversa para concentração de suco de laranja e simulação da recuperação do etil butirato através da pervaporação com predição de propriedades**. 2007. 140 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

ARAÚJO, W. A.; MACIEL, M. R. W. Reverse osmosis concentration of orange juice using spiral wound membranes. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 16, n. 3, p. 213-219, 2005.

BAKER, R. A.; BRUEMER, J. H. Enzyme treatment of orange juice to increase cloud and yield and decrease sinking pulp level. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Orlando, v. 84, p. 197-200, 1971.

BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; JULIANO, P. Food sterilization by combining high pressure and thermal energy. In: GUTIÉRREZ-LÓPEZ, G. F.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; WELTI-CHANES, J.; PARADA-ARIAS, E. **Food engineering: Integrated approaches**. New York: Springer, 2008. p. 9-46.

BERK, Z. **Industrial processing of citrus fruit**. Vienna: United Nations Industrial Development Organization, 1969. 45 p. (UNIDO. Food Industry Studies, 2).

- BRADDOCK, R. J. **Handbook of citrus by-products and processing technology**. New York: John Wiley & Sons, 1999. 247 p.
- BRAVERMAN, J. B. S. **Citrus products: chemical composition and chemical technology**. New York: Interscience, 1949. 424 p.
- BUSLIG, B. S. Oranges. In: ESKIN, N. A. M. (Ed.). **Quality and preservation of fruits**. Boca Raton: CRC Press, 1991a. p. 1-16.
- BUSLIG, B. S. The grapefruit. In: ESKIN, N. A. M. (Ed.). **Quality and preservation of fruits**. Boca Raton: CRC Press, 1991b. p. 29-43.
- CARDELLO, A. V.; SCHUTZ, H. G.; LESHER, L. L. Consumer perceptions of foods processed by innovative and emerging technologies: A conjoint analytic study. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, NL, v. 8, n. 1, p. 73-83, 2007.
- CASSANO, A.; DONATO, L.; DRIOLI, E. Ultrafiltration of kiwifruit juice: operating parameters, juice quality and membrane fouling. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 79, n. 2, p. 613-621, 2007.
- CHEFTEL, J. C. Review: High-pressure, microbial inactivation and food. **Food Science and Technology International**, Tokyo, JP, v. 1, n. 1, p. 75-90, 1995.
- CIANCI, F. C.; SILVA, L. F. M.; CABRAL, L. M. C.; MATTA, V. M. Clarificação e concentração de suco de caju por processo com membranas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 3, p. 579-583, 2005.
- COHN, R.; COHN, A. L. The by-products of fruit processing. In: ARTHEY, D.; ASHURST, P. R. (Ed.). **Fruit processing**. London, GB: Blackie Academic & Professional, 1996. p. 196-220.
- CORCUERA, J. I. R.; BRADDOCK, R. J.; GOODRICH-SCHNEIDER, R. M. Oranges. In: SIDDIQ, M.; AHMED, J.; LOBO, M. G.; OZADALI, F. (Ed.). **Tropical and subtropical fruits: Postharvest, processing and packaging**. Ames: Wiley-Blackwell, 2012. p. 399-417.
- COUTURE, R.; ROUSEFF, R. L. Debitting and deacidifying sour orange (*Citrus aurantium*) juice using neutral and anion exchange resins. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 57, p. 380-384, 1992.
- CROSS, S. Membrane concentration of orange juice. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Winter Haven, v. 102, p. 146-152, 1989.
- CRUPI, F.; RISPOLI, G. Citrus juice technology. In: DUGO, G.; GIACOMO, A. (Ed.). **The genus citrus**. Boca Raton: CRC Press, 2002. p. 77-113.
- DARROS-BARBOSA, R.; CURTOLO, J. E. Produção industrial de suco e subprodutos cítricos. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico: FUNDAG, 2005. p. 840-870.
- DELIZA, R.; ROSENTHAL, A.; SILVA, A. L. S. Consumer attitude towards information on non conventional technology. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 14, n. 1-2, p. 43-49, 2003.
- FERREIRA, E. H. R.; ROSENTHAL, A.; CALADO, V.; SARAIVA, J.; MENDO, S. *Byssochlamys nivea* inactivation in pineapple juice and nectar using high pressure cycles. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 95, n. 4, p. 664-669, 2009.
- GARICA-DIEZ, F.; GARCIA MEDIÁVILLA, V.; BAYON, J. E.; GONZALEZ GALLEGU, J. Pectin feeding influences fecal bile acid excretion, hepatic bile acid and cholesterol synthesis and sérum cholesterol in rat. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 126, n. 7, p. 1766-1771, 1996.
- GOODNER, J. K.; BRADDOCK, R. J.; PARISH, M. E.; SIMS, C. A. Cloud stabilization of orange juice by high pressure processing. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 64, n. 4, p. 699-700, 1999.
- HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. **Processos de separação por membranas**. Rio de Janeiro: E-papers, 2006. 180 p.
- HOGAN, E.; KELLY, A. L.; SUN, D. High pressure processing of foods: An overview. In: SUN, D. (Ed.). **Emerging technologies for food processing**. St. Louis: Elsevier, 2005. p. 3-32.
- HORTON, P. B.; DICKMAN, S. R. Stability of ascorbic acid in reconstituted frozen orange juice. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 40, p. 584-585, 1977.
- JACKIX, M. H. **Doces, geléias e frutas em calda**. São Paulo: Icone, 1988. 172 p.
- JESUS, D. F.; LEITE, M. F.; SILVA, L. F. M.; MODESTA, R. D.; MATTA, V. M.; CABRAL, L. M. C. Orange (*Citrus sinensis*) juice concentration by reverse osmosis. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 81, n. 2, p. 287-291, 2007.
- JOHNSON, J. D.; VORA, J. D. Natural citrus essences. **Food Technology**, Chicago, v. 12, p. 92-93, 1983.
- KIMBALL, D. A. **Citrus processing: a complete guide**. 2nd ed. Gaithersburg: Aspen, 1999. 450 p.

- KIMBALL, D. A. Grapefruits, lemons, and limes. In: SOMOGYI, L. P.; BARRETT, D. M.; HUI, Y. H. (Ed.). **Major processed products**. Lancaster: Technomic Publishing, 1996a. p. 305-336.
- KIMBALL, D. A. Orange and tangerines. In: SOMOGYI, L. P.; BARRETT, D. M.; HUI, Y. H. (Ed.). **Major processed products**. Lancaster: Technomic Publishing, 1996b. p. 265-304.
- KOSEOGLU, S. S.; LAWHON, J. T.; LUSAS, E. W. Use of membranes in citrus juice processing. **Food Technology**, Chicago, v. 44, n. 12, p. 90-97, 1990.
- LABOISSIÈRE, L. H. E. S.; DELIZA, R.; BARROS-MARCELLINI, A. M.; ROSENTHAL, A.; CAMARGO, L. M. A. Q.; JUNQUEIRA, R. G. Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on sensory characteristics of yellow passion fruit juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, NL, v. 8, n. 4, p. 469-477, 2007.
- LEE, S. K.; KADER, A. A. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, NL, v. 20, n. 3, p. 207-220, 2000.
- LIU, M.; FLOROS, J. D. Aseptic processing and packaging. In: SUN, D. (Ed.). **Thermal food processing: New technologies and quality issues**. Boca Raton: CRC, 2012. p. 441-458.
- LIU, Y. Q.; HEYING, E.; TANUMIHARDJO, S. A. History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Anaheim, v. 11, p. 530-545, 2012.
- MALDONADO, J. **Membranas e processos de separação**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Tecnologia, 1991. 91 p.
- MANTHEY, J. A.; GROHMANN, K.; GUTHRIE, N. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to câncer and inflammation. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 8, p. 135-153, 2001.
- MORAND, C.; DUBRAY, C.; MILENKOVIC, D.; LIOGER, D.; MARTIN, J. F.; SCALBERT, A.; MAZUR, A. Hesperidin contributes to the vascular protective effects of orange juice: A randomized crossover study in healthy volunteers. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 93, p. 73-80, 2011.
- MOR-MUR, M.; YUSTE, J. Microbiological aspects of high-pressure processing. In: SUN, D. (Ed.). **Emerging technologies for food processing**. St. Louis: Elsevier, 2005. p. 47-65.
- NAGY, S.; CHEN, C. S.; SHAW, P. E. (Ed.). **Fruit juice processing technology**. Aurburndale: Agscience, 1993. 713 p.
- NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: Markestrat, 2010. 138 p.
- NISIDA, A. L. A. C. **Estabilidade de suco de laranja (*Citrus sinensis*) refrigerado, acondicionado em embalagem**. 2000. 61 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- NISIDA, A. L.; MENEZES, H. C.; TOCCHINI, R. P.; BERBARI, S. A. G. Estabilidade de suco de laranja (*Citrus sinensis*) refrigerado, acondicionado em embalagem asséptica. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 5, p. 95-100, 2002.
- OHR, L. M. Fortifying with fiber. **Food Technology**, Chicago, v. 58, n. 2, p. 71-75, 2004.
- OLIVA, P. B. **Influência das variedades cítricas (*Citrus sinensis* L Osbeck) Natal, Pêra-Rio e Valência na qualidade do suco da laranja pasteurizado**. 2002. 162 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- ONGARATTO, R. S.; VIOTTO, L. A. Clarificação do suco de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) e a concentração de carotenoides por microfiltração e ultrafiltração. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, VII BMCFB, p. 86-93, jun. 2009.
- PALLET, D.; CABRAL, L.; MATTA, V.; PEZOA-GARCIA, N. H.; MENEZES, H. C.; DORNIER, M.; REYNES, M. Aplicação da tecnologia de membranas no processamento de sucos de frutas brasileiras. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, DF, v. 22, n. 2, p. 427-437, 2005.
- POZZAN, M.; TRIBONI, H. R. Colheita e qualidade do fruto. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico: FUNDAG, 2005. p. 800-822.
- QIU, X.; SHARMA, S.; TUHOLA, L.; JIA, M.; ZHANG, Q. H. An integrated PEF pilot plant for continuous nonthermal pasteurization of fresh orange juice. **Transactions of the ASAE**, St. Joseph, v. 41, n. 4, p. 1069-1074, 1998
- RAGHAVARAO, K. S. M. S.; NAGARAJ, N.; PATIL, G.; BABU, B. R.; NIRANJAN, K. Athermal membrane process for the concentration of liquid foods and natural colours. In: SUN, D. (Ed.). **Emerging Technologies for food processing**. St. Louis: Elsevier, 2005. p. 251-277.

