

QUIMERAS PERICLINAIS DIPLÓIDES-TETRAPLÓIDES SURGIDAS EM FORMA DE VARIAÇÕES SOMÁTICAS EM *CITRUS* (*)

H. B. Frost (**)

C. A. Krug (***)

INTRODUÇÃO

Numerosas variações genéticas, afetando diversas partes de plantas cítricas, têm sido constatadas em culturas destas árvores frutíferas. "Variações de borbulha" ou "mutações de borbulha" (mutações somáticas) têm sido largamente estudadas, do ponto de vista hortícola, em diversas variedades comerciais, como, por exemplo, nos limões "Eureca" e "Lisboa" (23), mas pouco se sabe ainda a respeito das verdadeiras causas destas modificações hereditárias.

Certas formas de mutações somáticas, que se caracterizam por tecidos de constituição mista, como certos limoeiros que ostentam folhas de margens brancas (21) e laranjeiras apresentando dois tipos de casca nos seus frutos (22), constituem, aparentemente, quimeras periclinais, que encerram o tipo original como um dos seus componentes. Em outros casos, como acontece com a variedade Wase Satsuma, de importância econômica (24), parece duvidoso se as freqüentes reversões somáticas de tal variação ao seu tipo primitivo devem ser atribuídas a uma constituição original quimérica ou à instabilidade genética do mutante.

A extraordinária diversidade das formas cítricas e a pronunciada heterozigose, que parece ser generalizada neste gênero (25, 7), sugerem que as mutações de gens ocorrem com relativa freqüência. Este processo, portanto, pode ser considerado como uma das prováveis causas das variações somáticas em *Citrus* apesar de se tornar difícil discerní-

(*) Tradução, ligeiramente ampliada, do original publicado em *Genetics* 27 : 619-634. 1942 (publicação n.º 464 da University of California Citrus Experiment Station, Riverside, California).

(**) Associate Plant Breeder da Citrus Experiment Station, Riverside, California.

(***) Pesquisa realizada por este autor, em 1941, naquela Estação Experimental, em virtude de ter recebido uma bolsa de estudos da John Simon Guggenheim Memorial Foundation.

lo dos casos de ocorrência de "crossing-over" somático ou de anomalias estruturais nos cromosômios.

Variações "gêmeas", às vezes afetando os caracteres da casca e que modificam setores adjacentes em direções opostas em relação à expressão original do respectivo caráter, também têm sido observadas. Estas sugerem a ocorrência de uma mitose anormal. Quando, tanto a espessura da casca como também a sua coloração são modificadas em direções opostas em dois setores adjacentes, o que já tem sido observado, deve ter ocorrido uma mudança no mecanismo citológico de tal ordem a afetar, no mínimo, a posição de dois gens. Além dos casos acima mencionados (inclusive das transferências de camadas geratrizes nas quimeras), a natureza exata das variações de borbulha em *Citrus*, somente poderá ser determinada quando uma alteração citológica visível estiver envolvida.

Quanto às causas das variações somáticas em *Citrus*, evidentemente, apenas as mudanças do número de cromosômios podem ser facilmente determinadas. Microsporocitos e pontas de raízes de estacas revelam o número de cromosômios de apenas duas camadas geratrizes, das quais êles se derivam. Estas contagens, nos casos de mutações somáticas, precisam ser completadas, de preferência, pela determinação direta ou indireta do número de cromosômios na epiderme derivada da primeira camada geratriz. Estas investigações detalhadas são necessárias para se poder distinguir entre variações totalmente modificadas e quimeras.

Durante os últimos anos muitas investigações têm sido realizadas, com o fim de determinar o número de camadas geratrizes existentes nos primórdios das plantas. Schmidt (20) propôs a teoria do "tunica-corporis", que apenas considera a existência de duas regiões geratrizes principais, ao passo que Foster (4, 5) demonstrou que o número de camadas geratrizes, que tomam parte no desenvolvimento dos diversos tecidos, varia consideravelmente de espécie para espécie. Blakeslee et al (1) e Satina et al (18, 19), trabalhando com várias quimeras de *Datura*, induzidas pela Colchicina, demonstraram claramente que três camadas geratrizes tomam parte no desenvolvimento desta planta. Aparentemente, nada se sabe, ainda, a êste respeito, com relação ao gênero *Citrus*.

Apenas poucas determinações do número de cromosômios têm sido feitas, até hoje, em formas cítricas que se originaram por variações somáticas. Nakamura (14) examinou microsporocitos de dois ramos mutantes da Satsuma, conhecida por Wase. Êle encontrou o mesmo

número de cromosômios ($2n=18$) nestes ramos e na parte normal da árvore em questão, não notando, igualmente, diferenças no comportamento dêstes cromosômios. A laranja Shamouti, da Palestina, que, provavelmente, se originou da laranja Belladi por mutação de borbulha, e que freqüentemente produz ramos do tipo da Belladi (15), também possui o número normal de cromosômios nos seus microsporocitos (16).

Pelo menos, sob determinadas condições climáticas, a tetraploidia é comum em "seedlings" produzidos por via agâmica (por embriões nucelares) e descendentes de plantas diplóides de muitas variedades (6, 8, 13). Considerando-se que plantas triplóides, e não tetraplóides, têm sido encontradas entre mudas de origem reconhecidamente gamética (híbridos F_1 interespecíficos), nas mesmas culturas em que apareciam tetraplóides nucelares, chega-se à conclusão de que a duplicação do número de cromosômios da qual resulta a tetraploidia em mudas de *Citrus*, deve ocorrer, de preferência, antes do início das divisões embriônicas. Os freqüentes casos da produção tanto de mudas tetraplóides como diplóides, pela mesma semente, sugere que a duplicação geralmente ocorre no pistilo e provavelmente no nucelo.

Notícias sobre a existência de ramos tetraplóides em árvores cítricas diplóides, indicando que a tetraploidia se originou em meristemas dos galhos, não parecem ter sido publicadas antes da realização do presente trabalho. Considerando-se os caracteres das árvores originadas por variações somáticas, na Califórnia, conclue-se que variações tetraplóides de borbulha são raras em *Citrus*. No caso apresentado no presente trabalho, pequena parte de uma árvore ("pé franco") era tetraplóide, tendo a mudança do número de cromosômios provavelmente ocorrido após a germinação da semente.

MATERIAL E MÉTODOS

De uma tangerina híbrida, obtida pela polinização da mandarina King pela tangerina Dancy, na Citrus Experiment Station, Riverside, Califórnia, foram obtidas 128 mudas, provenientes de 111 sementes derivadas da polinização aberta. Em janeiro de 1932, quando tais mudas tinham aproximadamente 4 a 4 1/2 anos, tôdas estas plantas pareciam idênticas à planta-mãe, quanto ao seu tipo genético, presumindo-se, pois, que tôdas se derivaram, assexuadamente, de embriões nucelares. Em uma destas árvores, entretanto, um pequeno ramo (mais tarde designado por "b"), que se originou do tronco a uma altura de mais ou menos 1 a 1,5 m, produziu 4 ramos laterais, dos quais o maior possuía fôlhas largas e aparentemente grossas, sugerindo tetraploidia. Nenhuma

descrição foi feita para os outros três ramos laterais. Quando, na primavera seguinte, novos brotos e folhas se tinham desenvolvido, procedeu-se a um novo exame do ramo "b". Entre um total de 13 brotos, possuindo, cada um, duas folhas ou mais, apenas um parecia ser diplóide, 10 parecendo ser tetraplóides e 2 possivelmente intermediários. Todo o galho mutado, entretanto, secou após o transplântio da árvore.

O restante desta árvore (designada por "a") parecia ser inteiramente diplóide. As árvores **a-1** a **a-3**, mencionadas mais adiante, foram obtidas pela enxertia de borbulhas colhidas de dois ramos normais bem distantes do ramo "b". Dois pares de árvores (b-1 e b-2; b-3 e b-4) se derivam de borbulhas colhidas em dois ramos novos, não adjacentes, do ramo "b". As árvores a-1 a b-4 estão tôdas enxertadas em cavalos de *Poncirus trifoliata*. A árvore **b-5** tem como "cavalo" uma muda de laranja doce, derivando-se a borbulha de um dos brotos acima mencionados. Em 1936 estas mudas foram transplantadas para o pomar, na ordem de **a-1** a **b-5**.

Em agosto de 1940 obtiveram-se estacas, possuindo algumas folhas, de vários ramos terminais de 4 das árvores acima mencionadas: a-1, a-2, b-1 e b-4 e plantadas dentro de um estufim, contendo areia aquecida por uma resistência elétrica; em outubro, do mesmo ano, transplantaram-se, para vasos, várias destas estacas então enraizadas, mantendo-as na estufa.

