



**PAULA ALMEIDA NASCIMENTO**

**CITOMETRIA DE FLUXO E ANATOMIA CAULINAR COMO  
INDICADORES DE COMPATIBILIDADE DE MUDAS  
CÍTRICAS**

**LAVRAS - MG**

**2017**

**PAULA ALMEIDA NASCIMENTO**

**CITOMETRIA DE FLUXO E ANATOMIA CAULINAR COMO INDICADORES DE  
COMPATIBILIDADE DE MUDAS CÍTRICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Joyce Dória Rodrigues Soares

Orientadora

Profa. Dra. Leila Aparecida Salles Pio

Coorientadora

**LAVRAS - MG**

**2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA,  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Nascimento, Paula Almeida.

Citometria de fluxo e anatomia caulinar como indicadores de compatibilidade de mudas cítricas/ Paula Almeida Nascimento. - 2017.  
71 p. : il.

Orientadora: Joyce Dória Rodrigues Soares.

Coorientadora: Leila Aparecida Salles Pio.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras,  
2017.

Bibliografia.

1. Enxertia. 2. Citometria de fluxo. 3. Anatomia do lenho. I. Soares,  
Joyce Dória Rodrigues. II. Pio, Leila Aparecida Salles. III. Título.

**PAULA ALMEIDA NASCIMENTO**

**CITOMETRIA DE FLUXO E ANATOMIA CAULINAR COMO INDICADORES DE  
COMPATIBILIDADE DE MUDAS CÍTRICAS**

***FLOW CYTOMETRY AND ANATOMY CAULINATE AS COMPATIBILITY  
INDICATORS OF CITRUS SEEDLINGS***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 19 de abril de 2017.

Prof. Dr. Antônio Decarlos Neto      UFLA  
Dra. Ester Alice Ferreira              EPAMIG

Profª. Dra. Joyce Dória Rodrigues Soares  
Orientadora

Profª. Dra. Leila Aparecida Salles Pio  
Coorientadora

**LAVRAS - MG**

**2017**

*Ao Senhor **Deus**, por toda a sabedoria.*

*À minha família: minha mãe, Maria de Fátima, pelo apoio e carinho em todos os momentos; ao meu pai, Paulo César, pelo incentivo; aos meus irmãos Caroline e Rafael e meu cunhado Ailton pela torcida; aos meus sobrinhos Emanuel e Ester.*

***Dedico.***

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a **Deus**, fonte de sabedoria e amor, por proporcionar mais essa vitória em minha vida.

À minha família que me incentivou nessa caminhada. Aos meus pais, Paulo César e Maria de Fátima, meus irmãos Caroline e Rafael, meus sobrinhos Emanuel e Ester e ao meu cunhado Ailton. Amo muito vocês!!!

À Universidade Federal de Lavras, UFLA, especialmente ao Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Joyce Dória Rodrigues Soares, agradeço pelos ensinamentos, paciência e assistência durante todo o curso do Mestrado.

À minha coorientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leila Aparecida Salles Pio, pessoa maravilhosa, a qual agradeço pelo apoio, compreensão, incentivo, pela confiança e assistência durante todo o curso do Mestrado.

Aos membros da banca, a Dr.<sup>a</sup> Ester Alice Ferreira (EPAMIG) e prof. Dr. Antônio Decarlos Neto (UFLA) por aceitarem participar da banca avaliadora. Meu especial agradecimento.

Aos colegas da turma de Fruticultura Tropical, pelo auxílio nos experimentos de campo, com as mudas no pomar de Fruticultura da UFLA. Obrigada Evaldo, Arnaldo, Elaine, Milena, Bárbara, Irton, Rafael Arruda, Rafael Romanielo, Matheus, Virgílio, Paulyene, Dalílhia, Givago, Henrique, Lucas, Aline Dutra e Aline Ciaciá pelo trabalho em conjunto.

A todos do laboratório de Anatomia Vegetal, do Departamento de Biologia (DBI), UFLA, em especial ao técnico Ítalo, pelo auxílio com as fotografias.

A todos do laboratório de Anatomia da Madeira, do Departamento de Ciências Florestais (DCF), UFLA, em especial ao professor Dr. Fábio Akira Mori e ao Alyson Myller, pelos ensinamentos e assistência com o material histológico.

A todos do laboratório de Cultura de Tecidos, do Departamento de Agricultura (DAG), UFLA, em especial à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Lara, a Flávia Aparecida, a Raíssa e ao Filipe Almendagna pela assistência e disposição nos experimentos de citometria de fluxo e ensinamentos de estatística.

À Marli, secretária da Pós-Graduação em Fitotecnia, pela colaboração em todos os momentos.

Ao meu amigo Luiz Eduardo Santos Lazzarini, pela torcida, pela forte amizade e apoio.

**MUITO OBRIGADA!!!!**

"É **Graça Divina** começar bem.

**Graça Maior** é persistir na caminhada certa.

Mas a **Graça das Graças** é não desistir nunca."

(Dom Hélder Câmara)



## RESUMO

A enxertia eficiente é consequência da compatibilidade da copa com o porta-enxerto, ou seja, uma combinação bem sucedida entre duas partes de plantas distintas que prossegue seu desenvolvimento formando um único indivíduo. Na citricultura, há necessidade de diversificação do uso de porta-enxertos, pois é de extrema importância conhecer o comportamento das combinações copas x porta-enxertos cítricos. Sabe-se que o porta-enxerto influencia na variedade copa numa série de características que determinarão sua maior ou menor capacidade produtiva. Sendo assim, no intuito de observar a possibilidade de ocorrência de incompatibilidade precocemente e a influência do porta-enxerto no conteúdo de DNA entre variedades copas de laranjeiras e tangerineiras em diferentes porta-enxertos cítricos, realizou-se análises de citometria de fluxo e anatomia da região da enxertia. Foram realizados dois experimentos de compatibilidade de enxerto e porta-enxerto: um com cultivares de laranjeiras com as variedades copas “Lane Late”, “Navelate”, “Navelina” e outro experimento com as tangerineiras com as variedades copas “Clemenules” e “Satsuma Okitsu” e o híbrido “Ortanique”. As copas de laranjeiras e tangerineiras foram enxertadas em cinco porta-enxertos de variedades cítricas diferentes: Limoeiro “Cravo Sta. Cruz”, Tangerineira “Sunki Tropical”, Citrandarin “Índio”, Citrandarin “San Diego”, Citrumelo “Swingle”. Nas análises de citometria de fluxo, utilizou-se o Delineamento Inteiramente Casualizado, DIC, em esquema fatorial com 3 (copas) x 5 (porta-enxertos), com três repetições. Foram avaliados os conteúdos de DNA das folhas e raízes de cada combinação de copas de laranjeiras e tangerineiras sobre os diversos porta-enxertos cítricos. Foi encontrado diferenças estatísticas nos conteúdos de DNA das folhas, entretanto os conteúdos de DNA das raízes não foram significativos. Enquanto que, nas análises de anatomia do lenho das mudas, foram avaliados cortes anatômicos transversais e longitudinais das secções dos caules na região da enxertia. O delineamento utilizado foi Inteiramente Casualizado, DIC, em esquema fatorial 2 x 4, sendo o primeiro fator as duas cultivares copas “Navelina” e “Clemenules” e o segundo fator os quatro porta-enxertos: Citrandarins “Índio” e “San Diego”, “Limão-cravo Sta. Cruz” e tangerina “Sunki Tropical”. Assim, as análises estatísticas foram realizadas com a mensuração das alturas dos raios com n= 30 repetições e a mensuração dos diâmetros dos vasos com n= 40 repetições. Foram encontradas diferenças estatísticas nas médias das alturas dos raios e nos diâmetros dos vasos dos tratamentos avaliados. Conclui-se que as variedades copa de laranjeiras e tangerineiras apresentam tendência de variar o conteúdo de DNA conforme o porta-enxerto utilizado. Os cortes histológicos do lenho das combinações copa x porta-enxerto cítricos analisados, após um ano de enxertia, apresentaram formação e a proliferação de células desorganizadas (calos) observando conexão dos elementos vasculares entre enxerto e porta-enxerto.

**Palavras-chave:** Enxertia. Citometria de fluxo. Anatomia do lenho. *Citrus* spp.

## ABSTRACT

Effective grafting is a consequence of the canopy's compatibility with the rootstock, that is, a successful combination between two distinct plant parts that continues to grow into a single individual. In the citriculture, there is a need for diversification of the use of rootstocks, as it is extremely important to know the behavior of the crown-x citric rootstock combinations. It is known that the rootstock influences the canopy variety in a series of characteristics that will determine its greater or lesser productive capacity. Thus, in order to observe the possibility of occurrence of early incompatibility and the rootstock influence on the DNA content between orange and mandarin crown varieties in different citrus rootstocks, flow cytometry analysis and anatomy of grafting area were performed. Two graft and rootstock compatibility experiments were carried out: one with orange cultivars with the varieties 'Lane Late', 'Navelate', 'Navelina' and another experiment with the mandarins with the 'Clemenules' and 'Okitsu' Satsuma and the 'Ortanique' hybrid. The crowns of orange and mandarin were grafted on five rootstocks of different citrus varieties: 'St. Cruz Clave Lemon Tree', 'Tropical Sunki' Mandarin Tree, 'Índio' Citrandarin, 'San Diego' Citrandarin, 'Swingle' Citrumelo. Flow cytometry analyzes were performed using a Completely Randomized Design, CRD, in a factorial scheme with 3 (crowns) x 5 (rootstock), with three replications. The DNA contents of the leaves and roots of each combination of oranges and mandarins crowns on the various citrus rootstocks were evaluated. Statistical differences were found in the DNA contents of the leaves; however, the DNA contents of the roots were not significant. While, in the analysis of the seedlings wood anatomy, transversal and longitudinal anatomical sections of the sections of the stems were evaluated in the area of the grafting. The design was Completely Randomized, CRD, in a 2 x 4 factorial scheme, the first factor being the two 'Navelina' and 'Clemenules' crown cultivars and the second factor the four rootstocks: 'Índio' and 'San Diego' Citrandarins, Clave Lemon Tree 'Sta. Cruz' and 'Sunki Tropical' Mandarin. Thus, statistical analyzes were performed by measuring the rays heights rays with  $n = 30$  repetitions and the vessel diameters measurement with  $n = 40$  repetitions. Statistical differences were found in the rays heights and vessel diameters average of the evaluated treatments. The conclusion is that orange and mandarin canopy varieties tend to vary the DNA content according to the rootstock used. In the histological sections of the crowns x rootstock analyzed combinations of the wood, after one year of grafting, they presented formation and the proliferation of disorganized cells (callus), observing some connection of the vascular elements between graft and rootstock.

**Keywords:** Grafting. Flow Cytometry. Wood anatomy. *Citrus* spp.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 - Mudas cítricas enxertadas. Setor de Fruticultura UFPA, Lavras - MG.....   | 31 |
| Figura 2 - Diagrama da metodologia utilizada para analisar o conteúdo de DNA nuclear por citometria de fluxo.....  | 34 |
| Figura 3 - Os cortes anatômicos em mudas cítricas: na copa, no ponto de enxertia e no porta-enxerto. ....  | 35 |
| Figura 4 - Histogramas de Citometria de Fluxo de diferentes variedades copa de laranjeiras enxertadas sobre porta-enxertos cítricos, analisados com padrão interno rabanete <i>Raphanus sativus</i> . .... | 40 |
| Figura 5 - Histogramas de Citometria de Fluxo das raízes das combinações copas laranjas x porta-enxertos cítricos, analisados com padrão interno rabanete <i>Raphanus sativus</i> . ....                   | 44 |
| Figura 6 - Histogramas de Citometria de Fluxo de diferentes variedades copa de tangerinas enxertadas sobre porta-enxertos cítricos, analisados com padrão interno rabanete <i>Raphanus sativus</i> .....   | 49 |
| Figura 7 - Histogramas de Citometria de Fluxo das raízes das combinações das copas Tangerinas x porta-enxertos cítricos, analisados com padrão interno rabanete <i>Raphanus sativus</i> . ....             | 52 |
| Figura 8 - Cortes histológicos do lenho da região da enxertia das combinações copa x porta-enxertos cítricos.....  | 54 |
| Figura 9 - Secção transversal do lenho das copas das cultivares de laranja Navelina e tangerina Clemenules enxertadas nos diferentes porta-enxertos cítricos. ....   | 57 |
| Figura 10 - Secção transversal do lenho dos porta-enxertos das cultivares de laranja Navelina e tangerina Clemenules enxertadas nos diferentes porta-enxertos cítricos.....                                | 58 |
| Figura 11 - Secção longitudinal da região da enxertia com detalhes dos raios. ....   | 60 |
| Figura 12 - Secção longitudinal tangencial do lenho no ponto da enxertia das combinações copa x porta-enxertos cítricos.....   | 62 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 - Material vegetal utilizado nos experimentos de Citometria de Fluxo. ....   | 32 |
| Tabela 2 - Material vegetal utilizado nos Cortes Anatômicos da Madeira. ....  | 35 |
| Tabela 3 - Índices de DNA (ID) em pictogramas e coeficiente de variação (CV) em folhas e raízes de laranjeiras enxertadas em diferentes porta-enxertos, submetidas à análise de citometria de fluxo. ....   | 39 |
| Tabela 4 - Índices de DNA (ID) em pictogramas e coeficiente de variação (CV) em folhas e raízes de tangerineiras enxertadas em diferentes porta-enxertos, submetidas à análise de citometria de fluxo. ....   | 47 |
| Tabela 5 - Diâmetro médio dos vasos da copa e do porta-enxerto obtidos na secção transversal das cultivares copa Navelina e Clemenules enxertadas nos porta-enxertos San Diego, Cravo Santa Cruz, Citrandarin Índio e Sunki Tropical, após 16 meses da realização da enxertia. .... | 55 |
| Tabela 6 - Altura dos raios do enxerto e do porta-enxerto obtidos na secção transversal das cultivares copa Navelina e Clemenules enxertadas nos porta-enxertos San Diego, Cravo Santa Cruz, Citrandarin Índio e Sunki Tropical, após 16 meses da realização da enxertia. ....      | 61 |

## SUMÁRIO

|              |   |    |
|--------------|---|----|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | 13 |
| <b>2</b>     | <b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....  | 15 |
| <b>2.1</b>   | <b>Panorama atual da citricultura</b> .....                                     | 15 |
| <b>2.2</b>   | <b>Variedades cítricas</b> .....  | 17 |
| <b>2.2.1</b> | <b>Variedades de porta-enxertos</b> .....                                       | 21 |
| <b>2.3</b>   | <b>Propagação de citros por enxertia</b> .....                                  | 24 |
| <b>2.4</b>   | <b>Compatibilidade copa e porta-enxerto</b> .....                               | 25 |
| <b>2.5</b>   | <b>Citometria de fluxo</b> .....  | 26 |
| <b>2.6</b>   | <b>Anatomia caulinar</b> .....  | 28 |
| <b>3</b>     | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 31 |
| <b>3.1</b>   | <b>Material vegetal</b> .....   | 31 |
| <b>3.2</b>   | <b>Análises de citometria de fluxo</b> .....                                    | 32 |
| <b>3.3</b>   | <b>Análises anatômicas da madeira</b> .....                                     | 34 |
| <b>3.4</b>   | <b>Parâmetros mensurados na caracterização anatômica da madeira</b> .....       | 36 |
| <b>4</b>     | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....   | 37 |
| <b>4.1</b>   | <b>Análises de Citometria de Fluxo: copas apirênicas de laranjeiras</b> .....   | 37 |
| <b>4.2</b>   | <b>Análises de citometria de fluxo: copas apirênicas de tangerineiras</b> ..... | 45 |
| <b>4.3</b>   | <b>Análises anatômicas do caule</b> .....                                       | 53 |
| <b>5</b>     | <b>CONCLUSÃO</b> .....  | 64 |
|              | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 65 |

## 1 INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira está vulnerável devido, principalmente, à utilização de poucas combinações entre copas e porta-enxertos. Diante disto, a ampliação da base genética relacionada às variedades utilizadas para copas e porta-enxertos, incluindo aquelas com capacidade de adaptação a estresses abióticos, contribuirá decisivamente para que se alcancem rendimentos economicamente superiores.

O potencial de produção de frutos dos citros, em pomares comerciais, é determinado, principalmente, pelo valor genético das variedades de copas e porta-enxertos. A enxertia cria uma associação entre dois indivíduos, geneticamente diferentes, cada qual com suas características, que precisam se relacionar mutuamente com benefícios para que a nova planta seja produtiva e tenha vida longa. O uso da enxertia tornou-se fundamental para a quebra da juvenilidade das plantas, manutenção da resistência/tolerância dos citros a fatores bióticos (ex.: tristeza dos citros) e abióticos (ex.: eficiência de uso da água e de nutrientes), e aumento da produtividade e da qualidade da fruta.

Os tecidos dos calos formam-se do porta-enxerto e da copa e, com essa união, as células se multiplicam e se preenchem. A enxertia é realizada pela mistura e entrelaçamento do tecido do calo, constituído de células parenquimatosas. O parênquima é um tecido constituído de células vivas, potencialmente meristemático, que conserva sua capacidade de divisão mesmo após as células estarem completamente diferenciadas, sendo de grande importância no processo de cicatrização ou regeneração de lesões, como na união de enxertos ou outras lesões mecânicas.

Assim sendo, a incompatibilidade é um dos principais fatores que prejudicam o rendimento na enxertia. Duas plantas são consideradas incompatíveis quando não formam, entre as partes enxertadas, uma união perfeita. Uniões incompatíveis são frequentemente encontradas quando da enxertia entre plantas com grau de parentesco distante (o limite é a família), com exigências nutricionais distintas, com metabolismo, vigor e ciclo de vida diferentes, com diferenças na consistência dos tecidos ou sem afinidade anatômica. A incompatibilidade normalmente não apresenta sintomas na fase de formação de mudas cítricas, sendo necessário descobrir novas metodologias que podem detectar essa incompatibilidade de forma precoce, ou seja, antes de ir para o campo.

A citometria de fluxo pode ser uma boa opção para estimar essa incompatibilidade, pois quanto maior a diferença de quantidade de DNA entre enxerto e porta-enxerto maiores são as chances de incompatibilidade na enxertia. Prevendo precocemente maior ou menor

sucesso na enxertia. Por meio desta técnica será possível também observar se o porta-enxerto exerce influência sobre a quantidade de DNA do enxerto e vice-versa.

A citometria de fluxo é uma técnica que deve ser trabalhada em conjunto com outra a fim de aumentar a acurácia dos resultados. Sendo assim, também foram realizadas análises de anatomia vegetal do ponto de enxertia, visando observar conexões de elementos vasculares entre enxerto e porta-enxerto.

Sendo assim, no intuito de observar a possibilidade de ocorrência de incompatibilidade precocemente e a influência do porta-enxerto no conteúdo de DNA entre variedades copa de laranjeiras e tangerineiras enxertadas em diferentes porta-enxertos cítricos, realizaram-se análises de citometria de fluxo e cortes anatômicos da região da enxertia.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Panorama atual da citricultura

A citricultura representa uma das atividades agrícolas de maior importância no território brasileiro, tanto pela sua produção como para o seu mercado consumidor. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2015), a safra de laranja, em toneladas, alcançou 16,2 milhões em julho de 2015. Conseqüentemente, houve crescimento da área plantada, da área de produção e aumento de rendimento. São Paulo, o estado que é o maior produtor, participa com 71,7% do total a ser colhido no país. Desta forma, a estimativa da produção da laranja apresenta crescimento de 9,3% frente ao ano de 2014. O suco brasileiro está mais valorizado no exterior por causa das recentes valorizações do dólar. Certamente, são vantajosas as comercializações com produtos cítricos e a tendência é aumentar os investimentos em tratamentos culturais, adubações nas lavouras, geração de empregos e desenvolvimento do comércio e serviços.

O Brasil é considerado o maior produtor de laranjas e o maior exportador do suco da fruta mundialmente. Há ainda, muitos entraves em organização e faltam políticas voltadas ao desenvolvimento da cadeia citrícola. Além disso, os aumentos dos riscos fitossanitários citrícolas e as barreiras tarifárias que diminuem a sua competitividade no mercado internacional dificultam a comercialização. A maior concentração da produção cítrica brasileira está na região Sudeste, entretanto houve expansão para outras regiões, como no Nordeste, Norte e Sul, tendo como base a agricultura familiar. Considerando a dimensão e a diversidade climática do país, a região Sul predomina o mercado de frutas para mesa com prioridades para frutos sem sementes, enquanto que a região Sudeste destaca-se por frutos para processamento e mercado interno, e a região Nordeste a produção é de limas ácidas, doces, limões, pomelos, tangerinas e laranjas (CUNHA SOBRINHO et al., 2013).

No comércio mundial, a produção citrícola tem vários destinos: processamento industrial, ou seja, a produção de suco, o consumo interno de fruta *in natura* e a exportação da fruta *in natura*. Assim, o cinturão citrícola de São Paulo e Minas Gerais (Triângulo Mineiro) direciona sua produção para o processamento industrial, ou seja, o mercado de suco de laranja. Na América do Norte, os Estados Unidos concentram a maioria da produção de suas frutas para o processamento industrial, sendo a Flórida com mercado voltado para suco de laranja. Enquanto que o México já prioriza o mercado de fruta fresca e apresenta pequena produção de suco. Na Ásia, a China focaliza sua produção no fornecimento de frutas para consumo *in natura*. A Espanha se posiciona entre os países europeus pela exportação de fruta



fresca, com alto valor agregado, produzindo frutos apirênicos com notável cor e aparência externa (NEVES et al., 2010).