- SÁ, I. S.; CABRAL, L. M. C.; MATTA, V. M. Concentração de suco de abacaxi através dos processos com membranas. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 6, n. 1, p. 53-62, 2003.
- SANDHU, K. S.; MINHAS, K. S. Oranges and citrus juices. In: HUI, Y. H.; BARTA, J.; CANO, M. P.; GUSEK, T. W.; SIDHU, J. S.; SINHA, N. K. (Ed.). **Handbook of fruits and fruit processing**. Ames: Blackwell, 2006. p. 309-357.
- SILVA, F. C.; GUIMARÃES, D. H. P.; GASPARETTO, C. A reologia do suco de acerola: efeitos da concentração e temperatura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 121-126, 2005.
- SILVA, F. T.; JARDINE, J. G.; MATTA, V. M. Concentração de suco de laranja (*Citrus sinensis*) por osmose inversa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 99-104, 1998.
- SMOOT, J. M.; NAGY, S. Effects of storage temperature and duration on total vitamin C content of canned single-strength grapefruit juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 28, n. 2, p. 417-421, 1980.
- STARK, A.; MADAR, Z. Dietary fiber. In: GOLDBERG, I. (Ed.). **Functional foods**. New York: Chapman & Hall, 1994. p. 183-201.
- STEWART, I. Pro-vitamin A carotenoids in citrus juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 25, p. 1132-1137, 1977.
- SUN, D. **Emerging technologies for food processing**. St. Louis: Elsevier, 2005. 771 p.
- SWIENIEK, R. J. Homogenization of orange juice during evaporation decreases viscosity 50%. **Food Processing**, Chicago, v. 51, p. 56-60, 1990.
- TAKAHASHI, F.; PEHRSSON, P. E.; ROVERE, P.; SQUARCINA, N. High-pressure processing of fresh orange juice. **Industria Conserve**, Parma, v. 73, n. 4, p. 363-368, 1998.
- TING, S. V. Citrus fruit. In: CHAN JUNIOR, H. T. (Ed.). **Handbook of tropical foods**. New York: Marcel Dekker, 1983. p. 201-253.
- TING, S. V.; DESZYCK, E. J. The carbohydrates in the peel of oranges and grapefruit. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 26, p. 146-152, 1961.
- TING, S. V.; MOORE, E. L.; MCALLISTER, J. W.; STREIFF, R. R.; HSU, J. N. C.; HILL, E. C. Nutrient assay of Florida frozen concentrated orange juice for nutrition labeling. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Orlando, v. 87, p. 206-209, 1974.
- TING, S. V.; ROUSEFF, R. L. **Citrus fruits and their products**. New York: Marcel Dekker, 1986. 293 p.
- TING, S. V.; VINES, H. M. Organic acids in the juice vesicles of Florida 'Hamlin' orange and 'Marsh' seedless grapefruit. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, Beltsville, v. 88, p. 291-297, 1966.
- VAILLANT, F.; MILLAN, A.; DORNIER, M.; DECLoux, M.; REYNES, M. Strategy for economical optimization of the clarification of pulpy fruit juices using crossflow microfiltration. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 48, n. 1, p. 83-90, 2001.
- VARSEL, C. Citrus juice processing. In: NAGY, S.; ATTAWAY, J. (Ed.). **Citrus nutrition and quality**. Washington, DC: American Chemical Society, 1980. p. 225-271.
- VIÉGAS, F. C. P. A industrialização dos produtos cítricos. In: RODRIGUEZ, O. (Ed.). **Citricultura brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v. 2, p. 898-922.
- WANG, Y.; CHEN, S.; YU, O. Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 91, n. 4, p. 949-956, 2011.



# Experimentação agrícola

Carlos Alberto da Silva Ledo  
Ranulfo Corrêa Caldas

## Introdução

O presente capítulo tem por objetivo expor algumas noções de experimentação agrícola com ênfase na cultura dos citros, que compreende espécies do gênero *Citrus* (Linnaeus) e de gêneros afins. Inicialmente serão apresentados conceitos básicos sobre o que é a experimentação e seus elementos fundamentais, sendo sequencialmente discutidos os procedimentos para a análise estatística dos principais delineamentos experimentais. Finalmente, serão feitas considerações sobre a importância de se conduzir um experimento com precisão. Diversas informações relatadas, neste capítulo, são oriundas de revisões realizadas em livros de experimentação agrícola publicados nas principais universidades de agronomia do País e da experiência de pesquisadores da Embrapa Mandioca e Fruticultura, ao longo de vários anos de experimentação com a cultura dos citros.

A experimentação é uma atividade que tem por finalidade estudar os experimentos, ou seja, seu planejamento, condução, coleta e análise de dados, e sua interpretação de resultados. Visando a um melhor entendimento do que é experimentação agrícola, faz-se necessário conceituar alguns elementos:

**Experimento:** é um trabalho planejado, que segue determinados princípios básicos, com o objetivo de se fazer comparações dos efeitos dos tratamentos.

**Tratamento:** é a condição imposta à parcela experimental, cujo efeito deseja-se medir ou comparar em um experimento.

**Parcela experimental:** é a menor unidade de um experimento em que se aplica um dado tratamento ou uma combinação deste. Denomina-se parcela útil a unidade na qual os tratamentos são avaliados e onde são coletadas as variáveis respostas.

Em pesquisas com citros, a parcela pode ser representada por uma ou várias plantas, um tubo de ensaio, uma placa de petri ou um vaso em casa de vegetação. A representatividade da parcela varia de acordo com o tipo de experimento que se estuda.

Na unidade experimental, deve haver uma grande uniformidade do material em estudo. Em se tratando de experimento de campo, a parcela deve ser formada por um único tipo de muda. Atenção especial deve ser dada à origem do porta-enxerto. Não se devem colocar, na mesma

parcela, mudas em fases de desenvolvimento diferentes ou mudas de origem desconhecida. Esse descuido pode levar a um maior erro experimental, não se devendo esquecer que, em experimentos com culturas perenes, como no caso dos citros, esse erro tem efeito multiplicativo.

A estrutura da parcela pode variar de um experimento para outro, dependendo da linha de pesquisa e de seu objetivo. O número de plantas úteis na parcela é função do material genético, do custo do experimento, da variabilidade do solo, do número de repetições e do coeficiente de correlação intraclasse. Esse coeficiente mede a competição entre as plantas dentro da parcela; quanto maior esse coeficiente, menor número de plantas deve haver na parcela, de modo a diminuir essa competição. Em culturas com alto grau de correlação intraclasse, o ideal seria uma planta útil por parcela, com um grande número de repetições, de 15 a 20.

Em alguns experimentos, em razão da natureza dos tratamentos e da proximidade das parcelas experimentais entre si, utilizam-se bordaduras.

**Bordadura:** é uma área de proteção utilizada para evitar que uma parcela seja afetada pelo tratamento da parcela vizinha. Sua finalidade é proteger e permitir condições homogêneas às plantas úteis da parcela experimental, que são as plantas que vão fornecer os dados necessários ao teste das hipóteses formuladas.

Justifica-se o uso de bordadura na cultura dos citros principalmente quando se trata de experimentos de adubação, irrigação ou espaçamento ou, também, quando se quer proteger o experimento contra efeitos externos, tais como ventos e roubo.

Deve-se atentar para o fato de que a utilização de bordadura aumenta consideravelmente a área e os custos do experimento, devendo seu emprego ser analisado com muito cuidado.

Dependendo do tipo de experimento que se pretende instalar, utiliza-se ou não bordaduras. Comparando-se um experimento de competição de cultivares com um experimento de irrigação, no primeiro a exigência de bordadura é pequena, enquanto que no segundo esse cuidado é obrigatório, pela influência da lâmina de água de um tratamento sobre o outro.

**Delineamento experimental:** é a forma de distribuição dos tratamentos na área experimental. Os principais delineamentos experimentais utilizados são: inteiramente casualizado, blocos casualizados e quadrado latino.

## Princípios básicos da experimentação

Para que um experimento forneça dados que possam ser analisados mediante procedimentos estatísticos, há necessidade de que alguns princípios básicos sejam atendidos, conhecidos como princípios básicos da experimentação: repetição, casualização e controle local.

**Repetição:** consiste no número de vezes em que o tratamento aparece no experimento. Tem por finalidade permitir a obtenção da estimativa do erro experimental, aumentar a precisão das estimativas e aumentar o poder dos testes estatísticos. Dentre os fatores que determinam o número de repetições a ser usado, pode-se citar: número de tratamentos, disponibilidade de material experimental, de área e de recursos para a pesquisa.

**Casualização:** tem por finalidade propiciar a todos os tratamentos a mesma probabilidade de serem designados a qualquer uma das parcelas experimentais. Visa dar validade às estimativas calculadas com os dados observados e aos testes de hipóteses realizados.

**Controle local:** sua função é diminuir o erro experimental. É usado quando uma área experimental é heterogênea. Consiste em dividir uma área heterogênea em áreas menores e homogêneas, chamadas de blocos. Dentro do bloco, a variação deve ser mínima, porém entre os blocos poderá haver grande ou pequena variação. Na análise de variância, esse fator será separado.

Os princípios básicos da repetição e da casualização são obrigatórios em todos os experimentos. O do controle local vai depender das condições da área experimental. Em áreas homogêneas, dispensa-se o seu uso. Já em áreas heterogêneas, a exemplo de áreas com declividade, onde se espera que exista um gradiente de fertilidade do solo, seu emprego é necessário.

## Delineamentos experimentais

### Delineamento inteiramente casualizado (DIC)

No delineamento inteiramente casualizado é necessária a completa homogeneidade das condições ambientais e do material experimental. A única restrição que se impõe é para os tratamentos; as outras variações, de qualquer ordem, são consideradas do acaso.

Na cultura dos citros, esse delineamento é usado em experimentos de laboratório (p. ex.: avaliações de meios de culturas e fontes de sacarose), ou em casa de vegetação (p. ex.: avaliações de cultivares resistentes ao alumínio). No campo, raramente serão encontradas condições homogêneas de solo que permitam utilizar esse delineamento experimental.

Quando as condições favorecem o uso desse delineamento, os tratamentos são distribuídos ao acaso nas unidades experimentais, e o número de repetições pode variar de um tratamento para outro, constituindo uma vantagem desse delineamento. É o único delineamento em que não há necessidade de se aplicar o princípio básico do controle local.

Um exemplo de um experimento em que serão avaliadas cinco cultivares de citros (C1, C2, C3, C4 e C5), instalado no delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições (R1, R2, R3 e R4), é apresentado a seguir:

C4 R3	C1 R2	C2 R3	C4 R1	C3 R2
C1 R3	C2 R4	C5 R1	C5 R3	C2 R1
C4 R2	C3 R1	C3 R4	C3 R3	C4 R4
C5 R4	C1 R4	C2 R2	C5 R2	C1 R1

Observa-se que não há qualquer restrição à casualização, podendo um determinado tratamento ocupar qualquer posição na área experimental.

O modelo estatístico do delineamento inteiramente casualizado é dado por:

$$y_{ij} = m + t_i + e_{ij}$$

em que

$y_{ij}$ : valor observado na parcela experimental que recebeu o tratamento  $i$  na repetição  $j$  ( $j = 1, 2, \dots, J$ );

$m$ : média geral do experimento;

$t_i$ : efeito do tratamento  $i$  ( $i = 1, 2, \dots, I$ );

$e_{ij}$ : erro experimental.

Na Tabela 1 é apresentado o esquema da análise de variância relativa a experimentos instalados com base no delineamento inteiramente casualizado.

Não são apresentadas as expressões para a obtenção das estimativas dos efeitos genéticos e de suas respectivas somas de quadrados. Essas expressões poderão ser obtidas em Banzatto e Kronka (1992), Ferreira (2000a) e Gomes (2000).

**Tabela 1.** Esquema da análise de variância para experimentos instalados no delineamento inteiramente casualizado.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos (T)	I - 1	SQ (T)	QM (T)	QM (T) / QM (R)
Resíduo (R)	I(J - 1)	SQ (R)	QM (R)	
<b>Total</b>	<b>IJ - 1</b>	<b>SQ (Total)</b>		

## Delineamento em blocos casualizados (DBC)

O delineamento em blocos casualizados é utilizado quando as condições da área experimental não são homogêneas. É o delineamento mais empregado na experimentação com a cultura dos citros e na experimentação agrícola em geral.

A área heterogênea é subdividida em blocos, de forma que cada bloco seja o mais homogêneo possível. A exigência de homogeneidade dentro de cada bloco pode limitar o número de tratamentos a serem testados.

