

**PROPAGAÇÃO DE HÍBRIDOS SOMÁTICOS DE CITROS E
REAÇÃO À INFECÇÃO POR *Phytophthora nicotianae* E
VÍRUS DA TRISTEZA DOS CITROS**

RAFAEL PIO

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura
“Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de
Concentração: Fitotecnia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Março – 2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**PROPAGAÇÃO DE HÍBRIDOS SOMÁTICOS DE CITROS E
REAÇÃO À INFECÇÃO POR *Phytophthora nicotianae* E
VÍRUS DA TRISTEZA DOS CITROS**

RAFAEL PIO

Engenheiro Agrônomo

Orientador Prof. Dr. **FRANCISCO DE ASSIS ALVES MOURÃO FILHO**

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura
“Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de
Concentração: Fitotecnia.

PIRACICABA

Estado de São Paulo – Brasil

Março – 2005

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Pio, Rafael

Propagação de híbridos somáticos de citros e reação à infecção por *Phytophthora nicotianae* e vírus da tristeza dos citros / Rafael Pio. - - Piracicaba, 2005.
144 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.
Bibliografia.

1. Estaca (Planta) 2. Fruta cítrica 3. Gomose 4. Hibridação vegetal 5.
Melhoramento genético vegetal 6. Porta-enxerto 7. Propagação vegetal 8.
Resistência genética vegetal 9. Tristeza cítrica I. Título

CDD 634.3

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as pessoas que colaboraram direta ou indiretamente a minha formação como Eng^o. Agrônomo na Universidade Federal de Lavras (UFLA), tanto os profissionais envolvidos nos estágios de férias, como os colegas de trabalho, especialmente aos funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Vantuil e Claret, Prof. Moacir Pasqual do Depto. de Agricultura e Prof. Evaristo Mauro de Castro do Depto. de Biologia.

Dedico as pessoas envolvidas no meu curso de Mestrado na UFLA, Prof. Nilton Nagib Jorge Chalfun e Prof. Márcio Ribeiro do Vale do Depto. de Agricultura, Pesquisadores da EPAMIG Ângelo Albérico Alvarenga e Enilson Abrahão, em especial aos funcionários do Setor de Fruticultura e os amigos Tiago Chaltein Almeida Gontijo, Edney Paulo Carrijo, Juliana Helena C. Coelho e Vander Mendonça (colaboradores).

Dedico também as pessoas envolvidas no meu curso de Doutorado na USP/ESALQ, Prof. Francisco de Assis Alves Mourão Filho e Prof. João Alexio Scarpate Filho do Depto. de Produção Vegetal, em especial aos funcionários do Anexo do Depto. José A. Volpato, Éder A. Cintra, David Ulrich e Aparecido D. Serrano e os amigos Fábio Albuquerque Entelmenn e André Siqueira Rodrigues Alves (colaboradores).

Dedico aos colegas e Pesquisadores do Centro APTA Frutas do Instituto Agrônômico de Campinas (IAC), Jundiaí-SP.

Enfim, aos meus pais Luiz Américo Pio e Maria Aparecida Bardi Pio, ao meu irmão Bruno Pio, avós maternos e paternos e especialmente a pessoa mais importante da minha carreira profissional, que transmitiu valiosos conhecimentos, exemplo de vida, amizade e me orientou na busca de minhas maiores conquistas, meu grande Mentor Prof. José Darlan Ramos, orientador de Iniciação Científica e Mestrado.

AGRADECIMENTOS

A Universidade de São Paulo, aos Prof. do Conselho de Pós-Graduação e do Depto. de Produção Vegetal da USP/ESALQ.

Ao CNPq pelo fornecimento da bolsa de estudo e recursos financeiro, ao FUNDECITRUS pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Francisco de Assis Alves Mourão Filho, pela oportunidade em me orientar, tempo cedido, incentivo e apoio.

Ao Prof. João Alexio Scarpate Filho pela amizade, orientação em pesquisas paralelas e oportunidade de ministrar algumas aulas.

Ao Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”, na pessoa do Dr. Jorgino Pompeu Júnior, pela colaboração, auxílio e fornecimento de materiais utilizados nos experimentos.

Ao Pesquisador Eduardo Feichtenberger, da Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Sorocaba, pela colaboração, auxílio, prestação e fornecimento de materiais utilizados nos experimentos.

A secretária do curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, Luciane Aparecida Lopes Toledo.

As bibliotecárias da Biblioteca Central da USP/ESALQ, Eliana e Silvia.

Aos alunos de graduação e colaboradores da USP/ESALQ Fábio Albuquerque Entelmenn, André Siqueira Rodrigues Alves e Fabrizzio de Souza Cantagallo, aos alunos do Pró-Hort, em especial Luis Felipe Paes de Almeida.

A amiga e companheira de pesquisas paralelas, Débora Costa Bastos.

A todos funcionários do Anexo do Depto. de Produção Vegetal da USP/ESALQ, em especial José A. Volpato, Éder A. Cintra e David Ulrich.

As funcionárias Marli e Edileuza.

A turma do futebol da Atlético, do CENA, aos colegas do time do Setor, Tiririca, em especial Vander de Miranda e Mário.

Aos amigos do curso de Pós-Graduação, em especial Fernando Alves de Azevedo, Evandro Henrique Schinor, Alexandra Pavan, Raquel Capistrano Moreira, João Paulo Campos de Araújo e Euro Detomini.

Aos demais amigos da USP/ESALQ e da UFLA, em especial aos grandes amigos de Lavras-MG, Lourenço Viana de Souza e Marcelo de Carvalho Alves.

Em especial, a Sthela de Siqueira Angeli, pelo companheirismo, compreensão e carinho nas horas mais difíceis.

Enfim, a todos os fruticultores e produtores rurais, nossos grandes aliados na pesquisa agropecuária.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO.....	xvi
SUMMARY.....	xviii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Importância da citricultura no Brasil e no mundo.....	3
2.2 Classificação botânica e distribuição dos citros.....	4
2.3 Importância da utilização de porta-enxertos na citricultura.....	6
2.4 Melhoramento de porta-enxertos de citros.....	9
2.4.1 Hibridação sexual.....	9
2.4.2 Hibridação somática.....	12
2.5 Métodos propagativos de porta-enxertos de citros.....	15
2.5.1 Obtenção de porta-enxertos de citros por estacas.....	16
2.6 <i>Phytophthora</i> spp. dos citros.....	19
2.6.1 Resistência varietal de citros a <i>Phytophthora</i> spp.....	22
2.6.2 Métodos para avaliar a resistência/tolerância de citros a <i>Phytophthora</i> spp.....	25
2.7 Vírus da tristeza dos citros (CTV).....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Experimento 1: Propagação dos híbridos somáticos.....	34
3.1.1 Enraizamento das estacas.....	34

3.1.2 Crescimento das mudas.....	35
3.2 Reação dos híbridos somáticos a <i>Phytophthora nicotianae</i>	39
3.2.1 Experimento 2: Reação dos híbridos somáticos à infecção de tronco por <i>Phytophthora nicotianae</i>	42
3.2.2 Experimento 3: Reação dos híbridos somáticos à infecção de raízes por <i>Phytophthora nicotianae</i>	44
3.3 Experimento 4: Reação dos híbridos somáticos ao CTV.....	49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1 Experimento 1: Propagação dos híbridos somáticos.....	53
4.1.1 Enraizamento das estacas.....	53
4.1.2 Crescimento das mudas.....	62
4.2 Reação dos híbridos somáticos à infecção por <i>Phytophthora nicotianae</i>	77
4.2.1 Experimento 2: Reação dos híbridos somáticos à infecção de tronco por <i>Phytophthora nicotianae</i>	78
4.2.2 Experimento 3: Reação dos híbridos somáticos à infecção de raízes por <i>Phytophthora nicotianae</i>	88
4.3 Experimento 4: Reação dos híbridos somáticos ao CTV.....	104
5 CONCLUSÕES.....	116
ANEXOS.....	117
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Média semanal das temperaturas máxima e mínima na casa-de-vegetação, coletadas após o transplântio das estacas. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004.....	38
2 Temperaturas máxima e mínima no telado, localizado o experimento de reação dos híbridos somáticos à infecção de raízes por <i>Phytophthora nicotianae</i> . USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004.....	48
3 Temperaturas máxima e mínima no telado, localizado o experimento de reação dos híbridos somáticos ao CTV. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004.....	52
4 Detalhe do sistema radicular das estacas dos híbridos somáticos L. ‘Cravo’ + L. azeda (A), L. ‘Caipira’ + L. ‘Cravo’ (B), L. ‘Caipira’ + T. ‘Cleópatra’ (C), L. ‘Caipira’ + L. ‘Volkameriano’ (D), L. ‘Caipira’ + L. ‘Rugoso’ (E), T. ‘Cleópatra’ + L. ‘Volkameriano’ (F), T. ‘Cleópatra’ + L. azeda (G), L. ‘Cravo’ + T. ‘Sunki’ (H), L. ‘Ruby Blood’ + L. ‘Volkameriano’ (I), L. ‘Rohde Red’ + L. ‘Volkameriano’ (J), L. ‘Valência’ + <i>Fortunella obovata</i> (K) e brotações das estacas (L). USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004.....	61

5	Detalhe dos híbridos somáticos L. ‘Caipira’ + T. ‘Cleópatra’ (A), T. ‘Cleópatra’ + L. azeda (B), L. ‘Ruby Blood’ + L. ‘Volkameriano’ (C), L. ‘Valência’ + <i>Fortunella obovata</i> (D), L. ‘Caipira’ + L. ‘Volkameriano’ (E), L. ‘Rohde Red’ + L. ‘Volkameriano’ (F), L. ‘Cravo’ + L. azeda (G), L. ‘Cravo’ + T. ‘Sunki’ (H), T. ‘Cleópatra’ + L. ‘Volkameriano’ (I), L. ‘Caipira’ + L. ‘Cravo’ (J) e L. ‘Caipira’ + L. ‘Rugoso’ (K) após 210 dias do transplante. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004.....	72
6	Classificação de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros quanto à resistência e susceptibilidade a podridão do tronco ocasionado por <i>Phytophthora nicotianae</i> . USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004.....	85
7	Algodão umedecido para favorecer o desenvolvimento de <i>Phytophthora nicotianae</i> (A); Detalhe da lesão sob a casca (B) e sob o lenho (C); Comparação de porta-enxerto resistente (D), mediamente susceptível (E) e altamente susceptível (F) a podridão do tronco ocasionada por <i>Phytophthora nicotianae</i> . USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004.....	87
8	Classificação de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros quanto à tolerância e intolerância a podridão das raízes e radículas ocasionado por <i>Phytophthora nicotianae</i> . USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004.....	100
9	Comparação de porta-enxerto altamente tolerante (A), tolerante (B), moderadamente tolerante (C) e intolerante (D) a podridão das raízes e radículas ocasionado por <i>Phytophthora nicotianae</i> . Planta da esquerda infestada e da direita sadia (controle). USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004.....	101
10	Comparação entre as plantas de laranja azeda (A), L. ‘Caipira’ + T. ‘Cleópatra’ (B), L. ‘Caipira’ + L. ‘Cravo’ (C), L. ‘Caipira’ + L. ‘Rugoso’ (D), L. ‘Caipira’ + L. ‘Volkameriano’ (E), T. ‘Cleópatra’ + L. azeda (F), T. ‘Cleópatra’ + L. ‘Volkameriano’ (G), L. ‘Cravo’ + T. ‘Sunki’ (H) e L. ‘Rohde Red’ + L. ‘Volkameriano’ (I), infectadas com CTV (esquerda) e sadias – controle (direita). ESALQ/USP, Piracicaba-SP, 2004.....	109

