

BRAGANTIA

Boletim Técnico da Divisão de Experimentação e Pesquisas
INSTITUTO AGRONÔMICO

Vol. 4

Campinas, Julho de 1944

N.º 7

OBSERVAÇÕES CITOLÓGICAS EM CITRUS

II. Variedades triplóides (*)

C. A. Krug

Oswaldo Bacchi

INTRODUÇÃO

As Secções de Citricultura, Genética e Citologia do Instituto Agronômico, a Estação Experimental de Limeira do mesmo Instituto e a Cadeira de Cito-Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" elaboraram, em 1937, um programa de investigações com *Citrus*, que compreende numerosas pesquisas sôbre taxonomia, fisiologia, citologia, genética e melhoramento.

Como parte do programa a ser executado pela Secção de Citologia foi decidido fazer-se um exame detalhado da constituição cromosômica de tôdas as espécies e variedades de *Citrus* existentes na coleção da Estação Experimental de Limeira. Em um trabalho preliminar, o segundo dos autores apresentou os resultados de uma parte destas determinações (1); como era esperado, a maioria das espécies e variedades examinadas têm $2n = 18$, sendo $x = 9$ o número básico dos cromosômios, para o gênero, o que está de acôrdo com as contagens anteriores realizadas por Frost (2), Longley (7), Kandelaki (5), Lapin (6) e Nakamura (11). Uma variedade, entretanto, a "Tahiti Lime", revelou ser triplóide ($2n = 27$) e uma outra, ainda não determinada, hipertriplóide ($2n = 28$). Na progênie desta última foram constatadas duas plantas, uma com 33 e outra com 21 cromosômios somáticos.

Na primavera de 1941 o primeiro dos autores fêz novas investigações citológicas na "Citrus Experiment Station" em Riverside, Califórnia, tendo encontrado mais uma variedade triplóide. Após a publi-

(*) Tradução do original publicado em "The Journal of Heredity" 34 (9) : 277-283. 1943.

cação do trabalho acima mencionado (1), foram levadas a efeito, no Instituto Agrônomo, várias outras determinações do número de cromossômios na progênie do triplóide e também investigações sobre a meiose do mesmo triplóide. No presente trabalho serão apresentadas tôdas as informações até agora existentes sobre esta forma poliplóide de *Citrus*.

TRIPLOIDIA E HIPERTRIPLOIDIA EM *CITRUS*

Revisão da literatura

Excetuando-se as constatações de Bacchi (1), a triploidia em *Citrus* somente tem sido encontrada em híbridos artificiais. O primeiro triplóide artificial em *Citrus* foi feito por Swingle, polinizando a *Fortunella Hindsii*, um "kumquat" tetraplóide (7) que é bastante produtivo e nativo nas montanhas do sudeste da China, com um "limequat" diplóide (*Citrus aurantifolia* x *Fortunella margarita*). Como se esperava, três híbridos resultantes dêste cruzamento foram encontrados por Longley (8) como sendo triplóides; êles são constituídos por plantas vigorosas, denominadas "procimequats", que, com apenas alguns anos de idade (16), já florescem e frutificam abundantemente. Longley esteve especialmente interessado na constituição citológica dêste híbrido e no comportamento dos seus cromossômios na meiose. Na primeira metáfase, foram geralmente encontrados 13 bivalentes e um univalente; outras vêzes os cromossômios se juntavam em grupos polivalentes, ou então um número maior de univalentes aparecia em diaquinese; muitas vêzes não era possível distinguir os cromossômios bivalentes dos trivalentes.

As tétrades eram, em geral, anormais, contendo freqüentemente cinco ou seis microsporos, sendo também anormal o pólen maduro. Frost (3) menciona a formação esporádica de híbridos triplóides, quando se cruzam variedades diplóides de *Citrus*, ocorrência que se explica pela duplicação do número de cromossômios, provavelmente durante a formação do nucelo. Trivalentes são usualmente formados na primeira divisão meiótica, juntamente com bivalentes e univalentes; devido a estas irregularidades, os microsporos de cada microsporocito são variáveis em tamanho e número.