Em janeiro de 1941, pontas de raízes de várias destas estacas foram fixadas na solução "Craf" (17) durante 24 horas e desidratadas pelo método do álcool butílico terciário (11) e depois incluídas na parafina. Cortes transversais de 6 microns de espessura foram depois coloridos pela hematoxilina de Heidenhain. Todos os desenhos foram feitos com câmara clara, à altura da mesa, com uma ampliação de cerca de 3.900 vêzes.

Em abril, do mesmo ano, colheram-se botões florais de vários tamanhos dos pés a-1, b-1 e b-4 (a-2 não possuía então botões, provavelmente devido a um excesso de produção do ano anterior), que foram fixados, durante 12 horas, numa solução contendo 3 partes de álcool e uma de ácido acético e depois conservadas em álcool 70%. Os esfregaços feitos com carmim-acético (solução concentrada em ácido acético a 45%) foram aquecidos, até leve fervura, antes da lutagem. As contagens de cromossômios foram feitas em microsporocitos em divisão com aproximadamente o mesmo aumento usado nas contagens de cromossômicos nas pontas de raízes.

Ao mesmo tempo procedeu-se à fixação, em líquido Craí, de pontas de ramos novos, em pleno desenvolvimento, e também de pequenos setores centrais de fôlhas maduras, que depois foram desidratadas como fôra feito para as pontas de raízes. Êste material também foi seccionado a 8-10 microns e colorido pela hematoxilina.

MORFOLOGIA DAS ÁRVORES ENXERTADAS

Caracteres gerais das plantas e das fôlhas ; frutificação

Em fevereiro de 1941, os pés a-1 a a-3 apresentavam uma boa carga de frutos (bem apreciável em dois dêles e mais fraca no terceiro), sendo em tudo semelhantes à árvore (pé franco) da qual se derivaram (fig. 1). Dos 5 pés descendentes do ramo "b", os de números b-1 e b-5, principalmente o primeiro, se apresentavam com uma copa relativamente curta e larga, não possuindo mais de 4 frutos cada um ; (os tetraplóides caracterizam-se por uma relativa falta de produtividade) ; b-1, pelo menos, possuía uma folhagem típica dos tetraplóides, apresentando um porte particularmente largo, como resultado da sua ramificação muito baixa (fig. 2). Os pés b-2 a b-4, representando os dois brotos do ramo "b", eram altos e de porte ereto, semelhantes, em sua forma, aos pés a-1 a a-3, sendo, porém, intermediários na sua frutificação (b-2 e b-3 medianamente produtivos e b-4 pouco produtivo) (fig. 3). A maioria, senão tôda a sua folhagem, entretanto, parecia indicar tetraploidia, como acontecia com o pé **b-5**.

ESPESSURA DAS FÔLHAS

Vinte fôlhas maduras, aproximadamente do mesmo tamanho, foram colhidas, em abril de 1941, em pontos semelhantes de cada uma das árvores, das quais tinham sido retiradas estacas para enraizamento. Duas medições da sua espessura foram feitas nas proximidades do seu centro, por meio de um micrômetro usado para medir a espessura de lamínulas de vidro, que permitia a medição em centésimos de milímetros. As médias e os seus erros "standard" acham-se no quadro I.

QUADRO I

ESPESSURA DAS FÔLHAS DAS ÁRVORES DAS QUAIS SE RETIRARAM ESTACAS PARA ENRAIZAMENTO

ÁRVORE n.º	ESPESSURA DAS FÔLHAS (mm/100)		
	Médias	Diferenças	Diferença/Erro "standard"
a-1	27,25±0,26		
a-2	27,70±0,44		
b-1	36,32±0,34	8,62	15,4(*)
b-4	37,45±0,31	9,75	18,1(**)

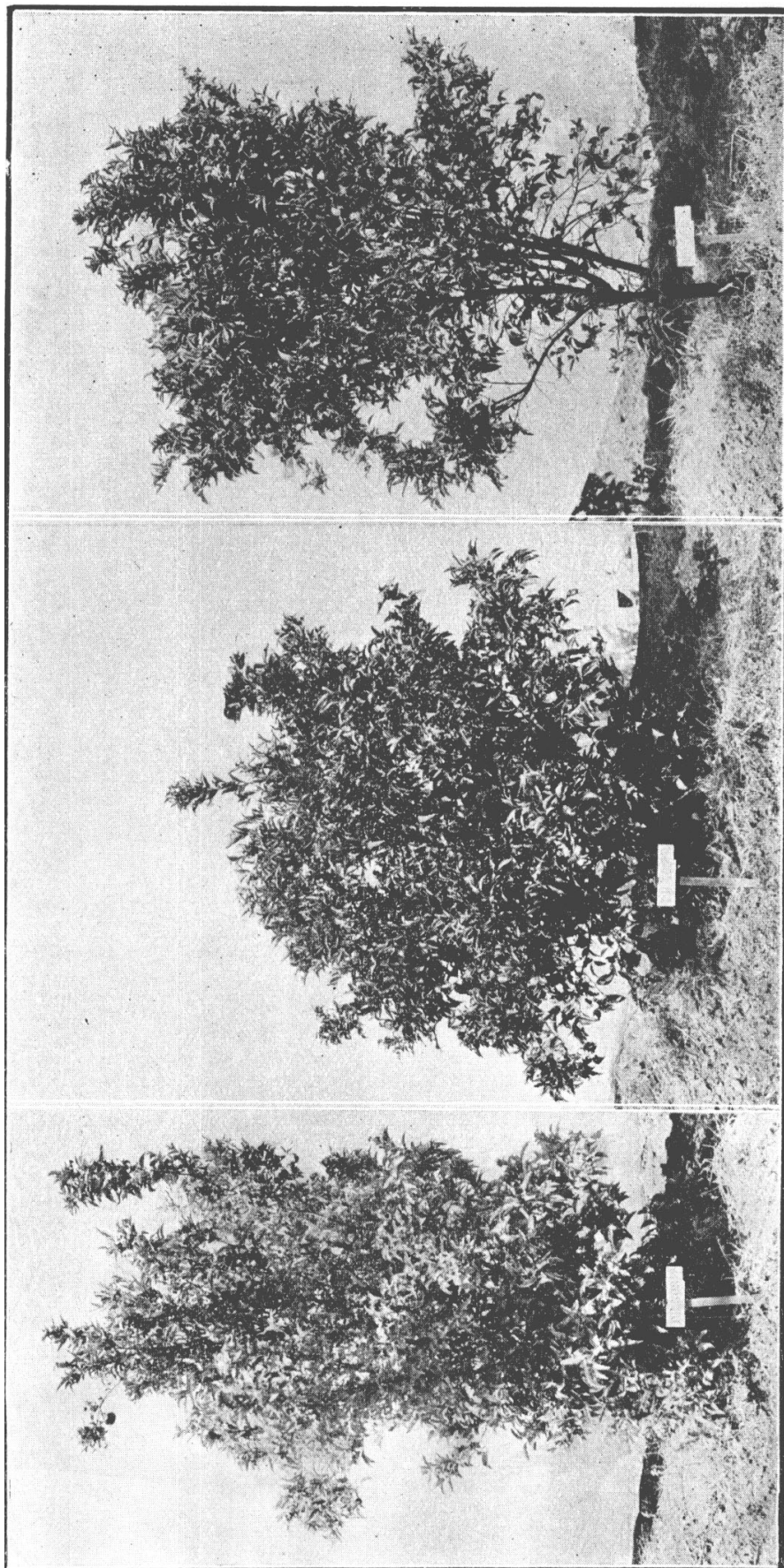
Para a determinação da significância das diferenças, as médias dos pés b-1 e b-4 foram comparadas com a do pé a-2, que apresenta uma média mais elevada e maior variabilidade do que a-1. As fôlhas de ambas as árvores derivadas do ramo "b" eram significativamente mais grossas do que aquelas dos pés derivados das outras partes normais ("a") da planta primitiva. Por outro lado, a diferença entre os dois pés "b" foi muito pouco significativa e aquela entre as duas plantas "a" não era significativa.

ÍNDICE DAS FÔLHAS

Para a obtenção de uma amostra conveniente destinada à determinação do índice da forma da lâmina foliar (comprimento/largura), tôdas as fôlhas, ainda existentes nas estacas utilizadas para o enraizamento, foram medidas, descartando-se, apenas, algumas mal conformadas. As médias e seus erros "standard" são apresentadas no quadro II.

(*) A diferença entre a-2 e b-1 é altamente significativa ($t=2,71$ para $n=40$ e $P=0,01$) (10, Tabela 94).