Considerando um experimento em que serão avaliadas cinco cultivares de citros (C1, C2, C3, C4 e C5), em uma área com gradiente de fertilidade do solo conhecido, instalado no delineamento em blocos casualizados com quatro repetições (blocos I, II, III e IV), um plano experimental passível de utilização constaria de:

Bloco I	C3	C1	C2	C5	C4
Bloco II	C1	C4	C3	C5	C2
Bloco III	C5	C3	C1	C2	C4
Bloco IV	C4	C5	C3	C2	C1

Fertilidade  
↓

Observa-se que em cada bloco há uma repetição de cada tratamento. Os tratamentos são casualizados dentro de cada bloco. A disposição dos blocos vai depender das condições de heterogeneidade da área experimental. No esquema indicado, como o gradiente de fertilidade é no sentido vertical, os blocos devem ser dispostos no sentido horizontal, ou seja, têm-se no Bloco I todos os tratamentos avaliados em condição de baixa fertilidade do solo, enquanto que no Bloco IV os mesmos tratamentos serão avaliados em condições de alta fertilidade do solo. De maneira geral, o bloco deve ser o mais homogêneo possível, podendo haver diferenças marcantes de um bloco para o outro.

O modelo estatístico do delineamento em blocos casualizados é dado por:

$$y_{ij} = m + b_j + t_i + e_{ij}$$

em que

$y_{ij}$ : valor observado na parcela experimental que recebeu o tratamento  $i$  no bloco  $j$ ;

$m$ : média geral do experimento;

$b_j$ : efeito do bloco  $j$  ( $j = 1, 2, \dots, J$ );

$t_i$ : efeito do tratamento  $i$  ( $i = 1, 2, \dots, I$ );

$e_{ij}$ : erro experimental.

Na Tabela 2, é apresentado o esquema da análise de variância relativa a experimentos instalados com base no delineamento em blocos casualizados.

**Tabela 2.** Esquema da análise de variância para experimentos instalados no delineamento em blocos casualizados.

FV	GL	SQ	QM	F
Blocos (B)	J - 1	SQ (B)	QM (B)	QM (B) / QM (R)
Tratamentos (T)	I - 1	SQ (T)	QM (T)	QM (T) / QM (R)
Resíduo (R)	(J - 1)(I - 1)	SQ (R)	QM (R)	
<b>Total</b>	<b>IJ - 1</b>	<b>SQ (Total)</b>		

Fonte: Gomes (2000).

## Delineamento em quadrado latino (DQL)

O delineamento em quadrado latino permite o controle simultâneo de dois fatores externos, cujos efeitos sejam conhecidos. As parcelas são arranjadas como em um quadrado. O número de tratamentos é igual ao número de linhas que, por sua vez, é igual ao número de colunas e ao número de repetições. Tais características limitam o uso desse delineamento. Em razão disso, o experimenter deve evitar trabalhar com quadrado  $3 \times 3$  ou  $4 \times 4$ , porque os ensaios terão poucas parcelas, 9 e 16, respectivamente, o que não é recomendável na experimentação agrícola, principalmente no tocante à cultura dos citros, a menos que esses quadrados sejam repetidos, com o experimento incluindo vários quadrados.

Linhas e colunas são termos gerais utilizados para referenciar critérios de classificação, podendo, assim, representar uma espécie de tratamentos. Os tratamentos são casualizados tanto dentro de linhas como de colunas, sendo estas também submetidas à casualização na montagem do experimento. Nesse processo, cada tratamento deve ocorrer somente uma vez dentro de cada linha e de cada coluna, o que nem sempre se verifica ao se realizar as casualizações necessárias, podendo, não raramente, um mesmo tratamento aparecer mais de uma vez dentro de uma dada linha ou coluna, isso porque, ao se proceder, por exemplo, a casualização em nível de linhas, automaticamente a casualização também se verificará em nível de colunas, e vice-versa. Visando contornar essa dificuldade, publicações especializadas trazem sorteios dessa natureza já prontos, passíveis de serem empregados por aqueles que deles necessitem.

Em ensaios agrônômicos sob condições de campo, o quadrado latino geralmente é utilizado para controlar diferenças de fertilidade em dois sentidos.

Em um experimento instalado no delineamento em quadrado latino, com cinco repetições, em que serão avaliadas cinco cultivares de citros (C1, C2, C3, C4 e C5), em uma área com gradiente de fertilidade em dois sentidos, horizontal e vertical, pode-se ter o seguinte esquema:

Fertilidade				
→				
C4	C1	C3	C2	C5
C5	C2	C4	C3	C1
C2	C4	C1	C5	C3
C3	C5	C2	C1	C4
C1	C3	C5	C4	C2
↓ Fertilidade				

Observa-se que cada tratamento ocorre uma única vez em cada linha e em cada coluna. O modelo estatístico do delineamento em quadrado latino é dado por:

$$y_{ijk} = m + l_j + c_k + t_i + e_{ijk}$$

em que

$y_{ijk}$ : valor observado na parcela experimental que recebeu o tratamento  $i$ , na linha  $j$  e na coluna  $k$ ;

$m$ : média geral do experimento;

$l_j$ : efeito da linha  $j$  ( $j = 1, 2, \dots, I$ );

$c_k$ : efeito da coluna  $k$  ( $k = 1, 2, \dots, I$ );

$t_i$ : efeito do tratamento  $i$  ( $i = 1, 2, \dots, I$ );

$e_{ijk}$ : erro experimental.

O esquema da análise de variância do delineamento em quadrado latino é apresentado na Tabela 3. Desde que linhas e colunas representam restrições à casualização, o teste F pode não ser apropriado a esses critérios de classificação.

**Tabela 3.** Esquema da análise de variância para experimentos instalados no delineamento em quadrado latino.

FV	GL	SQ	QM	F
Linhas (L)	I - 1	SQ (L)	QM (L)	QM (L) / QM (R)
Colunas (C)	I - 1	SQ (C)	QM (C)	QM (C) / QM (R)
Tratamentos (T)	I - 1	SQ (T)	QM (T)	QM (T) / QM (R)
Resíduo (R)	(I - 1)(I - 2)	SQ (R)	QM (R)	
<b>Total</b>	<b>I<sup>2</sup> - 1</b>	<b>SQ (Total)</b>		

## Experimentos fatoriais

São aqueles em que os tratamentos resultam da combinação de fatores. Tais fatores podem ser quantitativos (épocas, níveis de adubação, doses de nutrientes, lâminas de água usada em irrigação, etc.) ou qualitativos (variedades, híbridos, tipos de poda, método de plantio, etc.). No experimento fatorial, os tratamentos podem ser formados pela combinação de um fator quantitativo e outro qualitativo, somente de um tipo ou de vários tipos. Isso dependerá dos fatores que se quer testar. Por exemplo: três seleções ou clones de laranja 'Pera' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] (qualitativo) e três níveis de adubação (quantitativo), fatorial 3 x 3; três porta-enxertos híbridos de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. enxertados com copas de laranja 'Bahia' (*C. sinensis*) (qualitativo) e quatro lâminas de água distintas (qualitativo), fatorial 3 x 4; três níveis de fósforo (P) (quantitativo), três níveis de potássio (K) (quantitativo) e quatro níveis de nitrogênio (N) (quantitativo), fatorial 3 x 3 x 4.

O experimento fatorial é denominado completo quando ele inclui todas as combinações dos fatores. Exemplo: quatro espaçamentos (E1, E2, E3 e E4) e três cultivares de laranja 'Bahia' em combinação com limoeiro 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck) (C1, C2 e C3), fatorial 4 x 3, em que têm-se as 12 combinações possíveis:

**E1 C1   E2 C1   E3 C1   E4 C1**  
**E1 C2   E2 C2   E3 C2   E4 C2**  
**E1 C3   E2 C3   E3 C3   E4 C3**

Se o experimento não inclui todas as combinações possíveis, ele é denominado experimento fatorial incompleto.

Esses experimentos, além de estudar os fatores *per se*, permitem também investigar a interação entre os fatores testados.

Na experimentação com a cultura dos citros, os experimentos fatoriais completos são os mais usados, sejam eles de adubação ou não. Esses experimentos permitem uma análise estatística menos complexa que os experimentos fatoriais incompletos, os quais, na maioria das vezes, requerem um grande volume de cálculos estatísticos.

Como os experimentos fatoriais resultam da combinação de fatores, essa combinação, também denominada delineamento dos tratamentos, pode ser instalada no delineamento inteiramente casualizado ou em blocos casualizados completos ou incompletos ou em parcelas subdivididas.

Uma das desvantagens desses experimentos consiste no elevado número de tratamentos em função da combinação dos fatores, o que, às vezes, implica trabalhar com blocos muito grandes. Para contornar esse problema, pode-se usar a técnica do confundimento. Os tratamentos de cada bloco (incompleto) são selecionados de tal maneira que as estimativas dos fatores não são prejudicadas, o que somente ocorre com as interações de pouco interesse. O uso adequado dessa técnica requer um certo conhecimento de estatística experimental ou a assessoria de um especialista em métodos quantitativos, podendo ser consultados Cochran e Cox (1957), Fisher (1942, 1945) e Gomes (1984a).

Nos experimentos fatoriais, o modelo estatístico varia de um experimento para outro em razão do número de fatores testados. Para um experimento fatorial em blocos casualizados com dois fatores  $a$  e  $c$ , o modelo estatístico é dado por:

$$y_{ijk} = m + b_j + a_i + c_k + (ac)_{ik} + e_{ijk}$$

em que

$y_{ijk}$ : valor observado na parcela experimental que recebeu o nível  $i$  do fator  $a$  e o nível  $k$  do fator  $c$  no bloco  $j$ ;

$m$ : média geral do experimento;

$b_j$ : efeito do bloco  $j$  ( $j = 1, 2, \dots, J$ );

$a_i$ : efeito do nível  $i$  do fator  $a$  ( $i = 1, 2, \dots, I$ );

$c_k$ : efeito do nível  $k$  do fator  $c$  ( $k = 1, 2, \dots, K$ );

$(ac)_{ik}$ : efeito da interação entre o nível  $i$  do fator  $a$  e o nível  $k$  do fator  $c$ ;

$e_{ijk}$ : erro experimental.

O esquema da análise de variância relativa a um experimento fatorial, instalado com base no delineamento em blocos casualizados, é apresentado na Tabela 4.

**Tabela 4.** Esquema da análise de variância para experimento fatorial instalado no delineamento em blocos casualizados.

FV	GL	SQ	QM	F
Blocos (B)	J - 1	SQ (B)	QM (B)	QM (B) / QM (R)
Fator a (A)	I - 1	SQ (A)	QM (A)	QM (A) / QM (R)
Fator c (C)	K - 1	SQ (C)	QM (C)	QM (C) / QM (R)
A x C (AC)	(I - 1)(K - 1)	SQ (AC)	QM (AC)	QM (AC) / QM (R)
Resíduo (R)	(IK - 1)(J - 1)	SQ (R)	QM (R)	
<b>Total</b>	<b>IJK - 1</b>	<b>SQ (Total)</b>		

## Experimentos em parcelas subdivididas

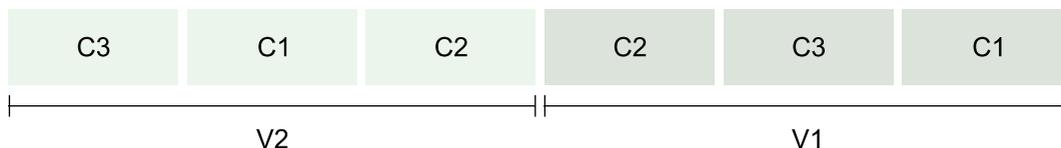
Esses experimentos, também conhecidos como *split plot*, são utilizados quando se tem dois ou três fatores, e há um maior grau de importância de um sobre o outro ou sobre os outros. Nesse tipo de experimento, aparecem dois resíduos na análise da variância: o primeiro, denominado resíduo (a), servirá para testar o fator que se encontra na parcela maior, de menor importância; e o segundo, resíduo (b), que testará o fator da parcela menor (subparcela), de maior importância. Portanto, ao optar por esse delineamento experimental, o pesquisador, primeiramente, deve observar com muita atenção a questão dos dois resíduos, de modo a não haver uma grande diferença entre eles, não devendo o resíduo (b) ser mais de duas vezes superior ao resíduo (a).