Certamente, o Brasil já é considerado eficiente na cadeia citrícola. Assim, a pesquisa de melhores cultivares cítricas, a escolha de melhores combinações copa/porta-enxerto, as mudas e os viveiros certificados, cultivo e manejo adequado nos pomares, a produção do suco de laranja e a comercialização das frutas para consumo *in natura*. O Brasil detém 50% da produção mundial de suco de laranja e exporta 98% do que produz e consegue incríveis 85% de participação no mercado mundial. Além disso, de cada cinco copos de suco de laranja consumidos no mundo, três são produzidos nas fábricas brasileiras. Entretanto, não possui tradição na produção de citros de mesa, especialmente em se tratando de cultivares apirênicas (NEVES et al., 2010).

Minas Gerais é o quarto maior produtor de laranja do Brasil, participa com 5,47% da produção nacional. Na primeira colocação, se encontra o estado de São Paulo que responde por 11,8 milhões de toneladas, em segundo lugar o estado da Bahia com 1,01 milhão de toneladas e, no terceiro lugar, o estado do Paraná com 927 mil toneladas (VALVERDE, 2014). Segundo a Secretaria de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, SEAPA, a produção de laranja no ano de 2014 foi de 946,5 mil toneladas no estado, significando um aumento de 5,85% em relação aos anos anteriores. A área de produção da fruta em 2014 foi de 43 mil hectares (VALVERDE, 2014).

Segundo Ferreira (2014), o Brasil destaca-se como maior produtor de laranja, segundo maior produtor de tangerina e terceiro maior produtor de lima ácida “Tahiti”. Encontra-se frutas cítricas em todos os estados da federação, entretanto, na região Sudeste no estado de Minas Gerais a maior produção, ou seja, 75% do volume estadual está no Triângulo Mineiro, região próxima ao estado de São Paulo, considerado o polo nacional de produção da citricultura nacional.

As tangerinas são o segundo grupo de maior importância comercial. São consumidas *in natura* e, por apresentar pouca quantidade de suco em relação à laranja, são pouco utilizadas no processamento industrial de suco. A tangerina “Ponkan” (*Citrus reticulata*) é a principal cultivar plantada no Brasil (FERREIRA, 2014).

Os frutos cítricos destinados para consumo de mesa devem apresentar qualidades que atendam aos consumidores exigentes. Uma grande oportunidade para pequenos e médios produtores com o objetivo de agregar maior valor aos frutos destinados ao consumo *in natura*. A citricultura para fruto de mesa fortalece o mercado interno com melhoria na qualidade da fruta e diversificação de oferta de novas cultivares (FERREIRA, 2014).

Embora o Brasil seja o maior produtor mundial de suco de laranja, o país não possui tradição na produção de frutas cítricas de alta qualidade para consumo *in natura*, existindo ainda um grande mercado a ser explorado. Países como a Espanha, com uma produção total quatro vezes menor que a brasileira, movimentam o dobro do valor em exportações, por trabalharem com o mercado de frutas frescas (OLIVEIRA; NAKASU; SCIVITTARO, 2008).

## 2.2 Variedades cítricas

Os citros pertencem à família *Rutaceae*, subfamília *Aurantioideae*, tribo *Citrae*, subtribo *Citrinae*, sendo os principais gêneros: *Fortunella*, *Poncirus* e *Citrus*. O gênero *Citrus* apresenta a subgênero *Eucitrus*, no qual se agrupam as seguintes espécies: *C. medica*, *C. limon*, *C. aurantifolia*, *C. aurantium*, *C. sinensis*, *C. grandis*, *C. paradisi* e *C. reticulata* (KUBITZKI et al., 2011; SIMÃO, 1998).

As laranjeiras “Lane Late”, “Navelate” e “Navelina” (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) são de umbigo e pertencem ao grupo Navel. As tangerinas “Clemenules” (*C. reticulata* Blanco) e satsuma “Okitsu” (*C. unshiu*) e o híbrido “Ortanique” (híbrido natural provavelmente entre *C. sinensis* (L.) Osbeck e *C. reticulata* Blanco) são frutos cítricos que apresentam ausência de sementes, com características sensoriais bastante apreciadas pelo mercado consumidor (WALLACE; LEE, 1999). Recentemente, borbulhais dessas cultivares apirênicas foram introduzidas no Brasil pela Embrapa - Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado. Essas frutas cítricas sem sementes apresentam grande aceitação no mercado internacional e são cultivadas comercialmente em vários países (OLIVEIRA et al., 2008).

O grupo das laranjas de Umbigo, de endocarpo alaranjado, são as cultivares “Lane Late”, “Navelate” e “Navelina” não são recomendadas para extração de suco (OLIVEIRA et al., 2008). Segundo Lorenzi et al. (2006), as laranjeiras *Citrus sinensis* (L.) Osbeck são árvores de porte médio e copa de formato esférico. As cultivares diferenciam-se quanto à maturação, que pode ser precoce, meia-estação ou tardia e quanto à coloração do endocarpo, que pode ser mais claro, mais alaranjado ou apresentar polpa vermelho-intensa, pela presença de antocianinas. Assim, as cultivares de laranjeiras apresentam grãos de pólen e sacos embrionários estéreis. Desta forma, não produzem sementes, mesmo na presença de cultivares polinizadoras.

As tangerinas e seus híbridos constituem um grupo bastante diversificado e são o segundo grupo de frutas cítricas mais produzidas no Brasil (BOTEON; NEVES, 2005). As tangerinas satsuma “Okitsu” possuem grãos de pólen e sacos embrionários estéreis em uma elevada porcentagem, raramente produzindo sementes. Já as tangerinas “Clemenules” e os

híbridos “Ortanique” são autoincompatíveis, ou seja, não produzem sementes quando cultivados de forma isolada de cultivares produtoras de grãos de pólen férteis. As espécies do gênero *Citrus* são alógamas, podendo, de forma natural, principalmente pelo vento e ou insetos, cruzarem entre si e com gêneros afins, tais como o *Poncirus* e *Fortunella*, havendo consequente produção de híbridos férteis.

Segundo Iglesias et al. (2007), muitas variedades cítricas são partenocárpicas, estéreis, autoincompatíveis ou desenvolveram algum pólen com defeito. Além disso, há cultivares de citros sem sementes, apresentando alta partenocarpia, devido à esterilidade gamética. Desta forma, a formação sem sementes nessas variedades e todo o processo de polinização, fertilização e ativação do crescimento dos frutos foram substituídos por sinais endógenos. Assim, os processos de reprodução em citros são fortemente afetados pelos reguladores hormonais de crescimento das plantas.

A seguir serão descritas as cultivares copa de laranjeiras e tangerineiras apirênicas.

### “Navelina”

A “Navelina” é uma laranja de umbigo originária da Califórnia, Estados Unidos, por mutação espontânea. Em 1910, recebeu a denominação de “Smith’s Early Navel”. Na Espanha, em 1933, foi denominada de “Navelina”, em função do porte mediano das plantas (OLIVEIRA et al., 2008).

A cultivar “Navelina”, (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), é um laranjeira Navel, de cor intensa, com características próximas às da “Bahia”. A árvore da laranjeira Navelina tem tamanho médio, com a copa esférica e frondosa. Apresenta ramos com pequenos espinhos, folhas pequenas, formato lanceoladas, coloração verde-escura, pecíolo curto e não alado. As flores são grandes e não apresentam grãos-de-pólen e sacos embrionários viáveis. Os frutos de forma ovoide, com tamanho médio a grande, possuem peso que varia entre 180 a 250 g. Assim, são achatados na porção distal, onde ocorre a formação de um umbigo. Inclusive possuem casca lisa e fina. Sua polpa tem textura média e sabor agradável, com cerca de 10 a 12 gomos e sem sementes. Suco abundante e boa relação entre açúcares e acidez. A produção comercial inicia no terceiro ano com tendência para a alternância de colheitas. Os frutos são destinados para consumo *in natura* e são produzidos precocemente (OLIVEIRA et al., 2008; OLIVEIRA; SCIVITTARO, 2011).

### **“Lane Late”**

A “Lane Late” (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) é uma laranja de umbigo tardia originada de mutação espontânea de gema da cultivar Washington Navel, tendo sido descoberta em 1950, na propriedade do Sr. Lane, em Victoria, na Austrália.

A árvore da laranjeira “Lane Late” é vigorosa, grande, com copa arredondada iniciando a produção comercial no terceiro ano. Os ramos com poucos espinhos e a folhagem apresentam cor verde-escura, com as folhas grandes e compridas com formato elíptico. As flores completas, grandes, sem a presença de grãos-de-pólen e com sacos embrionários inviáveis. Os frutos redondos, grandes com peso superior a 200, possuem casca lisa, com espessura fina a média aderida na polpa e umbigo pequeno. A polpa é saborosa, com pouca acidez. Apresentam boa qualidade e são consumidos *in natura* e não possuem sementes. É uma cultivar de maturação tardia (OLIVEIRA et al., 2008; OLIVEIRA; SCIVITTARO, 2011).

### **“Navelate”**

A “Navelate” (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) é uma laranja de umbigo e sem sementes, originária de mutação espontânea de gema da cultivar Washington Navel, identificada em Castellón de la Plana, na Espanha, em 1948.

A laranjeira “Navelate” é uma árvore muito vigorosa com copa grande no formato elipsoidal. Os ramos possuem abundância de espinhos, presença de folhas elípticas de coloração verde-escura, pecíolo médio e cordiforme. As flores completas, mas sem a presença de grãos-de-pólen e sacos embrionários viáveis. Os frutos são arredondados, com base oval, tamanho médio a grande e pesando entre 180 a 230 g. Apresentam casca lisa de espessura média aderida à polpa e com coloração alaranjada. A polpa amarela-alaranjada, com suco abundante, pouco ácido, alto teor de sólidos solúveis e baixo de limonina. Os frutos apresentam excelente qualidade e são destinados para consumo *in natura*, devido à presença de umbigo e à ausência de sementes. A maturação dos frutos é tardia (OLIVEIRA et al., 2008; OLIVEIRA; SCIVITTARO, 2011).

### **“Satsuma Okitsu”**

A cultivar satsuma “Okitsu” (*Citrus reticulata* Blanco) é uma tangerina do grupo das satsumas. Sua origem é nucelar, a partir de uma semente da cv. Miyagawa resultante de polinização controlada com *Poncirus trifoliata*. Foi obtida em 1940, no Japão, onde foi registrada em 1963.

A tangerineira “Okitsu” é planta vigorosa, com copa de tamanho médio. Os ramos apresentam crescimento vertical, com espinhos vigorosos. As folhas são de coloração verde intensa, com formato lanceolado e os pecíolos são de tamanho médio e não alados. As flores são completas, grandes e as anteras são de coloração branca-amarelada. Os grãos de pólen e o saco embrionário das flores são estéreis (AMORÓS, 1995), razão pela qual o fruto não possui sementes, mesmo na presença de cultivares polinizadoras.

Os frutos arredondados e achatados nos polos, variação no tamanho de pequeno a grande. A casca rugosa, fina e de fácil remoção. A casca e polpa da tangerina apresentam coloração amarela-alaranjada. Inclusive ausência de sementes mesmo quando as plantas são cultivadas de forma isolada de cultivares que produzam grãos-de-pólen férteis e compatíveis. Tangerina própria para consumo *in natura*, por não possuir sementes e a maturação dos frutos é precoce. A produção inicia-se a partir do terceiro ano do plantio da muda (OLIVEIRA et al., 2008; OLIVEIRA; SCIVITTARO, 2011).

### “Clemenules”

A cultivar “Clemenules” (*Citrus reticulata* Blanco) é uma tangerina de altíssima qualidade e sem sementes, originária de Nules, Espanha (1953), sendo proveniente de mutação espontânea de gema da clementina “Fina”. Também é conhecida como “Clementina de Nules”, “Clementina Reina”, “Clementina Victoria” e “Nulesina”.

A tangerineira “Clemenules” é de formato esferoide, com copa de tamanho médio. Os ramos não apresentam espinhos e as folhas são de vários tamanhos com coloração verde-clara, formato lanceolado. As flores são completas, pequenas, brancas, com anteras amarelas. Apresentam grãos-de-pólen e sacos embrionários férteis, porém autoincompatíveis. Os frutos arredondados, achatados com peso oscilando entre 80 a 90 g. A casca e a polpa possuem coloração laranja intensa. A casca é fina e aderida à polpa, com facilidade de descasque. Há ausência de sementes, desde que não ocorra polinização com cultivares compatíveis. Trata-se de uma cultivar de maturação média (OLIVEIRA; SCIVITTARO, 2011).

### “Ortanique”

A “Ortanique” (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *C. reticulata* Blanco) é um tangor, ou seja, um híbrido de uma laranjeira com uma tangerineira. Acredita-se que seja proveniente de cruzamento natural, tendo sido descoberta na Jamaica, em 1920.

“Ortanique” é uma tangerineira, seu nome é uma síntese dos termos em inglês que o caracterizam: Orange (laranja), tangerine (tangerina) e unique (única). A árvore é vigorosa e

apresenta produção precoce. Os ramos são resistentes e não possuem espinhos. As folhas elípticas com tamanho médio e pecíolo alado. Os frutos apresentam tamanho médio a grande com peso aproximado de 180 g. Possuem forma achatada na parte distal, com formação do umbigo. A casca de cor laranja com grande quantidade de óleo essencial, oferecendo certa dificuldade para descascar. Os frutos de “Ortanique” não apresentam sementes, a não ser que sejam produzidos na proximidade de cultivares polinizadoras. A maturação dos frutos de “Ortanique” é tardia (CANTILLANO et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2008; OLIVEIRA; SCIVITTARO, 2011).

### **2.2.1 Variedades de porta-enxertos**

O limão-cravo é o principal porta-enxerto utilizado no Brasil, ou seja, nos pomares brasileiros ele é exclusivo. O limoeiro Cravo (*Citrus limonia* L. Osbeck) possui diversas características pelas quais viveiristas e citricultores o consideram como um excelente porta-enxerto, dentre as quais se destacam: tolerância à seca; compatibilidade com todas as variedades-copa; média resistência ao frio; possui em média 12 sementes; os frutos amadurecem de março a maio; alta produtividade e tolerância à tristeza dos citros. Entretanto, apresenta algumas desvantagens, por exemplo, suscetibilidade ao declínio dos citros, à morte súbita dos citros, aos nematoides dos citros (*Tylenchulus semipenetrans* (Cobb)), e também, suscetibilidade aos viroides da exocorte e xiloporose. Assim, apresenta melhor comportamento quando plantado em solos arenosos e profundos (POMPEU JUNIOR, 2005).

A citricultura está vulnerável devido à expansão de doenças e pragas, havendo necessidade de diversificação do uso de porta-enxertos no Brasil. Deste modo, é fundamental o conhecimento do comportamento das variedades cítricas das copas e dos porta-enxertos, tal como das combinações entre essas e como se expressam em diferentes regiões de cultivo (BASSANEZI; GIMENES-FERNANDES; YAMAMOTO, 2003; CERQUEIRA et al., 2004; GALARÇA et al., 2013).

Em vista da necessidade de diversificação dos porta-enxertos cítricos pela elevada concentração dos pomares brasileiros de uma só variedade, o limoeiro Cravo (*Citrus limonia* Osbeck), surgiu alternativas de utilizar outras variedades em plantios comerciais. Destacando-se o uso do citrumelo “Swingle” (*C. paradisi* Macfad. cv. Duncanx *Poncirus trifoliata* (L) Raf.) que passou a ser o mais utilizado como nova opção de porta-enxerto na citricultura, devido ao surgimento da morte súbita; da tangerineira “Sunki” (*C. sunki* Hayata) hort. ex Tanaka); do limoeiro Volkameirano (*Citrus volkameriana* Ten. Et Pasq.) e da tangerina Cleópatra (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.). Além disso, os trifoliatas e seus híbridos vêm sendo

utilizados com maior frequência nos últimos anos. Inclusive, os citrandarins (híbridos de trifoliata com microtangerinas) são considerados uma nova geração de porta-enxertos (FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA - FUNDECITRUS, 2006).

A seguir serão descritas as cultivares dos diversos porta-enxertos cítricos.

### **Limão-cravo “Santa Cruz”**

O limoeiro “Cravo Santa Cruz” é uma mutação de gema do limoeiro “Cravo Santa Bárbara”, identificada no Banco Ativo de Germoplasma de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura em 1997. A árvore possui boa produção de frutos, com floração nos meses de agosto a setembro. As folhas não aladas com limbo ondulado e flores de coloração arroxeada. Seus frutos são de coloração laranja-avermelhada, com casca de fácil remoção quando maduros, formato achatado, com presença de várias sementes, superior a 15 por fruto. Destaca-se por ser um porta-enxerto de grande rusticidade e adaptação a diferentes condições de clima e solo, recomendado para diversas variedades-copa (OLIVEIRA et al., 1997).

Desta forma, a superioridade do limoeiro Cravo Santa Cruz refere-se aos fatores genéticos. Suas características vantajosas como porte reduzido, compatibilidade com diversas copas comerciais e boa adaptação em regiões com ocorrência de seca. Além disso, a planta apresenta profundidade efetiva do seu sistema radicular (DONATO et al., 2007; MAGALHÃES FILHO et al., 2008; POMPEU JUNIOR; BLUMER, 2005; SOARES FILHO et al., 2008).

### **Citrumelo “Swingle”**

O Citrumelo “Swingle” (*Citrus paradisi* Macfad. cv. Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) tem sua origem de um cruzamento entre o pomelo Duncan e um trifoliata. As plantas apresentam porte baixo, ou seja, com potencial ananicante. No Brasil, essa planta é bem recomendada com o objetivo de diversificação de porta-enxertos. Apresenta tolerância à tristeza, à exocorte, à xiloporose e ao declínio. O citrumelo Swingle é resistente à gomose de *Phytophthora*, ao nematoide dos citros e à morte súbita dos citros (BASSANEZI; GIMENES-FERNANDES; MASSARI, 2002).

As plantas produzem bem em solos arenosos ou argilosos, mas não toleram solos alcalinos e mal drenados. Além disso, é pouco resistente à seca e a geadas. Uma desvantagem é a suscetibilidade à mancha bacteriana dos citros que causa queima em milhares de mudas. Os frutos têm em média 20 sementes e possuem maturação mais tardia em relação à maturação do limão-cravo. Uma importante restrição para o uso do “Swingle” é sua

incompatibilidade com a “Pêra”, principal variedade copa de laranjeira no Brasil (POMPEU JUNIOR, 2005).

### **Tangerina “Sunki Tropical”**

“Sunki Tropical” (*Citrus sunki* (Hayata) hort. Ex Tanaka) está entre os principais porta-enxertos disponíveis para a enxertia. O porta-enxerto 'Sunki Tropical' destaca-se por apresentar boa tolerância à gomose de *Phytophthora*. A tangerina 'Sunki Tropical' foi identificada pela Embrapa Mandioca e Fruticultura através de seleções da tangerina 'Sunki'. Apresenta elevado número de sementes por fruto, em torno de 19. Inclusive é um porta-enxerto indicado para combinações com copas de laranjas, tangerinas e pomelos proporcionando alta produtividade (LIMA, 2013).

### **Citrandarin “Índio”**

O Citrandarin “Índio”, Tangerineira “Sunki” (*C. sunki* (Hayata) hort ex Tanaka) x Trifoliata (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) “English”, ou seja, é um híbrido oriundo da Estação Experimental de Índio, Califórnia, pertencente ao United States Department of Agriculture (USDA), introduzido na Embrapa Mandioca e Fruticultura por intermédio do Instituto de Pesquisa do Centro Sul – IPEACS. Apresenta elevada produção, copa ereta e porte médio. As folhas trifoliadas, típica do *Poncirus trifoliata*. Boa qualidade dos frutos, pequenos e achatados com peso médio de 60 g.

A maturação é meia-estação, com média de 22 sementes por fruto. Intolerante à seca, resistente à gomose de *Phytophthora* e ao Citrus Tristeza Vírus (CTV). Além disso, possui tolerância à tristeza, ao declínio dos citros, aos viroides de exocorte, adapta-se bem aos solos calcários e possui resistência ao frio (OLIVEIRA et al., 2012; RODRIGUES et al., 2014; SOARES FILHO, 2011).

### **Citrandarin “San Diego”**

O Citrandarin “San Diego”, é um porta-enxerto oriundo da Estação Experimental de Índio, Califórnia, pertencente ao United States Department of Agriculture (USDA), introduzido na Embrapa Mandioca e Fruticultura por intermédio do Instituto de Pesquisa do Centro Sul - IPEACS. É um híbrido do cruzamento entre a tangerineira “Sunki” (*Citrus sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.).



A planta apresenta porte médio, copa ereta com folhas trifoliadas, típica do *Poncirus trifoliata*. Além disso, os frutos são pequenos e achatados, com peso em média de 50 g, com 14 a 18 sementes. O Citrandarin “San Diego” apresenta maturação meia-estação. É planta tolerante à tristeza, ao declínio dos citros, ao viroide de exocorte, adapta-se bem aos solos calcários e são resistentes ao clima frio e à gomose de *Phytophthora* (OLIVEIRA et al., 2011, 2012; RAMOS et al., 2006; RODRIGUES et al., 2014; SOARES FILHO, 2011).

### **2.3 Propagação de citros por enxertia**

A propagação vegetativa, mediante enxertia, é um método antigo de propagação dos citros, que permitiu ao homem clonar plantas de interesse comercial, reduzir o período juvenil dos pomares e propiciar pomares mais homogêneos (SCHÄFER et al., 2001). A enxertia é uma associação entre duas cultivares geneticamente diferentes, com o objetivo de formar uma nova planta (POMPEU JÚNIOR, 2005).

Segundo Fachinello et al. (2005), a enxertia de borbulhia, ou de gema, consiste em justapor uma pequena porção da casca de uma planta (enxerto), contendo apenas uma gema, com ou sem lenho, em outra planta o porta-enxerto. Assim, a maneira de como é inserido a gema pode ser de várias formas e as mais comuns são em T normal e em T invertido. A enxertia em T normal é bastante usada na propagação de espécies frutíferas, principalmente em citros.