(**) A diferença entre a-2 e b-4 é também altamente significativa. A diferença entre b-1 e b-4 é apenas levemente significativa: $\text{Diferença/Erro "standard"} = \frac{1,13}{0,46} = 2,46$ ($t=2,42$ para $n=40$ e $P=0,02$).

**Fig. 1**

Árvore enxertada a-1, de porte erecto, idêntico ao da planta original.

Fig. 2

Árvore enxertada b-1; a sua folhagem indica tetraploidia. O formato achatado da sua copa foi intensificado pela ramificação muito baixa que se formou após a enxertia.

Fig. 3

Árvore enxertada b-4; quanto ao formato, é semelhante à planta a-1, a maioria da sua folhagem indicando, entretanto, tetraploidia.

QUADRO II

ÍNDICE DA FORMA DAS FÔLHAS DAS ESTACAS ENRAIZADAS

ÁRVORE n.º	NÚMERO DE FÔLHAS	ÍNDICE DA FORMA DA FÔLHA		
		Médias	Diferenças	Diferença/Erro "standard"
a-1 e a-2	23	2,035±0,025		
b-1	19	1,916±0,030	0,119	3,05(*)
b-4	12	1,880±0,032	0,155	3,78(**)

Os resultados obtidos pela medição de amostras de 50 fôlhas, colhidas em outras variedades, e anteriormente estudadas na Citrus Experiment Station, indicam que as diferenças constantes do quadro II, apesar da sua significância estatística, não são altamente significantes, pois são elevadas as probabilidades de serem encontradas tais diferenças entre amostras colhidas em árvores diferentes, mas da mesma constituição genética. As diferenças atrás relatadas indicam, entretanto, maior largura relativa das fôlhas das árvores enxertadas com borbulhas do ramo mutante. Onze formas cítricas tetraplóides, em cultivo na Citrus Experiment Station, acusaram, tôdas, uma largura mais acentuada das suas fôlhas do que os diplóides correspondentes, sendo as diferenças encontradas, em geral, bem maiores do que as enumeradas no quadro II.

CITOLOGIA E HISTOLOGIA

O estudo dos caracteres morfológicos acima descritos, dos pés obtidos pela enxertia com borbulhas do ramo mutante "b", sugere francamente que êste se originou pela duplicação do número de cromosômios. Para provar esta hipótese, realizaram-se contagens de cromosômios em extremidades de raízes de estacas, na meiose e, mais tarde, em fôlhas novas e ramos; determinou-se, igualmente, o tamanho dos estomas, estudando-se também a histologia dos primórdios das fôlhas, fôlhas maduras e de ramos novos.

(*) A diferença entre a média geral (a-1 e a-2) e b-1 é significativa ($t=2,71$ para $n=40$ e $P=0,01$).

(**) A diferença entre a mesma média e b-4 é também significativa ($t=2,72$ para $n=35$ e $P=0,01$).

A diferença entre b-1 e b-4 não é significativa:

Diferença/Erro "standard" = 0,78 ($t=2,76$ para $n=29$ e $P=0,01$).

NÚMERO DE CROMOSÔMIOS NAS PONTAS DE RAÍZES DE ESTACAS

Como já foi dito atrás, contaram-se os cromosômios em pontas de raízes de estacas procedentes dos pés a-1, a-2, b-1 e b-4. Procurou-se, sempre, efetuar contagens em várias camadas do tecido meristemático. Com exceção de dois casos, o mesmo número foi encontrado em tôdas as camadas de uma determinada raiz. Num dêstes casos, verificou-se, aparentemente, a existência de dois núcleos diplóides numa célula rodeada por tecido tetraplóide ($4n=36$) (*), um dos quais se achava em divisão, possibilitando a vista polar de sua metáfase, a contagem de, aproximadamente, 18 cromosômios. Num outro caso foi encontrada uma só célula tetraplóide num tecido inteiramente diplóide.

Excluindo-se as exceções acima mencionadas, foram obtidos os seguintes resultados :

QUADRO III

ÁRVORE	N.º DE ESTACAS EXAMINADAS	N.º DE RAÍZES EXAMINADAS	N.º DE CROMOSÔMIOS
a-1	1	3	$2n=18$
a-2	1	3	$2n=18$
b-1	4	15	$4n=36$
b-4	4	21	$2n=18$

Como era de se esperar, as árvores a-1 e a-2 produziram raízes normais diplóides em suas estacas (fig. 4); b-1 deu origem a raízes tetraplóides (fig. 5) e b-4, inesperadamente, tinha, em suas estacas, raízes diplóides.

NÚMERO DE CROMOSÔMIOS NA MEIOSE

Na primavera de 1941, as árvores a-1, b-1 e b-4 produziram pequeno número de botões florais, os quais foram examinados quanto ao seu número de cromosômios na meiose. As contagens foram feitas na M I e A I (**), e, especialmente, na M II e A II. Além disso, fizeram-se observações sôbre a presença de "laggards", o número de microsporos derivados de cada microsporocito, e a variabilidade do tamanho do pólen. Os resultados foram os seguintes :

Árvore a-1 : Não pôde ser feita contagem alguma dos cromosômios, mas o número de microsporos de cada microsporocito foi, com

(*) Nesta publicação "n" (=x) foi usado exclusivamente para designar um genômio, não para distinguir entre as condições reduzida (n) e somática (2n).

(**) M, A e T representam, respectivamente, metáfase, anáfase e telófase.

raras exceções, **quatro**, e o pólen era de côr normal e de tamanho uniforme.

Árvore b-1 : O número exato de cromosômios nas diferentes fases da divisão dos microsporocitos apenas pôde ser determinado num limitado número de casos, uma vez que não era possível distinguir nitidamente entre cromosômios uni- bi- e multivalentes. Durante a M I puderam ser observados 14 a 18 bivalentes (aparentes), supondo-se existir grupos multivalentes, quando se contavam menos de 18 ; na A I vários agrupamentos, dois em cada célula, de 16 a 17 univalentes (aparentes) puderam ser observados ; nesta fase, bem como em T I encontraram-se, às vêzes, alguns "laggards" ; numa configuração M II, duas placas de, aproximadamente, 14 univalentes foram observadas, notando-se a existência de vários "laggards" distribuídos pelo citoplasma ; em vários agrupamentos de A II observaram-se 17 a 18 cromosômios ; em duas destas fases, contudo, foram achados grupos de, somente, 9 cromosômios. Apenas 70% de 200 microsporocitos examinados originaram quatro microsporos normais, 0,5% originando **três**, 21,5% **cinco** e 8% **seis** microsporos. Os grãos de pólen maduros eram de vários tamanhos.

Árvore b-4 : Várias contagens em M I mostraram 9 bivalentes (aparentes), dois grupos duvidosos de 9 univalentes em A I, e 9 univalentes em M II e A II. Contudo, em duas primeiras metáfases, aproximadamente, 18 supostos bivalentes foram contados. Dos microsporocitos examinados, 87% deram origem a 4 microsporos e 13% a 5 microsporos ; os grãos de pólen eram uniformes em tamanho, talvez um pouco mais variável do que os da árvore a-1.

As tétrades normais encontradas na árvore a-1 indicam que ela provavelmente apenas produz microsporocitos normais diplóides. Os microsporocitos da árvore **b-1** aparentam ser tetraplóides, contudo duas contagens sugerem a possibilidade de que uma pequena parte desta árvore produz microsporocitos diplóides. Os resultados concernentes à árvore b-4 são muito escassos para se tirar uma conclusão definitiva referente à constituição citológica dos seus microsporocitos. Apesar de se tornar muitas vêzes impossível, principalmente em preparações de carmim-acético, determinar a valência dos cromosômios metafásicos de *Citrus*, parece provável que, pelo menos, parte dos microsporocitos da árvore **b-4** seja diplóide. Duas contagens de cromosômios e 13% das contagens de microsporos, entretanto, sugerem tetraploidia. Devemos ter em conta que o número de botões examinados e de contagens de cromosômios efetuadas foi reduzido, em virtude de os tetraplóides de *Citrus* florescerem, em geral, menos que os diplóides. Por êsse motivo,

as contagens de cromosômios não devem ser consideradas suficientes para desprezar as provas histológicas de que, pelo menos, parte da segunda camada geratriz hipodermal é tetraplóide na árvore b-4. Evidentemente, esta árvore, como aconteceu para o galho mutante do qual se originou, não possui camadas geratrizes idênticas em tôdas as suas partes. A existência de diferenças genéticas (citológicas) numa mesma camada geratriz, aqui verificada, está de acôrdo com a acentuada variabilidade de outras formas de *Citrus* conhecidas como sendo quimeras periclinais. Por exemplo, a famosa "bizarria" descrita por Nati, há 300 anos atrás, que se originou no ponto de união de um enxerto entre cidra e laranja azêda, produz, muitas vêzes, frutos inteiros ou setores em que uma das espécies, das quais se compõe a quimera, se acha inteiramente ausente.