Lapin (6) relata sobre a constituição citológica de 6524 "seedlings" de *Citrus* do seu projeto de hibridação, entre os quais se encontraram 118 poliplóides inclusive triplóides, tetraplóides, um hipertriplóide e um hexaplóide. O aparecimento de "seedlings" triplóides é explicado pela produção de grãos de pólen com $2n$ ou de células-ovo não reduzidas; no cruzamento *C. limon* x *C. paradisi* foram encontrados tri-

plóides numa percentagem de 6,67%. O hipertriplóide ($2n=28$) era um híbrido entre duas variedades de limão (*C. limon* x "Meyer Chinese Lemon"). É interessante notar que Luss (9) também relata a constatação de uma planta hipertriplóide, com 28 cromossomos somáticos, derivada de um cruzamento entre o "Novoafon lemon" e o "Meyer Chinese lemon", provavelmente o mesmo usado por Lapin (7) no seu trabalho de hibridação. Infelizmente, nada se conhece a respeito da constituição citológica deste "Chinese Lemon", usado como agente polinizador por ambos os autores.

No capítulo seguinte discutir-se-á detalhadamente a triploidia em *Citrus aurantifolia* Swingle.

DESCRIÇÃO DAS FORMAS CÍTRICAS TRIPLÓIDES

Citrus aurantifolia Swingle

De acôrdo com Hume (4) e Webber (21) esta espécie de *Citrus* compreende um grupo de plantas extremamente variáveis, principalmente com relação aos caracteres dos seus frutos. Inclue tipos com suco ácido e doce, podendo o primeiro dêles apresentar casca aderente ou solta. As limas verdadeiras somente são constituídas por algumas variedades do chamado grupo "Mexicano", que produzem frutos pequenos de casca amarela, com sementes, e suco ácido. Segue-se, em importância econômica, o grupo das limas de frutos grandes, no qual as variedades "Tahiti" e "Bearss" são mais conhecidas devido à falta de sementes e ainda por apresentarem diversos outros caracteres favoráveis.

A "Tahiti lime"

Origem e caracteres morfológicos gerais. Esta variedade foi descrita em detalhe por Hume (4) e Webber (21, 22, 23). Supõe-se ter sido originada de semente de limas comuns importadas pelos Estados Unidos, de Tahiti.

Na Estação Experimental de Limeira as árvores desta variedade, derivadas de plantas importadas dos Estados Unidos, possuem copas largas e relativamente baixas. A folhagem é abundante e verde-escura, possuindo as fôlhas pecíolos levemente alados; os espinhos são pequenos. A produtividade é satisfatória. As flores são normais, com a exceção de suas anteras brancas ou amareladas, que não são deiscentes, sendo completamente desprovidas de pólen (10, 19). Os frutos representados na fig. 1, típicos desta variedade, são ovais com um compri-

mento médio de cerca de 68 mm. Eles contêm muito suco, apresentam casca de cor amarela, típica dos limões, sendo persistente o estilo. Muitos frutos são completamente desprovidos de sementes; examinando-se um total de 100 frutos, na Estação Experimental de Limeira, apenas 34 sementes foram encontradas. Uma deficiência semelhante de sementes foi verificada por Moreira e Gurgel (10), ou seja uma média de 0,2 a 0,4 sementes por fruto.