Para a produção de mudas de citros por enxertia é necessário que as mudas sejam produzidas a partir de material básico retirado de plantas-matrizes ou borbulheiras sadias obtidas e manejadas adequadamente. Segundo Fachinello et al. (2005), uma planta propagada por enxertia é composta, de duas partes: o enxerto e o porta-enxerto. O enxerto é a parte representada por um fragmento da planta, contendo uma ou mais gemas, responsável pela formação da parte aérea da nova planta enquanto que o porta-enxerto é a parte responsável pela formação do sistema radicular.

O porta-enxerto é obtido de semente enquanto a copa de enxertia. Muitas variedades cítricas poderiam reproduzir por propagação sexual, mas esse método de propagação não é muito viável economicamente, porque plantas originadas de pé fraco necessitam de muito mais tempo para entrar em produção econômica (SIMÃO, 1998).

As condições ambientais afetam fortemente o pegamento dos enxertos, inclusive as variações de temperaturas e a umidade relativa do ar muito baixa interferem no processo da enxertia. E, também as trocas gasosas devem ser mantidas durante a cicatrização, ou seja, evitar a completa asfixia na região da enxertia. Excessiva luminosidade pode ser prejudicial.

A realização da enxertia em áreas desprotegidas e sujeitas a ventos fortes pode levar ao insucesso.

#### **2.4 Compatibilidade copa e porta-enxerto**

A compatibilidade na enxertia é a harmonia entre duas plantas enxertadas formando uma combinação bem-sucedida possibilitando o desenvolvimento normal do novo indivíduo. As combinações entre as partes de plantas envolvidas estão relacionadas aos seguintes fatores: sanidade, idade da planta, época de realização da enxertia, técnica usada, condições ambientais, afinidade genética, fatores fisiológicos, fatores bioquímicos, consistência dos tecidos, afinidade anatômica, porte e vigor da planta (FACHINELLO et al., 2005; PEREIRA et al., 2014).

Bithell et al. (2013) afirmam que o uso efetivo do enxerto requer copas específicas para combinações selecionadas para suportar o tipo de solo, genética dos patógenos e fatores ambientais. A incompatibilidade pode ocorrer se a união do enxerto for fraca ou tiver uma incompatibilidade fisiológica associada ao mal reconhecimento celular.

De acordo com Benjamin, Tietel e Porat (2013), a seleção de porta-enxertos é essencial para a comercialização de citros. As combinações copa/porta-enxerto influenciam as características como produtividade, maturação, peso, coloração da casca, tolerância aos insetos, às doenças e fatores abióticos: frio, salinidade, toxicidade de Al e seca. Além disso, os porta-enxertos podem afetar os parâmetros de qualidade internos de citros, incluindo suco total de sólidos solúveis totais (SST) e os níveis de acidez, bem como vitamina C. Segundo Pompeu Júnior (2005), o porta-enxerto interfere na absorção de nutrientes, na transpiração da planta, na composição química das folhas, na abscisão dos frutos, na senescência das folhas enquanto a copa beneficia o porta-enxerto com o desenvolvimento do sistema radicular, resistência ao frio, à seca e aos fitopatógenos. Há suspeitas de que o porta-enxerto possa influenciar quantidade de DNA da copa.

Segundo Albacete et al. (2015), as raízes extensas e mais eficientes possuem mecanismos de absorção e transporte que são os principais meios dos porta-enxertos regular o crescimento das plantas e conseqüentemente aumentar a produtividade da cultura.

De acordo com Fachinello et al. (2005), a incompatibilidade na planta é observada quando as partes envolvidas na enxertia não são capazes de se ligarem, ou seja, ocorre falta de união. Então, as principais características que identificam a incompatibilidade são: quebras no

local da enxertia; diâmetros diferentes da copa e do porta-enxerto; amarelecimento das folhas e queda precoce; pouco crescimento e vigor e conseqüentemente morte prematura da planta.

Inclusive, a afinidade genética é um dos requisitos para comprovar a compatibilidade da enxertia na planta. Assim, aconselham-se que enxerto e porta-enxerto sejam pertencentes à mesma família. A afinidade fisiológica está relacionada às exigências nutricionais. A afinidade anatômica é indispensável para o pegamento do enxerto, por exemplo, plantas com tecido lenhoso são incompatíveis com plantas de tecido herbáceo. Pois se as células do tecido meristemático entre o xilema (lenho) e o floema (casca) se apresentarem com tamanho, forma e consistência distintas, não terão harmonia. O porta-enxerto sem vigor não se desenvolve em copa vigorosa. Se a parte suscetível ao vírus é o cavalo, a planta toda vem a morrer e quando a suscetibilidade é da copa, a planta declina lentamente (PEREIRA et al., 2014).

Alguns atributos da incompatibilidade entre enxerto e porta-enxerto são a presença de uma linha de depressão na casca acompanhada por uma anormal brotação do enxerto. Essa linha de goma tanto na casca quanto no lenho de coloração amarelada refere-se ao anelamento e as plantas que apresentam esse sintoma mostram deficiências nutricionais, lento crescimento, baixas produções e, conseqüentemente, a morte. Também, as diferenças fisiológicas e bioquímicas formadas na região da enxertia, diferenças no vigor e no início e término do ciclo vegetativo do enxerto e porta-enxerto. Outros autores reconhecem como causas da incompatibilidade a ocorrência de vírus transmissíveis nas borbulhias (PEREIRA, 2005).

## **2.5 Citometria de fluxo**

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada em vários laboratórios. Os estudos de células e organelas vegetais podem apresentar algumas restrições, assim a citometria de fluxo permite análises eficientes e rápidas do conteúdo de DNA e RNA, da expressão de transgenes e contagem de células, entre outras aplicações (LOUREIRO; SANTOS, 2002).

O melhoramento de plantas tem se beneficiado com as aplicações da citometria de fluxo na quantificação de DNA nuclear, análise de ploidia, avaliação de poliploides em experimentos de indução de duplicação cromossômica, detecção de mixoploidia e aneuploidias, análise de ciclo celular, detecção de híbridos interespecíficos e separação de cromossomos para a construção de sondas para mapeamento genômico. Além disso, há muitos trabalhos utilizando a avaliação de ploidia de plantas oriundas de experimentos de duplicação cromossômica por citometria de fluxo (DOLEZEL, 1997).

As análises abrangem as propriedades ópticas, dispersão de luz e fluorescência de partículas que fluem numa suspensão líquida. A medição do fluxo concede análises à alta velocidade e certifica-se que os citomas analisados são selecionados aleatoriamente de toda a população, sem qualquer subjetividade associada (DOLEZEL, 1997; SHAPIRO, 2004).

Desta forma, a citometria de fluxo é um método que mede a quantidade de DNA e infere sobre níveis de ploidia, possui as seguintes fases: separação dos núcleos intactos das plantas; coloração dos núcleos com fluorocromo, assim as células são identificadas e quantificadas em razão da fluorescência emitida pelo fluorocromo e transição em alta velocidade da suspensão de núcleos ou células diante de uma fonte de luz ultravioleta. Os sinais são produzidos pela transição dos núcleos pelo foco de luz resultante na conversão de pulsos que é eletronicamente processada. Estes sinais são distribuídos e se completam em uma área, na forma de picos. A fluorescência obtida no foco de luz é proporcional à quantidade de DNA nuclear e a posição do pico reflete o nível de ploidia (BENNET; LEICHT, 1995; DOLEZEL; DOLEZELOVA; NOVAK, 1994).

Comparações são feitas na determinação do nível de ploidia de uma planta, equiparando o conteúdo de DNA da planta com o conteúdo de DNA de outra planta da mesma espécie, cujo nível de ploidia é conhecido. Sendo que, para ambos, a estimativa do conteúdo de DNA é calculada pela comparação das intensidades de fluorescências dos núcleos em G1 da planta que se deseja saber o conteúdo de DNA, com a da planta padrão de referência, cujo conteúdo de DNA já foi calibrado (TIMBÓ, 2011).

A escolha do padrão de referência visa garantir que as estimativas obtidas sejam confiáveis. O que determina selecionar o padrão de referência vegetal é o conteúdo de DNA próximo, mas não sobreposto, aos picos 2C e 4C da planta analisada (JOHNSTON et al., 1999).

Dolezel, Sgorbati e Lucretti (1992) calibraram o tamanho do genoma de cultivares selecionadas com o intuito de serem utilizados como padrões vegetais. Desta forma, *Raphanus sativus* (2C = 1,11 pg), *Lycopersicon esculentum* (2C = 1,96 pg), *Glycine max* (2C = 2,50 pg), *Zea mays* (2C = 5,72 pg), *Pisum sativum* (2C = 9,09 pg), *Vicia faba* (2C = 26,90 pg), *Secale cereale* (2C = 16,19 pg) e *Allium cepa* (2C = 34,89 pg).

A estimativa do conteúdo em DNA nuclear foi a primeira (HELLER, 1973) e continua a ser a principal utilização da citometria de fluxo em plantas.

Dolezel e Bartos (2005) afirmam que é possível obter milhões de núcleos de DNA em suspensão a partir de poucas gramas de tecido foliar em um procedimento simples que envolve a maceração desse tecido em uma solução tampão que mantém a integridade nuclear.

A coloração da amostra com corantes específicos para o DNA (iodeto de propídeo) permite ao aparelho estimar a quantidade de DNA. Tais estimativas apresentam uma série de aplicações: desde a pesquisa básica até o melhoramento de plantas, entre elas, a estimação do tamanho do genoma, avaliação de ploidia, avaliação do ciclo celular, estudo de eliminação cromossômica, separação de células, cromossomas ou organelas.

A quantidade de DNA tem sido estudada em vários gêneros de importância econômica, como *Zea* (RAYBURN et al., 1989), *Pennisetum* (PASSOS; LABERT; GALBRAITH, 1994), *Oryza* (BUSO et al., 2000), *Brachiaria* (PINHEIRO et al., 2000). No entanto, não há trabalho sobre a quantidade de DNA entre enxertos e porta-enxertos e sua relação com compatibilidade.

## **2.6 Anatomia caulinar**

A afinidade anatômica na enxertia consiste na íntima associação dos tecidos cambiais formando uma conexão contínua. O tecido meristemático está em constante multiplicação e divisão celular, em total atividade formando novas células (DIAS, 2006; LORETI, 2008; OLIVEIRA; DAMIÃO FILHO; CARVALHO, 2002).

A morfologia, anatomia e a constituição dos tecidos se referem aos vasos condutores do enxerto e do porta-enxerto que se unem com diâmetros semelhantes. Já a afinidade fisiológica está relacionada à quantidade e composição da seiva (PEIL, 2003). O diâmetro de caule é resultado do crescimento do meristema secundário, formado notadamente por vasos condutores (TAIZ; ZEIGER, 2013).

O xilema secundário constitui a madeira ou lenho. O xilema e o floema formam o sistema vascular, e estes tecidos são contínuos através de todos os órgãos das plantas. Assim, os xilemas primários e secundários são tecidos complexos formados por elementos condutores, células parenquimáticas e fibras, e outros tipos celulares. O xilema secundário é constituído de: traqueídes e elementos de vaso com função de condução de água; fibras libriformes e fibrotraqueídes com função de sustentação e armazenamento; parênquima axial com função de translocação de água e solutos à curta distância e de parênquima radial, os raios, com função de armazenamento, translocação de água e solutos a curta distância (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; GUERREIRO, 2006).

O parênquima é o tipo de tecido constituído de células vivas mais encontrado nos tecidos vegetais e está presente no córtex de raízes e de caules acompanhando os tecidos vasculares (xilema e floema). O tecido é potencialmente meristemático e se divide formando células diferenciadas, contribuindo no processo de cicatrização ou regeneração de lesões,

como, por exemplo, na união de enxertos em plantas (SCATENA; SCREMI-DIAS, 2003). Desta forma, o sistema vascular das plantas é constituído pelo xilema, o tecido condutor de água e íons minerais e também pelo floema, o tecido condutor de fotoassimilados. O xilema possui parede secundária espessada e rígida. É um tecido complexo. O elemento traqueal tem a função de condução junto com a de sustentação. Outros componentes são as fibras e as células parenquimáticas. O procâmbio origina o xilema primário e o câmbio vascular o xilema secundário. As células xilemáticas apresentam elementos traqueais (traqueídes e elementos de vaso) células de parênquima e esclerênquima (fibras xilemáticas).

A composição das paredes celulares parenquimáticas é: celulose, hemicelulose e substâncias pécnicas. As células parenquimáticas possuem várias funções como a realização de fotossíntese, respiração e trocas gasosas, secreção e excreção, cicatrização ou regeneração de lesões e ferimentos dentre outras. O parênquima xilemático, ou seja, o parênquima lenhoso, componente do xilema tem a função de formar raios de parênquima vivos. Assim, usado na identificação da madeira e também, apresenta modificações em sua espessura e número de células em cada feixe. Sua importância está na translocação de substâncias ao longo dos raios (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009).

Segundo Hartmann et al. (2002), os calos são originados dos tecidos meristemáticos das regiões cambiais em união, formando uma conexão. A partir do calo recém-formado, novas células cambiais são formadas, conectando os sistemas vasculares. Além disso, o xilema é o primeiro tecido a ser modificado, seguindo do floema para a reconstituição do sistema vascular. O sistema cambial formado pelas pontes de calos inicia as atividades típicas de formação dos tecidos vasculares secundários. Para plantas da mesma espécie e do mesmo gênero, a enxertia é bem sucedida em alguns casos, mas mal sucedida em outros. A utilização de enxertia intergenérica e interespecífica pode ser realizada em *Prunus*, *Citrus* e *Coffea* (DIAS, 2006; LORETI, 2008; OLIVEIRA; DAMIÃO FILHO; CARVALHO, 2002) e podem ser utilizadas comercialmente.

Segundo Burger e Richter (1991), para estudos anatômicos adotam-se os seguintes planos convencionais de corte: transversal perpendicular ao eixo axial da árvore; longitudinal radial na direção axial, paralelo ao eixo maior do tronco e paralelo à direção dos raios lenhosos, e ainda perpendicular aos anéis de crescimento; longitudinal tangencial na direção axial, paralelo ao eixo maior do tronco e em ângulo reto ou perpendicular aos raios lenhosos e ainda tangencial aos anéis de crescimento.

As características anatômicas da madeira das angiospermas mostram um conjunto heterogêneo de diferentes tipos de células com propriedades específicas para realizar as

funções de condução de líquidos, armazenamento, transporte de nutrientes e água e sustentação e proteção do vegetal (BURGER; RICHTER, 1991).

Segundo Core, Côté e Day (1979), o lenho inicial corresponde ao crescimento da árvore no início do período vegetativo. De acordo com Nisgoski (1999) os vasos são estruturas que ocorrem em todas as espécies folhosas. Assim, vaso é definido como um conjunto axial de células sobrepostas (elementos vasculares) formando uma estrutura tubiforme contínua, de comprimento indeterminado, que tem por função a condução ascendente de líquidos na árvore. Segundo a IAWA Committee (1989), quanto ao agrupamento, os vasos podem ser solitários e múltiplos, radiais ou tangenciais, e em cachos, grupos. Desta forma, os poros múltiplos de dois são reconhecidos como geminados.

O arranjo do parênquima axial, segundo Burger e Richter (1991) e Nisgoski (1999), é observado em seção transversal, em que se distinguem dois tipos básicos de distribuição: parênquima paratraqueal, associado aos vasos e parênquima apotraqueal, não associado aos vasos. Tem sua função no armazenamento de materiais de reserva, como gorduras e amido. Também são encontrados taninos, cristais, sílica e outras substâncias.

O parênquima radial, raios ou parênquima transversal, de acordo com Burger e Richter (1991), Lewin e Goldstein (1991) e Nisgoski (1999), é um agrupamento de células que tem seu eixo longitudinal orientado perpendicularmente ao eixo da árvore e faixas horizontais de comprimento indeterminado, formadas por células parenquimáticas, isto é, elementos que desempenham a função de armazenamento de substâncias nutritivas, dispostas radialmente no tronco.

Fahn (1982) e Nisgoski (1999) afirmam que a largura e altura dos raios podem ser medidas em seções tangenciais. Há variação das dimensões dos raios em diferentes plantas ou algumas vezes na mesma planta. Quando o raio possui uma célula de largura é conhecido como unisseriado, duas células, bisseriado, e com mais células é denominado multisseriado.

As fibras são células alongadas com parede secundária geralmente lignificada. Burger e Richter (1991) definem as fibras como tecido de sustentação. Constituem geralmente a maior parte do lenho das árvores folhosas. São classificadas em fibrotraqueoides e libriformes.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material vegetal

Os experimentos foram realizados na Universidade Federal de Lavras - UFLA, localizada no Sul do Estado de Minas Gerais, a uma latitude 21° 15' 43 Sul e a uma longitude 45° 59' 59 Oeste, estando a uma altitude de 918,87 metros. O clima de Lavras, segundo a classificação climática de Köppen, é Cwa, temperado chuvoso (mesotérmico) com inverno seco e verão chuvoso. As plantas cítricas permaneceram sob condições de casa de vegetação do pomar do setor de Fruticultura, do Departamento de Agricultura - DAG.

As mudas enxertadas foram cedidas da coleção da Epamig Sul de Minas, Lavras - MG. As borbulhias provenientes da Embrapa Clima Temperado, situada em Pelotas, RS e os porta-enxertos foram obtidos pela germinação de sementes procedentes do banco de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura, situada em Cruz das Almas, BA. As mudas foram enxertadas em agosto de 2014 e colocadas em sacos de polietileno preto com substrato comercial, Tropstrato®, com frequentes adubações foliares e irrigações em casa de vegetação (FIGURA 1).

Figura 1 - Mudas cítricas enxertadas. Setor de Fruticultura UFLA, Lavras - MG.



Fonte: Do autor (2015).

Foram realizados experimentos das combinações de enxerto e porta-enxerto, com cultivares de laranjeiras e de tangerineiras como variedades copa e diversas variedades de porta-enxertos cítricos. As cultivares de laranja “Lane Late”, “Navelate”, “Navelina” e as tangerinas “Clemenules” e Satsuma “Okitsu” e o híbrido “Ortanique” foram enxertadas em



cinco porta-enxertos de variedades cítricas diferentes: Limoeiro “Cravo Sta. Cruz”, Tangerineira “Sunki Tropical”, Citrandarin “Índio”, Citrandarin “San Diego” e Citrumelo “Swingle”. As combinações cítricas foram avaliadas de acordo com cada experimento, sendo oito combinações copa x porta-enxerto para o experimento de anatomia caulinar e 30 combinações copa x porta-enxerto para o de citometria de fluxo.

### 3.2 Análises de citometria de fluxo

O preparo das amostras e as análises por citometria de fluxo foram conduzidas no Laboratório de Cultura de Tecidos, no Departamento de Agricultura - DAG, da Universidade Federal de Lavras – UFLA, em setembro de 2015, um ano após a enxertia. O material vegetal utilizado nas análises de citometria de fluxo encontra-se descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Material vegetal utilizado nos experimentos de Citometria de Fluxo.

| <b>LARANJEIRAS<br/>COPAS</b> | <b>TANGERINEIRAS<br/>COPAS</b> | <b>VARIEDADES PORTA-<br/>ENXERTOS</b> |
|------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| ‘Navelina’                   | ‘Ortanique’                    | Limoeiro ‘Cravo Sta. Cruz’            |
| ‘Navelate’                   | ‘Okitsu’                       | Limoeiro ‘Cravo Sta. Cruz’            |
| ‘Lane Late’                  | ‘Clemenules’                   | Limoeiro ‘Cravo Sta. Cruz’            |
| ‘Navelina’                   | ‘Ortanique’                    | Tangerineira ‘ Sunki Tropical’        |
| ‘Navelate’                   | ‘Okitsu’                       | Tangerineira ‘ Sunki Tropical’        |
| ‘Lane Late’                  | ‘Clemenules’                   | Tangerineira ‘ Sunki Tropical’        |
| ‘Navelina’                   | ‘Ortanique’                    | Citrandarin ‘Índio’                   |
| ‘Navelate’                   | ‘Okitsu’                       | Citrandarin ‘Índio’                   |
| ‘Lane Late’                  | ‘Clemenules’                   | Citrandarin ‘Índio’                   |
| ‘Navelina’                   | ‘Ortanique’                    | Citrandarin ‘San Diego’               |
| ‘Navelate’                   | ‘Okitsu’                       | Citrandarin ‘San Diego’               |
| ‘Lane late’                  | ‘Clemenules’                   | Citrandarin ‘San Diego’               |
| ‘Navelina’                   | ‘Ortanique’                    | Citrumelo ‘Swingle’                   |
| ‘Navelate’                   | ‘Okitsu’                       | Citrumelo ‘Swingle’                   |
| ‘Lane Late’                  | ‘Clemenules’                   | Citrumelo ‘Swingle’                   |

Fonte: Do autor (2017).