Após a decisão do fator que será avaliado em nível de parcelas, estas poderão ser dispostas no delineamento inteiramente casualizado ou de blocos casualizados. O outro fator será sorteado nas subparcelas. Há experimentos em que as subparcelas também são divididas, testando-se um terceiro fator; nesse caso, o experimento é em parcelas subsubdivididas, com três resíduos distintos: resíduo (a), relacionado às parcelas; resíduo (b), às subparcelas; e resíduo (c), às subsubparcelas.

Em algumas situações, o pesquisador utilizará o esquema de parcela subdividida, em detrimento ao esquema fatorial, pela facilidade de instalação do experimento no campo em função dos tipos de tratamentos a serem estudados. Por exemplo, em um estudo com dois tipos de cobertura vegetal (V1 e V2) e três cultivares de citros (C1, C2 e C3), instalado no delineamento em blocos casualizados, em esquema fatorial, um provável sorteio para um dado bloco pode resultar em:



Nesse caso, uma determinada parcela deve receber a cobertura vegetal V1, e uma parcela vizinha a cobertura vegetal V2, situação inviável em termos práticos. Dessa forma, ao se utilizar o esquema de parcelas subdivididas, deve-se dividir o bloco em duas parcelas, em que serão sorteados os tipos de cobertura vegetal, sendo que dentro de cada parcela há uma subdivisão em subparcelas, com sorteio das cultivares. Um provável sorteio pode ser visualizado a seguir:



Observa-se que, nesse estudo, em função do tipo de tratamento, o esquema de parcelas subdivididas é mais adequado que o esquema fatorial, por propiciar uma maior facilidade prática na instalação do experimento em campo.

O modelo estatístico para o experimento em parcelas subdivididas, com dois fatores,  $a$  e  $c$ , no delineamento em blocos casualizados é o seguinte:

$$y_{ijk} = m + b_j + a_i + (ab)_{ij} + c_k + (ac)_{ik} + e_{ijk}$$

em que

$y_{ijk}$ : valor observado na parcela experimental que recebeu o nível  $i$  do fator  $a$  e o nível  $k$  do fator  $c$  no bloco  $j$ ;

$m$ : média geral do experimento;

$b_j$ : efeito do bloco  $j$  ( $j = 1, 2, \dots, J$ );

$a_i$ : efeito do nível  $i$  do fator  $a$  ( $i = 1, 2, \dots, I$ );

$(ab)_{ij}$ : efeito da interação entre o nível  $i$  do fator  $a$  e o bloco  $j$  (resíduo  $a$ );

$c_k$ : efeito do nível  $k$  do fator  $c$  ( $k = 1, 2, \dots, K$ );

$(ac)_{ik}$ : efeito da interação entre o nível  $i$  do fator  $a$  e o nível  $k$  do fator  $c$ ;

$e_{ijk}$ : erro experimental (resíduo  $b$ ).

O esquema da análise de variância relativa a um experimento em parcelas subdivididas, instalado com base no delineamento em blocos casualizados, é apresentado na Tabela 5.

**Tabela 5.** Esquema da análise de variância para experimento em parcela subdividida instalado no delineamento em blocos casualizados.

FV	GL	SQ	QM	F
Blocos (B)	J - 1	SQ (B)	QM (B)	QM (B) / QM (Ra)
Fator a (A)	I - 1	SQ (A)	QM (A)	QM (A) / QM (Ra)
Resíduo a (Ra)	(J - 1)(I - 1)	SQ (Ra)	QM (Ra)	
Fator c (C)	K - 1	SQ (C)	QM (C)	QM (C) / QM (Rb)
A x C (AC)	(I - 1)(K - 1)	SQ (AC)	QM (AC)	QM (AC) / QM (Rb)
Resíduo b (Rb)	I(J - 1)(K - 1)	SQ (Rb)	QM (Rb)	
<b>Total</b>	<b>IJK - 1</b>	<b>SQ (Total)</b>		

Fonte: Gomes (2000).

## Experimentos em reticulados quadrados

São utilizados principalmente em ensaios da área de melhoramento genético, em que, em muitas circunstâncias, dispõe-se de um número elevado de tratamentos (híbridos, clones, variedades) a serem testados. Nesses casos, em que o número de tratamentos é relativamente elevado, a opção pelo delineamento em blocos casualizados resultaria em blocos de grandes dimensões, que só em situações muito particulares poderiam ser considerados uniformes.

Nesse delineamento experimental, o número de tratamentos é um quadrado perfeito (16, 25, 36, 49, 64, 81, etc.), e os tratamentos de um bloco, em uma dada repetição, distribuem-se por todos os blocos das demais repetições. Em virtude dessa característica, a repetição é denominada ortogonal. Quando os tratamentos estão no mesmo bloco, eles são chamados primeiros associados. Porém, se estão em blocos diferentes, são segundos associados.

A ilustração seguinte indica um esquema em que serão avaliados 16 híbridos de tangerineira ‘Clementina’ (*C. clementina* hort. ex Tanaka), utilizando-se o reticulado quadrado balanceado:

Repetição 1				Repetição 2				Repetição 3				Repetição 4				Repetição 5			
1	2	3	4	1	5	9	13	1	6	11	16	1	4	7	12	1	10	15	8
5	6	7	8	2	6	10	14	5	2	15	12	13	2	11	8	9	2	7	16
9	10	11	12	3	7	11	15	9	14	3	8	5	10	3	16	13	6	3	12
13	14	15	16	4	8	12	16	13	10	7	4	9	6	15	4	5	14	11	4

Têm-se, portanto, os 16 tratamentos ( $k^2$ ) distribuídos em 5 repetições ortogonais ( $r$ ), em 20 blocos incompletos ( $r \cdot k$ ) com 4 tratamentos ( $k$ ) cada. Considerando-se o exemplo dado, se, por uma questão de falta de área ou de material genético, houver menos de 5 repetições ortogonais, o experimento será chamado reticulado quadrado não balanceado. Para outras estruturas, com 49, 64, 81, 100 e 144 tratamentos, consultar Cochran e Cox (1957).

O modelo estatístico do reticulado quadrado é dado por:

$$y_{ijk} = m + t_i + r_j + (b/r)_{jk} + e_{ijk}$$

em que

$y_{ijk}$ : valor observado na parcela que recebeu o tratamento  $i$ , na repetição  $j$  e no bloco  $k$ ;

$m$ : média geral do experimento;

$t_i$ : efeito do tratamento  $i$  ( $i = 1, 2, \dots, l$ );

$r_j$ : efeito da repetição  $j$  ( $j = 1, 2, \dots, J$ );

$(b/r)_{jk}$ : efeito do bloco  $k$  dentro da repetição  $j$  ( $k=1, 2, \dots, K$ );

$e_{ijk}$ : erro experimental.

O esquema da análise de variância relativa a um experimento instalado com base no delineamento reticulado quadrado é apresentado na Tabela 6.

**Tabela 6.** Esquema da análise de variância para experimento reticulado quadrado 4 x 4.

FV	GL	SQ	QM	F
Repetições (Rep.)	J - 1	SQ (Rep.)	QM (Rep.)	
Blocos / Rep. (B)	J(K - 1)	SQ (B)	QM (B)	
Tratamentos aj. (T)	K <sup>2</sup> - 1	SQ (T)	QM (T)	QM (T) / QM (R)
Resíduo (R)	(K - 1)(JK - K - 1)	SQ (R)	QM (R)	
<b>Total</b>	<b>JK<sup>2</sup> - 1</b>	<b>SQ (Total)</b>		

Fonte: Gomes e Garcia (1991).

## Análises de experimentos

### Análise de experimentos avaliados em diversos locais

É crescente o cultivo de espécies de citros em condições tropicais, o que implica em sua submissão às mais diversas condições ambientais. É de se esperar que as cultivares apresentem comportamentos diferenciados a depender do ambiente em que venham a ser avaliadas. Portanto, visando a um melhor conhecimento das variedades com as quais está trabalhando, é importante que o pesquisador avalie-as em diversos locais. Nesse contexto, inicialmente, é necessária a realização de uma análise de variância para cada um dos experimentos isoladamente. Para que os experimentos possam ser analisados conjuntamente, é preciso que os quadrados médios do resíduo sejam semelhantes. Segundo Gomes (2000), em experimentos em que todos os tratamentos tenham o mesmo número de repetições, a análise conjunta poderá ser realizada se a relação entre o maior e o menor quadrado médio do resíduo for menor que sete. Caso contrário, podem-se agrupar os experimentos com quadrados médios do resíduo semelhantes ou aplicar o método proposto por Cochran (1954), apresentado por Gomes (2000).

O modelo estatístico para a análise conjunta, considerando experimentos instalados com base no delineamento em blocos casualizados, é dado por:

$$y_{ijk} = m + (b/l)_{jk} + l_k + t_i + (tl)_{ik} + e_{ijk}$$

em que

$y_{ijk}$ : valor observado na parcela que recebeu o tratamento  $i$ , no bloco  $j$  e avaliado no local  $k$ ;

$m$ : média geral do experimento;

$(b/l)_{jk}$ : efeito do bloco  $j$  no local  $k$  ( $j = 1, 2, \dots, J$ );

$l_k$ : efeito do local  $k$  ( $k = 1, 2, \dots, K$ );

$t_i$ : efeito do tratamento  $i$  ( $i = 1, 2, \dots, I$ );

$(tl)_{ik}$ : efeito da interação entre o tratamento  $i$  e o local  $k$ ;

$e_{ijk}$ : erro experimental.

Na Tabela 7 tem-se o esquema da análise de variância para a análise conjunta de experimentos, instalados respeitando o delineamento em blocos casualizados, considerando os efeitos do modelo apresentado como aleatórios. Vencovsky e Barriga (1992) expõem os esquemas das análises de variância conjunta considerando os efeitos do modelo como fixos, aleatórios e mistos. Esses autores apresentam, também, considerações sobre experimentos avaliados em diferentes locais e em diferentes anos. Ramalho et al. (2000) mostram os procedimentos para realização da análise conjunta de experimentos utilizando médias, bem como de experimentos com dimensões diferentes.

**Tabela 7.** Esquema da análise de variância conjunta para experimentos avaliados em diversos locais no delineamento em blocos casualizados.

FV	GL	SQ	QM	F
Blocos / Locais (B/L)	$K(J - 1)$	SQ (B/L)	QM (B/L)	QM (B/L) / QM (R)
Locais (L)	$K - 1$	SQ (L)	QM (L)	$[QM (L) + QM (R)] / [QM (B/L) + QM (TL)]$
Tratamentos (T)	$I - 1$	SQ (T)	QM (T)	QM (T) / QM (TL)
T x L (TL)	$(I - 1)(K - 1)$	SQ (TL)	QM (TL)	QM (TL) / QM (R)
Resíduo (R)	$K(I - 1)(J - 1)$	SQ (R)	QM (R)	
<b>Total</b>	<b>IJK - 1</b>	<b>SQ (Total)</b>		

Fonte: Gomes (2000).

