

NOTAS CIENTÍFICAS

VIGOR HÍBRIDO EM TANGERINA 'SUNKI'¹

WALTER DOS SANTOS SOARES FILHO², CÉLIO DOS SANTOS MOREIRA³,
MARIO AUGUSTO PINTO DA CUNHA⁴, ALMIR PINTO DA CUNHA SOBRINHO⁵,
ORLANDO SAMPAIO PASSOS⁶ e LUCYMEIRE SOUZA MORAIS⁷

RESUMO - Estimou-se a frequência de plantas zigóticas em cruzamentos controlados de tangerina 'Sunki' com *Poncirus trifoliata* e híbridos desta espécie, comparando-se seu vigor com o das de origem nucelar. A taxa média de vingamento de frutos foi de 40%, indicando uma boa compatibilidade dos parentais nos cruzamentos. A frequência observada de plantas zigóticas foi de 48%, devendo estar subestimada em razão do emprego de híbridos de *Poncirus* nas polinizações. Estimativas dos caracteres comprimento do epicótilo e número de folhas verdadeiras mostraram que 91% dos híbridos identificados podem ser semelhantes, ou mesmo superiores, aos nucleares em relação ao vigor de planta.

HYBRID VIGOUR ON 'SUNKI' MANDARIN

ABSTRACT - Controlled crosses of 'Sunki' with *Poncirus trifoliata* and its hybrids were performed in order to estimate the zygotic seedlings frequency, by comparing its vigour with the ones from nucellar origin. A relatively high fruit set rate of 40% was achieved, which indicates a good compatibility within the parental crosses. The observed frequency of zygotic seedlings was 48% and certainly this was underestimated due to the presence of *Poncirus* hybrids in the pollinations. Epicotyl length and the true leaf number character estimates showed that 91% of the identified hybrids may be similar or even superior to the nucellar ones in relation to plant vigour.

A obtenção de híbridos em citros é limitada por particularidades de natureza biológica, dentre as quais destacam-se a ocorrência da poliembrião, comum em muitas variedades, o longo período pré-reprodutivo e a elevada heteroziguidade (Cameron & Frost, 1968; Furr, 1969; Salibe, 1971;

¹ Aceito para publicação em 2 de setembro de 1998.

² Eng. Agr., Dr., Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMT), Caixa Postal 007, CEP 44380-000 Cruz das Almas, BA. Bolsista do CNPq. E-mail: wsoares@cnpmf.embrapa.br

³ Eng. Agr., M.Sc., Rua João Peixoto Neto, 234, CEP 44380-000 Cruz das Almas, BA.

⁴ Eng. Agr., Dr., Embrapa-CNPMT. E-mail: maugusto@cnpmf.embrapa.br

⁵ Eng. Agr., M.Sc., Embrapa-CNPMT. E-mail: almir@cnpmf.embrapa.br

⁶ Eng. Agr., Embrapa-CNPMT. E-mail: orlando@cnpmf.embrapa.br

⁷ Eng^a Agr^a, M.Sc., Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Caixa Postal 02372, CEP 70770-900 Brasília, DF. E-mail: lmorais@cenargen.embrapa.br

Soares Filho et al., 1994). A primeira dificuldade a identificação dos indivíduos de origem sexuada, no sentido de separá-los dos nucelares, especialmente em cruzamentos envolvendo parentais estreitamente relacionados do ponto de vista taxonômico. O segundo exige um tempo relativamente longo para o início de avaliações agrônomicas que dependem da produção de frutos, e a última relaciona-se à imprevisibilidade quanto à manifestação, nos híbridos, de características de interesse horticultural presentes nos pais. A par disso, existe um pensamento generalizado de que os híbridos de citros apresentam-se, muitas vezes, pouco vigorosos, pela manifestação de alelos recessivos desfavoráveis ao seu desenvolvimento, encobertos por uma condição heterozigota nas variedades parentais.

Com o advento de novas tecnologias, principalmente das baseadas no emprego de isoenzimas e segmentos polimórficos de DNA como marcadores moleculares, o pronto reconhecimento de plantas zigóticas oriundos de sementes poliembriônicas, a partir de estádios jovens de desenvolvimento vegetativo, tem facilitado a geração de populações híbridas. Estudos dirigidos à indução precoce de florescimento em plantas de citros, por sua vez, pretendem reduzir seu longo período pré-reprodutivo (Soares Filho et al., 1997).

Diante disso, a utilização da hibridação no melhoramento genético dos citros tem experimentado um novo impulso, fato também estimulado por evidências de que as plantas zigóticas podem, em muitos casos, possuir um vigor compatível ou mesmo superior ao das de origem nucelar (Soares Filho et al., 1991).