No experimento das laranjeiras, as três cultivares copas “Navelina”, “Lane Late” e “Navelate” foram enxertadas nos cinco porta-enxertos limoeiro “Cravo Santa Cruz”, “Citrumelo Swingle”, Tangerineira “Sunki Tropical”, Citrandarin “Índio”, Citrandarin “San Diego”. No experimento das tangerineiras, as três cultivares copas “Ortanique”, “Okitsu” e

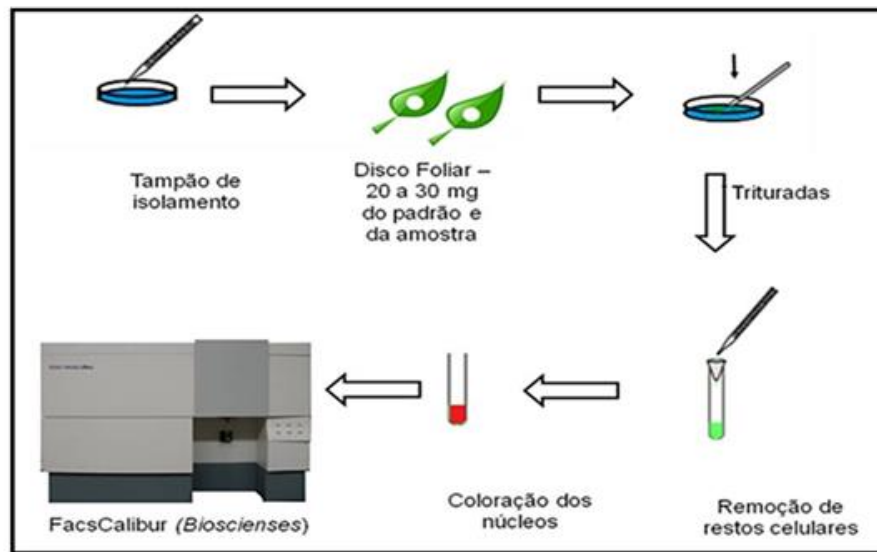
“Clemenules” foram enxertadas nos mesmos cinco porta-enxertos anteriores. O delineamento experimental utilizado nas análises estatísticas de citometria de fluxo foi o Delineamento Inteiramente Casualizado, DIC, em esquema fatorial com 3 x 5, sendo o primeiro fator as três cultivares copa e o segundo fator os cinco porta-enxertos, com três repetições de folhas e três repetições de raízes.

Para a determinação do conteúdo de DNA, foram coletadas folhas jovens e pontas de raízes em crescimento ativo de cada combinação de enxertos e porta-enxertos avaliados. As amostras foram preparadas com o material ainda fresco. Para cada combinação de copas de laranjas e de tangerinas enxertadas foram coletadas três folhas e também coletadas três pontas de raízes em crescimento ativo em três plantas cítricas.

Aproximadamente 20-30 mg de material coletado foram triturados em placa de Petri contendo 1 mL de tampão Marie gelado para a liberação dos núcleos. A suspensão de núcleos foi aspirada através de duas camadas de gaze, com auxílio de uma pipeta plástica e filtrada através de uma malha de 50 µm. Os núcleos foram corados pela adição de 25 µL de iodeto de propídeo. Para cada amostra, 10 mil núcleos foram analisados utilizando-se uma escala logarítmica. A análise foi realizada no citômetro Facscalibur (Becton Dickinson), os histogramas obtidos com o *software* Cell Quest e analisados estatisticamente no *software* WinMDI 2.8 (FIGURA 2). O conteúdo de DNA nuclear (pg) das plantas foi estimado utilizando-se a razão entre as intensidades de fluorescência dos núcleos G1 (núcleos que estão na fase G1 da Interfase) do padrão de referência (*Pisum sativum*) e dos núcleos G1 da amostra, multiplicando-se esta razão pela quantidade de DNA do padrão de referência (9,09 pg).

$$\text{Amostra, 2C} = \frac{\text{Canal do pico G1 da amostra}}{\text{DNA}} \times \frac{\text{Conteúdo 2C de DNA}}{\text{Canal do pico G1 de } \textit{Pisum sativum} \text{ do padrão (9,09 pg)}}$$

Figura 2 - Diagrama da metodologia utilizada para analisar o conteúdo de DNA nuclear por citometria de fluxo.



Fonte: Slide da professora Leila, UFLA (2015).

Os dados obtidos foram avaliados pela análise de variância à significância de 5% de probabilidade, pelo teste F, utilizando-se o programa computacional SISVAR (Sistema para Análise de Variância) desenvolvido por Ferreira (2011). Quando diferenças significativas foram detectadas, as médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

### 3.3 Análises anatômicas da madeira

Neste experimento, duas cultivares enxerto (laranjeira “Navelina” e tangerineira “Clemenules”) foram enxertadas em quatro porta-enxertos (limoeiro “Cravo Santa Cruz”, Tangerineira “Sunki Tropical”, Citrandarin “Índio”, Citrandarin “San Diego”) em casa de vegetação, assim como no experimento anterior. As condições experimentais foram as mesmas utilizadas no experimento de citometria de fluxo.

As análises anatômicas e histológicas das plantas foram realizadas no Laboratório de Anatomia da Madeira, Departamento de Ciências Florestais da Universidade Federal de Lavras (UFLA) em janeiro de 2016.

Os materiais selecionados para a realização dos cortes anatômicos encontram-se especificados na Tabela 2.

Tabela 2 - Material vegetal utilizado nos Cortes Anatômicos da Madeira.

| <b>COPA</b>  | <b>PORTA-ENXERTO</b>   |
|--|--|
| Tangerineira 'Clemenules'<br>Laranjeira 'Navelina' | Citrandarin 'San Diego'<br>Citrandarin 'San Diego'             |
| Tangerineira 'Clemenules'<br>Laranjeira 'Navelina' | Limoeiro 'Cravo Sta. Cruz'<br>Limoeiro 'Cravo Sta. Cruz'       |
| Tangerineira 'Clemenules'<br>Laranjeira 'Navelina' | Citrandarin 'Índio'<br>Citrandarin 'Índio'                     |
| Tangerineira 'Clemenules'<br>Laranjeira 'Navelina' | Tangerineira 'Sunki Tropical'<br>Tangerineira 'Sunki Tropical' |

Fonte: Do autor (2017).

Aos 16 meses após a enxertia, o lenho das mudas cítricas foi cortado em três posições do caule: no enxerto, no ponto de enxertia e no porta-enxerto, conforme mostra a Figura 3. Os cortes transversais foram feitos nas três regiões mencionadas anteriormente e cortes longitudinais somente na região da enxertia para observar as melhores características relacionadas à junção dos tecidos das duas plantas.

Figura 3 - Os cortes anatômicos em mudas cítricas: na copa, no ponto de enxertia e no porta-enxerto.



Fonte: Do autor (2015).

Os corpos-de-prova cortados dos caules das mudas cítricas apresentavam-se em estado verde. O material foi emblocado em resina sintética (Entellan<sup>®</sup>) segundo a microtécnica vegetal comumente usada. Após formação dos blocos, o material foi seccionado transversalmente e longitudinalmente em micrótomo rotativo para obtenção de secções de espessuras finas em torno de 10-20  $\mu\text{m}$ . Após seccionamento, o material foi submetido à imersão na seguinte ordem: hipoclorito de sódio; álcool etílico a 20%; safranina; álcool etílico a 50%; álcool etílico a 70%; álcool etílico a 80%; álcool etílico a 100%; álcool acetato 3:1; álcool acetato 1:1; álcool acetato 1:3; acetato 100%.

As secções foram montadas em lâminas de vidro, as lâminas permanentes, para serem observadas em microscópio binocular Olympus<sup>®</sup> CX 31 com câmera acoplada Olympus U-CMAD3. A captura das imagens foi realizada utilizando-se o *software* Bel View. As mensurações foram realizadas no *software* WinCell.

### **3.4 Parâmetros mensurados na caracterização anatômica da madeira**

As mensurações de raios e vasos foram feitas no Laboratório de Anatomia da Madeira, Departamento de Ciências Florestais, da Universidade Federal de Lavras - UFLA.

Nas secções transversais do lenho, em raio contíguo ininterrupto, no sentido da medula para casca, foram mensurados o diâmetro dos vasos do enxerto e do porta-enxerto e altura dos raios nas secções longitudinais de cada tratamento.

As mensurações e a caracterização das fotomicrografias dos materiais lenhosos foram realizadas de acordo com o IAWA Committee (1989). A partir dos valores anatômicos obtidos, calculou-se o diâmetro dos vasos somando os diâmetros radial e tangencial e logo após, dividindo o valor por 2, obtendo assim a média do diâmetro de vasos das copas e porta-enxertos dos tratamentos.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 4, sendo o primeiro fator as duas cultivares do enxerto e o segundo fator os quatro porta-enxertos. De acordo com cada parâmetro foram realizadas n=40 contagens ou repetições para os diâmetros dos vasos e n=30 repetições para as alturas de raios em número de células.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (Teste F,  $P<0,05$ ) utilizando-se o *software* SISVAR (FERREIRA, 2011). Na ocorrência de significâncias, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $P<0,05$ ).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análises de Citometria de Fluxo: copas apirênicas de laranjeiras

As análises de citometria de fluxo foram realizadas para exame do conteúdo de DNA nuclear e, no experimento, observou-se que o conteúdo de DNA das folhas das variedades copas de laranjeiras foi significativo. Enquanto que, o conteúdo de DNA das raízes em crescimento das laranjeiras não foi significativo (TABELA 3).

O índice de DNA (ID) das folhas das laranjeiras variou conforme o porta-enxerto que foi utilizado, conforme observado na Tabela 3. Sendo que as maiores estimativas de conteúdo de DNA ocorreram nas seguintes combinações de porta-enxerto/copa: San Diego/Lanelate, C. Swingle/Navelate e C. Swingle/Lanelate. Já os menores conteúdos de DNA ocorreram nas variedades copas Lane late e Navelina sobre o porta-enxerto Sunki Tropical. As demais combinações nos porta-enxertos C. Índio, San Diego e Cravo Santa Cruz apresentaram índices de DNA intermediários. Na Tabela 3, observa-se que o porta-enxerto Citrumelo Swingle se destacou em relação aos outros, obtendo os melhores valores de conteúdo de DNA, nas folhas com 4,61 pg e 4,67 pg, e as copas de laranjas enxertadas foram as cultivares Navelate e Lane late respectivamente.

Desta forma, esses resultados podem sugerir que o porta-enxerto influenciou na quantidade de DNA da cultivar copa, conforme observado, por exemplo, na cultivar Lane late que sobre porta-enxerto Sunki Tropical e C. Índio apresentaram menor conteúdo de DNA. Já sobre San Diego e Citrandarin Swingle, há um incremento na quantidade de DNA e sobre Cravo Santa Cruz, a quantidade de DNA é intermediária. As cultivares se comportam de maneira distinta, mantendo apenas um padrão, a Navelina sobre porta-enxerto Sunki Tropical, a quantidade de DNA é menor enquanto que a Navelate apresenta menor valor sobre o Cravo Santa Cruz.

A cultivar de laranja Navelina em combinação com os portas-enxerto Citrandarin Swingle, San Diego e Citrandarin Índio apresentou menores valores de coeficiente de variação. Isso significa que os dados coletados para essa cultivar possuem maior índice de confiabilidade.

O coeficiente de variação, CV, geralmente varia em células vegetais, entre 1 e 10% (DOLEZEL, 1991; ZOLDOS et al., 1998). Marie e Brown (1993) afirmam que o coeficiente de variação é um critério essencial na validação de métodos citológicos e estabelecem uma gama de valores entre 1 e 2% para análises citométricas de alta qualidade e 3% como um

valor de maior uso. Já Galbraith et al. (2002), determinaram um valor do coeficiente de variação menor do que 5% como critério de aceitação.

Os coeficientes de variação (CV) encontrados para os picos G1 das folhas de laranjeiras variaram de 0,70 a 1,64% (TABELA 3), caracterizando um excelente resultado. Galbraith et al. (2002) afirmam que coeficientes de variação de até 5% são aceitáveis. Houve diferença entre os CVs das combinações das cultivares copas de laranjeiras enxertadas em cinco porta-enxertos diferentes, no entanto, todos foram muito inferiores ao máximo aceitável.

Tabela 3 - Índices de DNA (ID) em pictogramas e coeficiente de variação (CV) em folhas e raízes de laranjeiras enxertadas em diferentes porta-enxertos, submetidas à análise de citometria de fluxo.

| Tratamentos | Porta-Enxerto/Copa                | CV folhas | ID Folhas (pg) | CV raízes (pico 1) | ID raízes (pico 1) (pg) | CV raízes (pico 2) | ID raízes (pico2) (pg) |
|-------------|-----------------------------------|-----------|----------------|--------------------|-------------------------|--------------------|------------------------|
| <b>T1</b>   | <b>Cravo Sta. Cruz/ Navelina</b>  | 1.12 a*   | 4.43 a*        | 1.71 a*            | 4.01 a*                 | 0.81 b*            | 7.48 a*                |
| <b>T2</b>   | <b>Cravo Sta. Cruz/ Navelate</b>  | 0.99 a    | 3.96 b         | 1.43 a             | 4.07 a                  | 0.73 b             | 7.49 a                 |
| <b>T3</b>   | <b>Cravo Sta. Cruz/ Lane late</b> | 1.24 a    | 4.28 a         | 1.15 a             | 3.97 a                  | 0.65 b             | 7.27 a                 |
| <b>T4</b>   | <b>Sunki Tropical/Navelina</b>    | 0.90 a    | 3.92 a         | 2.11 a             | 3.73 a                  | 0.78 b             | 6.76 a                 |
| <b>T5</b>   | <b>Sunki Tropical/Navelate</b>    | 0.95 a    | 4.02 a         | 2.21 a             | 3.89 a                  | 0.86 b             | 7.01 a                 |
| <b>T6</b>   | <b>Sunki Tropical/ Lane late</b>  | 0.70 a    | 3.73 a         | 1.51 a             | 5.09 a                  | 0.82 b             | 9.50 a                 |
| <b>T7</b>   | <b>C. Índio/ Navelina</b>         | 0.94 b    | 4.37 a         | 1.23 a             | 3.11 a                  | 0.65 b             | 6.79 a                 |
| <b>T8</b>   | <b>C. Índio/ Navelate</b>         | 1.31 a    | 4.34 a         | 1.77 a             | 3.52 a                  | 0.67 b             | 6.67 a                 |
| <b>T9</b>   | <b>C. Índio/ Lane late</b>        | 1.34 a    | 4.15 a         | 2.48 a             | 3.72 a                  | 1.26 a             | 6.74 a                 |
| <b>T10</b>  | <b>San Diego/ Navelina</b>        | 0.97 b    | 4.36 b         | 0.65 a             | 3.25 a                  | 0.42 b             | 5.93 a                 |
| <b>T11</b>  | <b>San Diego/ Navelate</b>        | 1.17 b    | 4.25 b         | 1.94 a             | 3.88 a                  | 0.96 a             | 7.23 a                 |
| <b>T12</b>  | <b>San Diego/ Lane late</b>       | 1.64 a    | 4.63 a         | 2.13 a             | 3.99 a                  | 1.07 a             | 7.14 a                 |
| <b>T13</b>  | <b>C. Swingle/ Navelina</b>       | 1.01 a    | 4.18 b         | 2.16 a             | 4.05 a                  | 0.81 b             | 7.15 a                 |
| <b>T14</b>  | <b>C. Swingle/ Navelate</b>       | 1.34 a    | 4.61 a         | 2.78 a             | 3.83 a                  | 0.98 a             | 6.91 a                 |
| <b>T15</b>  | <b>C. Swingle/ Lane late</b>      | 1.26 a    | 4.67 a         | 3.65 a             | 4.12 a                  | 1.20 a             | 7.28 a                 |

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Skott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2017).



Na Figura 4, é possível observar os histogramas de citometria de fluxo obtidos dos diferentes tratamentos. O primeiro pico diz respeito à amostra foliar das cultivares copa, e o segundo pico é sempre do padrão de referência interno *Raphanus sativus*. Quanto mais à direita o primeiro pico está do segundo, maior a quantidade de DNA, conforme pode ser observado na combinação: San Diego/Lane late; C. Swingle/Navelate e C. Swingle/Lane late.

Como foram analisados simultaneamente dois materiais vegetais, os histogramas geraram dois picos. O primeiro G1 referente à análise das amostras cítricas, enquanto o segundo é o do padrão de referência interno, *Raphanus sativus*. Segundo Dolezel (1997), para estimar o nível de ploidia, a posição do pico G1 de um histograma é comparado com o pico de uma planta padrão com uma ploidia conhecida. Os picos menores formados são referentes à fase G2 da interfase e mitose e não são necessários para as análises, portanto, são desconsiderados.

As análises de histogramas associados aos baixos valores de coeficientes de variação, indicam que os núcleos foram isolados adequadamente pelo processo de citometria de fluxo.

Figura 4 - Histogramas de Citometria de Fluxo de diferentes variedades copa de laranjeiras enxertadas sobre porta-enxertos cítricos, analisados com padrão interno rabanete *Raphanus sativus*. (continua)

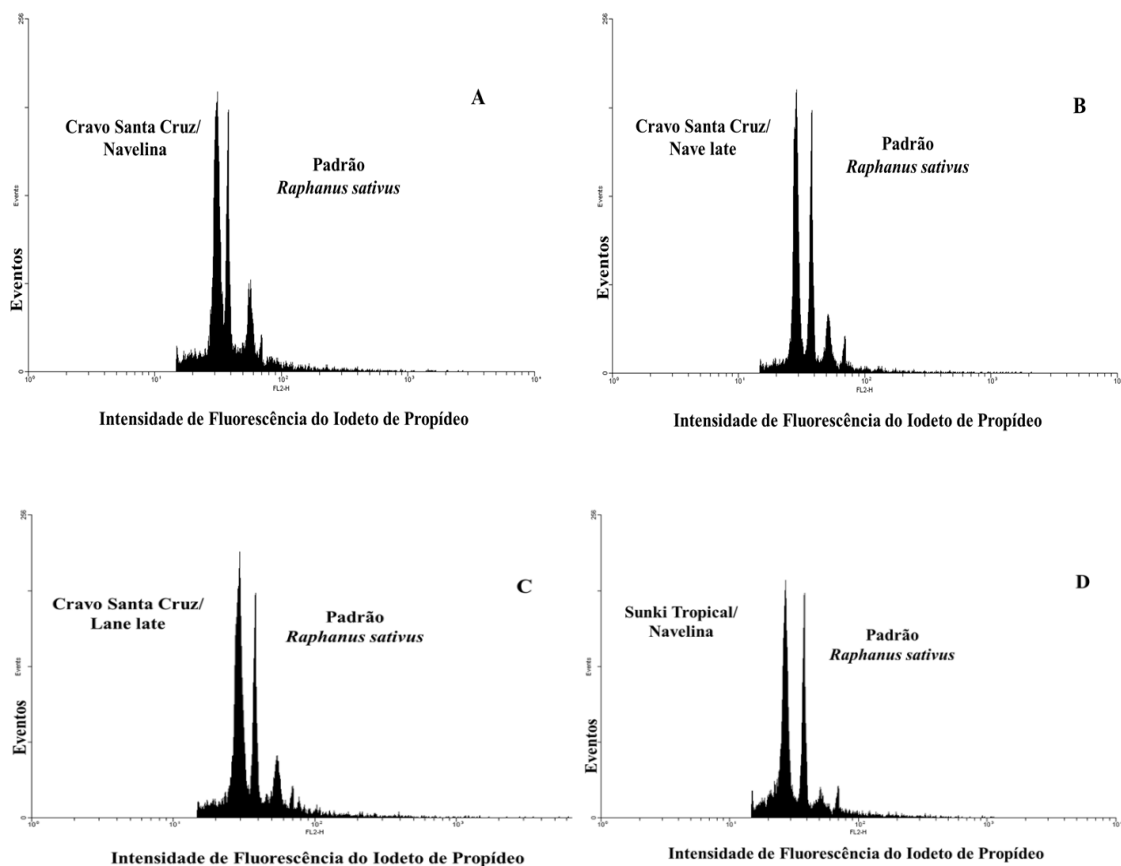


Figura 4 - Histogramas de Citometria de Fluxo de diferentes variedades copa de laranjeiras enxertadas sobre porta-enxertos cítricos, analisados com padrão interno rabanete (*Raphanus sativus*). (continuação)