Meiose e causa da falta de sementes. A falta de sementes nesta variedade tem sido discutida por diversos investigadores. Uphof (19) sugeriu que a falta de grãos de pólen e sacos embrionários normais é devida a uma desintegração precoce dos micro- e megasporocitos, que, aparentemente, não se dividem; ele comparou esta situação com aquela encontrada por Osawa (13) nas laranjas "Washington Navel" e "Satsuma" ("Unshiu mandarin"). Torres (17) também notou a falta de pólen nesta variedade e relacionou este fato com a falta de sementes, não tendo, entretanto, realizado estudos citológicos. Este autor (18) polinizou esta variedade com pólen de Limão Rugoso, não obtendo, porém, semente alguma. Moreira e Gurgel (10) também não conseguiram obter sementes viáveis pela hibridação do "Tahiti lime" e dizem que sementes provenientes de polinizações não controladas, não germinam. Nakamura (11, 12), que realizou extensas contagens de cromossomos no gênero *Citrus*, classificou o "Tahiti lime" como uma forma diplóide normal, afirmando que as células-mãe do grão de pólen degeneraram num estado precoce de desenvolvimento, como acontece na laranja "Washington Navel". Finalmente, Bacchi (1) foi o primeiro a demonstrar que esta variedade de *Citrus aurantifolia* Swingle é triplóide ($2n=27$) (Fig. 1). Ele emitiu a hipótese de que a constituição citológica pode ser responsável pela esterilidade masculina e feminina; não foram, entretanto, realizadas observações sobre a meiose.

Determinando o número de cromossomos de várias espécies e variedades de *Citrus*, na "Citrus Experiment Station" em Riverside, Califórnia, o primeiro dos autores confirmou os resultados de Bacchi, tendo constatado a condição triplóide do "Tahiti lime", em pontas de raízes de estacas de um exemplar típico desta variedade (C.E.S. 391; 3A-23-3) existente na coleção daquela Estação Experimental.

Estes resultados não concordam com as constatações de Nakamura (11), que classificou esta variedade como diplóide ($2n=18$), o que nos faz supor que a variedade por ele examinada não era um verdadeiro "Tahiti lime".