O presente trabalho teve por objetivo confirmar tais observações relativas ao vigor de híbridos de citros, mediante a realização de cruzamentos controlados tendo como parental feminino a tangerina 'Sunki' (*Citrus sunki* Hort. ex Tan.) e como polinizadores o *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. e híbridos desta espécie, verificando-se a frequência de plantas zigóticas e o vigor apresentado por elas.

O experimento foi conduzido, na Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMT), Município de Cruz das Almas, Recôncavo Baiano, durante o período de agosto de 1993 a março de 1995. Compreendeu uma etapa de campo, na qual foram efetuadas polinizações controladas, e outra de laboratório, referente ao cultivo *in vitro* dos embriões obtidos dessas polinizações. A tangerina 'Sunki', como parental feminino, foi cruzada com *Poncirus trifoliata* e híbridos desta espécie, em razão da característica trifoliada, dominante e de fácil identificação visual, presente nestes parentais, a seguir descritos: *P. trifoliata* seleção Barnes; Citranges (*C. sinensis* x *P. trifoliata*) Argentina, C13, C125, Rusk e Troyer; Citrumelo (*C. paradisi* Macf. x *P. trifoliata*) Swingle; Citrangequat Thomasville (*Fortunella* spp. x Citrange) 1434 e 1439; *P. trifoliata* x limão 'Cravo' (*C. limonia* Osb.).

A utilização de híbridos de *Poncirus* foi devida à pouca disponibilidade de pólen deste.

As hibridações foram realizadas durante o período de agosto a setembro de 1993. Flores recém-abertas dos parentais masculinos foram empregadas

na polinização de flores de tangerina 'Sunki', emasculadas anteriormente à antese. A emasculação compreendeu botões florais próximos da abertura, eliminando-se cuidadosamente as pétalas e anteras com o auxílio de pinça e bisturi, evitando-se o contato com o estigma. Os cruzamentos, num total de 247, foram efetuados imediatamente após a emasculação, protegendo-se as flores com sacos de gaze, os quais permaneciam nas plantas por um período de 30 a 60 dias, quando então eram removidos, oportunidade em que se verificava o vingamento do fruto.

Quatro ou cinco meses após as polinizações, os frutos foram colhidos e transportados para o Laboratório de Biotecnologia - Cultura de Tecidos, onde foram lavados em água corrente e tiveram suas sementes removidas mediante corte transversal incompleto, garantindo assim a integridade de cada semente. Estas eram lavadas em solução de água e detergente, secadas e despojadas do tegumento externo (testa). Sob condições assépticas, em câmara de fluxo de ar laminar estéril, as sementes eram tratadas com uma solução de etanol 70% durante cinco minutos, e, posteriormente, em hipoclorito de sódio 2%, por 20 minutos. Em cada etapa de preparação, efetuaram-se duas e três lavagens sucessivas com água destilada autoclavada, respectivamente.

A extração dos embriões foi realizada sob estereomicroscópio equipado com uma fonte luminosa, com o auxílio de bisturi, pinça e estilete. Mediante corte longitudinal, respeitando certa distância da região micropilar da semente para evitar ferimentos aos embriões, procedeu-se à remoção do tegumento interno (tégmen).

O meio utilizado para o cultivo dos embriões foi o MT (Murashige & Tucker, 1969), modificado (Tabela 1). O pH do meio foi ajustado para a faixa de 5,7 - 5,8. O ágar e os nutrientes foram dissolvidos por aquecimento e agitação, respectivamente, e distribuídos em frascos de vidro com 6,3 cm x 3,5 cm x 3,5 cm de dimensão, colocando-se 20 mL de meio por frasco, os quais eram fechados posteriormente com papel-alumínio. Os frascos com o meio eram então dispostos dentro de sacos de plástico e esterilizados por autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos. Foram colocados no máximo dois embriões por frasco, lacrados com uma película de polivinilcloro e mantidos em sala de crescimento a 27±1°C, com 16 horas/dia de iluminação a uma intensidade de 1.500 lux, fornecida por lâmpadas de 30-W super lux do dia.

Transcorrido um mês de cultivo em laboratório, as plantas foram transplantadas para canteiros de isopor, cujas células foram preenchidas por um composto de terra vegetal e vermiculita, na proporção de 3:1, e colocados sob condições de casa de vegetação. Nesta ocasião, as plântulas que apresentaram a característica morfológica trifoliada foram reconhecidas como híbridas. As plantas com limbo foliar simples seriam as nucelares, embora com a possibilidade de haver nesse grupo plantas zigóticas não identificadas, em razão do emprego de híbridos de *Citrus* com *Poncirus* como parentais masculinos. O vigor das plantas foi estimado com base no comprimento do epicótilo, contagens do número de folhas verdadeiras, além do emprego do seguinte critério de avaliação visual: bom, regular e ruim.