TAMANHO DOS ESTOMAS

Por meio de uma ocular micrométrica foram feitas medições da área dos estomas sob pequeno aumento; para êste fim prepararam-se cortes, à mão livre, da epiderme inferior, sendo dois de cada lado da nervura principal, no setor central de 10 fôlhas, colhidas ao acaso, da face sul das 3 árvores enxertadas, fixando-as, a seguir, numa solução de formalina, ácido acético e álcool 50% (5-5-90); as secções foram analisadas sem colorí-las; de cada fôlha mediram-se 20 estomas, cêrca de 5 de cada secção, perfazendo, assim, um total de 200 para cada árvore. A área de cada estoma foi calculada, multiplicando-se o produto comprimento x largura da área ocupada pelas duas células protetoras por $\pi/4$, julgando-se que esta área tenha a forma de uma elipse. A variância "entre" e "dentro" das fôlhas foi calculada para cada árvore, usando-se para a interpretação dos resultados obtidos a tabela de ϑ de Brieger (3). Esta análise revelou que as varianças encontradas não apresentaram diferenças significantes. Em consequência disso, a variabilidade total da área dos estomas de cada árvore foi utilizada para estimativa do êrro "standard" da média geral da área de estomas. As médias e os seus erros "standard" se acham reunidos no quadro IV.

QUADRO IV

ÁREA MÉDIA DOS ESTOMAS EM UNIDADES DA OCULAR MICROMÉTRICA (*)

ÁRVORE	N.º DE ESTOMAS	ÁREA EM UNIDADES QUADRADAS		
		Médias	Diferenças	Dif./E. S.
a-1	200	94.42±1.09		
b-1	200	106.38±0.97	11.96	8,19(**)
b-4	200	93.76±0.87	0.66	0.47(***)

Apesar do fato de a análise estatística acima revelar diferenças significantes entre as médias dos estomas das árvores a-1 e b-1 e também entre as plantas b-1 e b-4, conclue-se que estas diferenças devem ser atribuídas a algum fator do meio ambiente, e não à duplicação do número de cromosômios, porquanto elas não estão de acôrdo com as contagens de cromosômios efetuadas na epiderme de primórdios de fôlhas, como será demonstrado mais adiante, e que revelaram que esta camada celular é **diploide** para tôdas as três árvores; elas também estão em desacôrdo com as observações sôbre a espessura das células da epiderme de fôlhas maduras, que é igual nas três árvores. Investigações feitas no Instituto Agrônômico (12) revelaram que as diferenças entre as áreas médias dos estomas entre formas diploides e tetraploides de *Citrus*, tendo-se derivado estas daquelas pela duplicação dos cromosômios, são cêrca de 4 vêzes maiores do que as encontradas entre os pés a-1 e b-1 (quadro IV).

PRIMÓRDIOS DAS FÔLHAS

O material colhido e seccionado permitiu o estudo histológico e a determinação do número de cromosômios em diferentes camadas celulares não sômente em primórdios muito novos de fôlhas, como também em fases mais adiantadas, quando a lâmina foliar já se achava parcialmente desenvolvida. Primórdios muito novos de fôlhas apareceram,

(*) A área dos estomas em microns quadrados pode ser obtida multiplicando-se esta média por 2,89, porquanto cada unidade da ocular micrométrica corresponde a 1,7 microns.

(**) A diferença entre as médias de a-1 e b-1 é altamente significativa.

(***) A diferença entre as médias de a-1 e b-4 não é significativa. A diferença entre as médias de b-1 e b-4 é também muito significativa (Dif./E. S. = 9,71) ($t=2,60$ para $n=200$ e $P=0,01$).

nos cortes transversais, em forma de discos, sendo apenas constituídas por algumas camadas, mais ou menos concêntricas, de células. Um pouco mais tarde, aparecem duas protuberâncias, uma de cada lado, que dão origem à lâmina da folha. Neste estágio, o sistema vascular da nervura central inicia o seu desenvolvimento; em alguns cortes transversais também puderam ser observadas zonas do procâmbio da lâmina, que se acham ligadas com o tecido vascular da nervura central. A diferenciação dos tecidos esponjoso e paliçádico ocorre bem mais tarde.

As seguintes diferenças foram notadas nos cortes das três árvores examinadas :

a-1 (figs. 6a. e 7a.) — Em secções transversais circulares, as células da epiderme são, aproximadamente, do mesmo tamanho que as internas. Em estágios mais adiantados, devido ao fato de a epiderme se transformar numa camada mais bem organizada, as células geralmente se tornam um pouco mais compridas em direção radial, aparecendo, então, um pouco menores que as demais. As células do tecido parenquimatoso do lado dorsal da nervura central se tornam bem maiores que as da epiderme. As células do procâmbio, em secções transversais da lâmina, são estreitas e alongadas, contendo citoplasma fortemente colorido. No material de **a-1**, como era esperado, encontraram-se $2n=18$ em tôdas as camadas examinadas.

b-1 (figs. 6b e 7b) — O desenvolvimento dos primórdios das folhas é, naturalmente, idêntico ao verificado para **a-1**; as diferenças, entretanto, no tamanho das células, são as seguintes: a sub-epiderme e camadas adjacentes são formadas por células, as quais, desde o início, se apresentam bem maiores do que as células da epiderme; esta diferença se torna ainda mais evidente quando se compara a epiderme com o tecido parenquimatoso adjacente na face dorsal da nervura central de folhas um pouco mais velhas; a diferença do tamanho é aqui bem mais notável do que na árvore **a-1**. As células do procâmbio, pelo contrário, não parecem diferir, em tamanho, daquelas examinadas no pé **a-1**. Extensas investigações com a finalidade de determinar o número de cromossômios nas diferentes camadas celulares destes cortes transversais revelaram que a epiderme é diplóide ($2n=18$), a sub-epiderme e camadas adjacentes são tetraplóides ($4n=36$) e as células do procâmbio também tetraplóides ($4n=36$).

b-4 (figs. 6c, 7c e 8a, b) — Após cuidadoso exame chegou-se à conclusão de que não existem diferenças apreciáveis quanto ao tamanho e à estrutura das células dos primórdios das folhas entre os pés **b-4** e



Fig. 4

Cromosômios metafásicos em ponta de raiz de uma estaca procedente da árvore a-1 ($2n = 18$) x 3.900.

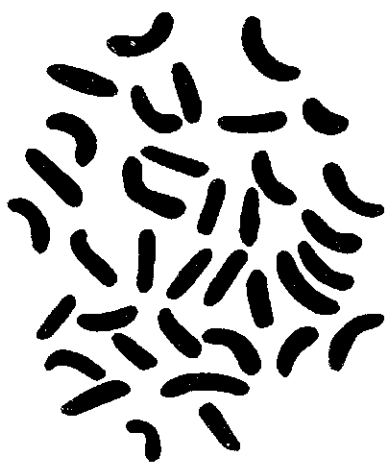
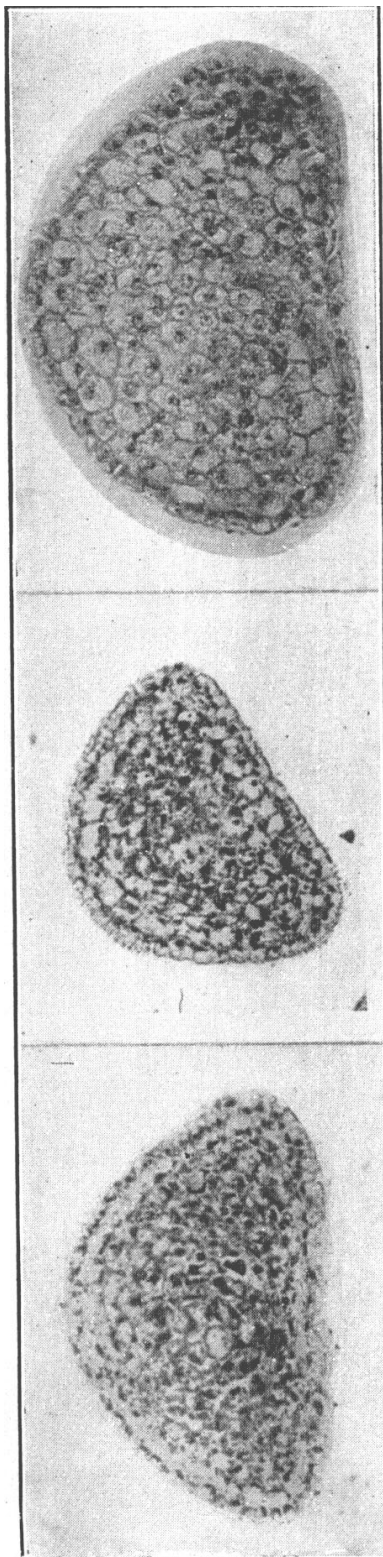


Fig. 5

Cromosômios metafásicos em ponta de raiz de uma estaca procedente da árvore b-1 ($4n = 36$) x 3.900.



a - da árvore a-1 b - da árvore b-1 c - da árvore b-4
Fig. 6 - Seções transversais de primórdios de folhas (x 200).