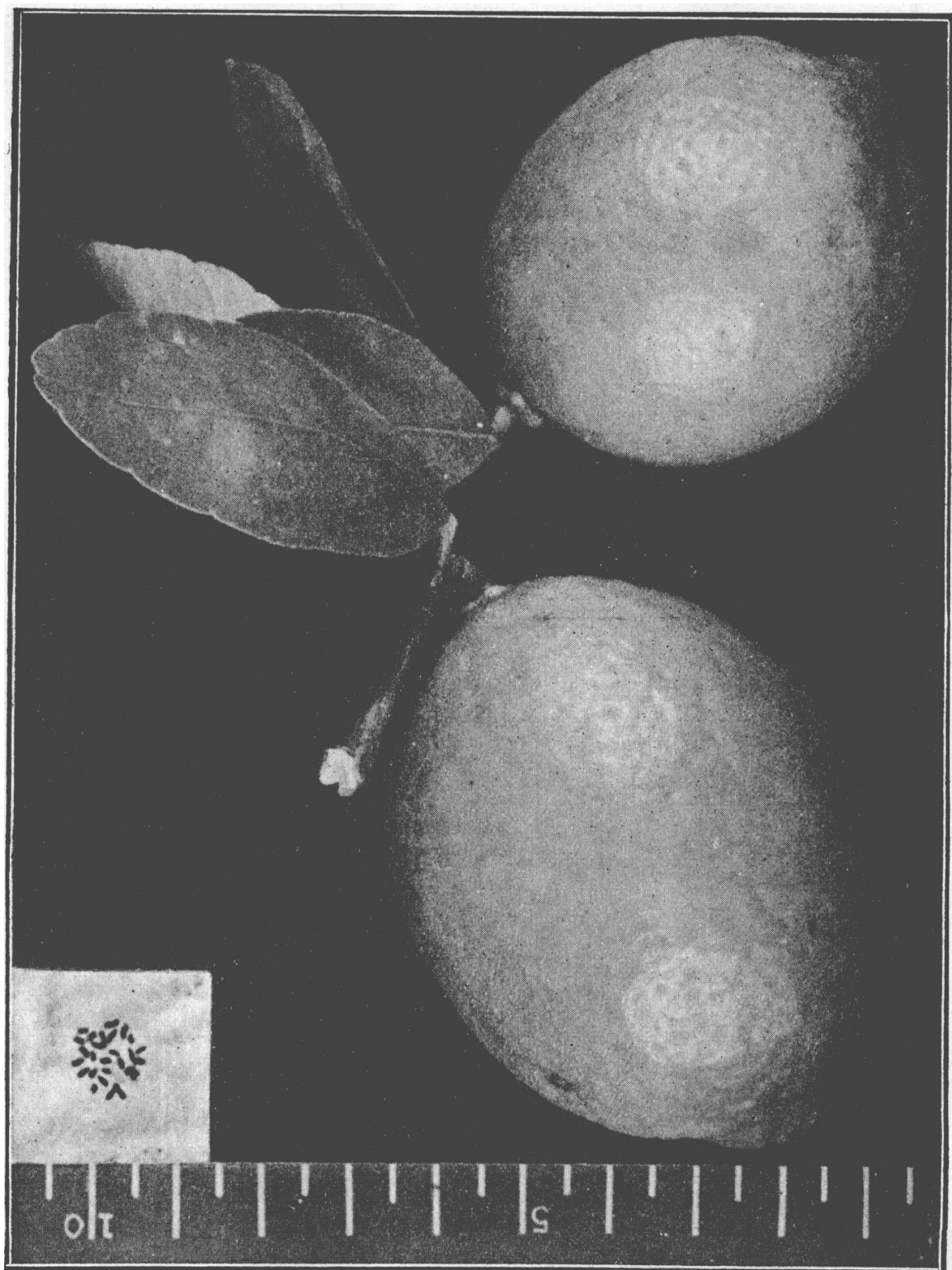


Fig. 1. -- Fôlhas e frutos da variedade triploide "Tahiti lime" (*C. aurantiifolia* Swingle). À esquerda, no alto, microfotografia de uma metáfase somática com $2n = 27$. ($\times 2.600$).