## Análise de experimentos avaliados em diversas colheitas

Em plantas perenes, como é o caso dos citros, é necessária a avaliação das cultivares em diversas colheitas. Nesse caso, como as colheitas são efetuadas na mesma parcela experimental, inclui-se um novo componente no modelo, não existente na análise conjunta discutida anteriormente, que é a interação colheita-blocos. Essa interação deve ser levada em consideração porque não há casualização das épocas nos diferentes blocos, ou seja, não há independência das medidas efetuadas ao longo do tempo. O modelo estatístico para esse caso, considerando um experimento instalado com base no delineamento em blocos casualizados, é dado por:

$$y_{ijk} = m + b_j + t_i + (bt)_{ij} + c_k + (bc)_{jk} + (tc)_{ik} + e_{ijk}$$

em que

$y_{ijk}$ : valor observado na parcela que recebeu o tratamento  $i$ , no bloco  $j$  e avaliado no local  $k$ ;

$m$ : média geral do experimento;

$(b/l)_{jk}$ : efeito do bloco  $j$  no local  $k$  ( $j = 1, 2, \dots, J$ );

$l_k$ : efeito do local  $k$  ( $k = 1, 2, \dots, K$ );

$t_i$ : efeito do tratamento  $i$  ( $i = 1, 2, \dots, I$ );

$(tl)_{ik}$ : efeito da interação entre o tratamento  $i$  e o local  $k$ ;

$e_{ijk}$ : erro experimental.

Na Tabela 8 é apresentado o esquema da análise de variância considerando a média e as colheitas como efeitos fixos e os demais efeitos como aleatórios. Um exemplo ilustrativo é apresentado em Ramalho et al. (2000).

Nos casos em que a interação tratamentos-colheitas for significativa, ou seja, quando o pesquisador tem interesse em comparar o efeito dos tratamentos em cada colheita, é necessária a utilização de uma variância combinada. Maiores detalhes para obtenção dessa variância podem ser obtidos em Steel e Torrie (1980).

**Tabela 8.** Esquema da análise de variância para experimentos avaliados em diversas colheitas no delineamento em blocos casualizados.

FV	GL	SQ	QM	F
Blocos (B)	J - 1	SQ (B)	QM (B)	$[QM (B) + QM (Rc)] / [QM (Ra) + QM (TC)]$
Tratamentos (T)	I - 1	SQ (T)	QM (T)	QM (T) / QM (Ra)
Resíduo a (Ra)	(I - 1)(J - 1)	SQ (Ra)	QM (Ra)	
Colheitas (C)	K - 1	SQ (C)	QM (C)	$[QM (C) + QM (Rc)] / [QM (Rb) + QM (TC)]$
Resíduo b (Rb)	(J - 1)(K - 1)	SQ (Rb)	QM (Rb)	
T x C (TC)	(I - 1)(K - 1)	SQ (TC)	QM (TC)	QM (TC) / QM (Rc)
Resíduo c (Rc)	(I - 1)(J - 1)(K - 1)	SQ (Rc)	QM (Rc)	
<b>Total</b>	<b>IJK - 1</b>	<b>SQ (Total)</b>		

Fonte: Ramalho et al. (2000).

## Programas estatísticos para análise de experimentos

Nas últimas décadas, os cálculos estatísticos foram muito facilitados pelo uso de aplicativos computacionais. Isso permitiu que métodos complexos e de aplicação demorada fossem rotineiramente utilizados. Entretanto, muitos pesquisadores passaram a empregar esses aplicativos sem uma concomitante consulta a profissionais da área de estatística, o que tem implicado em análises de experimentos mal realizadas e resultados erroneamente interpretados. Tal fato justifica a parti-

cipação de um técnico com conhecimento em técnicas experimentais e métodos quantitativos em todas as fases dos experimentos, desde o planejamento, condução e coleta de dados, até a análise de dados e interpretação de resultados.

Diversos pacotes estatísticos para análise de experimentos estão disponíveis, podendo-se citar programas como o *Statistical Analysis System* – SAS (SAS INSTITUTE, 2001), que é, em geral, um dos programas mais utilizados em todo o mundo para análise de dados da área agrônômica, biológica e social, o *Statistical Graphics System* – Statgraphics (STATGRAPHICS..., 1999), o *Statistica for Windows* (STATISTICA..., 2002), dentre outros. Existem, também, programas nacionais aos quais o leitor poderá ter acesso com maior facilidade, dentre eles o Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores (Sanest) da Universidade Federal de Pelotas (ZONTA; MACHADO, 1991), o Sistema de Análise de Variância (Sisvar) da Universidade Federal de Lavras (FERREIRA, 2000a), o Sistema para Análises Estatísticas (Saeg) (RIBEIRO JÚNIOR, 2001) e o Aplicativo computacional em Genética e Estatística (Genes) (CRUZ, 2001), ambos da Universidade Federal de Viçosa.

## Testes de significância

### Testes paramétricos

Quando se está testando tratamentos qualitativos, e o teste de F da análise de variância é significativo, há uma indicação de que os tratamentos são diferentes entre si. Para detectar essas diferenças, tem-se que usar testes paramétricos de comparações múltiplas. Os mais usados atualmente são os testes de Tukey, Duncan, Newman-Keuls, Dunnett e Scott-Knott. Maiores detalhes sobre esses testes podem ser obtidos em Banzatto e Kronka (1992), Ferreira (2000b), Gomes (2000) e Ramalho et al. (2000). Quando os tratamentos referem-se a níveis de um dado fator quantitativo, o procedimento apropriado ao estudo das médias dos tratamentos consiste no emprego da análise de regressão.

### Testes não paramétricos

São aplicados quando não se tem conhecimento perfeito da população da qual a amostra foi obtida. Não se exige a distribuição normal nem variâncias homogêneas. Também são muito úteis em experimentos sensoriais, em que as variáveis coletadas relacionam-se em ordem de classificação: bom, mau, pior, mais, menos, maior, menor, ótimo, etc. O qui-quadrado é o teste não paramétrico mais conhecido e utilizado, sendo vasta a literatura a seu respeito. Na estatística experimental não paramétrica, os testes de Kruskal-Wallis e Friedman correspondem ao teste de F para experimentos empregando os delineamentos estatísticos inteiramente casualizados e blocos casualizados, respectivamente. Maiores detalhes a respeito dos testes citados podem ser obtidos em Campos (1983).

## Precisão de experimentos

Um experimento deve ser conduzido de forma a se obter a maior precisão possível, principalmente em se tratando de regiões tropicais, nas quais as condições climáticas e de solo são muito heterogêneas, contribuindo, dessa forma, para o aumento do erro experimental.

A precisão de um experimento é avaliada pela magnitude do erro experimental, definido por Steel e Torrie (1980) como a variação devida ao efeito dos fatores não controlados ou que ocorrem ao acaso, de forma aleatória. Ramalho et al. (2000), a seu turno, definem o erro experimental como as variações aleatórias entre parcelas que receberam o mesmo tratamento.

Segundo Lúcio (1999), o erro experimental interfere diretamente na análise e na conclusão dos experimentos, pois, quanto maior for esse erro, as diferenças entre os tratamentos poderão não ser detectadas na análise realizada com a estatística F, levando à não discriminação de diferenças significativas entre as médias dos tratamentos. Outra interferência do erro experimental dá-se na variância da média estimada, utilizada nos procedimentos de comparações múltiplas, uma vez que quanto maior for o erro experimental menor será a probabilidade de se obter diferenças significativas entre as médias dos tratamentos.

Federer (1977) apresenta alguns fatores que são capazes de aumentar o erro experimental durante a fase de execução de um experimento, dentre eles: a) heterogeneidade das unidades experimentais, em razão de variações na fertilidade do solo, nivelamento, textura e estrutura do solo, drenagem, etc.; b) heterogeneidade do material experimental dentro dos tratamentos; c) tratos culturais desuniformes, como adubações, controle de ervas daninhas, pragas e doenças; d) competição intraparcelar, em virtude do aparecimento de falhas dentro da parcela; e) competição interparcelar, em razão da competição com plantas de parcelas vizinhas; f) ataque de pragas, doenças e ervas daninhas que ocorrem de forma localizada; e g) amostragem realizada de forma heterogênea e não representativa da parcela.

Com o objetivo de comparar a precisão de diferentes experimentos, foi proposta a utilização do coeficiente de variação experimental (CV) (%), dado pela expressão:

$$CV = 100 \times \frac{\sqrt{QM(R)}}{m}$$

em que

$QM(R)$ : quadrado médio do resíduo;

$m$ : média geral do experimento.

Constata-se, pela expressão dada, que quanto menor for o erro experimental menor será o coeficiente de variação experimental e, conseqüentemente, maior será a precisão do experimento. Segundo Gomes (2000), em experimentos de campo, se o coeficiente de variação for inferior a 10%,

considera-se ele como baixo, ou seja, o experimento tem alta precisão; de 10% a 20%, os CVs são considerados médios, implicando em boa precisão; de 20% a 30% são julgados altos, significando baixa precisão; e, acima de 30%, são tidos como muito altos, indicando baixíssima precisão. O inconveniente dessa classificação é de não levar em consideração a cultura estudada, as variáveis em análise, a heterogeneidade do solo, o tamanho da parcela, entre outros fatores.

A fim de contornar esse problema, Amaral et al. (1997) propuseram um estudo objetivando avaliar a distribuição do CV em experimentos com citros, considerando variáveis comumente utilizadas por pesquisadores da cultura, encontrando-se as faixas de classificação de CV obtidas apresentadas na Tabela 9. Os referidos autores concluíram que, dentre as variáveis analisadas, o número de frutos por planta foi a que se relacionou aos maiores CVs, enquanto que variáveis mensuráveis em laboratório, referentes à qualidade de fruto, à exceção da acidez total e da relação sólidos solúveis totais-acidez total, apresentaram os menores valores.

**Tabela 9.** Faixas de classificação dos coeficientes de variação (CV), em %, das variáveis mais utilizadas em experimentos com citros.

Variável	CV (%)			
	Baixo	Médio	Alto	Muito alto
Nº de frutos por planta	CV ≤ 9,0	9,0 < CV ≤ 47,5	47,5 < CV ≤ 66,8	CV > 66,8
Altura da planta	CV ≤ 6,3	6,3 < CV ≤ 9,4	9,4 < CV ≤ 10,9	CV > 10,9
Diâmetro do fruto	CV ≤ 2,9	2,9 < CV ≤ 3,8	3,8 < CV ≤ 4,3	CV > 4,3
Peso do fruto	CV ≤ 6,5	6,5 < CV ≤ 10,1	10,1 < CV ≤ 11,9	CV > 11,9
Acidez total	CV ≤ 5,7	5,7 < CV ≤ 12,9	12,9 < CV ≤ 16,5	CV > 16,5
Sólidos solúveis totais	CV ≤ 3,9	3,9 < CV ≤ 5,9	5,9 < CV ≤ 7,0	CV > 7,0
<i>Ratio</i> <sup>(1)</sup>	CV ≤ 5,6	5,6 < CV ≤ 8,7	8,7 < CV ≤ 10,2	CV > 10,2
pH do suco	CV ≤ 1,8	1,8 < CV ≤ 2,3	2,3 < CV ≤ 2,6	CV > 2,6
% de suco	CV ≤ 4,9	4,9 < CV ≤ 6,2	6,2 < CV ≤ 6,9	CV > 6,9

<sup>(1)</sup> Relação sólidos solúveis totais / acidez total.