Das 247 polinizações realizadas, 99 tiveram sucesso, obtendo-se um vingamento de frutos de 40%, taxa esta inferior à obtida por Soares Filho et al. (1991) com limão 'Cravo', considerando parentais masculinos semelhantes aos empregados no presente trabalho. O número de frutos efetivamente utilizado foi de 84, em virtude de perdas de frutos pós-colheita. Des-tes frutos, retiraram-se 379 sementes, das quais foram extraídos 460 embriões (média de 1,2 embrião por semente), que resultaram em 421 plantas, sendo 201 trifoliadas (híbridas) e 220 monofoliadas. Esse resultado indica uma freqüência observada de plantas zigóticas da ordem de 48%, subestimada em decorrência da utilização de híbridos de *Poncirus* em parte dos cruzamentos.

As avaliações relativas ao caráter tamanho de epicótilo mostraram uma superioridade das plantas trifoliadas em relação às monofoliadas, verificando-se valores médios de 16,5 cm e 14,2 cm, respectivamente. Além disso, dentre as plantas incluídas neste estudo, a de maior comprimento foi trifoliada (Tabela 2). Um predomínio de plantas trifoliadas nas classes de maior tamanho de epicótilo pode ser observado na Tabela 3, dando-se o contrário com respeito às monofoliadas, que incluem as plantas de origem

TABELA 1. Composição do meio MT (Murashige & Tucker, 1969) modificado, usado para o cultivo de embriões de tangerina 'Sunki' (*Citrus sunki*).

Constituintes	Concentração no meio (mg/L) ¹
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,20
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
NaMoO ₂ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Tiamina	10
Piridoxina	10
Ácido nicotínico	5
Glicina	2
Mio-inositol	100
Caseína-hidrolisada	500
ANA	0,02
BAP	0,04
Sacarose	50000
Ágar-ágar	7000

¹ pH = 5,7 - 5,8.

nucelar. No tocante ao caráter número de folhas, as observações realizadas apresentaram um ligeiro favorecimento para as plantas monofoliadas, segundo se constata pelos valores médios obtidos, muito embora a planta com maior número de folhas tenha sido trifoliada (Tabela 2). A distribuição do número de folhas dentro de plantas trifoliadas e monofoliadas indica que estas últimas manifestaram um comportamento contrastante: apresentaram um predomínio nas classes de maior número, porém o mesmo ocorreu na classe de menor número de folhas (Tabela 3). Esses resultados, em conjunto, revelam superioridade de vigor das plantas trifoliadas em relação às monofoliadas, o que vai de encontro à opinião generalizada de que, em citros, os indivíduos híbridos tendem a ser fracos, pouco desenvolvidos em termos vegetativos. Essa constatação foi confirmada a partir de observações visuais de vigor, as quais revelaram que cerca de 91% das plantas trifoliadas concentraram-se nas classes de vigor bom (69,2%) e regular (21,9%), ao passo que nas monofoliadas o percentual dessas classes foi de, aproximadamente, 68% (42,7% com vigor bom e 25,0% com vigor regular). Cabe destacar, também, que a taxa de mortalidade nas plantas monofoliadas (22,7%) foi superior à observada nas trifoliadas (2,5%) (Fig. 1). Soares Filho et al.

TABELA 2. Valores máximos, mínimos e médios de comprimento (cm) de epicótilo e número de folhas verdadeiras de plantas trifoliadas (T) e monofoliadas (M) obtidos de cruzamentos controlados de tangerina 'Sunki' (*Citrus sunki*) com *Poncirus trifoliata* e híbridos desta espécie. Cruz das Almas, BA. 1993-95.

Comprimento do epicótilo (cm)						Número de folhas verdadeiras					
Máximo		Mínimo		Médio		Máximo		Mínimo		Médio	
T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M
40,0	30,5	2,0	2,0	16,5	14,2	61	57	1	1	22,6	23,5

TABELA 3. Classes de comprimento de epicótilo e de número de folhas verdadeiras de plantas trifoliadas (T) e monofoliadas (M) obtidas de cruzamentos controlados de tangerina 'Sunki' (*Citrus sunki*) com *Poncirus trifoliata* e híbridos desta espécie. Cruz das Almas, BA. 1993-95.

Classes	Comprimento de epicótilo (cm) ¹		Número de folhas verdadeiras ²	
	T	M	T	M
1	8,2	14,7	8,7	16,5
2	41,3	54,1	53,6	38,2
3	38,8	24,1	33,7	35,9
4	10,7	7,1	3,1	7,6
5	1,0	0,0	1,0	1,8

¹ Classes de comprimento de epicótilo: 1= 1,0 - 8,0 cm; 2= 8,1 - 16,0 cm; 3 = 16,1 - 24,0 cm; 4= 24,1 - 32,0 cm; 5= 32,1 - 40,0 cm.