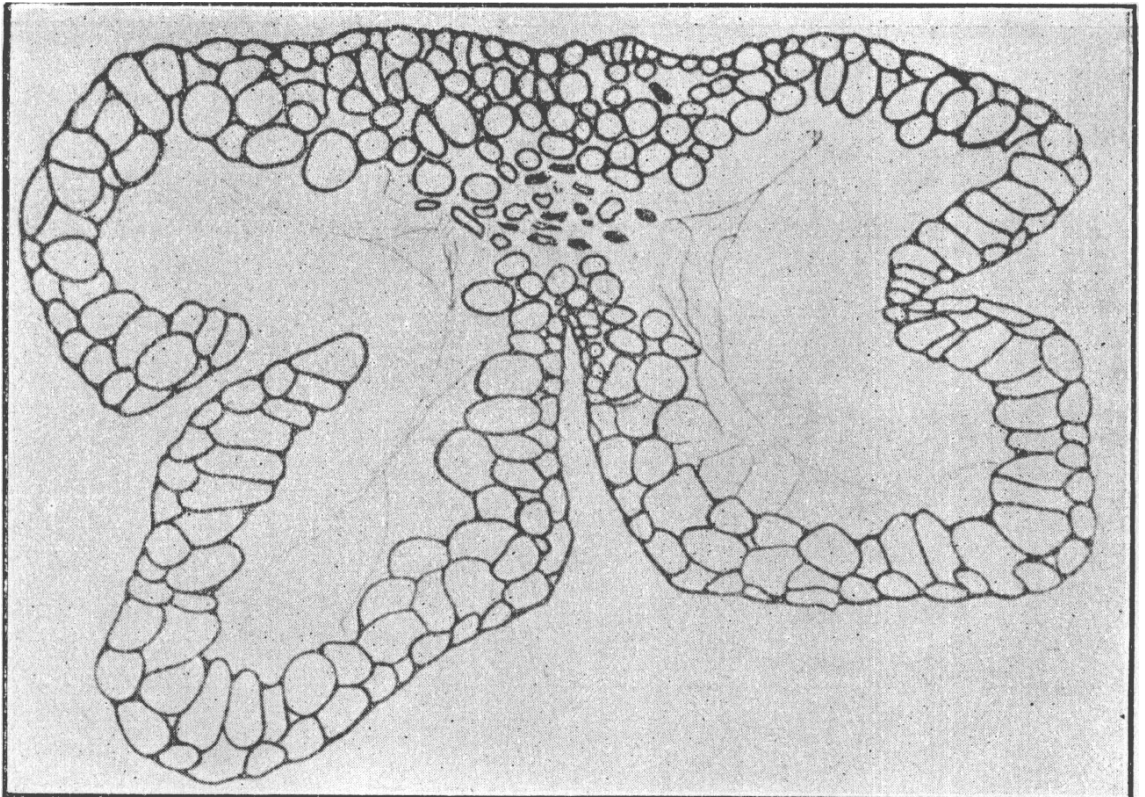


Fig. 2

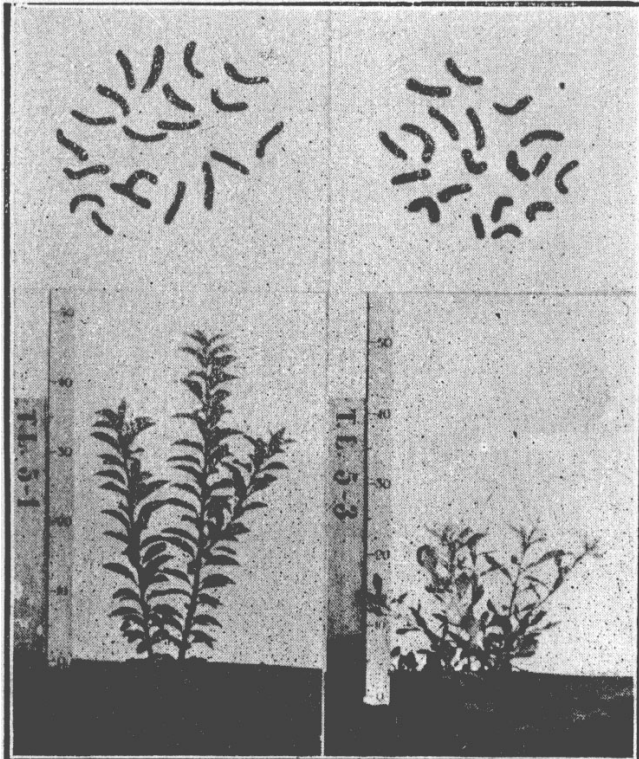


Fig. 3



Fig. 4

Fig. 2. — Secção transversal em uma antera madura da "Tahiti lime" (x 140).

Fig. 3. — "Seedlings" da "Tahiti lime": T. L. 5-1 com $2n=20$ e T. L. 5-3 com $2n=19$.
(Cromosômios x 3.000).

Fig. 4. — Metáfase somática na variedade "Bearss seedless lime" (*C. aurantifolia* Swingle)
com $2n=27$. (x 3.900).

Acreditamos que esta variedade se tenha originado em forma de um "seedling" de uma das limas diplóides, sendo razoável admitir que a triploidia se deve à fusão de um gameto masculino ou feminino não reduzido, com um haplóide normal.

A fim de se determinar se a falta de sementes nesta variedade é devida à sua constituição citológica ou a uma desintegração precoce dos micro- e megasporocitos, provavelmente controlada geneticamente, foram examinados botões florais em vários tamanhos, tanto em esfregaços de carmim-acético, como em secções cortadas ao micrótomo. Este material foi colhido na Estação Experimental de Limeira e na "Citrus Experiment Station", Riverside, Califórnia. Esfregaços de anteras de botões muito novos revelaram a presença de pequenos microsporocitos, mas nenhum foi encontrado em divisão; anteras mais velhas estavam completamente vazias ou continham um número muito limitado de grãos de pólen maduros e de tamanho variável. Secções transversal e longitudinal de anteras maduras revelaram que elas são completamente vazias ou contêm uma pequena porção de tecido comumente desorganizado (Fig. 2).

Baseando-se nestas observações e nos resultados obtidos por Uphof (19), conclue-se que a falta de sementes nesta variedade não é devida à sua natureza triploide, uma vez que, normalmente, não se verificam divisões meióticas, degenerando, num estado precoce de desenvolvimento, tanto os micro- como os megasporocitos. Considerando-se que alguns poucos grãos de pólen foram encontrados, e, também, que "seedlings" gaméticos (não nucelares) foram obtidos desta lima, como será discutido no capítulo seguinte, torna-se evidente que um número limitado de micro- e megasporocitos escapam à desintegração, ocorrendo as suas divisões meióticas, provavelmente como nos outros triploides.