- 11 Comparação entre as plantas de L. ‘Ruby Blood’ + L. ‘Volkameriano’ (J), L. ‘Valência’ + *Fortunella obovata* (K), L. ‘Cravo’ (L) e *Poncirus trifoliata* (M) infectadas com CTV (esquerda) e sadias – controle (direita). USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004..... 110
- 12 Folhas velhas e brotação de laranja azeda (A e B) e dos híbridos somáticos T. ‘Cleópatra’ + L. azeda (C e D) e L. ‘Valência’ + *Fortunella obovata* (E e F) com sintomas de CTV. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004..... 113
- 13 Classificação de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros quanto à tolerância e intolerância ao vírus da tristeza dos citros (CTV). USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004..... 114

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Isolados de <i>Phytophthora nicotianae</i> do Estado de São Paulo, identificação (LRS e IB) e data de isolamento. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004.....	40
2 Porcentagem de estacas enraizadas (PEE), porcentagem de estacas calejadas (PEC), número médio de raízes emitidas da estaca (NRE) e comprimento médio das raízes (CMR, cm) de híbridos somáticos de citros. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004.....	55
3 Porcentagem de estacas brotadas (PEB), número médio de brotos (NB), número médio de folhas (NF) e comprimento médio das brotações (CMB, cm) de híbridos somáticos de citros. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004.....	57
4 Coeficiente de correlação parcial linear (r) entre as variáveis observadas referentes ao enraizamento dos híbridos somáticos de citros, ajustados para os tratamentos. Porcentagem de estacas enraizadas (PEE), porcentagem de estacas calejadas (PEC), porcentagem de estacas brotadas (PEB), número médio de brotos (NB), número médio de folhas (NF), número médio de raízes emitidas da estaca (NRE), comprimento médio das brotações (CMB) e comprimento médio das raízes (CMR). USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004.....	60
5 Porcentagem de estacas vivas de híbridos somáticos de citros após o transplântio. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004.....	63

6	Porcentagem de estacas brotadas de híbridos somáticos de citros após o transplântio. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004.....	65
7	Comprimento médio das brotações (cm) de híbridos somáticos de citros após o transplântio. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004.....	68
8	Número médio de folhas de híbridos somáticos de citros após o transplântio. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004.....	69
9	Diâmetro médio da brotação (cm) de híbridos somáticos de citros após o transplântio. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004.....	70
10	Coeficiente de correlação parcial linear (r) entre as variáveis observadas referentes ao aspecto propagativo dos híbridos somáticos de citros, ajustados para os tratamentos. Porcentagem de estacas vivas (PEV), porcentagem de estacas brotadas (PEB), número médio de folhas (NF), comprimento médio das brotações (CMB) e diâmetro médio da brotação (DB), 210 dias após transplântio. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004.....	71
11	Porcentagem de plantas aptas à enxertia (PPAE), massa seca média da brotação (MSB, g) e massa seca média da raiz (MSR, g) de híbridos somáticos de citros 210 dias após o transplântio. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004.....	74
12	Concentrações de macro e micronutrientes em folhas de híbridos somáticos de citros. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004.....	76
13	Comprimento e largura de lesões sob a casca (mm) e presença de goma ocasionada por inoculações de diferentes isolados de <i>Phytophthora nicotianae</i> em caules de Limão ‘Siciliano’. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004.....	77
14	Largura (L) média de lesões sobre e sob a casca (mm) e porcentagem de goma ocasionadas por inoculações de <i>Phytophthora nicotianae</i> em caules de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004.....	79
15	Comprimento (C) e área (A) média de lesões (mm) sobre e sob a casca ocasionadas por inoculações de <i>Phytophthora nicotianae</i> em caules de	

	porta-enxertos e híbridos somáticos de citros. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004.....	82
16	Aumento, em vezes, do comprimento (C) e área (A) das lesões sob a casca ocasionadas por inoculações de <i>Phytophthora nicotianae</i> em caules de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros em relação à testemunha resistente (<i>Poncirus trifoliata</i>). USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004.....	84
17	Altura média (cm) de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros cultivados em substrato com e sem <i>Phytophthora nicotianae</i> , comparando-se plantas controle (C) e infestadas (I), no momento da infestação e a cada 15 dias. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004.....	89
18	Diâmetro médio (cm) de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros cultivados em substrato com e sem <i>Phytophthora nicotianae</i> , comparando-se plantas controle (C) e infestadas (I), no momento da infestação e ao final do ensaio. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004.....	91
19	Número médio de folhas (NF), massa seca média da parte aérea (MSPA, g) e massa seca média das raízes (MSR, g) de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros cultivados em substrato com e sem <i>Phytophthora nicotianae</i> , comparando-se plantas controle (C) e infestadas (I) ao final de 60 dias. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004.....	92
20	Perda de altura média (cm) obtida pela diferença (C - I) entre plantas controle (C) e infestadas (I) e índice de redução (%) de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros em detrimento à infestação ao substrato com <i>Phytophthora nicotianae</i> , no momento da infestação e a cada 15 dias até o final do ensaio. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004.....	95
21	Perda de diâmetro médio (cm) obtida pela diferença (C - I) entre plantas controle (C) e infestadas (I) e índice de redução (%) de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros em função da infestação ao substrato com <i>Phytophthora nicotianae</i> , no momento da infestação e ao final do ensaio. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004.....	96

- 22 Perda do número médio de folhas (NF), massa seca média da parte aérea (MSPA, g) e massa seca média das raízes (MSR, g) obtida pela diferença (C - I) entre plantas controle (C) e infestadas (I) e índice de redução (%) de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros em função da infestação ao substrato com *Phytophthora nicotianae*, ao final de 60 dias. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004..... 97
- 23 Severidade de podridão das radículas em detrimento à infestação ao substrato com *Phytophthora nicotianae* em porta-enxertos e híbridos somáticos de citros, através da comparação visual entre plantas controle (C) e infestadas (I), ao final de 60 dias. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004..... 99
- 24 Porcentagem de borbulhas brotadas de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros, comparando-se plantas sadias (S) e infectadas (I) com CTV aos 30, 60 e 90 dias após a retirada do fitilho do enxerto. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004..... 105
- 25 Número médio de folhas de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros, comparando-se plantas sadias (S) e infectadas (I) com CTV aos 30, 60 e 90 dias após a retirada do fitilho do enxerto. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004..... 106
- 26 Comprimento médio da brotação (cm) de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros, comparando-se plantas sadias (S) e infectadas (I) com CTV aos 30, 60 e 90 dias após a retirada do fitilho do enxerto. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004..... 107
- 27 Diâmetro médio da brotação (cm) de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros, comparando-se plantas sadias (S) e infectadas (I) com CTV aos 30, 60 e 90 dias após a retirada do fitilho do enxerto. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004..... 108
- 28 Comprimento médio da brotação (cm) de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros, comparando-se a diferença entre plantas sadias (S) e infectadas (I) com CTV (perdas) aos 30, 60 e 90 dias após a retirada do

	fitilho do enxerto. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004.....	111
29	Resultado do índice de redução (%) para o comprimento médio da brotação (cm) de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros aos 30, 60 e 90 dias após a retirada do fitilho do enxerto. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004.....	112

**PROPAGAÇÃO DE HÍBRIDOS SOMÁTICOS DE CITROS E REAÇÃO À
INFECÇÃO POR *Phytophthora nicotianae* E
VÍRUS DA TRISTEZA DOS CITROS**

Autor: RAFAEL PIO

Orientador: Prof. Dr. FRANCISCO DE ASSIS ALVES MOURÃO FILHO

RESUMO

A hibridação somática é uma nova opção em programas de melhoramento de espécies cítricas, obtendo-se híbridos somáticos que podem manter integralmente a combinação genética de ambos os progenitores envolvidos na hibridação. Assim, o objetivo desse trabalho foi estudar a propagação e crescimento de combinações parentais de híbridos somáticos com potencial para serem utilizados como porta-enxertos e verificar possíveis resistências/tolerâncias à infecção de tronco e raízes por *Phytophthora nicotianae* e ao vírus da tristeza dos citros (CTV). Os híbridos somáticos utilizados nos trabalhos foram: limão 'Cravo' + laranja azeda, laranja 'Caipira' + limão 'Cravo', laranja 'Caipira' + tangerina 'Cleópatra', laranja 'Caipira' + limão 'Volkameriano', laranja 'Caipira' + limão 'Rugoso', tangerina 'Cleópatra' + limão 'Volkameriano', tangerina 'Cleópatra' + laranja azeda, limão 'Cravo' + tangerina 'Sunki', laranja 'Ruby Blood' + limão 'Volkameriano', laranja 'Rohde Red' + limão 'Volkameriano' e laranja 'Valência' + *Fortunella obovata*. Na propagação dos híbridos, estacas de 15 cm de comprimento foram retiradas de plantas matrizes dos respectivos híbridos somáticos e submetidas ao enraizamento em câmara de nebulização

intermitente por 100 dias. Posteriormente, foram analisadas o sistema radicular das estacas e parte aérea. Em seguida, foram transplantadas para sacos plásticos, conduzidas em haste única e mantidas em casa-de-vegetação por 210 dias, realizando-se avaliações mensais em relação à parte aérea e ao final avaliações do sistema radicular. Para os ensaios de infecção por *Phytophthora nicotianae* e CTV, foram utilizadas mudas dos respectivos híbridos somáticos oriundos de estacas e ainda a inclusão de plantas testemunhas. Para os testes de resistência/tolerância a *P. nicotianae*, utilizou-se o método da agulha para o teste de infecção de tronco, sendo as lesões quantificadas após 25 dias da inoculação. Para o teste de podridão das raízes e radículas, o substrato foi infectado com estruturas do patógeno, sendo analisados a parte aérea das plantas quinzenalmente e o sistema radicular após 60 dias da instalação do ensaio. Para o teste de tolerância dos híbridos somáticos ao CTV, adotou-se o método de união dos tecidos (enxertia), analisando-se a parte aérea das plantas mensalmente em três avaliações. No enraizamento das estacas, os híbridos laranja 'Caipira' + tangerina 'Cleópatra', laranja 'Caipira' + limão 'Volkameriano', limão 'Cravo' + tangerina 'Sunki' e laranja 'Rohde Red' + limão 'Volkameriano' apresentaram melhores resultados, sendo que os híbridos laranja 'Caipira' + limão 'Volkameriano' e laranja 'Rohde Red' + limão 'Volkameriano' se destacaram em relação ao desenvolvimento das estacas após o transplantio. Os híbridos somáticos tangerina 'Cleópatra' + laranja azeda, limão 'Cravo' + tangerina 'Sunki', tangerina 'Cleópatra' + limão 'Volkameriano', laranja 'Ruby Blood' + limão 'Volkameriano', laranja 'Rohde Red' + limão 'Volkameriano' e laranja 'Caipira' + limão 'Volkameriano' apresentaram bons resultados em relação à redução da podridão do tronco e os híbridos somáticos tangerina 'Cleópatra' + limão 'Volkameriano', tangerina 'Cleópatra' + laranja azeda, laranja 'Caipira' + limão 'Volkameriano' e laranja 'Caipira' + limão 'Cravo' apresentaram tolerância a podridão das raízes e radículas ocasionado por *P. nicotianae*. Os híbridos tangerina 'Cleópatra' + laranja azeda e laranja 'Valência' + *Fortunella obovata* apresentaram intolerância ao vírus da tristeza dos citros.