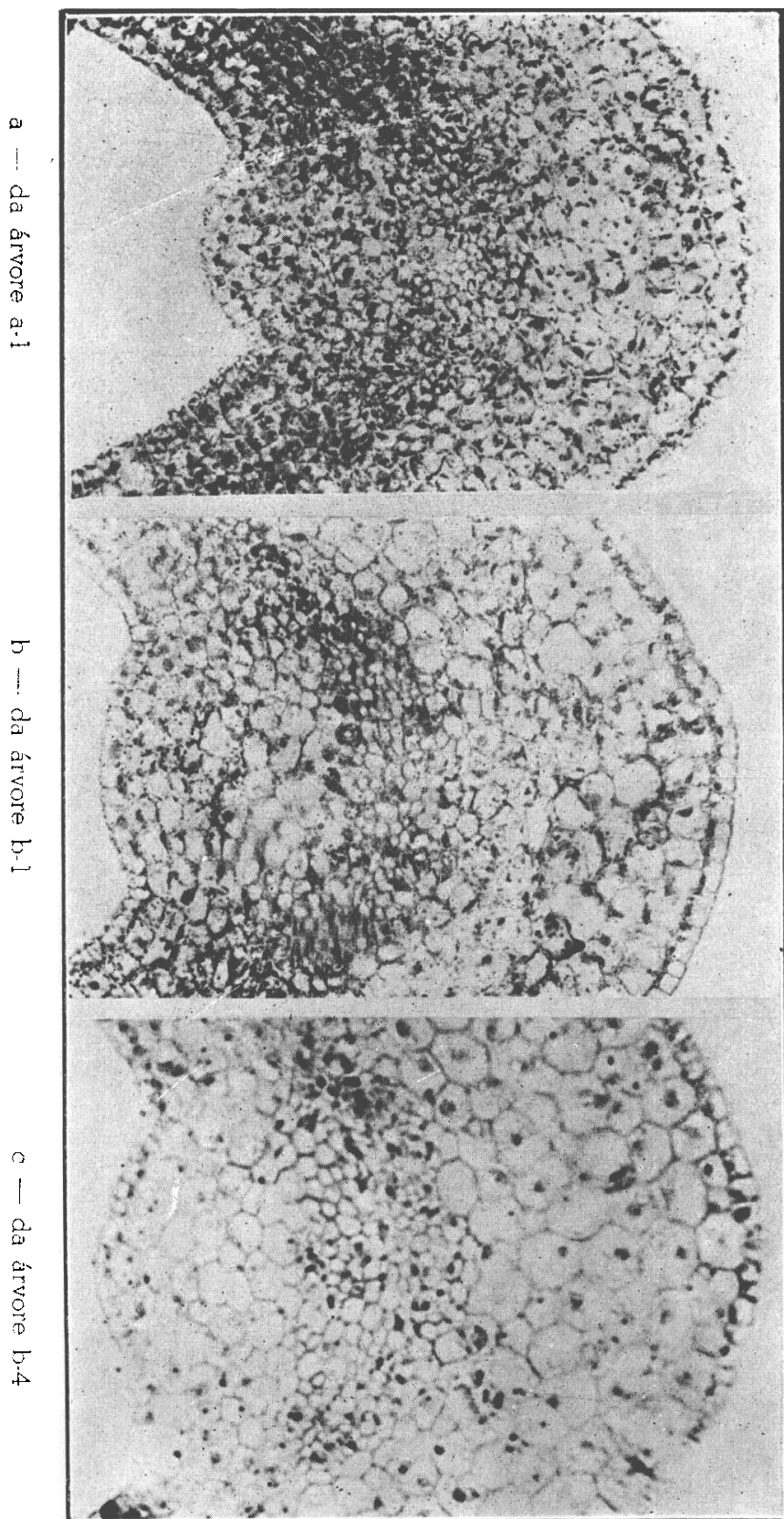
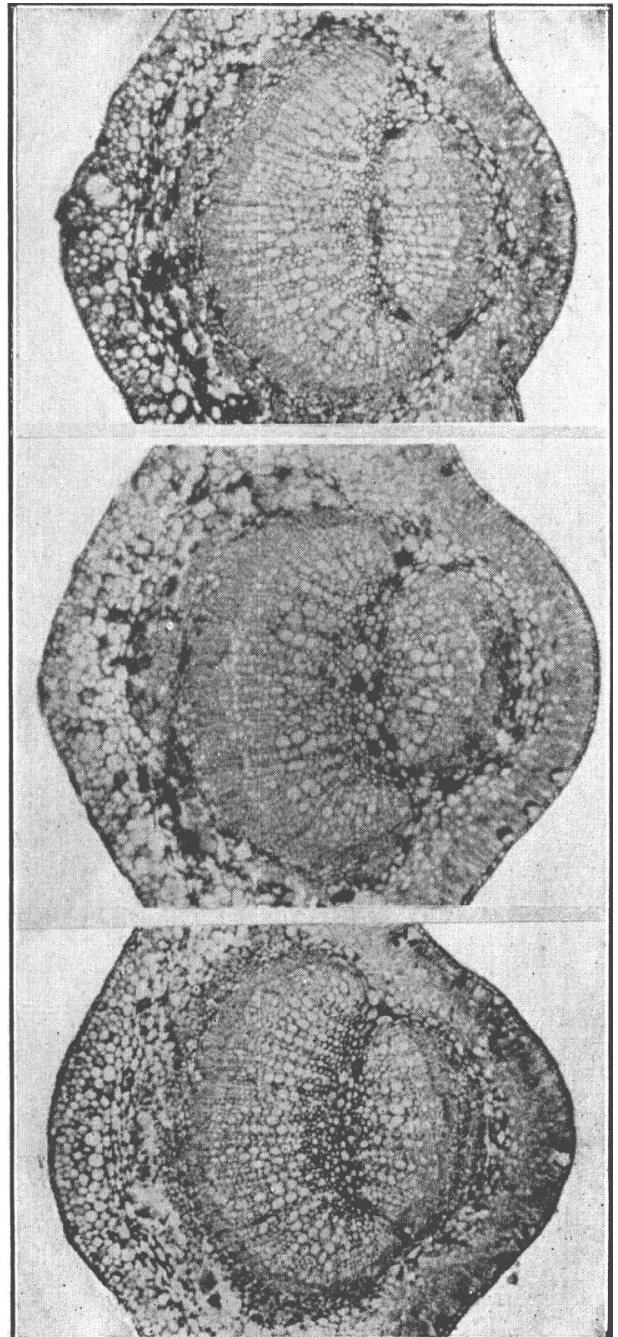


Fig. 7 Seções transversais da região da nervura central de folhas novas (x 200).



a -- $4n=36$ no procâmbio da lâmina da fôlha b -- $4n=36$ no procâmbio da região da nervura central

Fig. 8 -- Células do procâmbio de fôlhas novas da árvore b-4 (x 1.000).

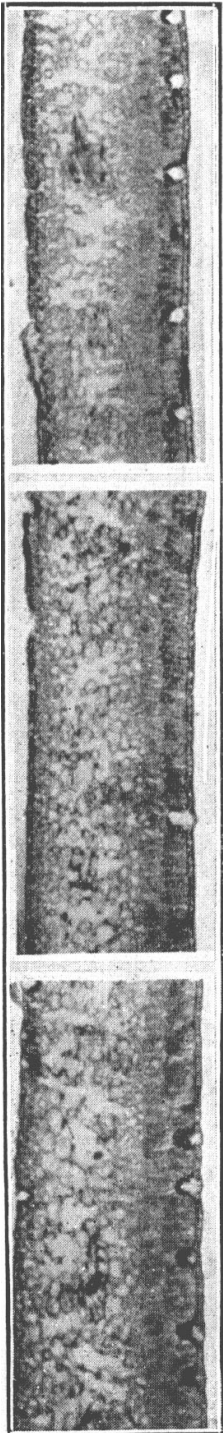


a ... da árvore a-1

b ... da árvore b-1

c ... da árvore b-4

Fig. 9. ... Seções transversais da região da nervura central de folhas maduras (x 50).



a ... da árvore a-1

b ... da árvore b-1

c ... da árvore b-4

Fig. 10. ... Cortes transversais de lâminas de folhas maduras (x 50).