Constituição citológica da sua progênie. Como não fôra possível obter sementes de polinizações controladas nesta variedade triploide, colheram-se, em janeiro de 1940, 54 frutos, de flores polinizadas livremente. Estes frutos forneceram um total de oito sementes, das quais, entretanto, nenhuma germinou. Em junho do mesmo ano, outros 33 frutos foram examinados, dos quais se conseguiram 11 sementes. Duas destas foram eliminadas e, das nove restantes, apenas seis germinaram. Das mudas obtidas, duas morreram ainda muito novas e somente três das sobreviventes forneceram bom material (pontas de raízes) para as determinações cromosômicas. Uma tem 19 e as outras duas, respectivamente, 20 e 21 cromosômios. Considerando-se a falta de pólen nesta variedade e supondo, portanto, que pólen normal com 9 cromosômios

das plantas circunvizinhas de outras variedades diplóides foi responsável pela formação destes "seedlings", conclue-se que apenas os megasporos com um número de cromosômios próximo a 9 dão origem a sacos embrionários viáveis nesta variedade triplóide.

Como era esperado, as plantas desta progênie são variáveis em tamanho, hábito de crescimento e caracteres foliares (Fig. 3). É interessante notar que nenhum dos "seedlings" examinados é nucelar, sendo todos de origem gamética, como indica a sua constituição cromosômica.

Semelhante comportamento foi verificado por Osawa (13) na laranja diplóide "Washington Navel", cujos micro- e megasporocitos degeneram comumente ao atingirem o estado de tétrade, não produzindo pólen. Este autor mostrou também que são formados, ocasionalmente, sacos embrionários normais, cuja existência talvez explique a ocorrência de muitas sementes contendo embriões viáveis, quando as suas flores são polinizadas com pólen de outras variedades, como também foi recentemente constatado na Estação Experimental de Limeira (10). Nenhuma informação existe, entretanto, que demonstre que os "seedlings" derivados de tais sementes são de origem gamética ou do tipo nucelar. É possível que o desenvolvimento dêste último tipo seja estimulado pela polinização cruzada.

"Bearss Seedless Lime"

Origem e caracteres morfológicos gerais. De acôrdo com Hume (4) esta variedade é "evidentemente uma forma da Tahiti" e Webber (21, 22, 23) afirma que ela se originou de um "seedling" desta variedade, tendo caracteres semelhantes, com exceção do crescimento mais ereto dos seus ramos e dos seus frutos que são ligeiramente menores. Estudos comparativos detalhados foram feitos pelo primeiro dos autores dêste trabalho, nas variedades "Bearss" e "Tahiti", na "Citrus Experiment Station", Riverside, Califórnia, onde elas crescem lado a lado. Não foram encontradas diferenças apreciáveis nos caracteres da planta, das folhas e dos frutos, sendo muito provável, portanto, que a "Bearss" seja um "seedling" nucelar da "Tahiti lime". Assim sendo, estas duas variedades deveriam ser idênticas na constituição citológica e genética.

Meiose e causa da falta de sementes. Ao que parece, ainda não haviam sido realizadas investigações citológicas nesta variedade, a-fim-de se determinar a causa da sua falta de sementes. Estacas de uma planta desta variedade (C.E.S. — 564; 3A-26-3) foram, portanto, enraizadas em areia na "Citrus Experiment Station", Riverside, Califórnia, na primavera de 1941. As contagens de cromosômios efetuadas

em pontas de raízes revelaram que esta variedade é, também, de constituição triploide ($2n=27$); (Fig. 4). Esta constatação constitui outra indicação de que esta variedade se originou de um "seedling" nucelar da Tahiti.