**PROPAGATION OF CITRUS SOMATIC HYBRIDS AND RESPONSE TO
Phytophthora nicotianae AND CITRUS TRISTEZA VIRUS INFECTION**

Author: RAFAEL PIO

Adviser: Prof. Dr. FRANCISCO DE ASSIS ALVES MOURÃO FILHO

SUMMARY

Somatic hybridization is a new alternative in citric species breeding, yielding somatic hybrids which may integrally keep the genetic combination of both progenitors involved in the hybridization. Thus, the objective of this work was to study the propagation and growth of somatic hybrids parental combinations with potential to be used as rootstock and to verify possible resistance/tolerance to trunk and roots infection by *Phytophthora nicotianae* and citrus tristeza virus (CTV). This work applied the following somatic hybrids: 'Cravo' lemon + sour orange, 'Caipira' orange + 'Cravo' lemon, 'Caipira' orange + 'Cleopatra' tangerine, 'Caipira' orange + 'Volkamerian' lemon, 'Caipira' orange + 'Rough' lemon, 'Cleopatra' tangerine + 'Volkamerian' lemon, 'Cleopatra' tangerine + sour orange, 'Cravo' lemon + 'Sunki' tangerine, 'Ruby Blood' orange + 'Volkamerian' lemon, 'Rohde Red' orange + 'Volkamerian' lemon and 'Valência' orange + *Fortunella obovata*. In hybrids propagation, stem cuttings of approximately 15 cm length were excised from matrix plants of respective somatic hybrids and submitted to rooting in intermittent nebulization chamber for 100 days. Later, the stem cuttings root system and air part were analyzed. In sequence, they were transplanted to plastic bags, conducted in only one hast and kept in greenhouse during

210 days, when monthly evaluations were performed concerning the air part and, in the end, root system evaluations. For the *Phytophthora nicotianae* and CTV infection essays, plants derived from the respective somatic hybrids originated from stem cuttings were used, as well as control plants. For the resistance/tolerance to *P. nicotianae* analysis, the needle method for the trunk infection test was applied, being the lesions quantified after 25 days post-inoculation. For the roots and radicels flashening test, substrate was infected with pathogen structures and the air part of the plants was analyzed at every 15 days; roots were analyzed 60 days after the essay implementation. To evaluate the somatic hybrids tolerance to CTV, it was adopted the method of tissues union (grafting), where the air part of the plants was analyzed once a month in three evaluations. On the stem cuttings rooting, the hybrids of 'Caipira' orange + 'Cleopatra' tangerine, 'Caipira' orange + 'Volkamerian' lemon, 'Cravo' lemon + 'Sunki' tangerine and 'Rohde Red' orange + 'Volkamerian' lemon presented the best results, with the hybrids of 'Caipira' orange + 'Volkamerian' lemon and 'Rohde Red' orange + 'Volkamerian' lemon being the top concerning the stem cuttings development after transplanting. The somatic hybrids of 'Cleopatra' tangerine + sour orange, 'Cravo' lemon + 'Sunki' tangerine, 'Cleopatra' tangerine + 'Volkamerian' lemon, 'Ruby Blood' orange + 'Volkamerian' lemon, 'Rohde Red' orange + 'Volkamerian' lemon and 'Caipira' orange + 'Volkamerian' lemon showed good results related to reducing the trunk flashening, and the somatic hybrids of 'Cleopatra' tangerine + 'Volkamerian' lemon, 'Cleopatra' tangerine + sour orange, 'Caipira' orange + 'Volkamerian' lemon and 'Caipira' orange + 'Cravo' lemon presented tolerance to roots and radicels flashening caused by *P. nicotianae*. The hybrids of 'Cleopatra' tangerine + sour orange and 'Valência' orange + *Fortunella obovata* showed to be intolerant to citrus tristeza virus.

1 INTRODUÇÃO

Os citros são propagados comercialmente através de enxertia, pois os porta-enxertos têm a capacidade de propiciar várias características favoráveis à copa cítrica, no referente a aspectos de qualidade dos frutos, bem como resistência e tolerância a adversidades climáticas e fitopatológicas.

A citricultura no Brasil caracteriza-se, entre diversos fatores, por apresentar mais de 80% dos cultivares copas enxertados sobre limão ‘Cravo’. Desta forma, corre-se sério risco de repetir a destruição causada pelo vírus da tristeza dos citros (CTV), em 1937, devido a suscetibilidade desse porta-enxerto ao declínio dos citros e a morte súbita dos citros (MSC), doenças de causa desconhecida que afetam plantas enxertadas sobre este porta-enxerto (Pompeu Júnior, 1991; Fundecitrus, 2004a). O emprego da diversificação de porta-enxertos na citricultura permite a obtenção de inúmeros ganhos, sendo necessária novas pesquisas com ênfase no melhoramento genético, uma vez que não existe um cultivar porta-enxerto considerado completo em suas características hortícolas.

Apesar da grande variabilidade genética existente entre os citros e outros gêneros da família Rutaceae, os programas tradicionais de melhoramento têm apresentado limitações à obtenção de novos cultivares porta-enxerto, devido principalmente às barreiras encontradas nos programas de melhoramento convencional, como a embrionia nucelar, poliembrionia, alta heterozigose, esterilidade de pólen e óvulo, incompatibilidade sexual e juvenalidade (Gmitter et al., 1992; Grosser et al., 2000), sendo que a maioria dos cultivares desenvolvidos para a citricultura mundial neste último século tem sido originados a partir de mutações e seleções naturais.

Utilizando-se diferentes técnicas biotecnológicas, tem-se conseguido ultrapassar barreiras naturais no melhoramento dos citros, contribuindo desse modo aos programas de melhoramento convencional e auxiliando no desenvolvimento de cultivares com características superiores. Dentre as técnicas de biotecnologia utilizadas no melhoramento de plantas, destaca-se a fusão de protoplastos, obtendo-se híbridos somáticos (alotetraplóides). Possuem a característica de manter integralmente a combinação genética de ambos os progenitores envolvidos na hibridação, devido ao fato de não existir segregação meiótica na hibridação somática, resultando na possível expressão aditiva das características dominantes nos híbridos, mantendo-se assim expressos os genes de interesse de ambos os parentais (Grosser & Gmitter Júnior, 1990a). A obtenção de híbridos somáticos interespecíficos e intergenéricos em *Citrus*, via fusão de protoplastos, pode resultar na produção de porta-enxertos mais promissores, pela possibilidade de combinar características desejáveis de duas espécies.

As fases seguintes incluem a adequada propagação das plantas regeneradas para a instalação de ensaios que irão confirmar possíveis heranças genéticas de resistência e tolerância a enfermidades bióticas e às condições abióticas.

Desta forma, o objetivo desse trabalho foi verificar o enraizamento de estacas e crescimento de combinações parentais de híbridos somáticos com potencial para serem utilizados como porta-enxertos e verificar possíveis resistências/tolerâncias à infecção de tronco e raízes por *Phytophthora nicotianae* e ao CTV.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância da citricultura no Brasil e no mundo

As estatísticas indicam que as frutas cítricas lideram o volume de produção mundial de frutas, totalizando 24% da produção total, superando culturas importantes como a viticultura, bananicultura e a pomicultura (ABECITRUS, 2003; FNP Consultoria & Comércio, 2004).

A citricultura é amplamente distribuída e economicamente importante nas regiões subtropicais e tropicais, onde as condições edafoclimáticas são adequadas para o seu desenvolvimento (Davis & Albrigo, 1994). Dentre as frutas cítricas cultivadas, as laranjas correspondem a 64% do volume de produção mundial (Neves & Boteon, 1998). Entretanto, a distribuição das áreas de plantio é muito irregular nas zonas de cultivo ao redor do mundo. Apenas dois países, entre os mais de cem produtores de citros, detêm mais de 35% da produção mundial: Brasil e Estados Unidos, sendo que o Brasil é o maior produtor, detendo 19,38% da produção mundial (FAO, 2004).

A cadeia agroindustrial cítrica no Brasil é uma atividade das mais importantes, mediante a movimentação de recursos alocativos e distributivos, considerando a geração de empregos, a formação de capital de renda, a agregação de valor regional, a ativação do setor terciário e a interiorização do desenvolvimento, principalmente no Estado de São Paulo, onde a citricultura tem expressivo impacto na economia e na balança comercial (Neves et al., 2001).

O desenvolvimento da citricultura no Estado de São Paulo é favorecido pelas condições climáticas favoráveis, pelo preço da terra, o custo da mão-de-obra e a garantia

de mercado para frutas cítricas (Amaro & Maia, 1997). As boas condições climáticas do Estado de São Paulo, associada ao uso de diferentes cultivares, permitiram a indústria local estender as suas operações por um período superior a nove meses no ano (Viégas & Guimarães, 1991), enquanto nos Estados Unidos e no México, concorrentes diretos do Brasil, o período de produção é de aproximadamente seis meses, devido ao menor número de cultivares plantados e às condições climáticas (Neves, 1996).

As indústrias de suco de laranja concentrado e congelado (SLCC) comercializam, anualmente, cerca de 85% da produção paulista. No mundo, a cada dez copos de suco de laranja consumidos, oito são de procedência brasileira, sendo o Estado de São Paulo responsável por 98% da produção total (Neves & Boteon, 1998). A produção brasileira de suco concentrado de laranja é praticamente toda destinada à exportação, sendo que somente 2% da fruta processada ficam para o mercado interno (Amaro & Maia, 1997).

A laranja ‘Pêra’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] é o principal cultivar de laranja doce cultivado no Estado de São Paulo, representado 43% do total das laranjas cultivadas, ou seja, quase 97 milhões do total de árvores cítricas em formação e produção (FNP Consultoria & Comércio, 2004). A hegemonia desse cultivar é devida principalmente a suas características intrínsecas para o processamento industrial de suco de laranja concentrado e congelado.

2.2 Classificação botânica e distribuição dos citros

O gênero *Citrus* pertence à tribo Citreae, da subfamília Aurantioideae, uma subdivisão da família Rutaceae. Esta por sua vez, pertence à divisão Embriofita Sifonógama, subdivisão Angiosperma, classe Dicotiledônea, sub-classe Archiclameida, ordem Geranialis, sub-ordem Geraniineae (Swingle & Reece, 1967).

Além do gênero *Citrus*, a tribo Citreae compreende ainda outros 27 gêneros e a subtribo Citrinae, outros 12 gêneros. De importância comercial, além do *Citrus*, aparecem os gêneros *Fortunella* e *Poncirus* (Giacometti, 1991). O gênero *Fortunella* é composto por quatro espécies, a saber: *F. margarita*, *F. japonica*, *F. crassifolia* e *F. hindsii*, sendo as duas primeiras denominadas kunquat oblongo e redondo,

respectivamente. O gênero *Poncirus* apresenta uma única espécie, *P. trifoliata*, muito utilizada como porta-enxerto e em hibridações (Swingle & Reece, 1967).

A classificação botânica do gênero *Citrus* apresenta controvérsias, tendo sido estudada por diversos autores, como Engler em 1896, Swingle em 1914, Tanaka de 1924 a 1941 (Swingle & Reece, 1967) e Hodgson (1967), sendo, entretanto, mais aceitas atualmente, as propostas de Swingle e Tanaka, publicadas em 1943 e 1961, respectivamente (Swingle & Reece, 1967). Swingle e Tanaka apresentaram, porém, muitos conceitos diferentes com relação à classificação das espécies onde o último descreve 169 espécies no gênero *Citrus* enquanto o primeiro cita apenas 16 espécies.

Análises filogenéticas posteriores, sugeriram que existiam apenas três espécies verdadeiras dentro das espécies cultivadas de *Citrus*, as tangerinas (*C. reticulata*), as toranjas (*C. grandis* ou *C. maxima*) e a cidra (*C. medica*). Os demais genótipos teriam sido derivados de hibridações entre estas três espécies (Barrett & Rhodes, 1976; Scora, 1975). Mais recentemente, este conceito tem ganhado suporte de alguns estudos utilizando marcadores moleculares e bioquímicos, incluindo isoenzimas, análise do genoma de organelas e microsátélites, de onde é possível concluir que a grande maioria dos genótipos conhecidos e cultivados hoje tem sua base genética fortemente relacionada com as três referidas espécies (Nicolosi et al., 2000).

Com relação ao centro de origem, as espécies do gênero *Citrus* e outros gêneros relacionados à subfamília Aurantioideae são originários da região Sudeste do continente asiático, estendendo-se do centro da China ao Japão e do Leste da Índia à Nova Guiné, Austrália e África Tropical (Scora, 1975; Soost & Cameron, 1975; Swingle & Reece, 1967). Acredita-se, também, que Yunnan, na China, desempenhe um papel importante na origem de espécies contemporâneas de *Citrus* (Gmitter Júnior & Hu, 1990). Os pomelos (*C. paradisi*) são uma exceção, tendo aparecido em Barbados antes de 1790 como um mutante ou, possivelmente, um híbrido de espécies introduzidas na região (Scora et al., 1982).