Fig. 11a

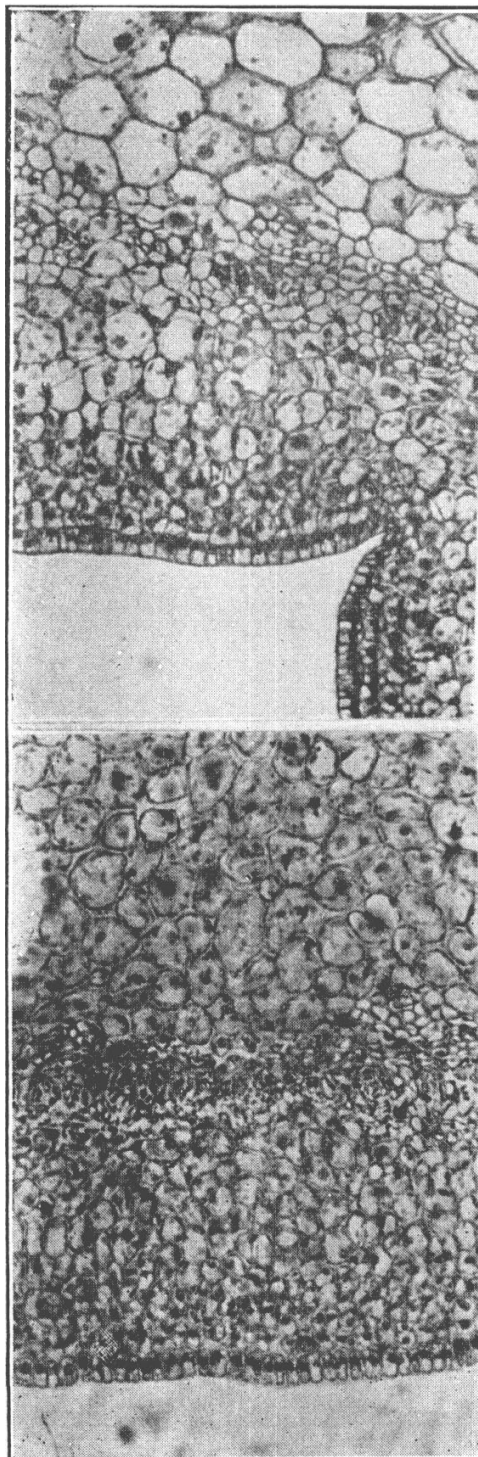


Fig. 11b

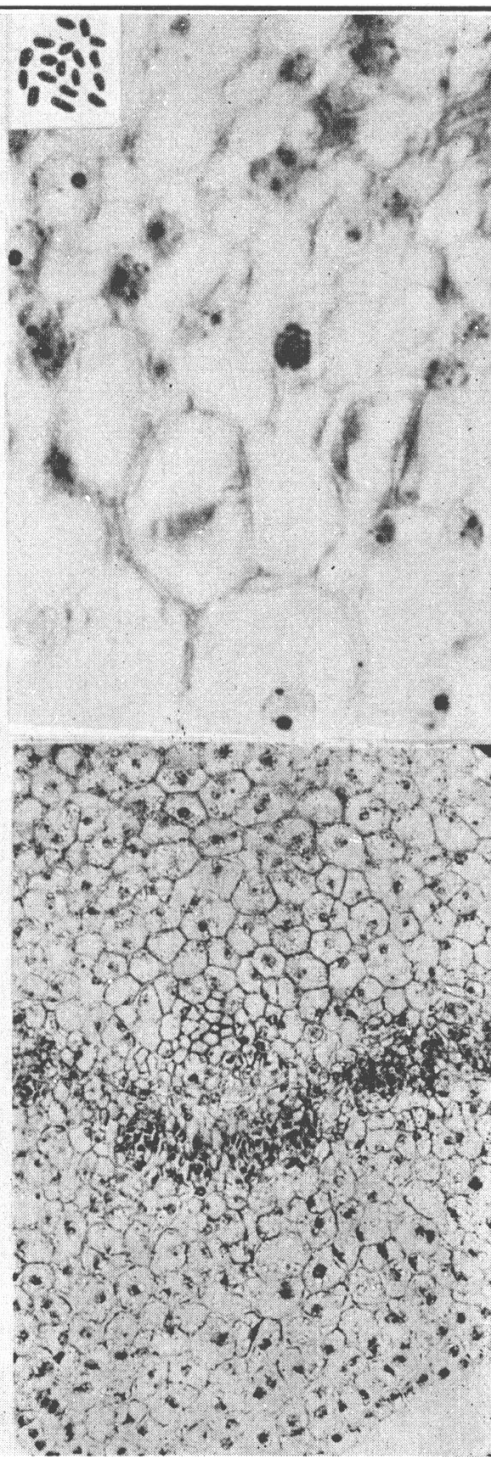


Fig. 11c

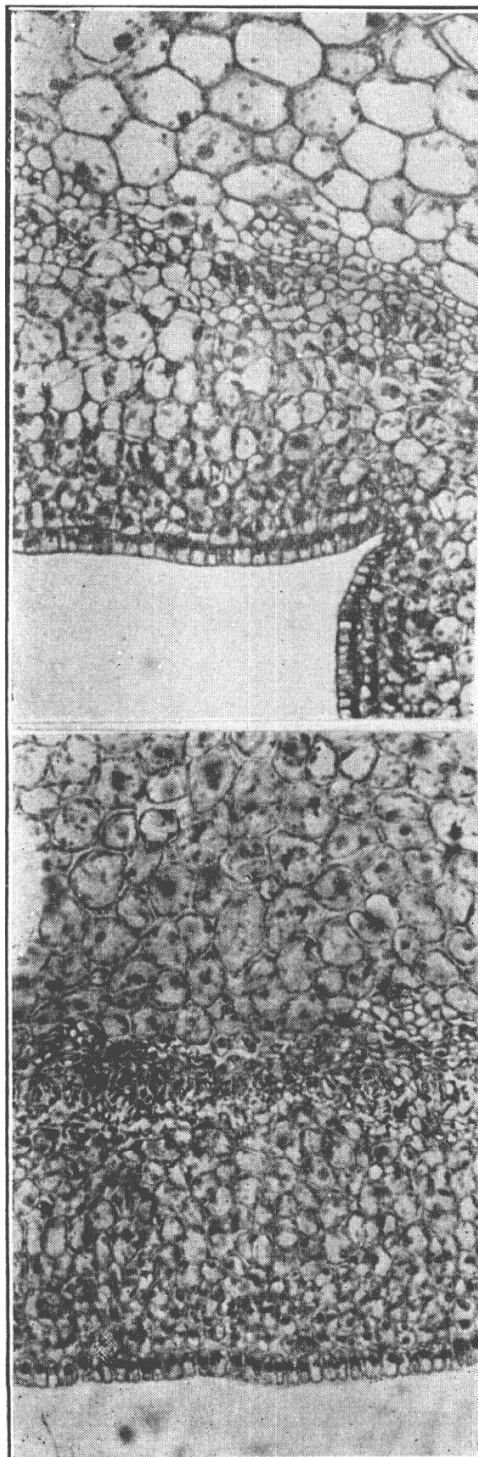


Fig. 12

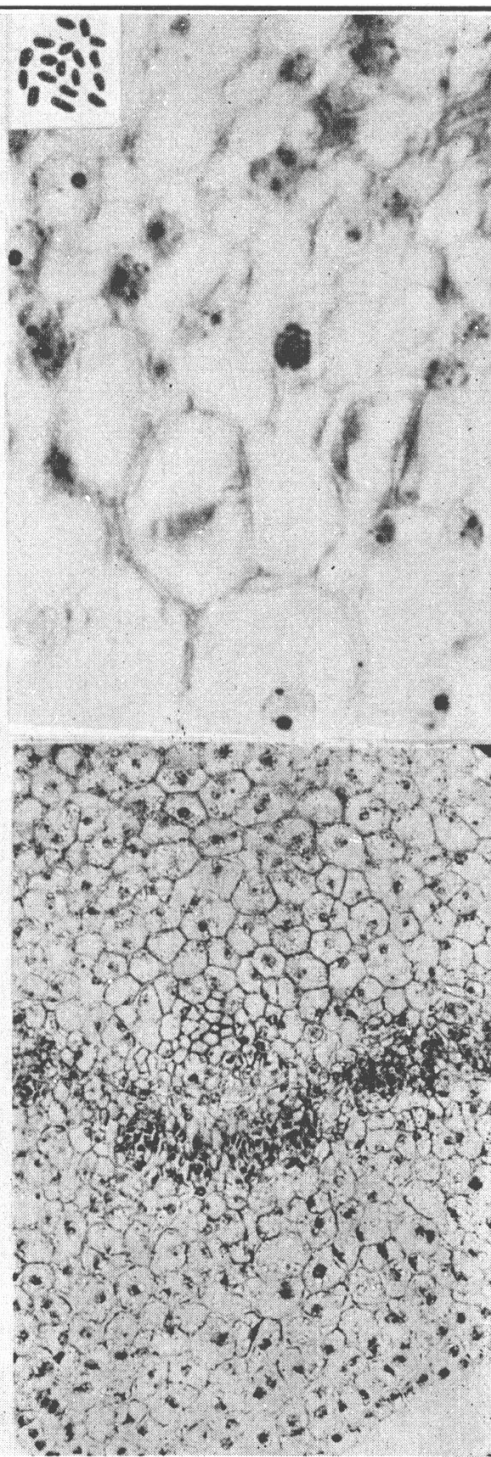


Fig. 11 — Cortes transversais de extremidades de ramos novos (x 200).