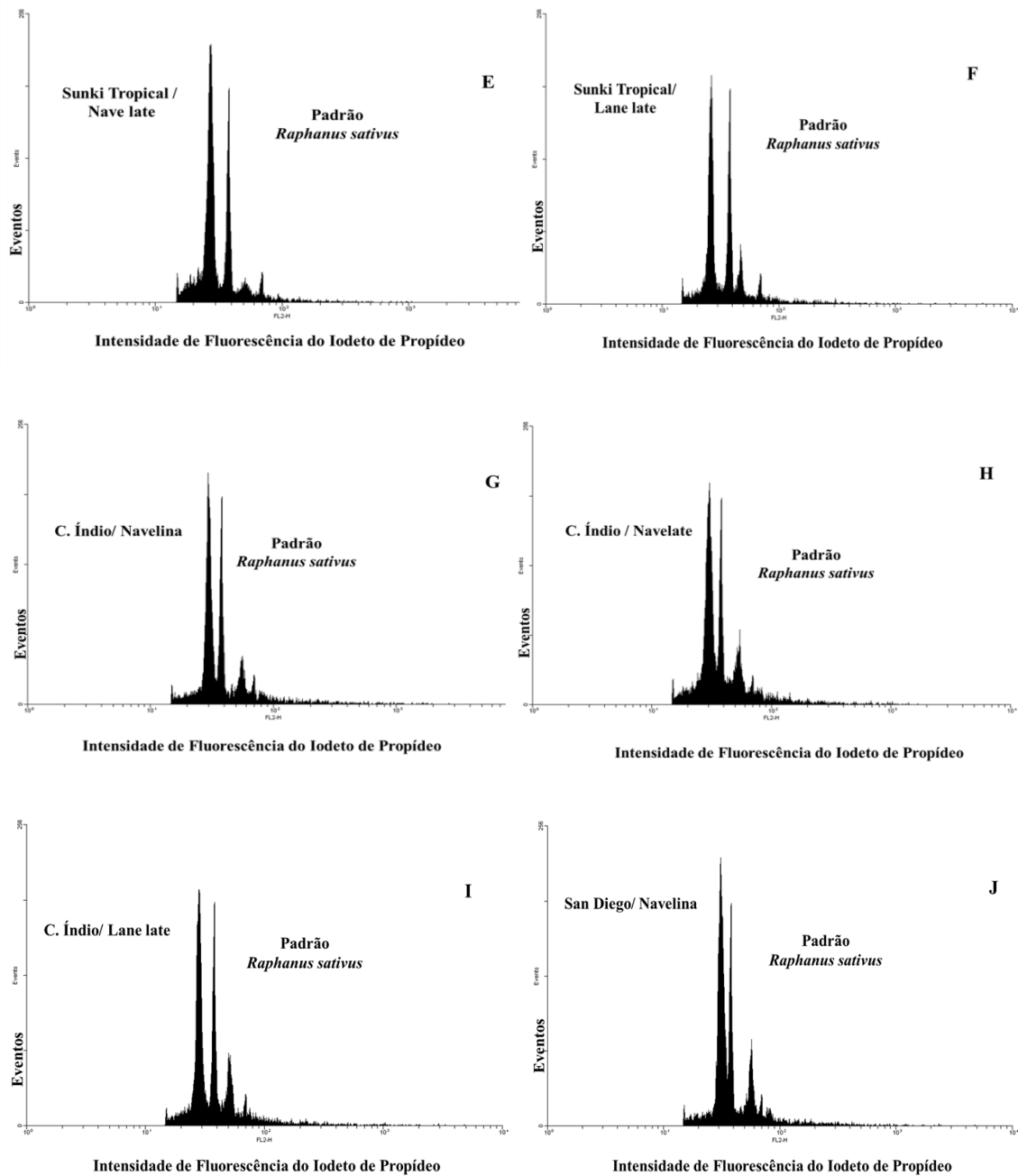
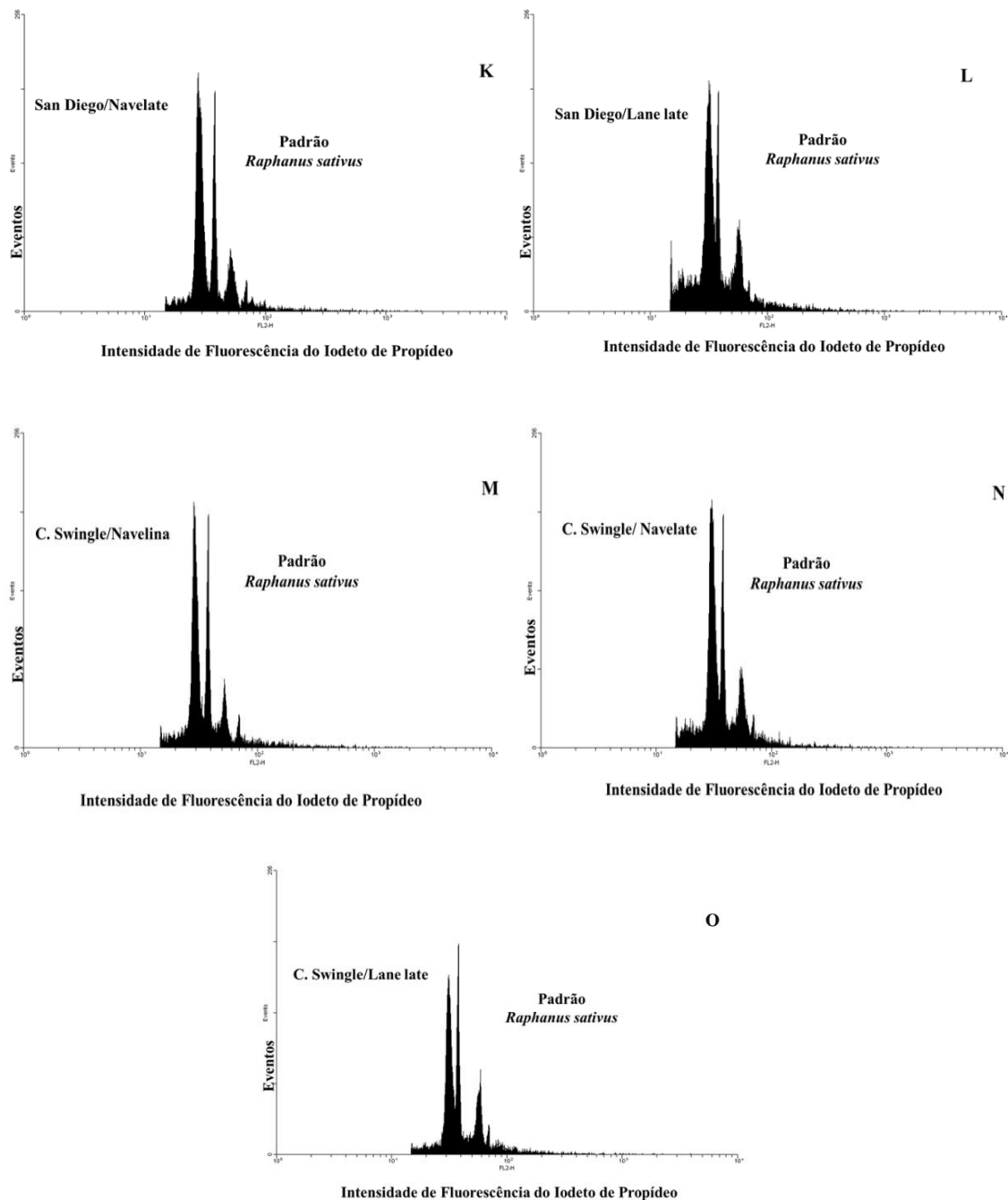


Figura 4 - Histogramas de Citometria de Fluxo de diferentes variedades copa de laranjeiras enxertadas sobre porta-enxertos cítricos, analisados com padrão interno rabanete (*Raphanus sativus*). (conclusão)



**Legenda:** O pico à esquerda de cada histograma corresponde ao G1 das amostras de folhas cítricas e o pico à direita corresponde ao padrão de referência *Raphanus sativus*. Cada figura representa uma combinação de porta-enxerto/copa de cultivares de Laranja. **A)** Cravo Santa cruz/Navelina; **B)** Cravo Santa cruz/Nave late; **C)** Cravo Santa Cruz/ Lane late; **D)** Sunki Tropical/ Navelina; **E)** Sunki Tropical /Nave late; **F)** Sunki Tropical/Lane late; **G)** C. Índio/Navelina; **H)** C. Índio/Navelate; **I)** C. Índio/Lane late; **J)** San Diego/Navelina; **K)** San Diego/Navelate; **L)** San Diego/Lane late; **M)** C. Swingle/Navelina; **N)** C. Swingle/Navelate; **O)** C. Swingle/Lane late.

Fonte: Do autor (2015).

Já nas raízes, os resultados foram diferentes. Para todos os porta-enxertos analisados, foram observados dois índices de DNA diferentes, conforme Figura 5. Provavelmente com duas ploidias distintas, sendo o primeiro pico 2C e o segundo 4C. Esse fenômeno é conhecido como endorreduplicação.

Na endorreduplicação ou polissomatia, a fase G1 apresenta conteúdo de DNA nuclear 2C; na fase S, ocorre a replicação do DNA e a fase G2 apresenta conteúdo de DNA 4C. A constante C indica o conteúdo de DNA para a condição haploide. As células que apresentam endorreduplicação replicam o DNA sem que haja a divisão celular. Ao invés da mitose convencional, estas células apresentam endociclos, os quais possuem as fases G1, S e G2, mas não apresentam mitose (CASTRO, 2013; EDGAR; ORR-WEAVER, 2001).

Sliwinska e Lukaszewska (2005) afirmam que a polissomatia refere-se à ocorrência de diferentes níveis de ploidia em um mesmo órgão ou tecido e estima-se que ocorra em mais de 90% das angiospermas. Assim, a presença de células somáticas com ploidias diferentes no mesmo órgão é resultado do processo de endorreduplicação, ou seja, transição dos núcleos por ciclos repetidos de replicação do DNA sem que ocorra a divisão celular (CHEVALIER et al., 2011).

O conteúdo de DNA das raízes das variedades de laranjeiras não teve variação significativa tanto no pico 1 como no pico 2 (TABELA 3). Os valores ID das raízes no pico 1 foram de 3,11 pg a 5,09 pg e no pico 2 os valores foram de 5,93 pg a 9,50 pg. Em todos os tratamentos das combinações copas de laranjas enxertadas nos cinco diferentes porta-enxertos não houve variação no conteúdo de DNA das raízes. Foi observado em todos os histogramas (FIGURA 5) que a porcentagem de DNA se manteve constante com o pico 1 com núcleos 2C, ao meio o pico com o padrão de referência e o pico 2 com núcleos 4C.

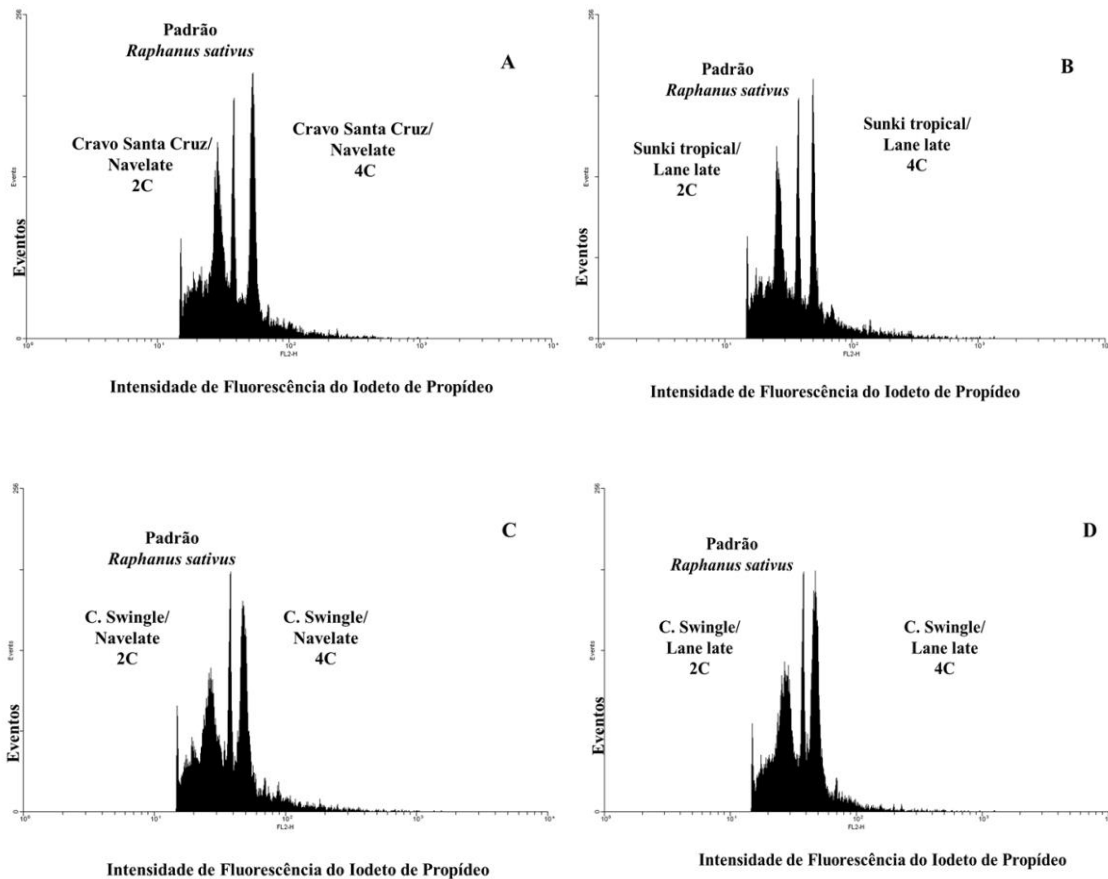
A endorreduplicação nos vegetais contribui para a adaptação a fatores ambientais variados, aumento no conteúdo de DNA nuclear, proteção contra irradiação UV (YAMASAKI et al., 2010), ou prevenção a segregação cromossômica desigual durante a mitose, adaptação da planta à alta concentração de sais (CECCARELLI et al., 2006), ao déficit hídrico (COOKSON; RADZIEJWOSKI; GRANIER, 2006) e às baixas temperaturas (BAROW, 2006).

No histograma da Figura 5, foram observados dois picos da amostra e um pico do padrão de referência. Este resultado comprova que raízes das combinações de copa/porta-enxertos de laranjas apresentam dois níveis de ploidia distintos, acontecendo nestes tecidos o fenômeno da endorreduplicação, o que foi observado em todos os tratamentos. A quantidade de DNA nuclear de uma determinada espécie só pode ser obtida por citometria de fluxo, por

meio de uma comparação com núcleos pertencentes a um padrão de referência, cujo conteúdo de DNA é previamente conhecido. A *Raphanus sativus* foi utilizada como padrão de referência, porque não sobrepôs seu pico nos demais picos fornecidos pela amostra (MENEZES et al., 2012).

No presente trabalho, os porta-enxertos parecem não sofrer influência das copas em relação ao índice de DNA, visto que não houve diferenças significativas entre os tratamentos, tanto para o pico 1, quanto para o pico 2.

Figura 5 - Histogramas de Citometria de Fluxo das raízes das combinações copas laranjas x porta-enxertos cítricos, analisados com padrão interno rabanete *Raphanus sativus*.



**Legenda:** O pico1, à esquerda, corresponde a fase G1(2C) das amostras de raízes das copas de laranjas e o pico ao meio corresponde ao padrão de referência, *Raphanus sativus*, o pico 2, à direita, corresponde a fase G2(4C). Esse fenômeno é conhecido como endoreduplicação. Cada figura representa uma combinação de porta-enxerto/copa de cultivares de Laranja. **A)** Cravo Santa Cruz/Navelate; **B)** Sunki tropical/Lane late; **C)** C. Swingle/Navelate; **D)** C. Swingle/Lane late.

Fonte: Do autor (2015).

## 4.2 Análises de citometria de fluxo: copas apirênicas de tangerineiras

As análises de citometria de fluxo foram realizadas para exame do conteúdo de DNA nuclear e, no experimento, observou-se que as análises de conteúdo de DNA das folhas das variedades copas de tangerineiras foram significativas. Enquanto que as análises do conteúdo de DNA das raízes em crescimento das tangerineiras não foram significativas (TABELA 4).

Em relação às análises de citometria de fluxo das tangerineiras, menores índices de DNA foram observados nas folhas das seguintes combinações: Cravo Santa Cruz/Ortanique, Cravo Santa Cruz/Okitsu, Sunki Tropical/Ortanique, Sunki Tropical/Okitsu e San Diego/Okitsu, mantendo o comportamento de variação de quantidade de DNA de acordo com o porta-enxerto utilizado, semelhante ao que ocorreu com as laranjeiras (TABELA 4).

Os índices de DNA das folhas para as combinações das copas de tangerinas enxertadas nos diferentes porta-enxertos foram observados valores que variaram entre 3,30 pg a 4,13 pg. Os porta-enxertos que melhor se destacaram em relação aos outros foram o C. Swingle e o C. Índio com altos valores de DNA. Assim, as combinações porta-enxertos/copas bem sucedidas foram C.Swingle/Clemenules com ID 3,97 pg, C.Swingle/Ortanique com ID 3,97 pg, C.Swingle/Okitsu com ID 3,80 pg e C.Índio/Okitsu com ID 4,00 pg, C.Índio/Ortanique com ID 3,96 pg e C.Índio/Clemenules com ID 3,77 pg. O melhor valor, ou seja, o maior conteúdo de DNA apresentado foi pela combinação porta-enxerto/copa San Diego/Clemenules, com o valor 4,13 pg.

Observa-se conforme a Tabela 4 que a copa de tangerineira que se destacou em relação às outras foi a variedade Clemenules que apresentou os maiores índices de conteúdo de DNA nas folhas. Em todas as combinações de porta-enxertos diferentes, a copa Clemenules obteve maiores valores ID, exceto sobre o porta-enxerto C. Índio que apresentou menor valor.

De acordo com Doležel e Bartoš (2005), valores de CV inferiores a 5% são considerados adequados para análises citométricas. Conseqüentemente, o protocolo empregado possibilitou uma quantidade suficiente de núcleos intactos, isolados e estequiometricamente corados. Assim as análises de citometria de fluxo para variedades de tangerineiras apresentaram valores de coeficientes abaixo de 5% sendo considerados ideais para as quantificações em plantas.

Desta forma, esses resultados podem sugerir que o porta-enxerto influencia na quantidade de DNA da cultivar copa, conforme observado, por exemplo, na cultivar Okitsu que, sobre porta-enxerto C. Índio, obteve conteúdo de DNA 4,00 pg e, sobre C. Swingle,

obteve conteúdo de DNA 3,80 pg (maiores valores), já sobre San Diego, Cravo Sta. Cruz e Sunki Tropical, os resultados foram índices inferiores 3,56 pg, 3,66 pg, 3,30 pg respectivamente. A cultivar copa de tangerineira Ortanique se comportou com valores de conteúdo de DNA intermediários sobre todos os porta-enxertos.

A cultivar de tangerineira Clemenules em combinação com os portas-enxertos Cravo Sta. Cruz, Sunki Tropical e C. Índio apresentou menores valores de coeficiente de variação. Isso significa que os dados coletados para essa cultivar possuem maior índice de confiabilidade.

Os coeficientes de variação (CV) encontrados para os picos G1 das folhas de tangerineiras variaram de 0,83 a 1,27 % (TABELA 4), caracterizando um excelente resultado.

Tabela 4 - Índices de DNA (ID) em pictogramas e coeficiente de variação (CV) em folhas e raízes de tangerineiras enxertadas em diferentes porta-enxertos, submetidas à análise de citometria de fluxo.

| Tratamentos | Porta-Enxerto/Copa                | CV folhas | ID Folhas (pg) | CV raízes (pico 1) | ID raízes (pico 1) (pg) | CV raízes (pico 2) | ID raízes (pico2) (pg) |
|-------------|-----------------------------------|-----------|----------------|--------------------|-------------------------|--------------------|------------------------|
| <b>T1</b>   | <b>Cravo Sta. Cruz/Ortanique</b>  | 0,93 b*   | 3,70 b*        | 1,80 a*            | 4,09 a*                 | 0,91 b*            | 7,44 a*                |
| <b>T2</b>   | <b>Cravo Sta. Cruz/Okitsu</b>     | 1,04 a    | 3,66b          | 1,19 a             | 3,75 a                  | 0,65 b             | 6,75 a                 |
| <b>T3</b>   | <b>Cravo Sta. Cruz/Clemenules</b> | 0,88 b    | 4,03 a         | 1,76 a             | 3,94 a                  | 0,81 b             | 7,19 a                 |
| <b>T4</b>   | <b>Sunki Tropical/Ortanique</b>   | 0,87 b    | 3,69 b         | 2,54 a             | 4,07 a                  | 0,93 b             | 7,41 a                 |
| <b>T5</b>   | <b>Sunki Tropical/Okitsu</b>      | 1,19 a    | 3,30 b         | 1,75 a             | 3,86 a                  | 0,75 b             | 7,15 a                 |
| <b>T6</b>   | <b>Sunki Tropical/Clemenules</b>  | 0,83 b    | 3,95 a         | 1,89 a             | 3,96 a                  | 0,94 b             | 7,48 a                 |
| <b>T7</b>   | <b>C.Índio/Ortanique</b>          | 1,19 a    | 3,96 a         | 2,30 a             | 4,92 a                  | 1,43 a             | 9,06 a                 |
| <b>T8</b>   | <b>C.Índio/Okitsu</b>             | 1,27 a    | 4,00 a         | 2,20 a             | 3,97 a                  | 1,09 a             | 7,48 a                 |
| <b>T9</b>   | <b>C.Índio/Clemenules</b>         | 0,98 b    | 3,77 a         | 1,47 a             | 3,84 a                  | 0,90 b             | 7,18 a                 |
| <b>T10</b>  | <b>San Diego/Ortanique</b>        | 0,88 b    | 3,83 a         | 2,11 a             | 3,56 a                  | 1,02 b             | 6,71 a                 |
| <b>T11</b>  | <b>San Diego/Okitsu</b>           | 0,99 b    | 3,56 b         | 2,94 a             | 3,90 a                  | 1,35 a             | 7,24 a                 |
| <b>T12</b>  | <b>San Diego/Clemenules</b>       | 1,09 a    | 4,13 a         | 1,80 a             | 3,54 a                  | 0,99 b             | 6,54 a                 |
| <b>T13</b>  | <b>C.Swingle/Ortanique</b>        | 1,00 b    | 3,97 a         | 2,68 a             | 3,75 a                  | 1,19 a             | 6,84 a                 |
| <b>T14</b>  | <b>C.Swingle/Okitsu</b>           | 1,08 a    | 3,80 a         | 2,55 a             | 3,66 a                  | 1,04 b             | 6,75 a                 |
| <b>T15</b>  | <b>C.Swingle/Clemenules</b>       | 1,06 a    | 3,97 a         | 2,19 a             | 3,77 a                  | 1,19 a             | 7,09 a                 |

\* Médias seguidas pela mesma letra na coluna pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Skott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2017).



Na Figura 6, observa-se histogramas de citometria de fluxo obtidos dos diferentes tratamentos. É possível observar que as combinações: Cravo Santa Cruz/Ortanique, Cravo Santa Cruz/Okitsu, Sunki Tropical/Ortanique, Sunki Tropical/Okitsu, San Diego/Okitsu possuem menores quantidades de DNA nas folhas. Sendo que a tangerineira Okitsu apresenta uma tendência de possuir menores quantidades de DNA.

Já nas interpretações dos gráficos gerados, os coeficientes de variação CV dos picos G1 dos histogramas são um indicativo de qualidade dos resultados, pois quanto menores os CVs mais confiáveis são as estimativas geradas por esses gráficos.