Atualmente, as plantas cítricas têm sido cultivadas em uma ampla faixa do globo terrestre, compreendida entre as latitudes de 40° S e 40° N, sendo as regiões mais

adequadas para o cultivo aquelas em latitudes superiores a 22° N e 22° S (Soost & Cameron, 1975; Davies & Albrigo, 1994).

2.3 Importância da utilização de porta-enxertos na citricultura

As plantas cítricas podem ser multiplicadas por sementes (via sexual), por estaquia e enxertia (via assexual), sendo que a forma utilizada comercialmente no Brasil é a enxertia (Machado Filho et al., 2003).

A enxertia é um método de propagação que consiste em se unir duas ou mais porções de tecidos de modo que a união destas partes venha a constituir-se em uma nova planta. Nesse caso, as partes que compõem a planta são o porta-enxerto ou “cavalo”, parte que confere o sistema radicular à planta e passa a ser o responsável pela absorção de nutrientes e água, além de servir de suporte e o enxerto ou “cavaleiro”, parte que irá originar a parte aérea da planta (Pasqual et al., 2001; Simão, 1998). A planta enxertada é, portanto, uma associação de duas plantas, podendo ser do mesmo cultivar ou de cultivares ou espécies diferentes, mas que guardam entre si relativa interdependência. A afinidade anatômica é necessária para o perfeito desenvolvimento da planta. A base da enxertia consiste na íntima associação dos tecidos cambiais, de modo a formarem uma conexão contínua (Simão, 1998).

O porta-enxerto é de fundamental importância na formação de uma muda cítrica, visto que ele pode interferir no desenvolvimento e vigor da copa, precocidade de produção, na quantidade e na qualidade da produção, no adiantamento e atraso da maturação dos frutos, na resistência a inúmeras pragas e doenças, bem como na capacidade de adaptação da planta às condições edafoclimáticas desfavoráveis, preservando as características fundamentais das copas desejadas (Cunha Sobrinho et al., 1980; Pompeu Júnior, 1991). O vigor da copa e conseqüentemente seu tamanho, estão ligados diretamente ao porta-enxerto utilizado. No passado, buscavam-se porta-enxertos que propiciassem maior tamanho de copa e, desta forma, maior produtividade. O surgimento das novas tendências da fruticultura, incluindo os plantios adensados, trouxeram novos conceitos, acarretando na busca de porta-enxertos que propiciem

menor tamanho de copa e com alta eficiência produtiva em relação ao volume da mesma (Carlos et al., 1997). De uma forma mais resumida, há cinco razões principais para o uso das plantas cítricas enxertadas: frutificação precoce supressão de juvenildade, plantas de tamanho uniforme, controle de produção e qualidade de fruto, tolerância a fatores desfavoráveis no solo e tolerância a *Phytophthora* spp., viroses e nematóides (Wutscher, 1991).

A habilidade de uma planta enxertada de formar uma combinação bem sucedida está relacionada, em grande parte, com a sua constituição e o seu modo de desenvolvimento. As falhas que ocorrem entre as plantas enxertadas podem ser devidas a incompatibilidade entre tecidos do enxerto e do porta-enxerto, que pode estar associada a questões estruturais e fisiológicas (Carlos et al., 1997; Simão, 1998). Para a citricultura brasileira, as incompatibilidades mais importantes são as da laranja ‘Pêra’ enxertadas em *Poncirus trifoliata* [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], citrumelo ‘Swingle’ [*Citrus paradisi* Macf x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], limão ‘Rugoso’ (*Citrus jambhiri* Lush.) e limão ‘Volkameriano’ (*Citrus Volkameriana* Pasq.), laranja ‘Seleta de Itaborai’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] enxertada em *Poncirus trifoliata* e limão ‘Rugoso’, limão ‘Eureka’ e ‘Siciliano’ (*Citrus limon* L.) enxertados em *Poncirus trifoliata* e citranges [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* L.] e tangor ‘Murcote’ (*Citrus reticulata* Blanco x *Citrus sinensis* L.) enxertado em *Poncirus trifoliata* e seus híbridos (Carlos et al., 1997).

A evolução do uso de porta-enxertos no Brasil está diretamente ligada a ocorrência de determinadas doenças: a gomose de *Phytophthora*, vírus da tristeza dos citros (CTV) e o declínio dos citros (Pompeu Júnior, 1991; Salibe, 1975).

Desde a época da introdução das plantas cítricas no Brasil pelos portugueses em 1540 até o final do século XIX, os citros eram multiplicados por sementes (Pompeu Júnior, 1991). A utilização de porta-enxertos começou na tentativa de buscar tolerância ao ataque de *Phytophthora* spp. No Brasil, a utilização de porta-enxertos começou com a laranja ‘Caipira’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. Entretanto, a suscetibilidade desse porta-enxerto a gomose de *Phytophthora* e à seca proporcionou a substituição pela laranjeira azeda (*Citrus aurantium* L.) a partir de 1920. Com o aparecimento do CTV em 1937,

substituiu-se este porta-enxerto pelo limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia* Osbeck). Entretanto, a suscetibilidade do limão ‘Cravo’ a exocorte e xiloporose, cuja presença nos pomares eram mascaradas pela tolerância da laranja azeda, se tornou um sério problema, desde que estas doenças podiam reduzir em até 70% a produção de frutos (Pompeu Júnior, 2001). As pesquisas levaram, então, o uso de clones nucelares a partir de 1955, sendo que de 1961 a 1970, a utilização do limão ‘Cravo’ como porta-enxerto aumentou de 77% para 99% (Pompeu Júnior, 2001).

A partir da década de 70, uma doença de etiologia desconhecida, o declínio dos citros, se tornou um problema tanto na Flórida (EUA) como no Brasil, sendo os porta-enxertos mais susceptíveis o *Poncirus trifoliata*, o limão ‘Rugoso’ e o limão ‘Cravo’ (Grosser & Gmitter Junior, 1990a). A intolerância do limão ‘Cravo’ ao declínio causou uma pequena diversificação de porta-enxertos usados no Brasil (Pompeu Júnior, 2001). Atualmente, mais de 80% das árvores cítricas em produção no Estado de São Paulo estão sobre o limão ‘Cravo’ e o restante está distribuído entre tangerinas, limões, citrumelos, trifoliatas e citranges (Abecitrus, 2004). Porém, com o surgimento da morte súbita dos citros na região Norte do Estado de São Paulo e Triângulo Mineiro (MG), doença de causa desconhecida que vem destruindo rapidamente as laranjeiras enxertadas sobre limão ‘Cravo’, inicia-se uma nova tendência de substituição desse porta-enxerto (Fundecitrus, 2004a).

A história da citricultura vem mostrando a importância da diversificação de porta-enxertos, além da necessidade de cultivares porta-enxertos melhorados. A utilização generalizada de um único porta-enxerto para todos os cultivares copa provavelmente não atende às características peculiares de cada cultivar, impedindo que a planta, mesmo recebendo os tratamentos culturais adequados, manifeste todo o seu potencial produtivo (Pompeu Júnior et al., 1986).

O conhecimento das características dos porta-enxertos e a racional utilização delas permite maior produtividade. A escolha do porta-enxerto a ser utilizado é uma fase de grande importância no planejamento de um pomar de citros. Essa escolha deverá levar em conta, também, o local de instalação do pomar, clima, solo, cultivar copa e o

manejo a ser adotado, já que não existe um porta-enxerto considerado completo em suas características hortícolas (Mourão Filho & Mendes, 2002; Pompeu Júnior, 1991).

2.4 Melhoramento de porta-enxertos de citros

O melhoramento genético vegetal busca o desenvolvimento de novos cultivares que promovam uma elevada e estável produtividade, bem como qualidade do produto. Isso envolve a seleção de progenitores e, geralmente, a seleção entre as progênies resultantes (Binsfeld, 1999). Diversos estudos indicam que muitas características importantes da combinação copa/porta-enxerto são influenciadas exclusivamente pelo porta-enxerto (Grosser & Gmitter Junior, 1990a). Os programas de melhoramento de cultivares porta-enxerto dão ênfase à tolerância ou resistência a doenças como gomose de *Phytophthora*, CTV, declínio e nematóides, a fatores abióticos tais como baixa temperatura, salinidade, estresse hídrico e encharcamento, além de características hortícolas como vigor e tamanho da copa, qualidade dos frutos e produtividade (Mourão Filho, 1996). Além disso, um bom porta-enxerto também deve ser de fácil propagação, compatível com o cultivar copa sobre ele enxertado, bem como conferir vigor reduzido às plantas para facilitar o planejamento e condução dos pomares adensados (Pompeu Júnior, 1991).

No entanto, não há um porta-enxerto cítrico usado atualmente, que não apresente alguma limitação. Ao longo de muitos anos, não se selecionaram porta-enxertos que melhor se adaptassem as próprias condições da cada área de produção. Assim, alguns países estão conduzindo programas de melhoramento durante anos, para a produção de novos porta-enxertos (Forner & Forner-Giner, 2002).

2.4.1 Hibridação sexual

Em sua grande maioria, as espécies do gênero *Citrus* são diplóides ($2n = 2x = 18$) havendo, porém, algumas exceções, como a lima ácida ‘Tahiti’ (*Citrus latifolia*

Tanaka), que é triplóide ($2n = 3x = 27$) (Gmitter Junior et al., 1992; Pompeu Júnior, 1991).

Inicialmente, a seleção de novos cultivares era realizada por cruzamentos entre plantas compatíveis, de acordo com as técnicas de melhoramento tradicionais. Entretanto, apesar da grande variabilidade genética existente entre os citros e outros gêneros da família Rutaceae, a base genética de várias espécies economicamente importantes é estreita. Além disto, o melhoramento genético tradicional tem apresentado limitações à obtenção de novos cultivares porta-enxerto e copa, devido à descontinuidade nos programas estabelecidos e a fatores biológicos característicos da espécie, como, por exemplo, poliembrião nucelar (apomixia), longos ciclos de reprodução, juvenilidade, poliploidia, elevada heterozigose, esterilidade gametofítica e incompatibilidade sexual (Cristofani, 1997; Grosser & Gmitter Junior, 1990a; Ling et al., 1990; Vardi & Galun, 1989; Vardi & Spiegel-Roy, 1982; Vardi et al., 1974). Como consequência, os cultivares cultivados nas últimas décadas têm sido originados a partir de seleções naturais e mutações (Soost & Cameron, 1975).

A apomixia ou embrião nucelar representa um dos maiores obstáculos para programas de melhoramento via hibridização sexual em citros. Devido à poliembrião, a produção de uma população de híbridos segregantes de tamanho suficiente para a seleção se torna difícil. Os embriões nucleares competem com o embrião zigótico por espaço e nutrientes nas sementes em desenvolvimento, resultando, freqüentemente, na perda do embrião zigótico. Várias técnicas têm sido utilizadas para identificar plântulas zigóticas e plântulas nucleares, como, por exemplo, isoenzimas ou marcadores moleculares do tipo RAPD (Cristofani et al., 1999). Parentais monoembriônicos, os quais produzem apenas seedlings zigóticos, podem ser utilizados na obtenção de populações segregantes, mas o número destes parentais é reduzido e limitado (Grosser & Gmitter Junior, 1990a).

Os programas de melhoramento em citros são prejudicados também pelo longo período juvenil, onde muitas espécies podem levar mais de cinco anos até a primeira produção (Soost & Cameron, 1975). Esta característica implica ainda na presença de plantas com grande quantidade de espinhos, crescimento vigoroso, resultando em

plantas com porte excessivo, dificultando a avaliação das progênies híbridas (Grosser & Gmitter Junior, 1990a).