a — da árvore a-1 b — da árvore b-1 c — da árvore b-4

Fig. 12 — Setor da medula e do procâmbio de um ramo novo da árvore b-4; $2n = 18$ (x 1.000).

b-1; a constituição cromossômica das diversas camadas de células foi a mesma, isto é, $2n = 18$ na epiderme; as camadas adjacentes e o procâmbio são tetraplóides ($4n = 36$).

Fôlhas maduras (figs. 9a, b, c e 10a, b, c)

O estudo de cortes transversais efetuados através da porção central de fôlhas maduras, inclusive a nervura central e partes da lâmina, revelou os seguintes dados: a epiderme é constituída por células de, aproximadamente, mesmo tamanho nas três árvores, a-1, b-1 e b-4; o parênquima do tecido paliçádico é notadamente mais largo em b-1 e b-4 do que em a-1, sendo as suas células, em média, mais compridas e largas nos dois primeiros; o parênquima esponjoso ocupa maior espaço e suas células são maiores em b-1 e b-4 do que em a-1. Na região da nervura central, o tecido parenquimatoso, paliçádico e esponjoso, é bem mais desenvolvido em b-1 e b-4 do que em a-1; no tecido vascular, os vasos, as traquéias, etc., apresentam, aparentemente, um diâmetro maior em b-1 e b-4 do que em a-1. Não foi possível notar quaisquer diferenças no tamanho das células entre o material examinado dos pés b-1 e b-4.

Ramos novos (figs. 11a, b, c e 12).

Examinaram-se, ainda, cortes transversais das extremidades de ramos novos. As células da epiderme foram encontradas como apresentando o mesmo tamanho nas três plantas examinadas a-1, b-1 e b-4. O córtex é constituído por células maiores nos pés b-1 e b-4 do que em a-1. Nestes brotos novos não puderam ser encontradas diferenças quanto ao tamanho das células do procâmbio e do tecido vascular, cujo desenvolvimento se inicia nesta região. Em material procedente dos pés a-1 e b-1 notou-se uma considerável diferença no tamanho entre as células da medula e do córtex, tendo a primeira células de tamanho quase o dobro que este último; no pé b-4, entretanto, a diferença do tamanho das células destas duas regiões era insignificante, sendo tôdas as células, aproximadamente, do mesmo tamanho. As seguintes contagens de cromossômios foram efetuadas: a epiderme era diplóide para os três pés, como era esperado; as células parenquimatosas do córtex eram tetraplóides para b-1 e b-4, sendo diplóides apenas para a-1; o procâmbio e as células da medula dos pés a-1 e b-4 eram diplóides, sendo estes tecidos tetraplóides apenas para b-1.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os resultados das investigações atrás relatadas indicam que o galho original mutante, encontrado em um dos enxertos derivados de uma tangerina híbrida (King x Dancy), deve os seus caracteres especiais à

duplicação somática dos cromosômios e produziu gemas de, pelo menos, dois tipos de constituição citológica. Ambos são quimeras periclinais e, considerando-se que três camadas geratrizes tomam parte no desenvolvimento do brôto vegetativo em *Citrus*, como ocorre em *Datura* (1, 2, 18, 19), tais quimeras são da seguinte constituição: uma é $2n-4n-4n$, respectivamente para a primeira, segunda e terceira camada geratriz, dando origem à planta b-1; outra, produzindo a árvore b-4, é de constituição $2n-4n-2n$ para as mesmas camadas. Não se poderá determinar em que época se processou esta duplicação: se numa gema da planta híbrida original, ou, ainda antes, durante a sua ontogenia; também não é possível saber-se de que maneira ocorreu a diferenciação entre estas duas quimeras.

As contagens de cromosômios para a planta b-4 indicam que ela produz alguns microsporocitos diplóides; existem, também, indicações de que apenas uma pequena parte da segunda camada geratriz desta árvore mudou para a condição diplóide.

Com base na constituição citológica destas duas quimeras, podem ser apresentadas as seguintes considerações: a primeira camada geratriz apenas toma parte na formação da epiderme; diferenças no tamanho dos estomas entre os dois indivíduos, apesar de serem de significação estatística, não representam sempre uma indicação da existência de diferenças do número de cromosômios na epiderme. Por êsse motivo devemos tomar cuidado ao fazer deduções quanto à constituição cromossômica desta camada, baseando-nos apenas no tamanho dos seus estomas.

A segunda camada geratriz é responsável pela formação do tecido interno da fôlha, inclusive o procâmbio e o tecido vascular, como foi claramente demonstrado por contagens de cromosômios no procâmbio de primórdios das fôlhas da planta b-4, cuja segunda camada geratriz apenas é tetraplóide.

A semelhança na grossura e na forma das fôlhas, esta última revelada pelos respectivos índices (tabela 1 e 2), constitue uma segunda prova de que a constituição citológica das fôlhas das plantas b-1 e b-4 é idêntica. Êste fato não está de acôrdo com as conclusões de Satina e Blakeslee (19), porquanto no gênero *Datura* o tecido vascular das fôlhas é derivado da terceira camada.

O fato de as fôlhas destas quimeras serem idênticas e se assemelharem muito às fôlhas de plantas tetraplóides puras, apesar de possuírem uma epiderme diplóide, constitue uma indicação do papel preponderante que a segunda camada geratriz exerce na formação das fôlhas de *Citrus*.

As camadas de células, localizadas abaixo da epiderme em ramos novos (córtex), também são derivadas da segunda camada. Como acontece com outras plantas, esta camada é responsável pela formação dos microsporo-citos. Como é ela tetraplóide nas duas quimeras em questão, torna-se responsável pela falta relativa de frutificação, característica das formas cítricas tetraplóides.

Todos os tecidos derivados do procâmbio e mais tarde do câmbio do caule e também sua medula se originam da terceira camada geratriz. O fato de ser esta camada diplóide numa das quimeras (b-4) e tetraplóide na outra (b-1) provavelmente constitui a explicação por que essas duas árvores tanto diferem no seu hábito de crescimento; b-4 sendo alta e ereta e mais ou menos idêntica no seu formato à planta a-1, b-1, pelo contrário, é curta e de copa larga. Se esta hipótese for confirmada, poder-se-á concluir que a terceira camada geratriz tem um papel importante na determinação do hábito de crescimento das árvores. Contagens de cromossomos, em pontas de raízes de estacas das duas quimeras, provaram que as raízes que se desenvolvem de um calo são sempre derivadas da terceira camada geratriz. Observou-se, também, que o calo, na base das estacas, se desenvolve abaixo da casca e parece originar-se somente do câmbio fascicular.

Verificou-se que a largura das folhas é mais estreita, nas duas quimeras em questão, do que em 11 formas cítricas, provavelmente tetraplóides puras, que têm sido estudadas na Citrus Experiment Station; esta diferença talvez possa ser atribuída à natureza diplóide da epiderme dessas quimeras.

Na árvore b-4, como já foi dito atrás, o tecido vascular das folhas é tetraplóide, sendo, porém, diplóide, o tecido correspondente no caule. Considerando-se que, de acordo com vários investigadores, as células procambiais nos primórdios das folhas se diferenciam em duas direções — para cima em direção ao ápice da folha e para baixo em direção ao ápice do brôto — para formar os traços foliares verticais, poder-se-á concluir que, na árvore b-4, os vasos das folhas tetraplóides provavelmente se unem com os vasos diplóides do caule na região da inserção do pecíolo.

Uma vez que ambas as quimeras se originaram pela duplicação somática natural dos cromossomos, e considerando-se ainda que elas não podem ser facilmente distinguidas, pelos seus caracteres morfológicos, dos tetraplóides puros, conclue-se que bastante cuidado deve ser tomado na separação de "seedlings" tetraplóides de *Citrus* destinados às investigações citogenéticas e aos trabalhos de melhoramento.