A determinação dos valores relativos da quantidade de DNA nuclear via citometria de fluxo, usando o iodeto de propídeo originou histogramas com resolução que diferenciou as fases G1, S e G2. Nos histogramas apresentados das cultivares de tangerinas, o pico 1, maior corresponde aos núcleos da fase G1 do ciclo celular, o pico menor corresponde à fase G2 e a região entre esses dois picos está o pico do padrão de referência. Desta forma, o número de núcleos está representado pelo eixo vertical e a intensidade de fluorescência relativa pelo eixo horizontal.

Nos histogramas é possível observar que quanto mais DNA tem a amostra mais à direita se forma o pico, portanto, o material das folhas cítricas tem o pico formado mais à direita em relação ao pico *Raphanus sativus*.

No histograma, o eixo x representa a intensidade de fluorescência do DNA nuclear marcado com o iodeto de propídeo e o eixo y o número de eventos, ou seja, o número de núcleos analisados. Os coeficientes de variação (CV) encontrados para os picos G1 das folhas de tangerineiras variaram de 0,83 a 1,27 % (TABELA 4), caracterizando um excelente resultado.

Figura 6 - Histogramas de Citometria de Fluxo de diferentes variedades copa de tangerinas enxertadas sobre porta-enxertos cítricos, analisados com padrão interno rabanete *Raphanus sativus*. (continua)

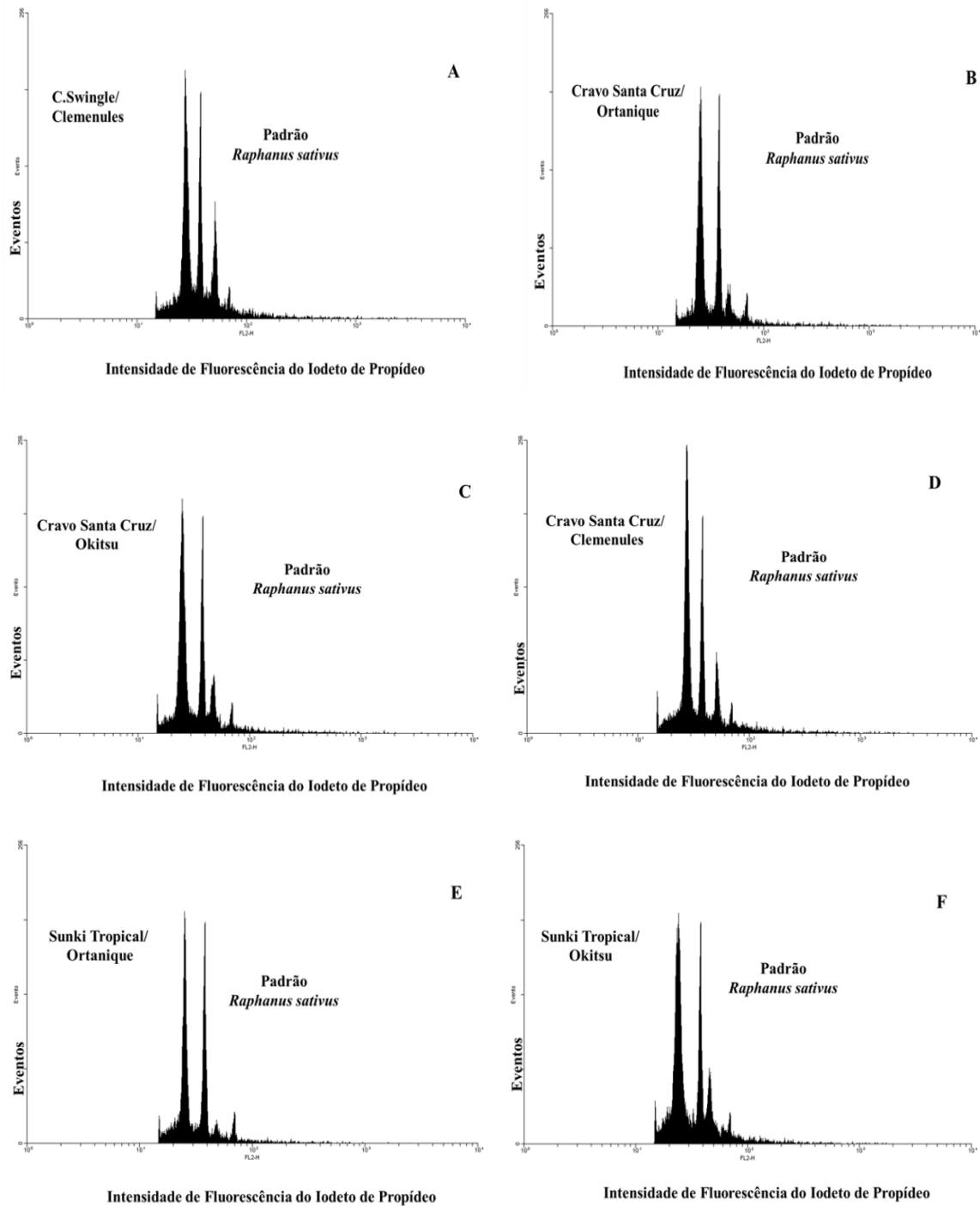
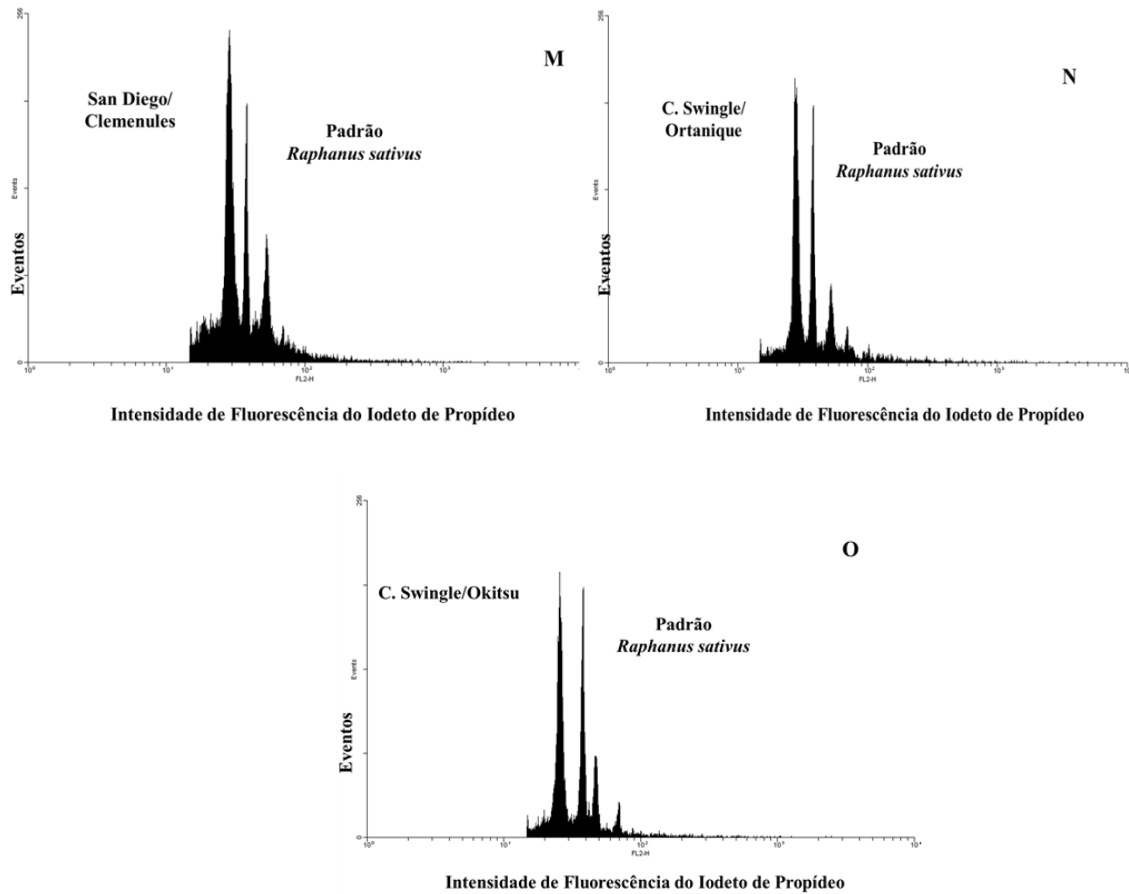




Figura 6 - Histogramas de Citometria de Fluxo de diferentes variedades copa de tangerinas enxertadas sobre porta-enxertos cítricos, analisados com padrão interno rabanete *Raphanus sativus*. (conclusão)

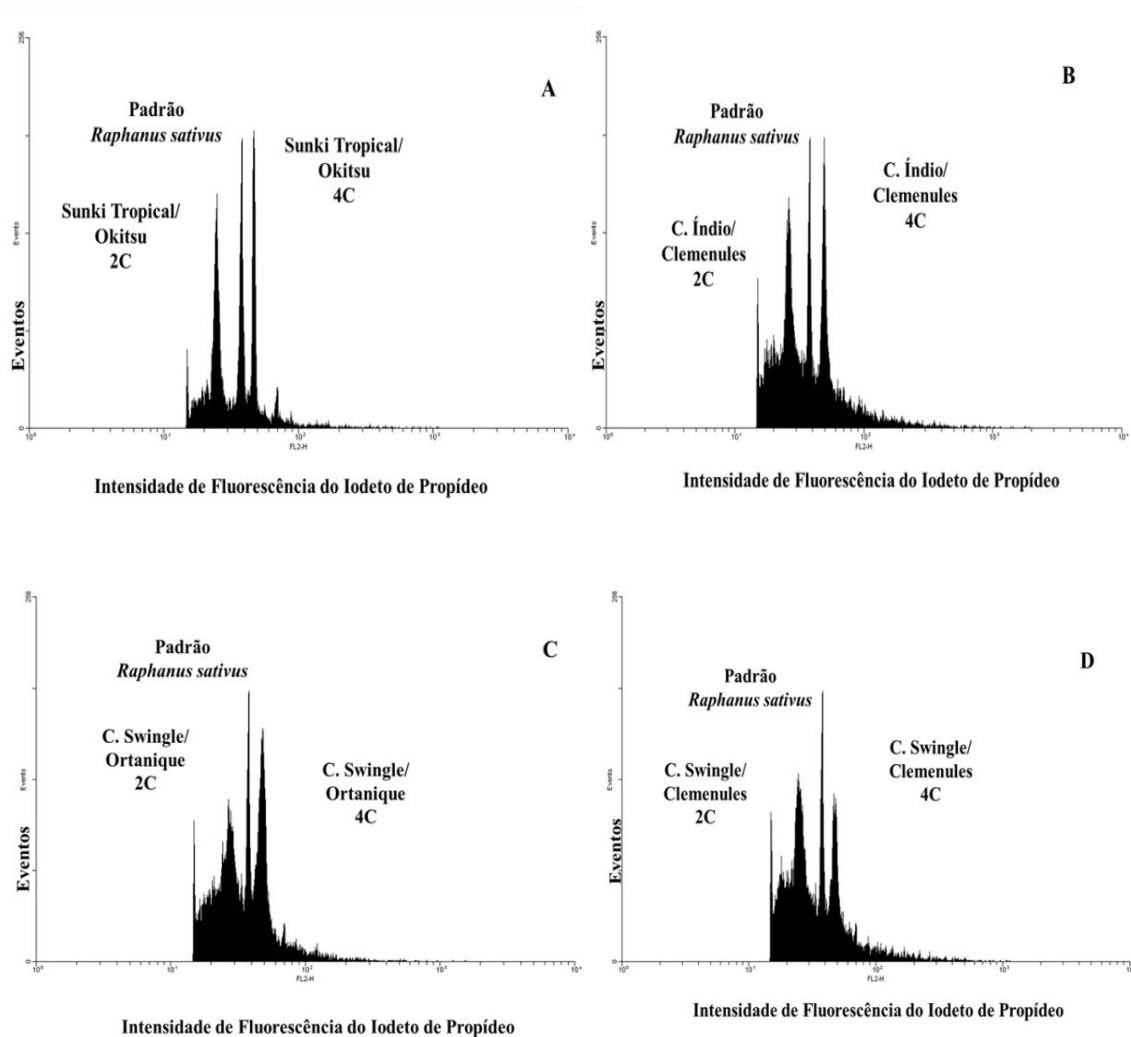


**Legenda:** O pico à esquerda de cada histograma corresponde ao G1 das amostras de folhas tangerinas e o pico à direita corresponde ao padrão de referência *Raphanus sativus*. Cada figura representa uma combinação de porta-enxerto/copa de cultivares de Tangerina. **A)** C. Swingle/Clemenules; **B)** Cravo Santa Cruz/Ortanique; **C)** Cravo Santa Cruz/Okitsu; **D)** Cravo Santa Cruz/Clemenules; **E)** Sunki Tropical/Ortanique; **F)** Sunki Tropical/Okitsu; **G)** Sunki Tropical/Clemenules; **H)** C. Índio/Ortanique; **I)** C. Índio/Okitsu; **J)** C. Índio/Clemenules; **K)** San Diego/Ortanique; **L)** San Diego/Okitsu; **M)** San Diego/Clemenules; **N)** C. Swingle/Ortanique; **O)** C. Swingle/Okitsu.

Fonte: Do autor (2015).

Conforme ocorreu nas laranjeiras, as análises de raízes dos porta-enxertos das tangerineiras também não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos em relação ao índice de DNA e também apresentaram o fenômeno da endorreduplicação (FIGURA 7).

Figura 7 - Histogramas de Citometria de Fluxo das raízes das combinações das copas Tangerinas x porta-enxertos cítricos, analisados com padrão interno rabanete *Raphanus sativus*.



**Legenda:** O pico 1, à esquerda, corresponde a fase G1(2C) das amostras de raízes das copas de tangerinas e o pico ao meio corresponde ao padrão de referência, *Raphanus sativus*, o pico 2, à direita, corresponde a fase G2(4C). Esse fenômeno é conhecido como endoreduplicação. Cada figura representa uma combinação de porta-enxerto/copa de cultivares de Tangerina. **A)** Sunki Tropical/Okitsu; **B)** C. Índio/Clemenules; **C)** C. Swingle/Ortanique; **D)** C. Swingle/Clemenules.

Fonte: Do autor (2015).

Como relatado pelos autores Castle et al. (1993), Cunha Sobrinho et al. (2013), Davies e Albrigo (1999) e Pompéu Júnior (1991), os porta-enxertos cítricos influenciam vários atributos na planta, inclusive interfere na composição química das folhas, na transpiração e no processo da fotossíntese. No presente trabalho, os resultados de citometria de fluxo sugerem que essa interferência ocorra também na quantidade de DNA.

Nota-se diferenças entre os conteúdos de DNA das folhas das copas de laranjeiras e tangerineiras enxertadas em cinco diferentes porta-enxertos. Entretanto, em relação ao conteúdo de DNA das raízes em crescimento tanto das variedades copas de laranjas e tangerinas não houve resultados significativos. Observa-se, pouca interferência das copas cítricas sobre os diferentes porta-enxertos. Assim, na literatura, estão comprovadas as influências da copa sobre o porta-enxerto no desenvolvimento do sistema radicular. Kolesnikov (1971 citado por ROM, 1987, p. 61), relata que “as raízes das plantas são tão ativas quanto as folhas e que o sistema radicular interagindo com o solo e a copa desempenha importante papel no crescimento, desenvolvimento e frutificação da planta”.

### **4.3 Análises anatômicas do caule**

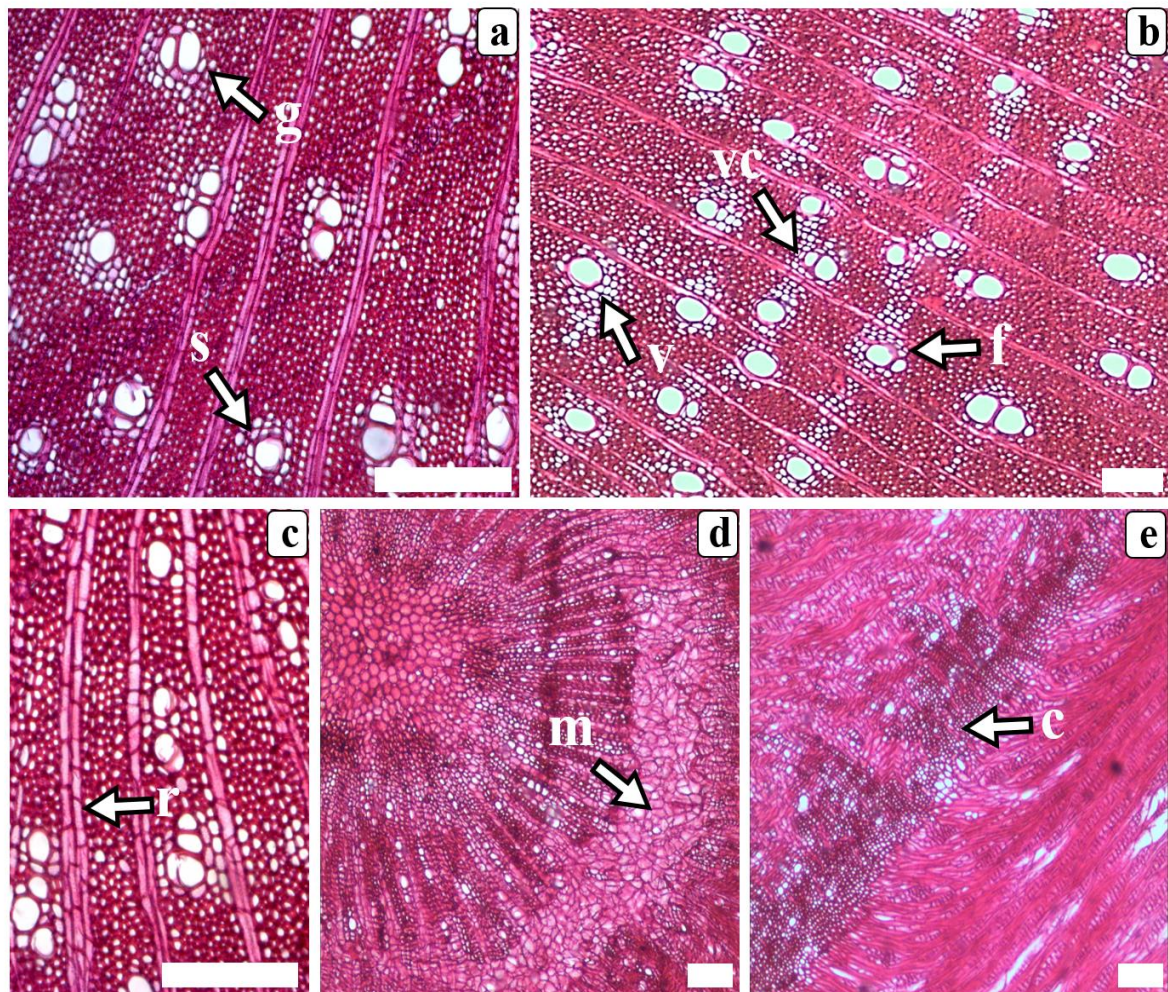
Decorridos 16 meses após a realização da enxertia, as mudas apresentavam aparência saudável e com franco desenvolvimento em casa de vegetação. Não foram constatados indícios de ocorrência de incompatibilidade, como anel de goma na linha de enxertia, em nenhuma das plantas do experimento. A formação de goma na linha da enxertia é considerada um sintoma de incompatibilidade, determinando pouca produção e vida curta em plantas cítricas. A incompatibilidade de enxertia é caracterizada como a incapacidade de uma planta enxertada crescer normalmente, levando à ocorrência da morte prematura do enxerto devido a algum tipo de intolerância fisiológica em nível celular. Também considerado um indicativo de incompatibilidade é a descontinuidade entre o xilema das duas partes, frequentemente observada em espécies frutíferas lenhosas, em que ocorre maior crescimento do diâmetro do tronco do enxerto em relação ao do porta-enxerto, que torna-se sensível para sustentar a parte aérea, ocasionando fácil quebra de plantas no ponto de enxertia (RODRIGUES et al., 2004).

Em associação com a anatomia quantitativa, o estudo da anatomia qualitativa é importante uma vez que permite a descrição de características gerais e observações microscópicas da madeira, possibilitando a inferência acerca da eficiência da enxertia nas diversas combinações copa x porta-enxerto.

Neste estudo, as combinações cítricas apresentaram vasos xilemáticos numerosos, com porosidade difusa uniforme e formato arredondado (ovalado a circular). Na sua maioria, eram do tipo solitário com presença de alguns geminados (FIGURA 8). Os vasos são responsáveis pelo transporte de água e sais minerais.



Figura 8 - Cortes histológicos do lenho da região da enxertia das combinações copa x porta-enxertos cítricos.



**Legenda:** Fotomicrografias de secções caulinares na região da enxertia das diferentes combinações cítricas. a-d: Secções transversais do caule evidenciando: a) vasos solitários (s) e geminados (g); b) padrões de ocorrência do parênquima, sendo eles: vasicêntrico (v), vasicêntrico confluyente (vc) e em faixas (f); c) raios (r) e d) máculas (m). e: Secção longitudinal mostrando o calo (c) formado nos locais de junção de tecidos de enxerto (lado direito) e porta-enxerto (lado esquerdo). Barras = 100  $\mu$ m.

Fonte: Do autor (2015).

Pela análise dos dados dos diâmetros médios dos vasos xilemáticos, foi observada interação significativa tanto na análise dos vasos do enxerto quanto no porta-enxerto (TABELA 5), o que pode ser indício de possíveis adaptações anatômicas que contribuirão para a ocorrência de compatibilidade.

Os dados indicaram que as médias dos diâmetros dos vasos da copa e do porta-enxerto das cultivares de laranja Navelina e tangerina Clemenules são dependentes dos diversos porta-enxertos cítricos.