A poliploidia não é comum em citros, porém é um dos fatores que interferem na complexa transmissão de caracteres. O número básico de nove cromossomos aparece em alguns cultivares, não somente multiplicado por dois, mas também em maior número, como ocorrem nas formas triplóides e tetraplóides (Cristofani et al., 1999).

Um outro problema que dificulta os trabalhos de melhoramento é a alta heterozigose, assim como o desconhecimento do modo de herança de características desejadas. Conseqüentemente, cruzamentos realizados entre parentais com características complementares freqüentemente resultam em progênies com produção e qualidade aquém da esperada. Além disso, muitas características importantes dos parentais são segregadas e perdidas nas progênies (Barrett & Rhodes, 1976; Swingle & Reece, 1967). Algumas características de importância econômica para o melhoramento dos citros, que podem ser herdadas como características determinadas por um único gene, é ao CTV, resistência aos nematóides dos citros, embriões nucelar e o caráter folha trilobada de *Poncirus trifoliata* (Cristofani et al., 1999).

A partenocarpia, desenvolvimento de frutos sem fertilização levando à formação de frutos sem sementes, ocorre em citros devido à esterilidade gamética ou auto-incompatibilidade. A esterilidade gamética e a autofecundação têm sido, juntamente com a triploidia, as principais causas do aparecimento de frutos sem sementes (Mourão Filho et al., 2002).

Apesar dos programas de melhoramento genético convencional terem iniciado há mais de um século, os cultivares utilizados nas últimas décadas têm sido originadas a partir de seleções naturais e mutações (Soost & Cameron, 1975). Um exemplo de melhoramento resultante da seleção de clones obtido via mutações naturais em gemas é a laranja ‘Piralima’, podendo ser citada, também, a laranja ‘Baianinha’, que é possivelmente uma variação da laranja ‘Baia’, sendo a laranja ‘Baia’ uma mutação da laranja ‘Seleta’ (Figueiredo, 1991). No entanto, algumas hibridações promoveram sucesso na obtenção de porta-enxertos, como é o caso do citrumelo ‘Swingle’ (*C. paradisi* x *P. trifoliata*), os citranges ‘Troyer’ e ‘Carrizo’ (*C. sinensis* x *P. trifoliata*), o

tangelo ‘Orlando’ (*C. paradisi* x *C. tangerina*) e os citremons (*P. trifoliata* x *C. limon*) (Mourão Filho et al., 2002).

Os programas de melhoramento convencionais através de cruzamentos sexuais confrontam com algumas barreiras inerentes à espécie e o melhoramento através de técnicas de biotecnologia traz alternativas para a produção de cultivares melhorados de porta-enxerto e copa, combinando características complementares dos cultivares disponíveis sem a ocorrência de segregação gênica.

O desenvolvimento e a incorporação de novas biotecnologias tais como a transformação genética, a indução de mutações e a fusão de protoplastos e obtenção de híbridos somáticos, em programas de melhoramento dos citros, vêm ajudar a pesquisa a superar as limitações encontradas no melhoramento tradicional e aproveitar a grande variabilidade genética disponível para a obtenção de novos cultivares. O melhoramento genético é desejável na maioria das espécies vegetais de importância comercial e, recentemente, vem contando com o auxílio da biotecnologia para o seu desenvolvimento, permitindo o aumento do potencial de produtividade destas culturas (Costa et al., 2003; Grosser & Gmitter Junior, 1990a; Mendes et al., 2001; Mourão Filho, 1996; Mourão Filho et al., 2002).

2.4.2 Hibridação somática

Uma das técnicas que vem sendo utilizada no melhoramento genético é a hibridação somática via fusão de protoplastos. São denominados protoplastos as células vegetais desprovidas de parede celular, permitindo assim realizar diversas manipulações experimentais, tais como a extração de organelas celulares, transferência gênica via transformação genética e a produção de híbridos somáticos (Grosser & Gmitter Junior, 1990a).

A hibridação somática de plantas é uma técnica por meio da qual propriedades das células podem ser modificadas mediante fusões nucleares ou citoplasmáticas (Carneiro et al., 1999). O sistema de produção de híbridos somáticos pela fusão de protoplastos é baseado na capacidade de regeneração de plantas a partir de calos, via

embriogênese somática, se tornando viável devido ao elevado potencial de regeneração de plantas, como é o caso dos citros (Kunitake & Mii, 1995; Motomura et al., 1995).

A vantagem da hibridação somática sobre os demais métodos de melhoramento de plantas, é que esta técnica consiste no isolamento e fusão de protoplastos com a produção de híbridos tetraplóides heterozigotos ou alotetraplóides ($2n = 4x = 36$), os quais contêm toda a informação genética de ambos os parentais envolvidos (Grosser, 1985; Grosser et al., 1998c; Gmitter Junior et al., 1992). A hibridação somática é um processo onde não existe segregação meiótica, resultando na expressão aditiva das características dominantes nos híbridos (Grosser & Gmitter Junior, 1990a; Ohgawara & Kobayashi, 1991). Assim, genes deletérios recessivos, mascarados nos parentais sob uma condição heterozigota, provavelmente permanecerão não expressos nos híbridos somáticos e características controladas por genes dominantes ou co-dominantes em um parental, ou genes recessivos sob condição homozigota em ambos, terão grande probabilidade de se expressar no híbrido somático (Grosser & Gmitter Junior, 1990a).

A hibridação somática é vantajosa no que tange ao uso direto no campo dos híbridos como porta-enxertos, sem a necessidade de realizar retrocruzamentos (Grosser & Gmitter Junior, 1990a). Outra vantagem desta técnica para porta-enxertos é a produção de híbridos somáticos intergenéricos entre *Citrus* e espécies/gêneros relacionados, sexualmente incompatíveis (Grosser & Gmitter Junior, 1990b).

Protoplastos podem sofrer fusão por métodos físicos ou químicos, sendo este último o mais usual devido a sua eficiência, baixo custo e por não interferir na viabilidade dos protoplastos (Grosser & Gmitter Junior, 1990a; Mourão Filho & Mendes, 2002; Mourão Filho et al., 1996). Nesta técnica, é necessário que um dos parentais apresente capacidade embriogênica para que haja regeneração de plantas após a fusão de protoplastos. Os protoplastos embriogênicos são isolados de linhagens de calos cultivados *in vitro* e protoplastos de um segundo parental não-embriogênicos são isolados de folhas. Após ser realizada a fusão dos protoplastos, a embriogênese somática é induzida e os embriões são formados, geminados e enraizados posteriormente *in vitro*, depois aclimatizados e realizada a confirmação da hibridação somática por teste

morfogênico foliar do híbrido e de seus parentais e RAPD (Grosser, 1993; Mourão Filho & Mendes, 2002).

Durante o processo de fusão de protoplastos, podem ocorrer vários resultados possíveis. Se ocorrer a fusão dos dois núcleos, tem-se um híbrido verdadeiro. Quando ocorre perda cromossômica de um ou de ambos os núcleos, chama-se híbrido assimétrico. Se todo o núcleo de um dos parentais é perdido, resta apenas um núcleo na mistura dos dois citoplasmas, este produto é chamado de cíbrido (Bengochea & Dodds, 1986).

O primeiro trabalho de hibridação somática envolvendo o gênero *Citrus*, foi a produção do híbrido alotetraplóide intergenérico resultante da fusão de protoplastos derivados de calos embriogênicos de laranja ‘Trovia’ (*C. sinensis*) com protoplastos de mesófilo foliar de *Poncirus trifoliata* (Ohgawara et al., 1985). Desde então, a hibridação somática nos programas de melhoramento de porta-enxertos para citros, visando à melhoria da resistência e tolerância a doenças, tem sido utilizada de forma intensiva na Universidade da Flórida - Estados Unidos. Numerosas combinações têm sido realizadas e mais de 50 híbridos têm sido propagados e colocados em ensaios de campo, para a avaliação do potencial como novos porta-enxertos (Grosser et al., 1992; 1994; 1998b; Louzada et al., 1992).

Os porta-enxertos oriundos de hibridação somática tem demonstrando potencial em reduzir o tamanho da copa, obtenção significativa em ganhos na qualidade dos frutos e produção de sementes (Grosser & Chandler, 2002; Grosser et al., 1998c). Quanto à resistência a doenças, verificou-se que os híbridos de laranja azeda + citrange ‘Carrizo’, laranja azeda + limão ‘Volkameriano’ e laranja azeda + limão ‘Cravo’ têm demonstrado tolerância ao CTV, uma vez que o parental laranja azeda é intolerante ao vírus, quando usado como porta-enxerto, porém, para o híbrido laranja azeda + ‘Fly Dragon’, houve susceptibilidade ao CTV, apesar do ‘Fly Dragon’ [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. var. *monstrosa*] ser tolerante ao vírus (Grosser & Chandler, 2000; Grosser et al., 1996; Grosser et al., 1998a). Outros resultados mostram que plantas de quatro anos de idade, enxertadas sobre o híbrido somático laranja ‘Hamlin’ + limão ‘Rugoso’, não

apresentaram sintomas dessa doença e obtiveram teste negativo para proteínas específicas do declínio (Grosser et al., 1998b).

As plantas cítricas representam uma das poucas espécies vegetais que estão alcançando potencial como híbridos somáticos, possibilitando a união da maioria das combinações parentais desejáveis (Grosser & Chandler, 2002), podendo os porta-enxertos oriundos de fusão de protoplastos serem uma nova opção para a citricultura mundial.

2.5 Métodos propagativos de porta-enxertos de citros

As plantas cítricas podem ser propagadas por cinco métodos: sementes (via sexual), alporquia, mergulhia, enxertia e estaquia (via assexual) (Hume, 1952). A produção de mudas através de sementes, denominadas “pé-franco”, na citricultura, não é uma prática viável, devido principalmente a problemas ocasionados por patógenos de solo, longo período juvenil, porte elevado, grande vigor e possibilidade de ocorrer variabilidade genética, apesar da maioria das espécies cítricas possuírem sementes poliembriônicas, há ainda uma pequena possibilidade do embrião zigótico superar os nucelares (Cunha Sobrinho et al., 1980; Pompeu Júnior, 1991; Machado Filho et al., 2003).

Uma outra técnica empregada para na propagação dos citros é a alporquia. No caso dos citros, apesar de ser uma técnica pouco estudada, trabalhos revelaram insucesso da alporquia em laranjas doces, constatando-se apenas a formação de calos como resposta ao anelamento dos ramos, não havendo sequer enraizamento (Sampaio et al., 1977). A mergulhia, como alternativa para a propagação dos citros, é um método pouco usado, exceto para cidreira, que tem demonstrado bom resultado (Hume, 1952).

O método de propagação mais empregado em citros é a enxertia, sendo que o porta-enxerto é obtido através de sementes, uma vez que a grande maioria das espécies cítricas são poliembriônicas e os embriões nucelares competem com o embrião zigótico por espaço e nutrientes nas sementes em desenvolvimento, resultando, freqüentemente, na perda do embrião zigótico (Cristofani et al., 1999; Pompeu Júnior, 1991). Esse

método de propagação apresenta algumas vantagens, entre as quais se pode citar a uniformidade das mudas, precocidade no início de produção e aumento na produtividade, devido à influência recíproca dos porta-enxertos (Carlos et al., 1997).

Muitas espécies cítricas podem ser propagadas por estacas, porém os resultados são variáveis entre as espécies. Limões, limas e cidras geralmente apresentam bons resultados de enraizamento, tangerinas apresentam certa dificuldade em emitirem raízes de suas estacas e laranjas doces, pomelos, trifoliatas e citranges apresentam capacidade intermediárias entre os citros no processo de regeneração de plantas por estaquia (Platt & Optiz, 1973).

A formação de porta-enxertos por estacas possibilita a viabilização de cultivares monoembriônicas com características desejáveis, como é o caso da toranja e, ao mesmo tempo, garante a uniformidade do pomar. Além disso, a produção de porta-enxertos pelo sistema tradicional é sazonal, enquanto a estaquia pode ser realizada, teoricamente, em qualquer época do ano (Zafarri et al., 1993).