Fonte: Amaral et al. (1997).

Uma forma de minimizar o erro experimental consiste no emprego de um maior número de repetições, combinado com parcelas menores. Em princípio, quanto maior for o número de repetições mais preciso será o experimento. Existem vários fatores, entretanto, que influenciam a definição do número de repetições, sendo encontradas discussões a respeito desse assunto em inúmeros trabalhos (MARQUES JÚNIOR, 1997).

Experimentos de campo com culturas perenes, geralmente, apresentam parcelas grandes, o que pode acarretar, de acordo com Rossetti (1994), sérios problemas, como a necessidade de grandes áreas experimentais e dificuldades no manejo, além da obtenção de resultados imprecisos

e não confiáveis. Vários métodos têm sido utilizados para se estimar o tamanho ótimo da parcela para culturas perenes, destacando-se metodologia desenvolvida por Gomes (1984b), baseada no coeficiente de correlação intraclasse ( $r$ ), como a preferida por muitos estudiosos do assunto.

Na literatura, diversos são os trabalhos dirigidos à determinação do tamanho ótimo de parcelas para culturas perenes, tanto sob condições tropicais como subtropicais, dentre elas: seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) (Rossetti et al., 1986; Rossetti; Gomes, 1987), cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) (ROSSETTI et al., 1991, 1996) e eucalipto (*Eucalyptus* spp.) (MUNIZ et al., 1999; SILVA, 1977; SIMPLÍCIO, 1987; SIMPLÍCIO et al., 1996; SOARES, 1980; ZANON; STORCK, 2000). Em experimentos com culturas perenes, é recomendável trabalhar com parcelas de menor tamanho, de modo a permitir o maior número possível de parcelas totais, ou seja, um maior número de repetições por tratamento. Deve-se evitar, porém, a utilização de parcelas com apenas uma planta por causa de problemas de perda de parcela por morte de plantas. Referindo-se especificamente à cultura dos citros, há uma carência de informações relativas à determinação do tamanho ótimo de parcelas, em condições tropicais. Na prática, em experimentos de campo com citros, têm-se utilizado parcelas com duas a quatro plantas úteis, no formato quadrado ou retangular, com dimensões que variam de 4 m a 7 m x 4 m a 7 m.

## Referências

- AMARAL, A. M.; MUNIZ, J. A.; SOUZA, M. de. Avaliação do coeficiente de variação como medida da precisão na experimentação com citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 32, n. 12, p. 1221-1225, 1997.
- BANZATTO, D. V.; KRONKA, S. do N. **Experimentação agrícola**. Jaboticabal: FCAV-UNESP, 1992. 247 p.
- CAMPOS, H. **Estatística experimental não-paramétrica**. 4. ed. Piracicaba: ESALQ-USP, 1983. 349 p.
- COCHRAN, W. G. The combination of estimates from different experiments. **Biometrics**, Raleigh, v. 10, p. 101-129, 1954.
- COCHRAN, W. G.; COX, G. M. **Experimental designs**. 2nd ed. New York: John Wiley, 1957. 611 p.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes**: versão Windows; aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2001. 648 p.
- FEDERER, W. T. **Experimental design**. 3rd ed. New York: Oxford and IBH, 1977. 591 p.
- FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Programa e resumos...** São Carlos: UFSCar, 2000a. p. 255-258.
- FERREIRA, P. V. **Estatística experimental aplicada à agronomia**. 3. ed. Maceió: EDUFAL, 2000b. 422 p.
- FISHER, R. A. A system of confounding for factors with more than two alternatives, giving completely orthogonal cubes and higher powers. **Annals of Eugenics**, London, GB, v. 12, p. 283-290, 1945.
- FISHER, R. A. The theory of confounding in factorial experiments in relation to the theory of groups. **Annals of Eugenics**, London, GB, v. 11, p. 341-353, 1942.
- GOMES, F. P. **A estatística moderna na pesquisa agropecuária**. Piracicaba: Potafos, 1984a. 160 p.
- GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental**. 14. ed. Piracicaba: Nobel, 2000. 477 p.
- GOMES, F. P. O problema do tamanho das parcelas em experimentos com plantas arbóreas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 19, n. 12, p. 1507-1512, 1984b.

GOMES, F. P.; GARCIA, C. H. Experimentos em látice: planejamento e análise por meio de “pacotes” estatísticos. **Série Técnica IPEF**, Piracicaba, v. 7, n. 23, p. 1-69, 1991.

LÚCIO, A. D. **Erro experimental relacionado às características dos ensaios nacionais de competição de cultivares de milho**. 1999. 73 f. Tese (Doutorado em Estatística) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.

MARQUES JÚNIOR, O. G. **Eficiência de experimentos com a cultura do feijão**. 1997. 80 f. Tese (Doutorado em Estatística) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MUNIZ, J. A.; SIMPLÍCIO, E.; AQUINO, L. H. de; SOARES, A. R. Determinação do tamanho de parcelas experimentais em povoamentos de *Eucalyptus grandis* Hill: II - Parcelas quadradas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 2, p. 446-453, 1999.

RAMALHO, M. A. P.; FERREIRA, D. F.; OLIVEIRA A. C. de. **A experimentação em genética e melhoramento de plantas**. Lavras: UFLA, 2000. 326 p.

RIBEIRO JÚNIOR, J. I. **Análises estatísticas no SAEG**. Viçosa: UFV, 2001. 301 p.

ROSSETTI, A. G. **Planejamento de experimentos de nutrição e adubação com plantas perenes arbóreas**. Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, 1994. 50 p. (EMBRAPA-CNPAT. Documentos, 13).

ROSSETTI, A. G.; ALMEIDA, J. I. L. de; PARENTE, J. I. G.; BARROS, L. de M. Tamanho ótimo de parcela para experimento com cajueiro-comum. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 13, n. 2, p. 117-122, 1991.

ROSSETTI, A. G.; BARROS, L. de M.; ALMEIDA, J. I. L. de. Tamanho ótimo de parcelas para experimentos de campo com cajueiro-anão precoce. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, n. 12, p. 843-852, 1996.

ROSSETTI, A. G.; GOMES, F. P. A method for the determination of optimum plot size in experiments with rubber tree (*Hevea*). **Journal of Natural Rubber Research**, Kuala Lumpur, v. 2, n. 3, p. 135-141, 1987.

ROSSETTI, A. G.; PEREIRA, A. V.; GOMES, F. P. A amostragem na experimentação em viveiros de seringueira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 21, n. 8, p. 837-841, 1986.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user's guide**. Version 8.2. Cary, 2001. 943 p.

SILVA, L. B. X. Tamanhos e formas de unidades de amostra em amostragem aleatória e sistemática para florestas plantadas de *Eucalyptus alba* Rewien. **Revista Floresta**, Curitiba, v. 8, n. 1, p. 13-18, 1977.

SIMPLÍCIO, E. **Determinação do tamanho de parcelas experimentais em povoamentos de *Eucalyptus grandis* Hill ex-Maiden**. 1987. 67 f. Dissertação (Mestrado em Estatística) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SIMPLÍCIO, E.; MUNIZ, J. A.; AQUINO, L. H. de; SOARES, A. R. Determinação do tamanho de parcelas experimentais em povoamentos de *Eucalyptus grandis* Hill ex-Maiden: I - Parcelas retangulares. **Cerne**, Lavras, v. 2, n. 1, p. 53-65, 1996.

SOARES, V. P. **Eficiência relativa de tamanhos e formas de unidades de amostra em plantações de *Eucalyptus grandis* de origem híbrida, na região de Bom Despacho, Minas Gerais**. 1980. 68 f. Dissertação (Mestrado em Estatística) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

STATGRAPHICS plus for Windows 4.0: User manual. Illinois: Manugistics Inc., 1999.

STATISTICA for Windows 6.0: Computer program manual. Tulsa: StatSoft Inc., 2002.

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. **Principles and procedures of statistics: a biometrical approach**. New York: McGraw-Hill Book Company, 1980. 633 p.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 496 p.

ZANON, M. L. B.; STORCK, L. Tamanho ótimo de parcelas experimentais para *Eucalyptus saligna* Smith em dois estádios de desenvolvimento. **Cerne**, Lavras, v. 6, n. 2, p. 104-111, 2000.

ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. **Manual do SANEST: sistema de análise estatística para microcomputadores**. Pelotas: UFPEL, 1991. 102 p.

# A citricultura brasileira

## Produção, mercado e perspectivas

Clóvis Oliveira de Almeida

Orlando Sampaio Passos

### Introdução

O Brasil é o primeiro produtor mundial de citros e o maior exportador de suco concentrado e congelado de laranja doce, principal produto do complexo agroindustrial da citricultura brasileira. Embora tenha desfrutado e continue desfrutando de inegável importância econômica, as condições internas de produção e as recentes mudanças na demanda externa por suco concentrado e congelado têm contribuído para o aumento da vulnerabilidade do setor cítrico nacional. Nestas páginas, realiza-se um breve diagnóstico dos principais problemas associados à produção, bem como dos desafios e tendências que se apresentam a esse importante setor do agronegócio brasileiro, especialmente aqueles relacionados ao grupo das laranjeiras doces.

### Vulnerabilidade na produção

A produção brasileira de citros está distribuída por todas as regiões do País, mas com uma notória concentração na região Sudeste, especialmente no Estado de São Paulo, cujos pomares estão demasiadamente concentrados nas laranjeiras doces, vindo a seguir as tangerineiras e limeiras ácidas. A Tabela 1 traz a distribuição geográfica da produção brasileira de citros e especialmente de laranja doce, principal espécie frutífera cultivada no Brasil, seja em área plantada ou colhida, quantidade produzida, valor da produção ou geração de emprego.

Além da concentração espacial, a produção brasileira de laranja também apresenta expressiva concentração com respeito às variedades utilizadas, copas e porta-enxertos. Estima-se que o limoeiro 'Cravo' responda por mais de 85% dos porta-enxertos, sendo a laranjeira 'Pera', à exceção do Rio Grande do Sul, a variedade copa predominante. Quanto ao destino da produção, mais de 80% são destinados à indústria de suco, o que explica a atual preferência pelas variedades copa mais exploradas. A Tabela 2 apresenta uma estimativa da predominância de variedades porta-enxerto nos principais estados produtores de laranja no Brasil.

**Tabela 1.** Distribuição geográfica da produção de laranja doce, tangerina e lima ácida no Brasil, média percentual do período 2000 a 2010.

Região	Participação na produção (%)		
	Laranja doce	Tangerina	Lima ácida
Sudeste	85,18	57,18	87,78
Nordeste	7,99	3,08	6,53
Sul	4,69	37,90	3,36
Norte	1,39	0,62	1,18
Centro-Oeste	0,75	1,23	1,15

Fonte: IBGE (2013).

**Tabela 2.** Variedades porta-enxerto predominantes nos principais estados brasileiros produtores de citros, em porcentagem.

Estado	Variedade porta-enxerto		
	Limoeiro Cravo ( <i>Citrus limonia</i> Osbeck)	Limoeiro Rugoso ( <i>C. jambhiri</i> Lush.)	Trifoliata <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.
São Paulo	85	-	-
Bahia	90	-	-
Sergipe	50	50	-
Minas Gerais	90	-	-
Paraná	90	-	-
Pará	90	-	-
Rio de Janeiro	98	-	-
Rio Grande do Sul	-	-	92

Fonte: Passos et al. (2005).