Botões florais de diversos tamanhos, colhidos da planta acima mencionada, foram estudados em preparações de carmim-acético, observando-se os mesmos resultados verificados na "Tahiti lime". Em algumas anteras foram constatados grupos de pequenos microsporocitos, aparentemente normais, enquanto que, em outras preparações, os microsporocitos se apresentavam anormais e disformes. Divisões meióticas não puderam ser vistas, a despeito da presença, em anteras maduras, de alguns grãos de pólen pequenos e degenerados.

Conclue-se, portanto, que a causa da sua falta de sementes é antes genética do que citológica, como foi observado para a "Tahiti lime", da qual se supõe se tenha originado.

IMPORTÂNCIA DA TRIPLOIDIA PARA O MELHORAMENTO DAS PLANTAS CÍTRICAS

Até a presente data, a poliploidia não tem tido particular importância na hibridação das plantas cítricas. Novas variedades comerciais têm aparecido tanto pelas variações somáticas, que são facilmente propagadas pela enxertia, como pela hibridação. O último processo, conforme afirma Frost (3), não tem dado bons resultados quando se cruzam variedades muito próximas de uma mesma espécie ou espécies semelhantes. Híbridos entre espécies não relacionadas e espécies pertencentes a gêneros distintos têm demonstrado, em muitos casos, grande vigor e alta produtividade, como os "tangelos", "citranges", "limequats", etc., conseguidos por Webber e Swingle (23), Webber (20, 22, 24), Swingle, Robinson e Savage (14). Alguns híbridos trigenéricos são vigorosos e produtivos, entre os quais os "citrangquats", descritos por Swingle e Robinson (15). De acordo com Frost (3), cruzamentos entre variedades de *Citrus reticulata* Blanco têm sido bem sucedidos na produção de novas variedades de importância comercial.

Quanto à importância da poliploidia nos trabalhos de melhoramento das plantas cítricas, pode-se afirmar que os tetraploides são comumente inferiores aos diploides. O seu crescimento é vagaroso, as plantas são menores e menos eretas; são comumente menos produtivas, com frutos de menor valor comercial, em vista da casca ser mais grossa e da estrutura interna ser mais fibrosa. Os triploides originados pela

hibridação têm sido descritos como sendo semelhantes, em aparência, aos tetraplóides; a maioria parece ser relativamente improdutivo, sendo que os seus frutos, ou são desprovidos de sementes ou possuem uma quantidade menor do que a maioria dos diplóides.

As limas "Tahiti" e a "Bearss", descritas no presente trabalho, parecem ser as primeiras variedades triplóides de *Citrus* de importância econômica. Apesar da sua constituição citológica, elas são altamente produtivas, possuindo frutos maiores que as limas comuns, das quais se derivam; além de conterem muito suco, os seus frutos apresentam casca fina e são quase completamente sem sementes. Considerando as ótimas qualidades destas limas, e admitindo que, como os outros triplóides, também seriam desprovidas de sementes, mesmo que os seus micro- e megasporocitos não se desintegrassem, conclue-se que a sua constatação é de especial importância para os trabalhos de melhoramento das plantas cítricas. A síntese de novos triplóides deveria ser, portanto, estimulada, uma vez que ficou demonstrado agora que tais poliplóides podem ser de grande importância econômica.

RESUMO

No presente trabalho apresenta-se um breve resumo dos conhecimentos atuais sobre a citologia do gênero *Citrus*; descrevem-se, a seguir, duas variedades triplóides de interesse econômico. Admite-se que uma delas se tenha derivado da outra por meio de um "seedling" nucelar. Os caracteres morfológicos e citológicos destes triplóides são apresentados em detalhes. Chama-se a atenção para a importância da triploidia nos trabalhos de melhoramento das plantas cítricas.

S U M M A R Y

A review is presented of citrus cytology and account is given of the author's investigations of this subject. Two triploid citrus varieties are described which are of economic importance. It appears probable that one of these is a nucellar seedling derived from the other. The morphological and cytological characteristics of these triploids are given in detail.

Attention is called to the importance of triploidy in citrus breeding.