2.5.1 Obtenção de porta-enxertos de citros por estacas

O enraizamento de estacas é um método de propagação que mantém as características básicas da planta-mãe e incrementa o número de plantas rapidamente, o que é de grande interesse para a citricultura. Muitas espécies de citros podem ser propagadas por estacas (Platt & Optiz, 1973).

A estaquia, ou propagação por estaca, é um método de propagação em que segmentos destacados de uma planta, sob condições adequadas, emitem raízes e originam uma nova planta, com características idênticas àquela que lhe deu origem (Pasqual et al., 2001). As raízes originárias das estacas são classificadas como adventícias, ao contrário do que ocorre na reprodução, onde são formadas raízes do tipo pivotante (Fachinello et al., 1995).

O processo de desenvolvimento das raízes adventícias é dividido em três estágios: a desdiferenciação celular, onde as células retornam ao estágio meristemático; a diferenciação das células meristemáticas em primórdios radiculares; o crescimento e

emergência de novas raízes (Hartmann et al., 2002). Na maioria dos casos, em estacas herbáceas as raízes adventícias são formadas na região do floema e em estacas lenhosas, as raízes adventícias originam-se no câmbio, próximas ao cilindro vascular (Alvarenga & Carvalho, 1983).

A capacidade de uma estaca emitir raízes está relacionada a fatores endógenos ou internos e fatores exógenos ou externos. Como fatores endógenos, consideram-se, principalmente, as condições fisiológicas e idade da planta matriz, época de coleta da estaca, potencial genético de enraizamento, sanidade, balanço hormonal, oxidação de compostos fenólicos e posição da estaca no ramo e, como fatores exógenos, a temperatura, luz, umidade, substrato e acondicionamento (Fachinello et al., 1995).

A formação de raízes adventícias deve-se à interação de tais fatores, principalmente, a translocação de substâncias localizadas nas folhas e gemas, onde estão o centro de produção de substâncias hormonais, chamadas de hormônios ou fitohormônios, que são translocados via floema para as diversas regiões da planta. Essas substâncias controlam a divisão celular em tecidos de plantas, podendo ser limitantes ou estimulantes nos processos fisiológicos (Torrey, 1996).

As auxinas são as substâncias mais importantes, que desempenham maiores funções no enraizamento de estacas. São sintetizadas no meristema apical e nas folhas novas, estimulam a divisão celular, além de apresentarem relações bastante importantes com ácidos nucléicos e proteínas, modificações da parede celular e estímulo a atividade enzimática (Hartmann et al., 2002; Figueiredo et al., 1995). Entre as principais funções biológicas das auxinas, citam-se o crescimento de órgãos, especialmente as raízes (Alvarenga, 1990).

Existem várias razões que justifiquem a utilização da propagação de citros por estaquia, principalmente em trabalhos de melhoramento e na obtenção de porta-enxertos. A utilização de porta-enxertos obtidos por estacas é uma alternativa para a produção de plantas com dificuldades de multiplicação por sementes ou que produzem pequenas quantidades de sementes por frutos, como é o caso da tangerina ‘Sunki’ (*Citrus sunki* Hort. ex. Tan.), visando a obtenção de mudas tolerantes ao declínio, visto que, pode-se intensificar a utilização de porta-enxertos menos sensível a esta desordem fisiológica

(Platt & Optiz, 1973; Ferri, 1997). Porta-enxertos de citros possuem variabilidade genética quanto ao enraizamento de suas estacas, existindo genótipos que possuem elevada capacidade de enraizamento, como é o caso do limão ‘Volkameriano’ (65,86%) e o limão ‘Cravo’ (60,28%) e média capacidade, como o citrumelo ‘Swingle’, no caso de estacas semilenhosas (48,26%) (Andrade & Martins, 2003).

Para trabalhos que envolvam caracterização de genótipos cítricos quanto à resistência e tolerância a enfermidades bióticas e às condições abióticas, é desejável que não haja variabilidade genética dentro de cada genótipo em estudo, o que pode acarretar a resultados contrários do esperado ou verdadeiro. Além disso, pode ocorrer elevado coeficiente de variação em trabalhos dessa natureza, principalmente em estudos que envolvam patógenos (Boava et al., 2003), uma vez que plantas cítricas obtidas por sementes, podem apresentar plantas oriundas de embriões zigóticos (Frost & Soost, 1968). No caso de seedlings de limão ‘Cravo’, foi determinado através de marcadores moleculares do tipo RAPD que a frequência de plantas zigóticas é de 6%, ou seja, plantas que apresentam padrões diferentes da planta-mãe, tratando-se de genótipos híbridos (Cristofani & Machado, 1998). Assim, a uniformidade obtida pela propagação dos citros por estacas em trabalhos de teste de progênie em citros é desejável.

Devido à natureza poliembriônica dos citros, é esperado que híbridos somáticos produzidos de dois parentais poliembriônicos também possuam poliembrião em suas sementes. Algumas sementes de plantas de híbridos somáticos com potencial uso como porta-enxertos (laranja ‘Hamlin’ + limão ‘Volkameriano’ e laranja azeda + limão ‘Cravo’) produziram consideráveis números de sementes, porém não produziram adequadamente sementes poliembriônicas (Grosser et al., 1998a). Outro híbrido somático que produz sementes com alta porcentagem de sementes zigóticas é o híbrido tangerina Nova + Toranja Hirado Buntan (Grosser & Chandler, 2002). Nesse caso, a propagação dos híbridos somáticos por estaquia vem a se tornar à técnica mais viável para a rápida multiplicação das matrizes selecionadas. Em trabalhos que envolvem a produção de híbridos somáticos, após a confirmação do híbrido, as plantas são propagadas geralmente por culturas de tecidos e mais usualmente, por estaquia (Grosser et al., 1995).

Propagação adequada de novos híbridos somáticos é essencial para testar o potencial agrônômico e verificar as aplicações comerciais dos híbridos. Considerando o longo período juvenil dos citros, é necessária a adoção de métodos de propagação vegetativa para avaliar os novos híbridos a curto prazo quanto à resistência e tolerância a enfermidades bióticas e às condições abióticas, antes destes entrarem na fase reprodutiva, onde muitas espécies podem levar mais de cinco anos até a primeira produção (Soost & Cameron, 1975). Assim, promove-se redução no tempo dos programas de melhoramento em citros, julgando com certa antecedência características agrônômicas essenciais na classificação de um híbrido somático com potencial uso como porta-enxerto.

Os híbridos somáticos, antes de chegarem a fase reprodutiva, apresentam elevado potencial de propagação por estaquia. Pode-se tomar como exemplo o híbrido somáticos *Citrus deliciosa* + *Poncirus trifoliata*, que apresentou 90% de enraizamento de suas estacas e 95% de sobrevivência ao transplantio (Ollitrault et al., 1998). Em geral, estacas retiradas de plantas em estágio juvenil apresentam maior capacidade de enraizamento (Janick, 1966).

2.6 *Phytophthora* spp. dos citros

A cadeia dos citros é de suma importância para a economia brasileira, porém a citricultura possui grande número de doenças que limitam ganhos na produtividade. Entre as principais doenças dos citros estão as causadas pelo gênero *Phytophthora*, que causa a mais séria doença de solo nas plantas cítricas (Rossetti, 2001). Esse grupo é amplamente distribuído no parque citrícola mundial, causando perdas na produção desde regiões áridas até as subtropicais. Estima-se que os danos provocados por *Phytophthora* spp. em citros sejam de 10 a 30% da produção mundial, proporcionando prejuízos de milhões de dólares anuais (Timmer & Menge, 1989).

As perdas ocorrem em todas as fases de produção de citros, tanto em viveiro como no campo. Na sementeira, o patógeno pode provocar o tombamento das mudas ou mela (damping-off), lesões em folhas, brotos e hastes; nos pomares, ocorrem as

podridões do colo ou pé (gomose) e podridões das raízes e radículas; em pós-colheita ocasiona a podridão parda dos frutos (Feichtenberger, 2001).

O gênero *Phytophthora* pertence à família Pythiaceae, ordem Pythiales, classe Oomycetes, filo Oomycota e reino Stramenopila (Luz & Matsuoka, 2001). Apesar de não se encontrarem dentro do reino Fungi, os oomicetos são estudados juntamente com os fungos verdadeiros, devido ao seu crescimento micelial. No entanto, várias diferenças existem entre esses grupos de microrganismos, sendo a principal a composição química da parede celular, onde no gênero *Phytophthora* não há quitina (Bartnicki-Garcia & Wang, 1983).

Os esporângios são esporos assexuais que se formam nas hifas diferenciadas (esporangiósforos), tendo sua produção mais freqüente nas estações quentes e chuvosas. Os esporângios de *Phytophthora* spp. podem formar tubo germinativo (germinação direta) ou por clivagem citoplasmática, produzindo zoósporos que são liberados através de um poro (germinação indireta). Os zoósporos são esporos assexuais móveis, biflagelados e sem parede celular. Podem nadar a curtas distâncias em superfície líquida e quando encontram as radículas e raízes com ferimento no hospedeiro, perdem os flagelos e emitem hifas. Mesmo sem encontrar seu hospedeiro, os zoósporos podem permanecer no solo por longo período. Também no solo, se encontram os principais estruturas de resistência de *Phytophthora* spp., os clamidósporos (esporos assexuais), ocorrendo quando o crescimento micelial (conjunto de hifas) é desfavorável (baixa disponibilidade de oxigênio e nutrientes, altos níveis de dióxido de carbono e baixas temperaturas) e os esporos sexuais, os oósporos, formados no interior dos gametângios femininos, os oogônios (Ribeiro, 1983; Feichtenberger, 2001).

Os esporângios e zoósporos são os principais responsáveis pela infecção e pelo rápido desenvolvimento da doença, os oósporos e, principalmente, os clamidósporos, são as mais importantes estruturas de sobrevivência do patógeno, atuando como inóculo primário de infecção, encontrados no solo principalmente no inverno (Lutz & Menge, 1991; Graham & Timmer, 1992).

Atualmente, onze espécies de *Phytophthora* estão associadas ao complexo de doenças *Phytophthora* spp. – citros, sendo que cinco já foram relatadas na América do

Sul (Fawcett & Bitancourt, 1940; Erwin & Ribeiro, 1996). No Brasil, as espécies *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan (*P. parasitica* Dastur) e *P. citrophthora* (Sm. & Sm.), são as mais frequentemente encontradas nas regiões citrícolas do país. No Estado de São Paulo, *P. nicotianae* é a espécie preponderantemente associada às perdas mais significativas provocadas por esse patógeno, tanto em viveiros, como em pomares comerciais. Além disso, *P. nicotianae* tem sido encontrada em mais de 90% dos casos analisados do Estado de São Paulo (Amorim, 1997; Feichtenberger, 1996; 2001). Na Flórida (EUA), *P. nicotianae* também causa sérias perdas por podridões de raízes e do colo em viveiros e pomares, os quais resultam no declínio das plantas e perdas de produção de muitos cultivares (Graham, 1990).

Em relação aos fatores ambientais que influenciam o desenvolvimento das doenças de *Phytophthora* spp., citam-se a alta temperatura, a umidade relativa e a elevada umidade do solo (Fawcett & Bitancourt, 1940; Rossetti, 1947; Feichtenberger, 1990a; 2001). A temperatura ideal para o desenvolvimento de *P. nicotianae* é de 30 a 32°C. Clamidósporos germinam e produzem esporângios em condições de elevadas temperaturas e alta umidade do solo; a formação e liberação de zoósporos dos esporângios ocorre em condição de saturação de umidade do solo (Feichtenberger, 1990a; Duniway, 1983).