² Classes de número de folhas verdadeiras: 1= 1 - 12; 2= 13 - 24; 3= 25 - 36; 4= 37 - 48; 5= 49 - 61.

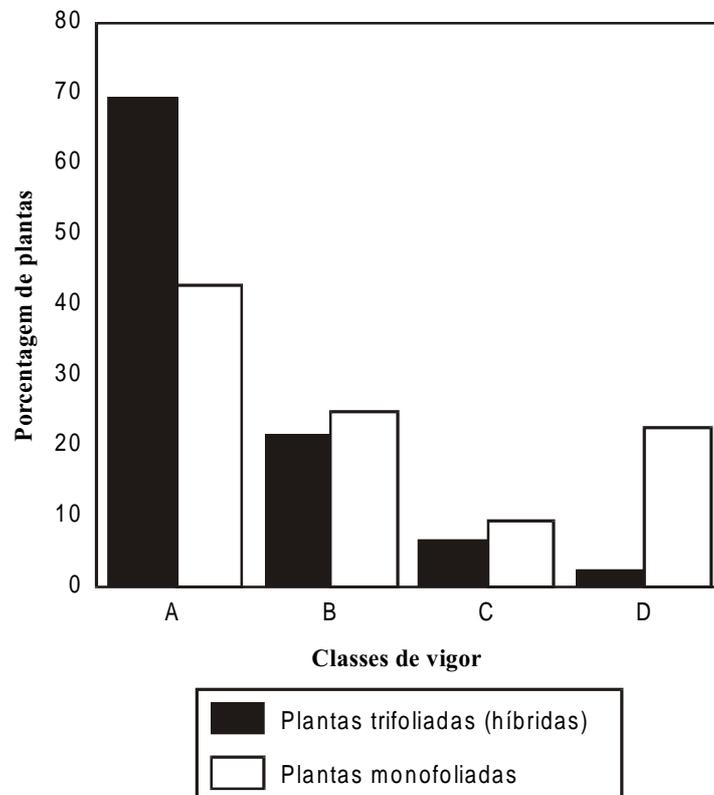


FIG. 1. Classes de vigor e porcentagem de mortalidade de plantas obtidas de cruzamentos controlados de tangerina 'Sunki' (*Citrus sunki*) com *Poncirus trifoliata* e híbridos desta espécie. Cruz das Almas, BA. 1993-95. A = Bom; B = Regular; C = Ruim; D = Planta morta.

(1991), em cruzamentos envolvendo o limão 'Cravo' como parental feminino, e *Poncirus trifoliata* e híbridos desta espécie como parentais masculinos, chegaram a conclusões semelhantes.

Pode-se destacar que: a tangerina 'Sunki' apresenta boa compatibilidade em cruzamentos com *Poncirus trifoliata* e híbridos desta espécie; a tangerina 'Sunki' pode ser indicada como importante parental feminino em programas de melhoramento genético de citros dirigidos à obtenção de novos porta-enxertos.

AGRADECIMENTOS

Ao Eng. Agr., M.Sc. em Agronomia, André Fernando Martinez Rocha, por sua colaboração na elaboração da figura.

REFERÊNCIAS

- CAMERON, J.W.; FROST, H.B. Genetics, breeding and nucellar embryony. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.B.; WEBBER, H.J. (Eds.). **The Citrus Industry**. Berkeley: Univ. of California, 1968. v.2, p.325-370.
- FURR, J.R. Citrus breeding for the arid Southwestern United States. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1968, Riverside. **Proceedings...** Riverside: Univ. of California, 1969. v.1, p.191-197.
- MURASHIGE, T.; TUCKER, D.P.H. Growth factor requirement of citrus tissue culture. In: INTERNATIONAL CITRUS SIMPOSIUM, 1., 1968, Riverside. **Proceedings...** Riverside: Univ. of California, 1969. v.3, p.1155-1161.
- SALIBE, A.A. Aspectos do melhoramento de plantas fruteiras no Brasil. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.26, n.6, p.688-691, 1971.
- SOARES FILHO, W. dos S.; VÁSQUEZ ARAUJO, J.E.; CUNHA, M.A.P. da; CUNHA SOBRINHO, A.P. da; PASSOS, O.S. Variabilidade genética em "limão 'Cravo'". **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.13, n.3, p.267-272, 1991.
- 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, Italy. **Proceedings...** Catania, Italy: International Society of Citriculture, 1994. v.1, p.135-138.
- 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. Cruz das Almas, BA: Embrapa-CNPMPF, 1997. 35p. (Embrapa-CNPMPF. Documentos, 74).