Conforme descrito na Tabela 5, os diâmetros dos vasos do enxerto sobre o porta-enxerto San Diego não apresentaram resultados significativos, tanto para a cultivar de laranja Navelina como para a cultivar tangerina Clemenules. Entretanto, sobre o porta-enxerto Cravo Santa Cruz a cultivar Clemenules apresentou diâmetro 19% maior em relação à Navelina. Mesmo comportamento foi observado na utilização de Clemenules sobre a cultivar Sunki Tropical, alcançando diâmetro 13% superior em comparação ao uso da Navelina. Para todos os porta-enxertos avaliados, a Navelina apresentou diâmetro de vaso maior (48,64 µm) apenas quando foi enxertada no porta-enxerto Citrandarin Índio.

Tabela 5 - Diâmetro médio dos vasos da copa e do porta-enxerto obtidos na secção transversal das cultivares copa Navelina e Clemenules enxertadas nos porta-enxertos San Diego, Cravo Santa Cruz, Citrandarin Índio e Sunki Tropical, após 16 meses da realização da enxertia.

| Tratamentos              | Diâmetro dos vasos do enxerto (µm) |            | Diâmetro dos vasos do porta-enxerto (µm) |            |
|--------------------------|------------------------------------|------------|--|------------|
|                          | Navelina                           | Clemenules | Navelina                                 | Clemenules |
| <b>San Diego</b>         | 38,74 aB*                          | 38,09 aB*  | 31,82 bB*                                | 36,32 aA*  |
| <b>Cravo Santa Cruz</b>  | 35,66 bB                           | 42,44 aA   | 37,58 aA                                 | 37,72 aA   |
| <b>Citrandarin Índio</b> | 48,64 aA                           | 40,71 bA   | 33,10 aB                                 | 30,67 aB   |
| <b>Sunki Tropical</b>    | 37,88 bB                           | 42,68 aA   | 34,34 aB                                 | 30,33 bB   |
| CV (%)                   | 17,24                              |            | 19,99                                    |            |

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

Fonte: Do autor (2017).

Em relação ao diâmetro de vasos no porta-enxerto (TABELA 5), a avaliação realizada na cultivar San Diego mostrou que a utilização da cultivar Clemenules favoreceu a ocorrência de maior diâmetro de vasos, em torno de 14% maior comparado ao uso de Navelina. Entretanto, na utilização de Sunki Tropical, observou-se maior diâmetro quando o enxerto era a Navelina. Para as demais combinações não foram encontradas diferenças significativas, ou seja, não houve variação nos vasos dos porta-enxertos independente dos enxertos utilizados.

Quando se analisa o fator enxerto em relação ao fator porta-enxerto, observa-se que o maior diâmetro de vasos do enxerto ocorre na combinação Navelina/Citrandarin Índio e nas combinações de Clemenules com Cravo Santa Cruz, Citrandarin Índio e Sunki Tropical. Em relação ao diâmetro dos vasos do porta-enxerto, a cultivar Navelina destacou-se quando



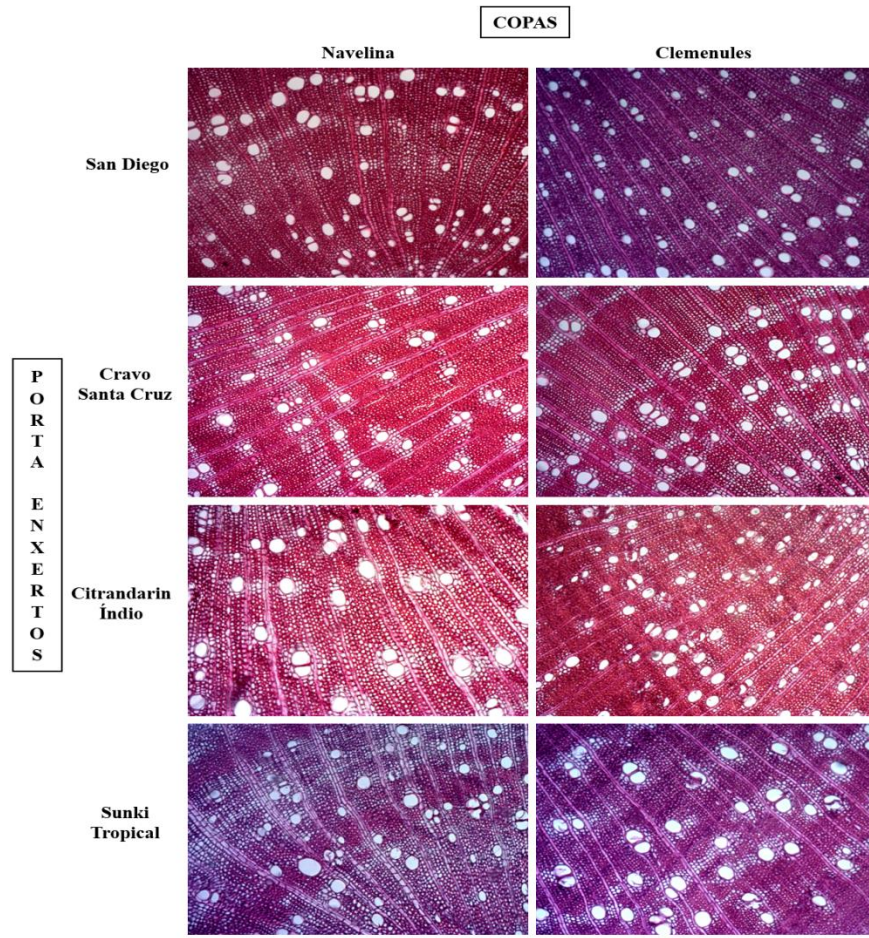
enxertada sobre Cravo Santa Cruz e a cultivar Clemenules apresentou maiores diâmetros quando enxertada tanto em San Diego quanto em Cravo Santa Cruz.

Pela análise dos dados, observa-se que o diâmetro dos vasos da copa apresentou uma tendência de superioridade em relação às médias do porta-enxerto em todas as combinações.

Os perfis dos diâmetros dos vasos da copa e do porta-enxerto na secção transversal podem ser visualizados nas Figuras 9 e 10. A descrição anatômica qualitativa das combinações enxerto/porta-enxerto cítricos possibilitou a inferência acerca da eficiência da enxertia nas diversas combinações bem como no transporte de água, sais minerais e fotoassimilados.

Goldschmidt-Blumental (1956) realizou estudos morfológicos e anatômicos de laranjeira “Shamouti” enxertada em nove porta-enxertos diferentes e foi identificada a natureza da união entre os tecidos dessas plantas. Constatou-se que na linha de união entre as partes, ocorreram alterações na largura e no número de vasos e na capacidade de conduzir água.

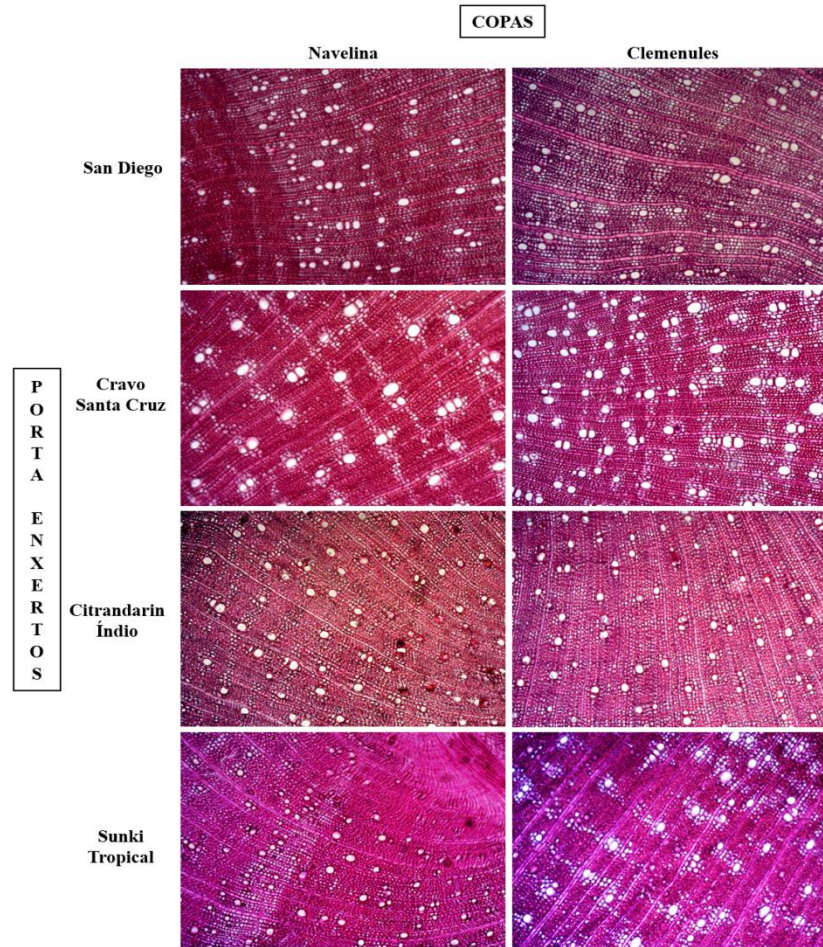
Figura 9 - Secção transversal do lenho das copas das cultivares de laranja Navelina e tangerina Clemenules enxertadas nos diferentes porta-enxertos cítricos.



**Legenda:** Corte transversal do lenho das copas mostrando fibras abundantes (parte vermelho-escura), vasos (partes claras e ovais) de distribuição difusa, solitários, geminados e múltiplos radiais e faixas de parênquima axial associados a vasos (parênquima vasicêntrico, vasicêntrico confluyente, em faixas). Raios medulares em faixas. Barra = 100  $\mu$ m.

Fonte: Do autor (2015).

Figura 10 - Secção transversal do lenho dos porta-enxertos das cultivares de laranja Navelina e tangerina Clemenules enxertadas nos diferentes porta-enxertos cítricos.



**Legenda:** Corte transversal do lenho dos porta-enxertos mostrando fibras abundantes (parte vermelho-escuro), vasos (partes claras e ovais) de distribuição difusa, solitários, geminados e múltiplos radiais e faixas de parênquima axial associados a vasos (parênquima vasicêntrico, vasicêntrico confluyente e em faixas). Raios medulares em faixas. Barra = 100  $\mu$ m.

Fonte: Do autor (2015).

O estudo dos vasos xilemáticos, também denominados como elementos de vaso, é importante para o conhecimento do sistema de condução de água e sais minerais, principalmente no caso de plantas enxertadas, pois esta característica contribui para o sucesso da enxertia (MARTÍNEZ-BALLESTA et al., 2010). Além disso, este fator é importante para estudos de incompatibilidade de enxertia, pois a escolha de enxertos e porta-enxertos com elementos de vasos distintos em diâmetro podem acarretar supercrescimento ou nanismo nas plantas formadas (DAVIS et al., 2008). Para os vasos, ocorreu aumento no diâmetro no sentido medula casca nas secções transversais da copa, do porta-enxerto e no ponto da enxertia nas combinações cítricas. Fan, Cao e Becker (2009) e Zanon et al. (2008), também observaram aumento no diâmetro dos vasos no mesmo sentido em Fagaceae, assim eles

sugerem que estas variações refletem o processo de maturação do câmbio, e no caso da enxertia, pegamento das combinações.

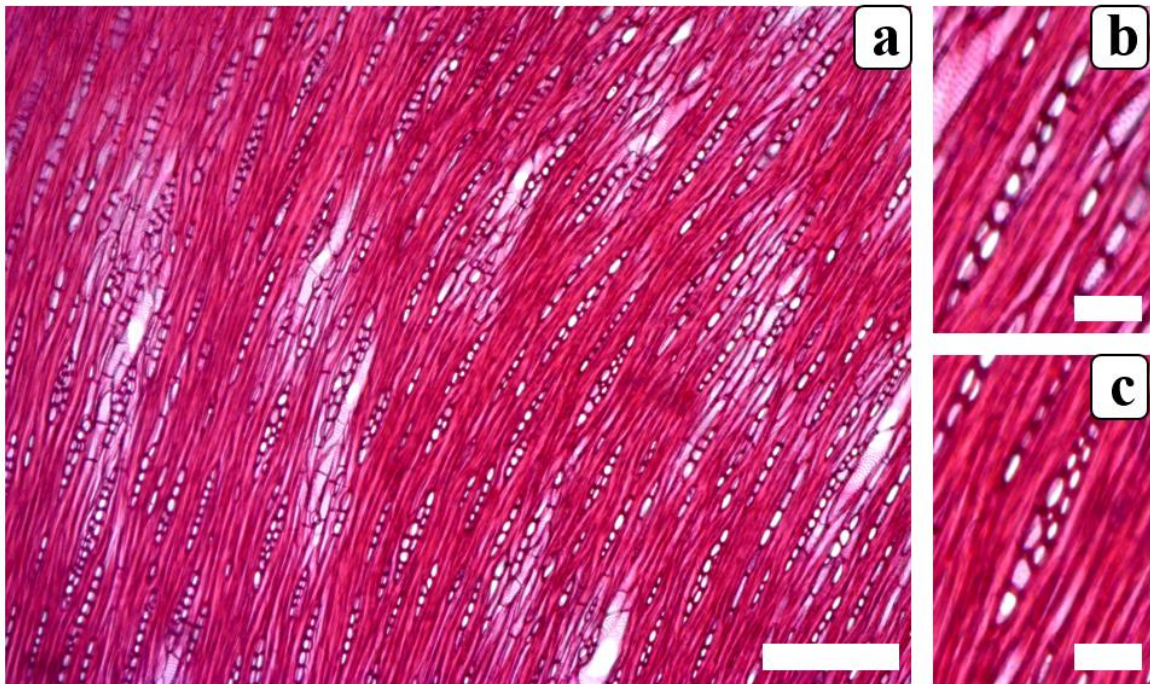
As secções caulinares também evidenciaram a presença de parênquimas dos tipos paratraqueal vasicêntrico confluyente, vasicêntricos e em faixas (FIGURA 8 b). As células parenquimáticas desempenham a função de armazenamento e de translocação de água e solutos a curta distância. As células são alongadas no sentido vertical com paredes delgadas. O parênquima paratraqueal se encontra associado aos elementos de vaso. Possui o padrão vasicêntrico quando forma bainha completa em torno dos vasos e confluyente quando o parênquima vasicêntrico de dois ou mais vasos contíguos se unem formando faixas irregulares. Também nessa seção transversal do xilema secundário, observa-se parênquima axial em faixas que estão associadas aos vasos, formando faixas contínuas.

O tecido parenquimático é composto de células vivas com grande potencialidade meristemática, com aptidão para multiplicar e dividir as células. Dentre as várias funções do tecido parenquimático, a cicatrização ou regeneração de lesões, como na união de enxertos é considerada de grande importância. A cicatrização acontece porque as células parenquimáticas podem retomar sua atividade meristemática diferenciando-se em outros tipos de células (APPEZATTO-DA-GLÓRIA; GUERREIRO, 2006).

Foram observados raios tanto nas secções transversais (FIGURA 8 c) como nas longitudinais (FIGURAS 11). Nesta última, os raios mostram-se unisseriados (FIGURA 11 b), uma vez que são constituídos apenas por uma fileira de células em largura, e multisseriados formados por duas ou mais células (FIGURA 11 c). O parênquima radial é responsável pelo armazenamento e translocação de água e solutos a curta distância, no sentido lateral.



Figura 11 - Secção longitudinal da região da enxertia com detalhes dos raios.



**Legenda:** Fotomicrografias de secções longitudinais na região da enxertia de todas as combinações cítricas. a) Padrão de distribuição dos raios; b) Raio unisseriado; c) Raio multisseriado. Barras = 100  $\mu\text{m}$  (a) e 25  $\mu\text{m}$  (b e c).

Fonte: Do autor (2015).

Para a variável altura de raios, a análise estatística revelou significância na interação enxerto x porta-enxerto, conforme mostrado na Tabela 6. A maior altura de raios do enxerto foi observada na combinação Clemenules/Cravo Santa Cruz (241,18  $\mu\text{m}$ ) e na combinação Navelina/Cravo Santa Cruz (198,66  $\mu\text{m}$ ). As cultivares San Diego e Sunki Tropical não alteraram a altura de raios independente do enxerto utilizado.

Tabela 6 - Altura dos raios do enxerto e do porta-enxerto obtidos na secção transversal das cultivares copa Navelina e Clemenules enxertadas nos porta-enxertos San Diego, Cravo Santa Cruz, Citrandarin Índio e Sunki Tropical, após 16 meses da realização da enxertia.

| Tratamentos              | Altura dos raios do enxerto<br>( $\mu\text{m}$ ) |            | Altura dos raios do porta-enxerto<br>( $\mu\text{m}$ ) |            |
|--------------------------|--|------------|--|------------|
|                          | Navelina   | Clemenules | Navelina   | Clemenules |
| <b>San Diego</b>         | 180,88 aA*                                       | 177,13 aB* | 147,82 bB*   | 195,11 aA* |
| <b>Cravo Santa Cruz</b>  | 198,66 bA  | 241,18 aA  | 225,59 aA  | 165,70 bB  |
| <b>Citrandarin Índio</b> | 179,33 aA  | 145,14 bC  | 166,49 bB  | 189,87 aA  |
| <b>Sunki Tropical</b>    | 181,59 aA  | 183,60 aB  | 233,52 aA  | 154,16 bB  |
| CV (%)                   | 26,42  |            | 20,95  |            |

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

Fonte: Do autor (2017).

Para a altura de raios do porta-enxerto, as cultivares San Diego e Citrandarin Índio apresentaram maior altura de raio quando combinadas com a cultivar Clemenules. Em contrapartida, as cultivares Cravo Santa Cruz e Sunki Tropical foram superiores em altura de raio quando receberam o enxerto de Navelina.

Quando se analisa o fator enxerto em relação ao fator porta-enxerto, observa-se que o uso da cultivar Navelina não sofre variação na altura de raios do enxerto independente do porta-enxerto utilizado. Para Clemenules, maior altura de raios do enxerto foi encontrada quando a enxertia foi sobre a cultivar Cravo Santa Cruz, alcançando até 66% de superioridade em relação aos demais porta-enxertos. Para altura de raios do porta-enxerto, as combinações de Navelina com Cravo Santa Cruz e com Sunki Tropical apresentaram maiores valores. Já para Clemenules, maior altura de raios foi observada com o uso dos porta-enxertos San Diego e Citrandarin Índio.

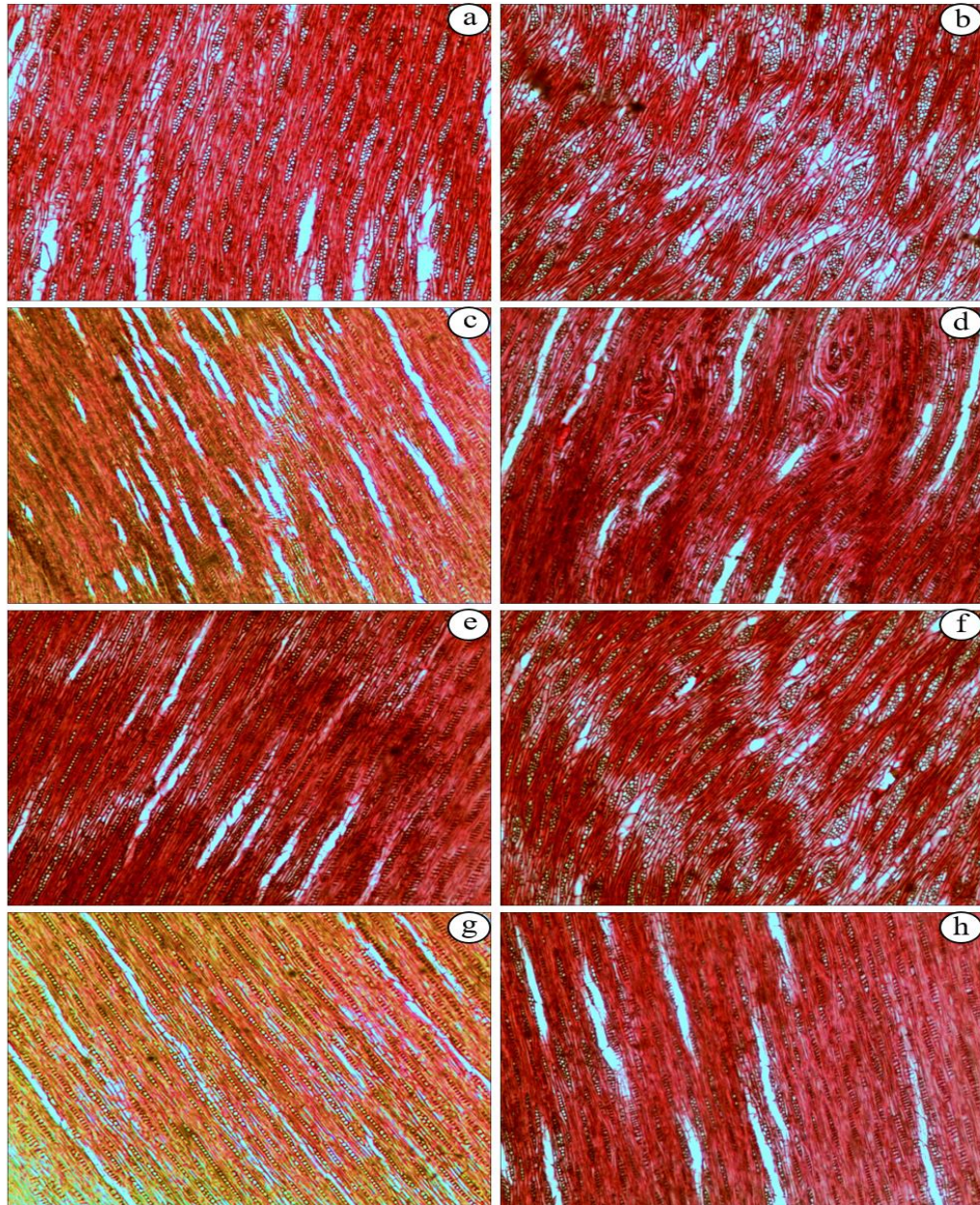
O padrão de distribuição de raios das combinações enxerto/porta-enxerto é mostrado na Figura 12. Os raios são expostos em sua extensão longitudinal. Quando o caule é cortado longitudinalmente, pode-se obter dois tipos de corte: o radial e o tangencial. Os cortes radiais expõem os raios como faixas horizontais perpendiculares ao sistema axial. Cortes tangenciais seccionam o raio quase perpendicularmente à sua extensão horizontal e mostram sua altura e largura.