As mudas têm-se constituído no principal veículo disseminador de *Phytophthora* spp. Levantamento realizado pelo Fundecitrus em viveiros do Estado de São Paulo revelou que o rigor da nova legislação de produção de mudas cítricas em ambiente protegido ocasionou a redução da percentual de viveiros contaminados por *Phytophthora* spp., notando-se queda sucessiva: 54,7% em 2000, 46,3% em 2001, 43,5% em 2002 e 25,5% em 2003. (Fundecitrus, 2004b).

Com relação ao controle das doenças ocasionadas por *Phytophthora* spp., diversas alternativas tem sido preconizadas, incluindo medidas curativas e preventivas, tais como: tratamento químico com fosetyl-Al em pulverizações foliares associados a aplicações de metalaxyl no solo (Davino et al., 1990; Feichtenberger, 1990b); controle biológico com microrganismos antagonistas (Feichtenberger, 1996); controle cultural através do aumento da altura de enxertia e utilização de compostos orgânicos (Koller &

Soprano, 1992; Amorim, 1997); utilização de espécies resistentes/tolerantes (Feichtenberger, 1990a; Feichtenberger et al., 1992; Erwin & Ribeiro, 1996) e o manejo integrado de doenças, envolvendo diversas medidas de controle (Feichtenberger, 1996).

2.6.1 Resistência varietal de citros a *Phytophthora* spp.

Das várias manifestações da doença devidas a *Phytophthora* spp., a podridão do colo e do tronco (gomose) e as podridões de raízes e radículas são as mais comuns nos pomares (Feichtenberger, 2001).

Os primeiros sintomas da podridão do colo se manifestam com a morte e escurecimento de pequenas zonas da casca com exsudação de goma no tronco e colo dos porta-enxertos susceptíveis. Lesões exsudativas também podem ocorrer em raízes principais, logo abaixo do nível do solo, porém de difícil constatação da goma, por ser facilmente dissolvida em água. Posteriormente, ocorrem rachaduras na casca e fendilhamentos longitudinais. Devido à infiltração da goma produzida pelas lesões, ocorre o escurecimento dos tecidos abaixo da casca e na superfície do lenho, que podem ser colonizados por microrganismos. Quando as lesões se desenvolvem muito, circulando grande parte do caule e destruindo o floema, a planta entra em rápido declínio, levando a morte da mesma (Rossetti, 1947; Timmer & Menge, 1989; Feichtenberger, 1990a; 1996).

A podridão de raízes e radículas é muito severa em viveiros. As raízes e radículas atacadas pelo patógeno apresentam podridões que podem reduzir drasticamente a área total das mesmas. Na parte aérea, as plantas podem apresentar sintomas reflexos da doença, que incluem descoloração das folhas, amarelecimento uniforme de toda a planta, murcha, seca e morte total da planta (Feichtenberger, 1990a; 1996). As podridões radiculares têm assumido menor importância em relação às infecções de tronco de *Phytophthora* spp. nos pomares, devido à baixa utilização da irrigação, tipo de solo, matéria orgânica do solo e a coincidência entre o período de inverno com o período seco, o que tem gerado maiores prejuízos aos produtores e estudos acadêmicos

focalizados a gomose do tronco, mas em regiões que adotam a irrigação, as podridões radiculares assumem igual importância a infecção de tronco (Feichtenberger, 2001).

O uso de porta-enxertos resistentes constitui-se na medida mais importante de controle das podridões do colo e s raízes provocadas por *Phytophthora* spp. em citros (Feichtenberger et al., 1997). A resistência genética é um dos métodos de controle que menos oneram o produtor. Os mecanismos de resistência de diferentes tecidos cítricos a *Phytophthora* spp. não foram ainda totalmente esclarecidos. Contudo, devido às grandes diferenças observadas nos tipos de resposta às infecções, em função do tipo e idade do tecido infectado, é provável que vários mecanismos estejam envolvidos (Feichtenberger, 2001). Com relação à herança para resistência/tolerância de porta-enxertos a *Phytophthora* spp., esta é do tipo poligênica, ou seja, controlada por vários genes (Graham & Castle, 1993).

No caso específico da doença denominado podridão das raízes e/ou radicelas de *Phytophthora* spp., os porta-enxertos são classificados como tolerantes, mediantemente tolerantes ou intolerante com relação a *Phytophthora* spp. Nesse caso, a tolerância do porta-enxerto está relacionada diretamente à sua capacidade de emitir novas raízes/radicelas frente ao ataque do patógeno no solo, ou pela limitação da conversão de propágulos do patógeno em infecções devido ao mecanismo bioquímico de plantas resistentes (Graham, 1995). Estudos histológicos de raízes infectadas mostraram menor colonização inter e intracelulares nos tecidos de porta-enxertos tolerantes do que nos tecidos dos suscetíveis, sugerindo que a tolerância atua na inibição do crescimento de *Phytophthora* spp. (Widmer et al., 1998). Porém, no caso da infecção do tronco ocasionada por *Phytophthora* spp., o porta-enxerto pode ser resistente ou suscetível.

Com relação à podridão do colo, o primeiro cultivar considerado resistente foi a laranja azeda, porém, esta somente é utilizada como porta-enxerto para limões verdadeiros, devido à intolerância a CTV (Erwin & Ribeiro, 1996). O *Poncirus trifoliata* é considerado como altamente resistente; as laranjas doces, limões verdadeiros, limas e pomelo são classificados como altamente susceptíveis (Timmer & Menge, 1989).

Na escolha de um porta-enxerto, recomenda-se que este apresente moderada susceptibilidade a *Phytophthora* spp. Nesse grupo, inclui-se o citrange ‘Troyer’, os

limões ‘Cravo’ e ‘Volkameriano’, tangelo ‘Orlando’ e as tangerinas ‘Cleópatra’ (*Citrus reticulata* Blanco) e ‘Sunki’ (Feichtenberger, 1990a; 1996). Em estudo da reação de vários porta-enxertos a inoculação com *P. nicotianae*, foi verificado que o limões ‘Cravo’ e ‘Volkameriano’ e tangerina ‘Cleópatra’ apresentaram resistência moderada, enquanto as laranjas doces foram altamente susceptíveis (Rondón et al., 1993).

Com relação à podridão de raízes e radículas, a ordem de tolerância dos porta-enxertos em função da capacidade de regeneração de suas raízes em solos infestados com *Phytophthora* spp., é a seguinte: *Poncirus trifoliata* e citrumelo ‘Swingle’ > citrange ‘Carrizo’ > laranja azeda > limões ‘Rugoso’, ‘Volkameriano’ e ‘Cravo’ > tangerina ‘Cleópatra’ > laranja ‘Pineapple’ (Castle et al., 1993). Porém, esta escala não pode ser adotada como padrão, uma vez que existem outros trabalhos que discordam desses resultados. Timmer et al. (1991), não verificaram diferenças na redução de massa de radículas em solos infestados com *P. nicotianae* entre os laranja azeda, tangerina ‘Cleópatra’ e citrange ‘Carrizo’, considerando-se esses como tolerantes, enquanto o limão ‘Volkameriano’ apresentou comportamento intermediário. Graham (1990) classificou o *Poncirus trifoliata* e citrumelo ‘Swingle’ como tolerantes, citrange ‘Carrizo’ como intolerante e laranjas doce e limão ‘Volkameriano’ como intermediários. Carvalho (2000) e Feichtenberger (2001) consideram os porta-enxertos limão ‘Cravo’, laranja azeda, tangerinas ‘Sunki’ e ‘Cleópatra’ como moderadamente tolerantes ou intolerantes à podridão das raízes e radículas.

Essas contradições têm como possível causa o fato de que esses testes de resistência ou tolerância se referirem a doenças diferentes e nem sempre existirem correlações entre elas (Carpenter & Furr, 1962). Outro fator que pode contribuir para variações nas respostas é a utilização de diferentes espécies do patógeno nos testes. A resposta do porta-enxerto a uma espécie de *Phytophthora* não deve ser a mesma para outras espécies (Matheron et al., 1998). É necessário considerar ainda que o desenvolvimento das infecções pode ser influenciado por outras variáveis como idade, vigor, estado nutricional, além da temperatura, o que poderia através de interações complexas, modificar a resposta dos diferentes porta-enxertos (Carvalho, 2000). O desenvolvimento da gomose é influenciado pelo estado de vegetação da planta. As

plantas que apresentam atividade fisiológica ativa, ou seja, brotações novas, maior vigor vegetativo e expressiva circulação nos vasos da casca produzem maiores lesões de *Phytophthora* spp. (Rossetti & Bitancourt, 1951).

Vale ressaltar que existem casos em que o porta-enxerto pode ser considerado resistente as infecções de tronco e medianamente tolerante ou intolerante à podridão das raízes e radículas, como é o caso da laranja azeda (Grimm & Hutchison, 1973; Graham, 1990; 1995) e do citrange ‘Carrizo’ (Feichenberger, 2001).

Os trabalhos de seleção para obtenção de porta-enxertos devem visar a resistência ou a tolerância a ambas doenças (infecção de tronco e podridão radicular) (Graham, 1995).

2.6.2 Métodos para avaliar a resistência/tolerância de citros a *Phytophthora* spp.

O isolamento de *Phytophthora* spp. de fragmentos das raízes, radículas, casca infectada e solo em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) não é uma tarefa simples. Os meios de cultura específicos recomendados para isolamento de *Phytophthora* spp. de tecido vegetal infectado e do solo são complexos, exigem antibióticos e reagentes, tornando-se de elevado custo (Tsao & Ocana, 1969; Broadbent, 1977). Uma técnica simples e de baixo custo no isolamento de *Phytophthora* spp. é a inserção de discos de folhas, raízes ou casca infectados na região do albedo de frutos de limão verdadeiro (*Citrus limon* L.), que atuará como filtros de agentes contaminantes. Os frutos são incubados em alta temperatura e umidade até que $\frac{2}{3}$ do fruto esteja tomado pelo patógeno, tempo necessário para que o mesmo atinja as sementes. As sementes são retiradas assepticamente, seccionada em pedaços e transferidas para placas de Petri contendo meio CA (cenoura-ágar). Após 24 a 72 horas observa-se o micélio do patógeno colonizando o meio de cultura (Erwin & Ribeiro, 1996).

A produção de esporângios pode ser realizada mediante estresse nutricional, transferindo o patógeno do meio de cultura para água destilada estéril, estimulando a formação dos esporângios (Mitchell & Kannwischer-Mitchell, 1993). Para induzir a liberação dos zoósporos, deve-se submeter placas de Petri contendo esporângios em

baixas temperaturas (4 a 8°C) por 15 a 20 minutos e, posteriormente, retornar a temperatura ambiente (Henderson et al., 1986; Mitchell & Kannwischer-Mitchell, 1993; Matheron et al., 1998).

Para a quantificação do patógeno no solo, pode-se adotar o método da isca através da contagem do número de esporângios. O método consiste em adicionar em um recipiente 100 g de substrato e 100 mL de água destilada, homogeneizar e adicionar 10 discos de 6 mm de diâmetro de folhas de limão verdadeiro previamente esterilizada em álcool 70% por 1 minuto na superfície da solução. As amostras devem ser mantidas sob iluminação contínua por quatro dias, sendo depois realizada a contagem do número de esporângios nas bordas das folhas em microscópio óptico e calculado a porcentagem de discos contaminados (Grimm & Alexander, 1973).

A avaliação de doenças causadas por *Phytophthora* spp. pode ser realizada em plantas com infecções naturais ou naquelas inoculadas experimentalmente em campo ou em ambiente controlado. Em condições naturais de infecção, há risco da resistência ser superestimada, em razão de “escape”, ou seja, a planta, embora susceptível, encontra-se em local onde as condições não são ideais para o desenvolvimento e infecção do patógeno, sendo assim as avaliações em ambiente controlado mais adequadas (Siviero et al., 2002a).