Diferentemente de países como Argentina, Espanha e Estados Unidos (Flórida), no Brasil, a utilização de espécies e variedades copa é bastante restrita (Tabela 3).

A estreita base genética, tanto das variedades copa como porta-enxerto atualmente utilizadas, tem facilitado a rápida proliferação de pragas e doenças nos principais pomares de laranja do País, especialmente no Estado de São Paulo, onde a produção cresce de forma acelerada e desordenada, impulsionada, principalmente, pela expansão da área de plantio, uma vez que a queda de produtividade é uma consequência direta dos problemas fitossanitários. Não é por acaso que os gastos com defensivos já representam a maior parcela dos custos de produção nos pomares das regiões norte e sul do Estado de São Paulo (Figuras 1, 2 e 3).

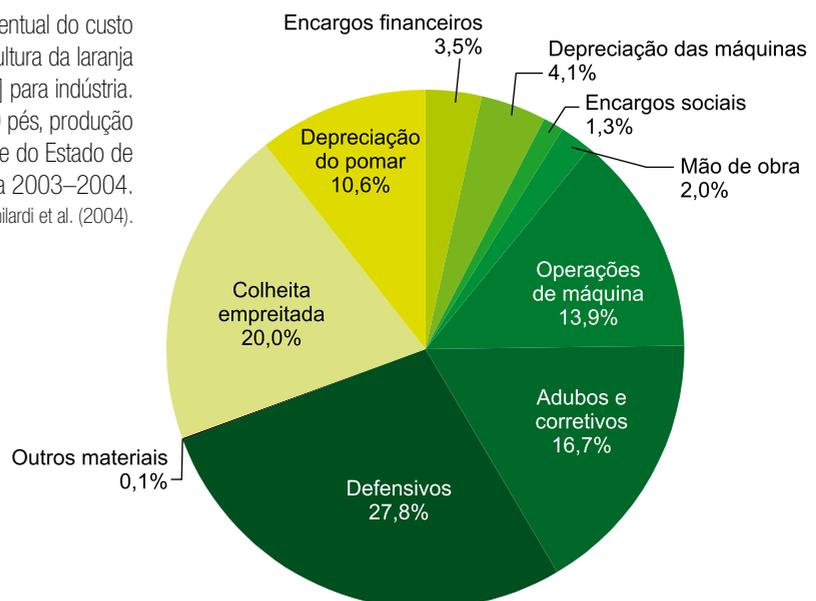
**Tabela 3.** Variedades copa predominantes nos principais estados brasileiros produtores de citros.

Estado	Variedade copa
São Paulo	Laranjeira Pera [ <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck] Tangerineira Ponkan ( <i>C. reticulata</i> Blanco)
Bahia	Laranjeira Pera Limeira ácida Tahiti <i>C. latifolia</i> (Yu. Tanaka) Tanaka
Sergipe	Laranjeira Pera
Minas Gerais	Laranjeira Pera
Rio Grande do Sul	Laranjeira Valência ( <i>C. sinensis</i> )
Paraná	Laranjeira Pera
Pará	Laranjeira Pera
Rio de Janeiro	Laranjeira Pera

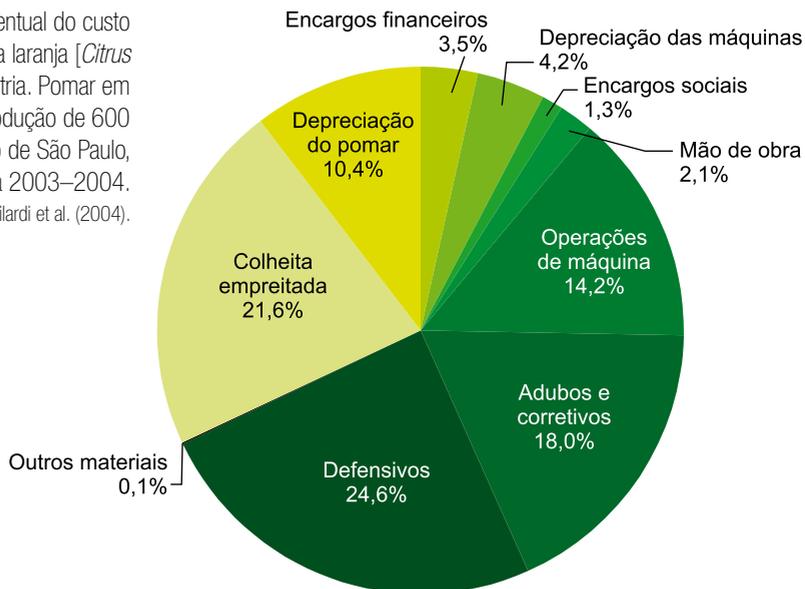
Fonte: Almeida e Passos (2011).

A distribuição percentual de custos de produção apresentada nas Figuras 1 e 2 leva em consideração somente um número mínimo de pulverizações, realizadas pela maioria dos pequenos e médios citricultores do Estado de São Paulo, no controle das principais pragas e doenças, tais como: ácaros da leprose e da ferrugem, mosca-das-frutas, *Colletotrichum*, formigas, além do controle de plantas infestantes por meio de herbicidas e da aplicação de macro e micronutrientes (GHILARDI et al., 2004).

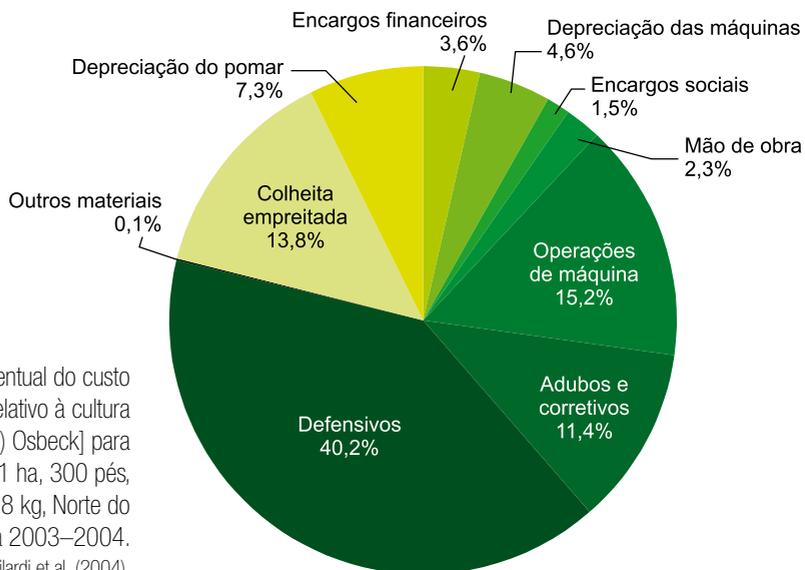
**Figura 1.** Distribuição percentual do custo operacional total relativo à cultura da laranja [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] para indústria. Pomar em produção, 1 ha, 300 pés, produção de 600 caixas de 40,8 kg, Norte do Estado de São Paulo, safra 2003–2004.  
Fonte: Ghilardi et al. (2004).



**Figura 2.** Distribuição percentual do custo operacional relativo à cultura da laranja [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] para indústria. Pomar em produção, 1 ha, 300 pés, produção de 600 caixas de 40,8 kg, Sul do Estado de São Paulo, safra 2003–2004.  
Fonte: Ghilardi et al. (2004).



**Figura 3.** Distribuição percentual do custo operacional total ampliado relativo à cultura da laranja [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] para indústria. Pomar em produção, 1 ha, 300 pés, produção de 600 caixas de 40,8 kg, Norte do Estado de São Paulo, safra 2003–2004.  
Fonte: Ghilardi et al. (2004).



A Figura 3 apresenta a distribuição percentual do custo de produção ampliado para a região norte, maior produtora de laranja no Estado de São Paulo. Nessa estimativa estão incluídas as despesas com defensivos para controle de outras pragas e doenças como bicho-furão, ortézia, pinta-preta e podridão-floral. As despesas com o controle do cancro-cítrico, da clorose-variegada-dos-citros, da morte-súbita (problema de natureza provavelmente viral) e da mais recente e ameaçadora doença, o HBL, também conhecido por *greening*, não foram incluídas. Os problemas fitossanitários merecem

especial atenção porque podem pressionar o custo médio unitário de produção de duas formas: aumentando o custo variável com a compra e aplicação de defensivos e reduzindo a produtividade do pomar.

Nos últimos anos, os custos de produção também têm sido pressionados pela elevação dos preços de outros insumos no mercado interno, a exemplo dos preços de mudas, fertilizantes e máquinas. A pressão sobre o preço das mudas também decorre de acertadas medidas preventivas contra problemas fitossanitários. Por força de lei, desde 2001, a produção de mudas no Estado de São Paulo somente é permitida sob proteção em viveiros telados.

Considerando a dimensão e a diversidade climática do País, torna-se evidente a necessidade de se criar um programa de diversificação de espécies e variedades, estabelecendo, em princípio, as seguintes prioridades:

1. Região Sul: frutos para mesa, com prioridade para laranja Bahia (*C. sinensis*) e tangerinas sem sementes.
2. Região Sudeste: frutos para processamento e mercado interno.
3. Região Nordeste: limas ácidas [*C. latifolia* e *C. aurantiifolia* (Christm.) Swingle] e doces (*C. limettioides* Tanaka), limões verdadeiros e pomelos (*C. paradisi* Macfad.) de preferência no semiárido, tangerinas (diversas espécies) em regiões de altitude, como Chapada Diamantina (BA), Brejo Paraibano (PB) e Serra de Ubajara (CE), e laranjas e limas ácidas nas áreas tradicionais (litoral norte e Recôncavo, na Bahia, e região sul, em Sergipe).

## Tendências do setor de processamento e do mercado externo

Como visto, o principal destino da produção de laranja no Brasil é a indústria de processamento de suco, voltada para o mercado externo. Portanto, as transformações ocorridas no setor de processamento e no mercado externo de suco refletem-se sobre os demais elos da cadeia produtiva do suco de laranja no Brasil. A seguir, são apresentadas as principais tendências em andamento no setor de processamento e no mercado externo de suco de laranja.

## Tendências do setor de processamento

Nos últimos anos, as indústrias de suco vêm aumentando a produção própria de laranja no sentido de assegurar o suprimento de matéria-prima e assim manter a regularidade na produção. Essa estratégia diminui o risco das indústrias associado ao suprimento de matéria-prima, mas simultaneamente enfraquece o elo da produção no estabelecimento e/ou renovação de contratos.

O segmento de processamento e exportação de suco também tem manifestado, nas últimas décadas, uma nítida tendência de concentração em torno de um pequeno número de entidades privadas: em 1998, as quatro principais empresas processadoras e exportadoras de suco respondiam por 66% do volume total de suco exportado, e, em 2003, chegaram a 78%. Com a venda da Cargill para a Cutrale e Citrosuco, estima-se que estas, maiores empresas brasileiras do setor, passem a responder pela quase totalidade do processamento e das exportações brasileiras de suco (BOTEON; COSTA, 2004). A mais recente fusão ocorreu em 2010, entre a Citrosuco, do grupo Fischer, e a Citrovita, do grupo Votorantim.

Essa concentração potencializa o ganho de escala das empresas processadoras e exportadoras de suco, porém enfraquece a cadeia de produção, porque restringe sensivelmente as opções de venda e, conseqüentemente, de negociação do produtor. Junto ao processo de concentração aqui discutido, também adveio o aumento da capacidade ociosa das indústrias de processamento; uma maior capacidade ociosa não só eleva o custo unitário médio de produção como igualmente inibe a entrada de novas indústrias no setor, enfraquecendo ainda mais o poder de negociação dos citricultores.