Os elementos anatômicos observados na Figura 12, no corte longitudinal tangencial: são os vasos que são células em série vertical coalescente, formando uma estrutura tubiforme de comprimento indeterminado. Cada célula que compõe o vaso é designada de elementos de vaso e, nas figuras, encontra-se na cor branca. As fibras estão identificadas com coloração



vermelha mais escura. E distribuídos na secção, estão os raios multisseriados, bisseriados e os unisseriados.

Figura 12 - Secção longitudinal tangencial do lenho no ponto da enxertia das combinações copa x porta-enxertos cítricos.



**Legenda:** Corte longitudinal tangencial mostrando raios multisseriados, bisseriados e os unisseriados das combinações copa x porta-enxerto cítricos. **a)** raios da copa “Navelina” x “San Diego”. **b)** raios da copa “Clemenules” x “Cravo Sta. Cruz”. **c)** raios da copa “Clemenules” x “C. Índio”. **d)** raios da copa “Clemenules” x “San Diego”. **e)** raios do porta-enxerto “Navelina” x “San Diego”. **f)** raios do porta-enxerto “Clemenules” x “Cravo Sta. Cruz”. **g)** raios do porta-enxerto “Clemenules” x “C. Índio”. **h)** raios do porta-enxerto “Clemenules” x “San Diego”. Barra = 200 $\mu$ m.

Fonte: Do autor (2015).

Neste estudo, observou-se presença de máculas medulares no lenho das copas, no ponto de enxertia e dos porta-enxertos foram observados nos cortes transversais (FIGURA 8 d). As máculas são formadas por células parenquimáticas de formato irregular com paredes lignificadas. Elas são originadas em resposta a injúrias ao câmbio, causadas por danos bióticos ou abióticos. As plantas lenhosas necessitam de vários mecanismos de segurança para a prevenção de danos, de habilidade de regeneração e de mecanismos de compartimentação de injúrias. Desta forma, dessa capacidade de regenerar partes danificadas com a habilidade de multiplicar células parenquimáticas em vários tecidos originou-se o tecido de ligação, ou melhor, a cicatrização unindo o enxerto com o porta-enxerto (COSMO et al., 2010). Esses autores afirmam que o princípio do tecido de cicatrização varia entre as espécies de plantas. Em plantas lenhosas os raios são os principais responsáveis por esse processo, entretanto outros componentes da zona cambial podem contribuir de forma variável em determinadas espécies. As células de raio contribuem em grande parte para a formação das máculas.

Nos tratamentos, foi observado o contato dos tecidos dos câmbios de porta-enxerto e enxerto, identificando as zonas cambiais com a maior interligação possível (FIGURA 8e). As células do câmbio das duas plantas produziram células parenquimáticas, formando o calo, ou seja, a soldadura e possivelmente as células se diferenciaram formando novas células de câmbio, as quais produziram novos tecidos vasculares, sem os quais não há pegamento do enxerto (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009). A baixa ou incorreta formação de calos entre o enxerto e porta enxerto poderia levar à desfolha, redução do crescimento do enxerto e baixa sobrevivência de plantas enxertadas (JOHKAN et al., 2009). Assim, a conexão vascular na interface da enxertia pode determinar a translocação de água e nutrientes, afetando as demais características fisiológicas (MARTÍNEZ-BALLESTA et al., 2010).

A análise da Figura 8e evidencia os detalhes anatômicos e histológicos da região do ponto de enxertia onde há indicações de união entre o porta-enxerto e o enxerto, embora ainda com nítida desorganização estrutural. Isto provavelmente acontece devido aos aspectos de união de tecidos na região da enxertia, com multiplicação de células do parênquima, que estabelecem o contato inicial das partes envolvidas (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009). O processo de soldadura da enxertia ocorre em poucos dias e, neste estágio inicial, há formação de células parenquimáticas na interface do enxerto, as quais preenchem a fenda no ponto da enxertia, constituindo-se em calo, que associa o enxerto e o porta-enxerto, com posterior contato entre as partes envolvidas.



## 5 CONCLUSÃO

Variedades copa de laranjeiras e tangerineiras apresentam tendência de variar o conteúdo de DNA conforme o porta-enxerto utilizado.

Nos cortes histológicos do lenho das combinações copa x porta-enxerto cítricos analisados, após um ano de enxertia, estes apresentaram formação e proliferação de células desorganizadas (calos) observando conexão dos elementos vasculares entre enxerto e porta-enxerto.

Nas mudas avaliadas das combinações copas de laranjeiras Navelate, Lane late, Navelina enxertadas sobre os diferentes porta-enxertos cítricos: limoeiro “Cravo Santa Cruz”, “Citrumelo Swingle”, Tangerineira “Sunki Tropical”, Citrandarin “Índio”, Citrandarin “San Diego”, após 12 meses de enxertia, não foram constatadas ocorrências de incompatibilidade.

Nas mudas avaliadas das combinações copas de tangerineiras Clemenules, Ortanique, Okitsu enxertadas sobre os diferentes porta-enxertos cítricos: limoeiro “Cravo Santa Cruz”, “Citrumelo Swingle”, Tangerineira “Sunki Tropical”, Citrandarin “Índio”, Citrandarin “San Diego”, após 12 meses de enxertia, não foram constatadas ocorrências de incompatibilidade.

## REFERÊNCIAS

- ALBACETE, A. Unravelling rootstock x scion interactions to improve food security. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 66, p. 2211-2226, Mar. 2015.
- AMORÓS, C. M. **Producción de agrios**. Valencia: Mundi, 1995. 286 p.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. 2. ed. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2006. 438 p.
- BAROW, M. Endopolyploidy in seed plants. **BioEssays**, Cambridge, v. 28, n. 3, p. 271-281, 2006.
- BASSANEZI, R. B.; GIMENES-FERNANDES, N.; YAMAMOTO, P. T. **Morte súbita dos citros**. Araraquara: Fundecitrus, 2003. 54 p.
- BASSANEZI, R. B.; GIMENES-FERNANDES, N.; MASSARI, C. A. **Resultados do levantamento detalhado da morte súbita dos citros na região afetada: junho a setembro de 2002**. Araraquara: Fundecitrus, 2002. 9 p.
- BENJAMIN, G.; TIETEL, Z.; PORAT, R. Effects of rootstock/scion combinations on the flavor of citrus fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 61, p. 11286-11294, Oct. 2013.
- BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Annals of Botany**, Oxford, v. 76, p. 113-176, 1995.
- BITHELL, S. L. et al. Grafting for soilborne disease management in Australian vegetable production systems: a review. **Journal of the Australasian Plant Pathology Society**, Melbourne, v. 42, p. 329-336, May 2013.
- BOTEON, M.; NEVES, E. M. Citricultura brasileira: aspectos econômicos. In: MATTOS JUNIOR, D. et al. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônomo; Fundag, 2005. p. 19-36.
- BURGER, L. M.; RICHTER, H. G. **Anatomia da madeira**. São Paulo: Nobel, 1991. 154 p.
- BUSO, G. S. C. M. I. O. et al. **Citometria de fluxo, contagem cromossômica e RAPD na identificação de genomas e espécies de *Oryza***. Brasília, DF: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 44 p. (Boletim de Pesquisa, 10).
- CANTILLANO, F. R. F. et al. Caracterização física, química e sensorial do híbrido sem sementes cv. Ortanique produzido no sul do Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 16, p. 13, 2004. Suplemento.
- CASTLE, W. et al. **Rootstocks for Florida citrus**. 2<sup>nd</sup> ed. Gainesville: University of Florida, 1993. 91 p.
- CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos, caule**. Lavras: Ed. UFLA, 2009. 234 p.

- CASTRO, L. E. de. **Aspectos fisiológicos, celulares e moleculares da tolerância à dessecação em sementes de *Anadenanthera colubrina* durante a germinação**. 2013. 64 p. Dissertação (Mestrado em Silvicultura)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.
- CECCARELLI, M. et al. Chromosome endoreduplication as a factor of salt adaptation in *Sorghum bicolor*. **Protoplasma**, Karlsruhe, v. 227, p. 113-118, 2006.
- CERQUEIRA, E. C. et al. Resposta de porta-enxertos de citros ao déficit hídrico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, p. 515-519, 2004.
- CHEVALIER, C. et al. Elucidating the functional role of endoreduplication in tomato fruit development. **Annals of Botany**, Oxford, v. 107, p. 1159-1169, Jan. 2011.
- COOKSON, S. J.; RADZIEJWOSKI, A.; GRANIER, C. Cell and leaf size plasticity in *Arabidopsis*: what is the role of endoreduplication. **Plant Cell & Environment**, Oxford, v. 29, p. 1273-1283, 2006.
- CORE, H. A.; CÔTÉ, W. A.; DAY, A. C. **Wood structure and identification**. Syracuse: Syracuse University Press, 1979. 182 p.
- COSMO, N. L. et al. Anatomia da madeira de *Sebastiania commersoniana* (Baillon) Smith & Downs (Euphorbiaceae): aspectos funcionais e ecológicos. **Acta Botanica Brasilica**, Curitiba, v. 24, n. 3, p. 747-755, 2010.
- CUNHA SOBRINHO, A. P. et al. (Ed.). **Cultura dos citros**. Brasília, DF: EMBRAPA, 2013. v. 1, 399 p.
- DAVIES, F. S.; ALBRIGO, L. G. **Cítricos**. Zaragoza: Acribia, 1999. 283 p.
- DAVIS, A. R. et al. Grafting effects on vegetable quality. **HortScience**, Alexandria, v. 43, n. 6, p. 1670-1672, 2008.
- DIAS, F. P. **Crescimento vegetativo e anatomia caulinar de cafeeiros enxertados**. 2006. 99 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.
- DOLEZEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v. 38, n. 3, p. 285-302, Apr. 1997.
- DOLEŽEL, J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. **Phytochemical Analysis**, Sussex, v. 2, p. 143-154, 1991.
- DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, London, v. 95, p. 99-110, 2005.
- DOLEZEL, J.; DOLEZELOVA, M.; NOVAK, F. J. Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 36, p. 351-357, 1994.

DOLEZEL, J.; SGORBATI, S.; LUCRETTI, S. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 85, p. 625-631, 1992.

DONATO, S. L. R. et al. Respostas de combinações de variedades copa e porta-enxerto de citros à deficiência hídrica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 42, p. 1507-1510, 2007.

EDGAR, B. A.; ORR-WEAVER, T. L. Endoreplication cell cycles: more for less. **Cell**, Cambridge, v. 105, p. 297-306, 2001.

FACHINELLO, J. C. et al. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília, DF: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2005. 221 p.

FAHN, A. **Plant anatomy**. New York: Pergamon, 1982. 544 p.

FAN, Z. X.; CAO, K. F.; BECKER, P. Axial and radial variations in xylem anatomy of angiosperm and conifer trees in Yunnan, China. **IAWA Journal**, Utrecht, v. 30, p. 1-13, 2009.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

FERREIRA, E. A. Panorama da citricultura brasileira. **Informe Agropecuário: Citricultura**, Lavras, v. 35, n. 281, p. 7-16, jul./ago. 2014.

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. **Manual da morte súbita dos citros**. Araraquara, 2006. 12 p.

GALARÇA, S. P. et al. Crescimento e desenvolvimento de pessegueiros 'Chimarrita' e 'Maciel' sobre diferentes porta-enxertos e locais de cultivo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 2, p. 219-224, fev. 2013.

GALBRAITH, D. W. et al. Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. In: ROBINSON, J. et al. (Ed.). **Current protocols in cytometry**. New York: J. Wiley, 2002. p. 1-22.

GOLDSCHMIDT-BLUMENTAL, S. Rootstock Scion influences in the morphology and anatomy of the Bud Union of Shamouti orange. **Bulletin of the Research Council of Israel**, Jerusalém, v. 5D, n. 2/3, p. 143-155, 1956.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 7<sup>th</sup> ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 880 p.

HELLER, F. O. DNA-measurement of *Vicia faba* L. with pulse ytophotometry. **Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, Berlin, v. 86, n. 5/9, p. 437-441, 1973.

IAWA COMMITTEE. IAWA list of microscopic features for hardwood identification. **IAWA Bulletin**, Leiden, v. 10, p. 219-332, 1989.

- IGLESIAS, D. J. et al. Physiology of citrus fruiting. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, n. 19, p. 333-362, 2007.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil**: levantamento sistemático da produção agrícola (LSPA). Rio de Janeiro, 2015. 79 p.
- JOHKAN, M. et al. Causes of defoliation and low survival rate of grafted sweet pepper plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 119, p. 103-107, 2009.
- JOHNSTON, J. et al. Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 86, n. 5, p. 609-613, May 1999.
- KUBITZKI, K. et al. Rutaceae. In: KUBITZKI, K. (Ed.). **The families and genera of vascular plant: flowering plants: Eudicots: Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceae**. Berlin: Springer, 2011. v. 10, p. 276-356.
- KUBITZKI, K. et al. Rutaceae. In: KUBITZKI, K. (Ed.). **Flowering plants: Eudicots: Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceae: the families and genera of vascular plants**. Hamburg: Springer, 2011. p. 276-356.
- LEWIN, M.; GOLDSTEIN, I. S. **Wood structure and composition**. New York: M. Dekker, 1991. 488 p.
- LIMA, A. C. B. de. **Crescimento do porta-enxerto 'Sunki Tropical' (*Citrus sunki* Hort. Ex. Tan.) em substratos orgânicos**. 2013. 45 p. Monografia (Graduação em Engenharia Agrônômica)-Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2013.
- LORENZI, H. et al. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo *in natura*)**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006. 640 p.
- LORETI, F. Porta enxertos para a cultura do pessegueiro do terceiro milênio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 1, p. 274-284, 2008.
- LOUREIRO, J.; SANTOS, C. Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. In: \_\_\_\_\_. **Métodos em biotecnologia: citometria de fluxo I**. Aveiro: Universidade de Aveiro, 2002. p. 18-29. Boletim de Biotecnologia.
- MAGALHÃES FILHO, J. R. et al. Deficiência hídrica, trocas gasosas e crescimento de raízes em laranjeira 'Valência' sobre dois tipos de porta-enxerto. **Bragantia**, Campinas, v. 67, p. 75-82, 2008.
- MARIE, D.; BROWN, S. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. **Biology of the Cell**, Paris, v. 78, p. 41-51, 1993.
- MARTÍNEZ-BALLESTA, M. C. et al. Physiological aspects of rootstock-scion interactions. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 127, p. 112-118, Aug. 2010.

- MENEZES, T. P. de et al. Micropropagação e endorreduplicação em pitaya vermelha, *Hylocereus undatus* Haw. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 6, p. 868-876, nov./dez. 2012.
- NEVES, M. F. et al. **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: FEA/USP, 2010. 138 p.
- NISGOSKI, S. **Identificação e caracterização anatômica macroscópica das principais espécies utilizadas para laminação na região de Curitiba-PR**. 1999. 113 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.
- OLIVEIRA, A. A. R. et al. **Novas variedades superiores de citros**. Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, 1997.
- OLIVEIRA, A. A. R. et al. Reação de genótipos de citros a *Phytophthora parasitica*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 36, n. 3, p. 986, 2011. Suplemento.
- OLIVEIRA, E. M. et al. Incompatibilidade de combinações copa e porta-enxerto de citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 22., 2012, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2012. v. 1, p. 1-4.
- OLIVEIRA, I. V. M.; DAMIÃO FILHO, C. F.; CARVALHO, S. A. Enxertia em citros por substituição de ápice caulinar. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 744-747, 2002.
- OLIVEIRA, R. P. de; NAKASU, B. H.; SCIVITTARO, W. B. **Cultivares apirênicas de citros recomendadas para o Rio Grande do Sul**. Pelotas: EMBRAPA Clima Temperado, 2008. 39 p. (EMBRAPA Clima Temperado. Documentos, 195).
- OLIVEIRA, R. P. de; SCIVITTARO, W. B. (Ed.). **Cultivo de citros sem sementes**. Pelotas: EMBRAPA Clima Temperado, 2011. 378 p. (Sistema de Produção, 21).
- OLIVEIRA, R. P. de; WREGE, M. S. O mapa dos citros no RS. **Cultivar**. Hortaliças e Frutas, Pelotas, n. 25, p. 8-9, abr./maio 2004.
- PASSOS, L.; LABERT, G.; GALBRAITH, D. Separação de acessos de capim elefante com base no teor de DNA genômico, medido por citometria de fluxo. In: SIMPÓSIO SOBRE CAPIM ELEFANTE, 2., 1994, Juiz de Fora. **Anais...** Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1994. p. 211.
- PEIL, R. M. A enxertia na produção de mudas de hortaliças. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 6, p. 1169-1177, 2003.
- PEREIRA, J. P. **Características de combinações de cultivares copa e porta-enxertos cítricos, na região de Bauru/SP**. 2005. 45 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.
- PEREIRA, P. S. et al. Incompatibilidade de enxertia em Prunus. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 9, p. 1519-1526, Sept. 2014.

- PINHEIRO, A. A. et al. Duplication of the chromosome number of diploid *Brachiaria brizantha* plants using colchicine. **Plant Cell Reports**, New York, v. 19, n. 3, p. 274-278, Jan. 2000.
- POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: MATTOS JUNIOR, D. de et al. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico; Fundag, 2005. p. 61-104.
- POMPEU JUNIOR, J.; BLUMER, S. Performance de citrumelos F80 no Estado de São Paulo. **Laranja**, Cardeirópolis, v. 26, p. 77-85, 2005.
- POMPEU JÚNIOR, J. Porta-enxertos. In: RODRIGUEZ, O. et al. (Ed.). **Citricultura brasileira**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v. 1, p. 265-280.
- RAMOS, J. D. et al. Poliembrião e caracterização de frutos de citrumelo Swingle e de *Poncirus trifoliata*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 1, p. 88-91, jan./fev. 2006.
- RAYBURN, A. L. et al. Detection of intraspecific DNA content variation in *Zea mays* L. by flow cytometry. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 40, n. 220, p. 1179-1183, Nov. 1989.
- RODRIGUES, A. C. et al. Compatibilidade entre diferentes combinações de cvs. Copas e porta-enxertos de *Prunus* sp. **Revista Brasileira Agrocência**, Pelotas, v. 10, p. 185-189, 2004.
- RODRIGUES, A. S. et al. Comportamento de híbridos de citros em relação à infecção natural pelo Citrus tristeza virus e à presença de sintomas de descamamento eruptivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. 3, p. 731-737, 2014.
- ROM, R. C. Introduction. In: ROM, R. C.; CARLSON, R. F. (Ed.). **Rootstocks for fruit crops**. New York: J. Wiley, 1987. p. 1-3.
- SCATENA, V. L.; SCREMIN-DIAS, E. Parênquima, colênquima e esclerênquima. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Ed.). **Anatomia vegetal**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2003. p. 109-127.
- SCHÄFER, G. et al. Produção e desenvolvimento da tangerineira 'montenegrina' propagada por enxertia e estaquia, no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 668-672, 2001.
- SHAPIRO, H. M. The evolution of cytometers. **Cytometry Part A**, New York, v. 58, n. 1, p. 13-20, 2004.
- SIMÃO, S. **Tratados de fruticultura**. Piracicaba: FEALQ, 1998. 760 p.
- SLIWINSKA, E.; LUKASZEWSKA, E. Polysomaty in growing in vitro sugar-beet (*Beta vulgaris* L.) seedlings of different ploidy level. **Plant Science**, Ireland, v. 168, p. 1067-1074, 2005.

SOARES FILHO, W. S. (Ed.). **Reunião técnica: obtenção, seleção e manejo de variedades porta-enxerto de citros adaptadas a estresses abióticos e bióticos**. Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, 2011. (Documentos, 200). 1 CD-ROM.

SOARES FILHO, W. S. et al. Potencial de obtenção de novos porta-enxertos em cruzamentos envolvendo limoeiro 'Cravo', laranjeira 'Azeda', tangerina 'Sunki' e híbridos de *Poncirus trifoliata*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 1, p. 223-228, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 819 p.

TIMBÓ, A. L. de O. **Duplicação cromossômica e identificação do nível de ploidia utilizando citometria de fluxo em *Brachiaria* spp.** 2011. 100 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

VALVERDE, M. Lavouras de laranja avançam em Minas. **Diário do Comércio**, Belo Horizonte, 29 jul. 2014. Disponível em: <<http://www.diariodocomercio.com.br/noticia.php?id=138695>>. Acesso em: 14 fev. 2017.

WALLACE, H. M.; LEE, L. S. Pollen source, fruit set and xenia in mandarins. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, West Sussex, v. 74, p. 82-86, 1999.

YAMASAKI, S. et al. Continuous UV-B irradiation induces endoreduplication and peroxydase activity in epidermal cells surrounding trichomes on cucumber cotyledons. **Journal of Radiation Research**, Oxford, v. 51, p. 187-196, Jan. 2010.

ZANON, B. R. et al. Variação radial da densidade básica e dimensões celulares de *Croton floribundus* Spreng. na Serra da Cantareira, SP. **IF Série Registros**, São Paulo, v. 36, p. 25-29, 2008.

ZOLDOS, V. et al. Genome size and base composition of seven *Quercus* species: inter- and intra-population variation. **Genome**, Ottawa, v. 41, p. 162-168, 1998.