LITERATURA CITADA

1. **Bacchi, O.** Observações Citológicas em *Citrus*. I. Número de cromossomos de algumas espécies e variedades. *Jornal de Agronomia* 3 (4) : 249-258. 1940.
2. **Frost, H. B.** The chromosomes of *Citrus*. *Jour. Wash. Acad. Sc.* 15 : 1-3. 1925.
3. **Frost, H. B.** The genetics and cytology of *Citrus*. Bangalore, India. Special Number on Genetics, pp. 24-27. 1938.
4. **Hume, H. H.** The cultivation of *Citrus* fruits. Macmilan Corp., New York. 1938

5. **Kandelaki, G. V.** Karyological investigation of some cultivated species and varieties of the genus *Citrus*. *Trav. Int. Bot. Tbilissi* **4** : 109-120. 1938. (*Cit. Plt. Breed. Abstr.* **9** : 465. 1938).
6. **Lapin, W. K.** Investigation on polyploidy in *Citrus*. *USSR All Union Scient. Res. Inst. Humid Subtrop.* **1** (4) : 1-68. 1937.
7. **Longley, A. E.** Polycary, Polyspory and polyploidy in *Citrus* and *Citrus* relatives. *Jour. Nat. Acad. Sc.* **15** : 347-351. 1925.
8. **Longley, A. E.** Triploid *Citrus*. *Jour. Wash. Acad. Sc.* **16** : 543-545. 1926.
9. **Luss, A. I.** *Citrus* introduction and selection in the USSR. *Soviet Subtropics* N.º 11 (15) : 17-27. 1935. (*Cit. Plt. Breed. Abstr.* **6** (4) : 1372. 1935).
10. **Moreira, S. e J. T. A. Gurgel.** A fertilidade do pólen e sua correlação com o número de sementes, em espécies e formas do gênero *Citrus*. *Bragantia* **1** : 669-711. 1942.
11. **Nakamura, M.** A preliminary report on the chromosome number, pollen sterility, and the formation of abnormal pollen tetrads in *Citrus*. *Bull. Kagoshima Coll. Agric. and Forestry* **1** : 11-14. 1934.
12. **Nakamura, M.** Cytological studies in the genus *Citrus*. II. The chromosome number, pollen sterility, and the formation of abnormal pollen tetrads. *Studia Citrol.* **6** : 162-178. 1934.
13. **Osawa, I.** Cytological and experimental studies in *Citrus*. *Jour. Coll. Agric. Univ. of Tokio* **4** : 83-116. 1912.
14. **Swingle, W. T., T. R. Robinson e E. M. Savage.** New *Citrus* hybrids. *U. S. Dept. Agric. Circular* 181. 1931.
15. **Swingle, W. T. e T. R. Robinson.** Two important new types of Citrous hybrids for the home garden : Citrangequats and limequats. *Jour. Agric. Research* **23** : 229-238, 5 pls. 1923.
16. **Swingle, W. T.** The Botany of *Citrus* and its wild relatives. In Webber, H. J. et al. : *The Citrus Industry*, Vol. I, Cap. IV. University of California Press, Berkeley, 1943.
17. **Torres, J. P.** Progress report on *Citrus* hybridization. *Philip. Jour. Agric.* **3** (3) : 217-229. 1932.
18. **Torres, J. P.** *Citrus* hybridization in the Philippines. *Philip. Jour. Agric.* **9** (2) : 161-176. 1938.
19. **Uphof, J. C. Th.** *Wissenschaftliche Beobachtungen und Versuche an Agrumen*. I. Ueber die Bluetenverhaeltnisse der Tahiti-limonelle. *Gartenbauwiss.* **4** (6) : 513-520. 1931.
20. **Webber, H. J.** Yearbook U. S. Dept. Agric. for 1906. 329-346, pls. 17-21. 1907.
21. **Webber, H. J.** Limes. Mimeogr. Paper of *Citrus* Exp. Sta., Riverside, Calif. 1940.
22. **Webber, H. J.** *The Citrus Industry*. Vol. I, Cap. III. University of California Press, Berkeley. 1943.
23. **Webber, H. J. e W. T. Swingle.** Yearbook U. S. Dept. Agric. for 1904. 221-240. 1905.