## Tendências do mercado externo

Até a década de 1980, o mercado cativo norte-americano de suco concentrado e congelado de laranja levou o Brasil à negligência tanto da produção de laranja típica de mesa quanto da produção de suco pronto para beber (BOTEON, 1999). O mais importante, entretanto, não foi deixado de lado, qual seja a busca de novos mercados para o escoamento das exportações de suco, principal produto do complexo agroindustrial da laranja, do qual o País desfruta de reconhecida vantagem competitiva (ALMEIDA, 2004). A década de 1980 distinguiu-se como aquela em que os preços internacionais do suco concentrado e congelado de laranja registraram os melhores níveis históricos.

A partir da década de 1970, enquanto a produção de laranja no Brasil aumentava continuamente, ano após ano, a produção norte-americana também exibiu uma impressionante capacidade de reação às condições adversas do clima. Graças ao redirecionamento, estrategicamente planejado e executado ao longo de décadas, dos plantios de laranja da região norte para as regiões central e leste (Indian River) do Estado da Flórida, menos susceptíveis à incidência de geadas, os Estados Unidos passaram a registrar consideráveis aumentos de produção nos anos 1990 (BOTEON, 1999; PASSOS, 1990). A Tabela 4 traduz, em números, o histórico esforço do citricultor do Estado da Flórida no sentido de escapar das adversidades climáticas impostas por rigorosas e sucessivas geadas, que aconteceram nas décadas de 1970 e 1980.

Essa estratégia permitiu a recuperação da produção norte-americana de laranja, interrompendo o período de queda provocado pelas geadas, que havia ocorrido na década de 1980 (ALMEIDA, 2004). Ao mesmo tempo, diminuiu a dependência norte-americana da importação de suco, especialmente do Brasil (BOTEON, 1999). A Tabela 5 traz as taxas de crescimento da produção

de laranja nos Estados Unidos, de onde se podem observar os períodos de expansão, declínio e recuperação.

Refletindo a nova conjuntura, as cotações internacionais dos preços do suco de laranja registraram fortes quedas nos anos 1990. Igual comportamento foi observado nos preços da laranja destinada ao mercado doméstico e à indústria de suco.

Na virada do milênio atual (2000 a 2003), os preços internacionais do suco concentrado e congelado de laranja continuaram a trajetória de declínio, agravando a situação de descapitalização que o setor já vinha enfrentando desde a década passada.

**Tabela 4.** Área cultivada, perdas provocadas pelas geadas e novos plantios de citros no Estado da Flórida, 1966 a 1988.

Ano	Área total (ha)	Perda (ha)	Novo plantio (ha)	Diferença
1966	347.265	-	-	-
1968	376.876	5.629	35.240	29.611
1970	381.013	10.568	14.705	4.137
1972 <sup>(1)</sup>	355.334	33.569	7.890	-25.679
1974	349.700	16.261	10.627	-5.634
1976	344.953	16.397	11.650	-3.099
1978 <sup>(1)</sup>	336.400	19.881	11.328	-8.553
1980	342.082	10.491	16.177	5.686
1982 <sup>(1)</sup>	343.127	21.020	22.062	1.041
1984 <sup>(1)</sup>	308.124	64.638	29.635	-35.003
1986 <sup>(1)</sup>	252.731	75.111	19.719	-55.393
1988	282.451	21.141	50.861	29.720

<sup>(1)</sup> Geadas em janeiro de 1971, 1977, 1981, 1982, 1985 e 1986, e em dezembro de 1983 e 1985. Embora não conste na tabela, a primeira geada de grande intensidade ocorreu em 1962 (Passos, 1990).

Fonte: Flórida Agricultural Statistics Service (1988 citado por PASSOS, 1990).

**Tabela 5.** Taxa geométrica de crescimento, média anual, da produção de laranja nos Estados Unidos da América.

Período	Taxa geométrica de crescimento (%)
1961 a 1969	5,20
1970 a 1979	2,32
1980 a 1989	-2,80
1990 a 1989	4,98

Fonte: FAO (2004).

Aliam-se à tendência de declínio dos preços internacionais do suco, na bolsa de Nova York, as barreiras tarifárias impostas ao suco brasileiro pelos principais países importadores de suco de laranja. Nos EUA, essas tarifas sobre o suco brasileiro chegam a ser proibitivas, relativamente às que-las aplicadas a outros países, como México e Costa Rica (ALMEIDA, 2004). Enquanto sobre o suco concentrado e congelado de laranja do Brasil incide uma tarifa, equivalente *ad valorem*, das mais altas aplicadas pelos EUA, as exportações de suco de laranja realizadas pelo México e pela Costa Rica gozam de tratamento privilegiado (BRASIL, 1999). O primeiro, em função do Acordo de Livre Comércio da América do Norte (Nafta), criado em 1994, e o segundo, em decorrência do Acordo para Recuperação Econômica da Bacia do Caribe (Cbera), de 1983 (BRASIL, 1999). O México tem alguma expressão na exportação de suco simples, enquanto a Costa Rica na de suco concentrado.

Mesmo diante de uma conjuntura externa desfavorável, registrada a partir de meados da década de 1990, caracterizada por excesso de oferta de laranja e de suco, redução das importações norte-americanas e barreiras tarifárias, o Brasil não só conseguiu preservar, mas também aumentar a posição conquistada no mercado internacional. Essa conquista não aconteceu por acaso, mas como resultado de uma feliz estratégia de diversificação de mercados (ALMEIDA, 2004).

Há mais de uma década, a União Europeia passou a ser o principal mercado de destino das exportações brasileiras de suco concentrado e congelado de laranja, situando-se o bloco Nafta, que tem os Estados Unidos da América como principal importador, na segunda posição. A manutenção dessa privilegiada posição alcançada pelo Brasil, ao longo de décadas, depende de uma estratégia que privilegie a busca de novos mercados e de seu poder de negociação nos acordos bilaterais, multilaterais e, especialmente, na Organização Mundial do Comércio (OMC).

Nos últimos anos, as temporadas de furacões na Flórida, principal região produtora de laranja de uso industrial nos EUA, têm contribuído para aumentar as incertezas no mercado internacional de suco. Os danos causados pelos furacões, entretanto, podem desacelerar, mas certamente não serão capazes de mudar as tendências de longo prazo de queda nas cotações internacionais de suco concentrado e congelado de laranja e de redução da dependência de importações norte-americanas do suco brasileiro, especialmente se mantidas a estabilidade da demanda no mercado externo e a forte concorrência com outros sucos.

Uma outra fonte de incerteza, que age em sentido oposto em relação ao comportamento das cotações internacionais do suco concentrado, é ainda mais nebulosa e preocupante: a forte incidência do *greening* nos pomares da Flórida, nos EUA, e em São Paulo, no Brasil.

Em função da notória vantagem competitiva do Brasil no mercado internacional de suco, o País deve continuar priorizando o mercado externo da *commodity*, sem, contudo, negligenciar o que ainda é secundário, o mercado doméstico. Um mercado doméstico forte, além de ser uma opção para o escoamento da produção, deve também servir de amortecedor dos inevitáveis, e às vezes imprevisíveis, choques externos (ALMEIDA, 2004).

## Referências

- ALMEIDA, C. O. Agronegócio citrícola no Brasil. **Bahia Agrícola**, Salvador, v. 6, n. 3, p. 27-33, 2004.
- ALMEIDA, C. O. de; PASSOS, O. S. Produção brasileira de citros de uso industrial. In: ALMEIDA, C. O. de; PASSOS, O. S. (Ed.). **Citricultura brasileira em busca de novos rumos: desafios e oportunidades na região Nordeste**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011. p. 11-19.
- BOTEON, M. **Mercado interno de frutas cítricas**. 1999. 84 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- BOTEON, M.; COSTA, C. D. Braço-de-ferro entre indústria e produtor é o determinante dos preços em 2004. **Citricultura Atual**, Cordeirópolis, v. 8, n. 41, p. 8-10, 2004.
- BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Indústria e Comércio. **Barreiras externas às exportações brasileiras 1999**. 1999. Disponível em: <[http://www.mdic.gov.br/arquivos/dwnl\\_1196772454.pdf](http://www.mdic.gov.br/arquivos/dwnl_1196772454.pdf)>. Acesso em: 25 jul. 2003.
- FAO. Food and Agriculture Organization. **Faostat**. Disponível em: <<http://apps.fao.org>>. Acesso em: 3 ago. 2004.
- GHILARDI, A.; MAIA, M. L.; NEGRI, J. D. **Laranja para indústria: custo (básico) de produção na safra agrícola 2003/04**. São Paulo: Instituto de Economia Agrícola, 2004. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=1385>>. Acesso em: 20 set. 2004.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção agrícola municipal**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 10 set. 2013.
- PASSOS, O. S. Citricultura na Flórida: um desafio. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 2, n. 11, p. 429-453, 1990.
- PASSOS, O. S.; SOARES FILHO, W. dos S.; PEIXOUTO, L. S. **Variedades copa de citros para mesa**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2005. 20 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Documentos, 154).





Na Livraria Embrapa, você encontra  
livros, DVDs e CD-ROMs sobre  
agricultura, pecuária, negócio agrícola, etc.

Para fazer seu pedido, acesse:  
**[www.embrapa.br/livraria](http://www.embrapa.br/livraria)**

ou entre em contato conosco  
**Fone: (61) 3448-4236**  
**Fax: (61) 3448-2494**  
**[livraria@embrapa.br](mailto:livraria@embrapa.br)**

Você pode também nos encontrar nas redes sociais:



[facebook.com/livrariaembrapa](https://www.facebook.com/livrariaembrapa)



[twitter.com/livrariaembrapa](https://twitter.com/livrariaembrapa)

*Impressão e acabamento*  
**Embrapa Informação Tecnológica**

*O papel utilizado nesta publicação foi produzido conforme a certificação do Bureau Veritas Quality International (BVQI) de Manejo Florestal.*



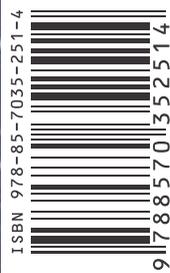
## *Mandioca e Fruticultura*

A sustentabilidade do agronegócio de citros depende, em grande parte, da adoção de tecnologias adequadas a essa finalidade, desenvolvidas à luz das reais necessidades nacionais, as quais apresentam forte relação com as particularidades de distintos ambientes de cultivo, distribuídos em todo o território nacional, compreendendo expressivas variações de condições de clima e solo.

Este livro contém conhecimentos úteis à sustentabilidade da citricultura brasileira, abordando um diversificado leque de informações, desde aquelas de natureza básica, como as apresentadas em capítulos que versam sobre a citogenética, o melhoramento genético, a fisiologia, entre outros, até aquelas de cunho mais pragmático, a exemplo do conteúdo sobre propagação e variedades, copas e porta-enxertos.

A obra é dividida em dois volumes. O primeiro aborda aspectos básicos da cultura dos citros, que vão de sua origem, classificação botânica e distribuição geográfica, àqueles relacionados aos recursos e melhoramento genéticos, biotecnologia, fisiologia, propagação, processamento, experimentação agrícola, mercado e suas perspectivas. O segundo compreende temas de natureza prática, tais como planejamento de um pomar, manejo de solos e de pragas, nutrição e adubação, irrigação, indexação de doenças e produção integrada.

Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento



CGPE 10281