A evidência, entretanto, indica que árvores tetraplóides parciais são provavelmente muito raras.

Há necessidade de serem efetuados novos estudos sobre as camadas geratrizes em *Citrus*, principalmente com referência à provável existência de apenas duas camadas geratrizes responsáveis pela ontogenia da folha, como indicam as investigações atrás. Compete ainda determinar qual a função destas camadas geratrizes na formação do pistilo e do fruto, estruturas tão complexas sob o ponto de vista morfológico. Não é fácil explicar como apenas duas camadas geratrizes podem existir em folhas como aquelas encontradas, por Shamel (21), no limão variegado, considerando-se que essas folhas possuem uma margem branca, uma parte interna variegada, devendo, portanto, possuir em sua epiderme dois tipos genéticos diversos (9).

SUMÁRIO

A investigação atrás relatada trata da natureza citológica de um mutante somático que se originou num enxerto de tangerina híbrida (King x Dancy). Do ramo mutante obtiveram-se vários enxertos que foram comparados com outros enxertos procedentes da parte normal da árvore. Os resultados de uma detalhada investigação indicam que os enxertos procedentes de ramo mutado se compõem, no mínimo, de dois tipos de constituição quimérica: um é $2n-4n-4n$, respectivamente, para a primeira, segunda e terceira camada geratriz, e outro $2n-4n-2n$, para as mesmas camadas.

Admitindo-se a existência de 3 camadas geratrizes em *Citrus*, demonstrou-se que a primeira camada geratriz forma a epiderme, a segunda todo o tecido das folhas (com exceção da epiderme), os microsporocitos e, no mínimo, uma parte do córtex de brotos vegetativos novos, e a terceira o procâmbio, câmbio e a medula do caule. As contagens do número de cromosômios em pontas de raízes de estacas dessas duas quimeras demonstraram que tais raízes, pelo menos, quando se derivam de um calo, têm origem na terceira camada geratriz. Comparações do tamanho de estomas de folhas maduras, de diferentes plantas, indicam que as diferenças de tamanho, mesmo quando estatisticamente significantes, não são sempre relacionadas com diferenças no número de cromosômios na epiderme. Os enxertos destas duas quimeras diferem consideravelmente no seu hábito de crescimento; os que possuem uma terceira camada geratriz diplóide têm um hábito de crescimento normal (ereto), possuindo os outros uma terceira camada tetraplóide,

sendo baixos e de copa larga. Êste fato sugere que a terceira camada exerce um papel considerável na determinação do hábito de crescimento das árvores. Ambas as quimeras são pouco produtivas, o que é típico para os tetraplóides de *Citrus*.

AGRADECIMENTOS

Os autores desejam expressar os seus agradecimentos ao sr. A. J. T. Mendes, pelo auxílio que lhes prestou durante o estudo final dos cortes transversais de fôlhas e ramos e também durante a preparação das microfotografias.

S U M M A R Y

The present investigation deals with the cytological nature of a bud variant which originated on a progeny tree of a hybrid mandarin (King x Dancy). From the variant branch several progeny trees were grown in comparison with others derived from the normal part of the tree. The results of extensive investigation indicate that the budded progeny of the variant branch includes at least two types of chimeral constitution: one is $2n-4n-4n$ respectively for its first, second, and third germ layers, and the other is $2n-4n-2n$ for the same layers.

On the assumption that three germ layers exist in *Citrus*, it was demonstrated that the first germ layer forms the epidermis, the second one all leaf tissues (with the exception of the epidermis), the microsporocytes and at least part of the cortex of young vegetative shoots, and the third one forms the procambium, cambium, and the pith of the stem. Determination of chromosome number in root tips of cuttings of these two chimeras, demonstrated that these roots, at least when they derive from a callus, have their origin in the third germ layer. Comparison of stomata of mature leaves of different plants indicates that size differences, even if they are of statistical significance, are not always due to differences in chromosome number in the epidermis. The progeny trees of these chimeras differ considerably in growth habit, the one with a diploid third germ layer being approximately normal (erect), the other with a tetraploid third layer being low and broad. This fact suggests that the third layer plays a considerable role in determining the growth habit of the trees. Both chimeras are rather unfruitful, which is typical for *Citrus* tetraploids.

LITERATURA CITADA

1. Blakeslee, A. F., A. D. Bergner, S. Satina e E. W. Sinnott. Induction of periclinal chimeras in *Datura stramonium* by colchicine treatment. *Science* 89 : 402. 1939.
2. Blakeslee, A. F. Effects of induced polyploidy in plants. *Amer. Nat.* 75 : 117-135. 1941.
3. Brieger, F. G. Tábuas e fórmulas para estatística. *Comp. Melhoramentos*, S. Paulo. 1937.
4. Foster, A. S. Leaf differentiation in angiosperms. *Bot. Rev.* 2 (7) : 349-372. 1936.
5. Foster, A. S. Problems of structure, growth and evolution in the shoot apex of seed plants. *Bot. Rev.* 5 : 454-470. 1939.
6. Frost, H. B. Tetraploidy in *Citrus*. *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.* 11 : 535-537. 1925.

7. **Frost, H. B.** Polyembryony, heterozygosis, and chimeras in *Citrus*. *Hilgardia* 1 : 365-402. 1926.
8. **Frost, H. B.** The genetics and cytology of *Citrus*. *Current Science*, Special Number on "Genetics". 1938.
9. **Frost, H. B.** Genetics and breeding. Chap. 9 in Webber, H. J., et al., *The Citrus Industry*, Vol. I. 1943.
0. **Goulden, C. H.** *Methods of statistical analysis*. 277 pp. New York : John Wiley and Sons. 1939.
1. **Johansen, D. A.** *Plant microtechnique*. 523 pp. New York and London : McGraw-Hill. 1940.
2. **Krug, C. A. e O. Bacchi.** Observações citológicas em *Citrus*. V. Poliploidia em relação à densidade e ao tamanho dos estomas em *Citrus* e outros gêneros das *Aurantioideæ*. *Bragantia* 4 : 429-448, fig. 1, gráf. 1-3. 1944.
3. **Lapin, W. K.** Investigations on polyploidy in *Citrus*. (In Russian, English summary). U.S.S.R. All-Union Sci. Res. Inst. Humid Subtropics Works 1 (4) : 1-68. 1937.
4. **Nakamura, M.** Cytological studies in the genus *Citrus*. I. On the Wase Satsuma originated through bud variation. (Japonês, Sumário em inglês). Tanaka Citrus Expt. Sta., Japan. *Studia Citrologica* 3 : 1-14. 1929.
5. **Oppenheim, J. D.** On the origin of the "Jaffa Orange". *Hadar* 2 : 31-33. 1929.
6. **Oppenheim, J. D. e O. H. Frankel.** Investigations into the fertilization of the "Jaffa Orange". I. *Genetica* 11 : 369-374. 1929.
7. **Randolph, L. F.** A new fixing fluid and a revised schedule for the paraffin method in plant cytology. *Stain Tech.* 10 : 85-86. 1935.
8. **Satina, S., A. F. Blakeslee e A. G. Avery.** Demonstration of the three germ layers in the shoot apex of *Datura* by means of induced polyploidy in periclinal chimeras. *Amer. J. Bot.* 27 : 895-905. 1940.
9. **Satina, S. e A. F. Blakeslee.** Periclinal chimeras in *Datura stramonium* in relation to development of leaf and flower. *Amer. J. Bot.* 28 : 862-871. 1941.
0. **Schmidt, A.** Histologische Studien an phanerogamen Vegetationspunkten. *Bot. Arch.* 8 : 345-404. 1924.
1. **Shamel, A. D.** A pink-fruited lemon. *J. Hered.* 23 : 23-27. 1932.
2. **Shamel, A. D., C. S. Pomeroy e R. E. Caryl.** Bud selection in the Washington Navel orange. Progeny tests of the Thomson, Washington, Corrugated and Golden Buckeye strains originating as limb variations on a single tree. *J. Hered.* 16 : 232-241. 1925.
3. **Shamel, A. D., C. S. Pomeroy e R. E. Caryl.** Bud selection in Eureka and Lisbon lemons and progeny tests of bud variations. U. S. Dept. Agric. Tech. Bull. 531 : 1-43. 1936.
4. **Tanaka, Tyôzaburô.** A monograph of the Satsuma orange, with special reference to the occurrence of new varieties through bud variation. *Mem. Taihoku Imp. Univ. Faculty Sci. and Agric.* 4 : 1-626. 1932.
5. **White, O. E.** Swingle on variation in F1 *Citrus* hybrids and the theory of zygotaxis. *Amer. Nat.* 48 : 185-192. 1914.