A tolerância de porta-enxertos pode ser avaliada estimando-se as podridões de raízes e radículas de plantas mantidas em solo ou substrato infestado com inóculo. Esse teste pode ser feito em tanques com água ou solução nutritiva inoculada com suspensões padronizadas de zoósporos, imergindo-se as raízes das plântulas por 18 a 20 horas nessa solução e depois transferindo para vasos em estufas ou canteiros de campo, que são periodicamente encharcados com água, para favorecer o desenvolvimento do patógeno e as infecções de radículas. Este teste é considerado muito drástico, porque a densidade de inóculo utilizada nos tanques, em geral é muita maior do que as que ocorrem naturalmente em pomares de citros (Feichtenberger, 2001).

As podridões de raízes e radículas podem ser avaliadas em solos ou substratos infectados com micélios, esporângios e zoósporos, ajustando-se às densidades de inóculo para valores próximos aos que podem ocorrer em pomares muito contaminados.

O solo ou substrato é mantido encharcado durante três dias seguintes da inoculação e depois inoculados com solução de estrutura do patógeno. A avaliação é realizada após seis a oito semanas das inoculações, através de comparações de redução entre plantas infestadas e plantas não-infestadas (Tsao & Garber, 1960; Grimm & Hutchison, 1973; Graham & Timmer, 1992; Feichtenberger, 2001).

As avaliações de resistência às infecções de colo, tronco e ramos podem ser feitas removendo-se a casca desses órgãos e colocando-se micélio do patógeno sobre a região do câmbio que foi exposta. O ferimento é necessário porque o *Phytophthora* spp. não consegue penetrar em tecidos suberizados de citros. O micélio do patógeno é coberto algodão umedecido e fita adesiva, para se evitar a inativação do inóculo e garantir condições favoráveis às infecções. Depois de algumas semanas a casca é removida e as lesões desenvolvidas são medidas, comparando-se assim os genótipos em questão por diferenças entre o comprimento e área das lesões (Feichtenberger, 2001). Além da inserção de micélio do patógeno no ferimento provocado nas plantas em estudo, existem outros métodos que abordam a inoculação de zoósporos ou clamidósporos, porém foi constatado que métodos que utilizam micélio do patógeno crescido em meio de cultura são mais eficientes nos estudos de resistência a *Phytophthora* spp. (Smith et al., 1987).

Os métodos para avaliação de resistência a infecção de tronco em plantas e seedlings de citros, são: método do disco, método da inserção sob a casca, método do palito e método da agulha. O método do disco consiste na inserção de um disco de meio de cultura colonizado com o patógeno, retirado de colônias de cinco a sete dias de idade e inserido no lenho da planta, de diâmetro igual (Rossetti, 1947). O método da inserção sob a casca consiste em introduzir um disco de meio de cultura infestado com o patógeno sob a casca da planta sem destacar o tecido vegetal (Grimm & Hutchison, 1973; Afek & Szejnberg, 1990). O método do palito consiste em colocar palitos de dente em colônias do patógeno e quando o micélio do patógeno estiver totalmente recoberto o palito, este é inserido na haste da planta (Aguilar-Vildoso & Pompeu Junior, 1997). Já o método da agulha consiste em perfurar a haste da planta com uma agulha previamente esterilizada, posteriormente infesta-se a agulha com micélios do patógenos,

retirados de bordas de colônias de cinco a sete dias de idade e inseri-se no local perfurado, retirando-se posteriormente a agulha (Siviero, 2001).

Entre os métodos de avaliação testados na fase de seedlings, ou seja, quando as plantas são jovens e apresentam diâmetro menor do ponto de enxertia (60 – 80 mm), o método da agulha é o mais indicado. Em plantas jovens, o método do disco e o da inserção sob casca foram os melhores. Nesse caso, a avaliação da doença, se possível, deve ser feita medindo-se a área total da lesão ou ainda utilizando-se o comprimento da lesão (Siviero, et al. 2002b).

2.7 Vírus da tristeza dos citros (CTV)

Historicamente, o CTV é uma das doenças mais importantes dessa cultura. Acredita-se que seja proveniente da China, centro de origem da maioria das espécies cítricas, disseminando-se posteriormente para outras partes do mundo através de mudas e borbulhas infectadas (Moreira, 1960; Bar-Joseph et al., 1981).

Inicialmente, foi reconhecida na Austrália e África do Sul, entre as combinações de laranjas doces enxertadas sobre laranja azeda, notando-se que estas entravam em colapso, enquanto sobre *Poncirus trifoliata* e limão ‘Rugoso’ este sintoma não era observado (Bennett & Costa, 1949).

A primeira grande devastação causada por essa doença ocorreu em 1930 na Argentina, onde se verificou a perda de dez milhões de árvores em 15 anos (Carreira, 1933). No Brasil, foi relatada pela primeira vez em 1937 no Vale do Paraíba-SP, denominada inicialmente como “a doença dos citros do Vale do Paraíba”, sendo posteriormente denominada como tristeza dos citros ou simplesmente tristeza (Moreira, 1942). Em 12 anos, dizimou sete milhões de árvores, o que correspondia a 75% dos pomares brasileiros de laranjas doces que, nessa época, eram enxertadas em laranja azeda (Moreira et al., 1949). A expansão e os danos do CTV em outras regiões seguiram os padrões observados no Brasil e Argentina. Atualmente, o CTV ocorre nas áreas mais importantes de cultivo de citros no mundo (Müller, 1976).

O CTV pode ser transmitido através de enxertia e também por insetos vetores, como o pulgão preto (*Toxoptera citricidus*). No caso do pulgão preto, o vírus é adquirido durante o período de alimentação na planta (seis horas) e transmitido em quatro a cinco segundos para outra planta pelo estilete do afídio. Outro vetor associado à transmissão do CTV é o *Aphis gossypii*, porém este é menos eficiente. A doença não é transmitida pelas sementes e mudas assim produzidas constituem-se em eficiente estratégia para livrar os clones infectados do CTV e de outros vírus (Retuerma & Price, 1972; Norman et al., 1972).

Os estudos a respeito do CTV são difíceis. Esse fato se deve a diversos fatores, principalmente à sua complexidade e à natureza da interação com o hospedeiro citros. Trata-se de um vírus limitado ao floema e que pode ocorrer em baixa concentração nas plantas cítricas. Além disso, a purificação do vírus é trabalhosa e as partículas virais são sujeitas a quebras durante esse processo. Complicações adicionais advêm do fato de que o CTV ocorre naturalmente na forma de diversas estirpes, freqüentemente co-infectando um mesmo indivíduo, cujas reações podem variar em intensidade em um mesmo hospedeiro (Li et al., 1990). Tipicamente, o CTV é um vírus longo, filamentososo, com simetria helicoidal, de 2.000 nm de comprimento por 12 nm de largura (Kitajima et al., 1965; Bar-Joseph et al., 1979). Com essas dimensões, constitui-se no maior vírus de planta conhecido, pertencente ao grupo dos closterovírus (Coffin & Coutts, 1993; Karasev et al., 1995).

Desde que ficou comprovado que o CTV era provocado por um vírus, a existência de mais de uma estirpe ou raça se tornou teoricamente possível, ficando evidenciado, posteriormente, a existência de uma estirpe fraca e uma severa. Estirpes francas proporcionavam poucos sintomas em plantas testes, ao passo que a estirpes severas ocasionavam sintomas fortes, ocasionando morte da planta (Grant & Costa, 1951). Posteriormente ficou evidenciada a presença de numerosas estirpes do CTV, inclusive uma extremamente severa, o variante Capão Bonito (Müller et al., 1990).

Os sintomas típicos do CTV são o amarelecimento das mudas, declínio moderado, declínio rápido, caneluras e mesmo ausência de sintomas visíveis; nesse caso, manifestam-se, em certas condições, apenas como uma interrupção ou diminuição na

taxa de crescimento (Bordignon et al., 2003). Porém, existem três sintomas reconhecidos causados pelo CTV: Stem pitting –desenvolvimento de caneluras ou sulcos longitudinais na superfície do xilema de troncos e ramos, provocando ainda decréscimo no vigor da planta e crescimento lento; Declínio típico de tristeza – sintomatologia clássica da presença do CTV, observada em combinações com laranja azeda como porta-enxerto. É caracterizado por folhas ligeiramente bronzeadas, aspecto coriáceo, quebradiço, ocorrendo em alguns casos amarelecimento da nervura principal ou então amarelecimento total das folhas, declínio rápido da planta, seca dos galhos, podridão nas radículas e posterior morte da planta; Seedling yellows – reação de certos tipos de citros com tecidos extremamente intolerantes, provocando reação de hipersensibilidade induzida em seedlings na presença de estirpes severas do vírus, manifestando forte amarelecimento das folhas pequenas, que geralmente ficam retorcidas. Em casos muito severos, o crescimento quase é paralisado (Müller, 1976; 1980).

Após ser inoculado em uma planta, o vírus invade células ocasionais do parênquima do floema, adjacentes aos tubos crivados. O citoplasma das células invadidas se torna espessado enquanto que o vacúolo tem seu tamanho reduzido. O núcleo permanece intacto e a célula continua a viver por algum tempo. O vírus ainda causa necrose na linha de união do enxerto, impedindo a passagem dos carboidratos, que ficam acumulados na região acima do ponto de enxertia (Schneider, 1959; Rossetti, 2001).

Não somente as plantas enxertadas em laranja azeda demonstram fortes sintomas de CTV. Lima ácida ‘Galego’ (*Citrus aurantifolia* Swingle), quando inoculada com CTV, mostra sintomas típicos de clareamento e suberificação das nervuras, podendo ser utilizado como planta teste (Rossetti, 2001). Além da laranja azeda e a lima ácida ‘Galego’, são ainda de utilização generalizada como indicadores de CTV os cultivares lima ‘Mexicana’ (*Citrus aurantifolia* Swingle), pomelos ‘Marsh seedless’ e ‘Duncan’ (*Citrus paradisi*), limão ‘Eureka’ e laranja ‘Madame Vinous’ (*Citrus sinensis*) (Desjardins et al., 1957; Permar & Garnsey, 1991; Lee et al., 1994; Müller et al., 1994; Carvalho et al., 1997).

A reação das diversas espécies e cultivares de citros ao CTV deve ser considerada sob dois aspectos fundamentais para seu adequado entendimento: a possibilidade que o vírus tem de se multiplicar na planta após ser infectada e a tolerância dos tecidos do floema à presença do vírus (Müller, 1976). De modo geral, os tecidos do floema das diversas espécies cítricas podem ser tolerantes, intolerantes ou de reação intermediária à presença de partículas virais em suas células. Por outro lado, as plantas podem também variar quanto à resistência, ou seja, à capacidade de multiplicar o CTV em seus tecidos. Alguns tipos, mesmo após severas e repetidas inoculações, são incapazes de multiplicar as partículas virais, portanto, resistentes; outros os multiplicam abundantemente, atingindo alta titulação viral nos tecidos do floema, denominados susceptíveis (Bordignon et al., 2003).

Como alternativa de controle para do CTV, deve-se abrir mão da utilização da laranja azeda como porta-enxerto, adotando-se a utilização de outros porta-enxertos tolerantes (Costa, 1956; Giacometti, 1961).

Quando se deseja verificar o comportamento de novas seleções de plantas cítricas com potencial uso como porta-enxertos frente a presença de estirpes do CTV, pode-se optar pelos testes de transmissibilidade no campo ou em estufa, por meio de insetos vetores, colocando-se sobre a planta cerca de 40-50 afídios por 24 horas, ou por união de tecidos (enxertia). Estes dois processos podem ser efetuados a céu aberto ou em ambiente protegido, porém neste último caso os resultados são mais seguros, uma vez que a céu aberto as plantas estão sujeitas a infecções naturais. Tanto para um como outro processo de transmissão, são necessárias plantas testemunhas, ou seja, plantas ausentes de pulgões ou inoculadas com borbulhas sadias, para que se possa comparar os sintomas entre plantas infectadas e sadias (Moreira et al., 1954).

No caso da transmissibilidade por enxertia, plantas provenientes de sementes de laranja azeda ou lima ácida ‘Galego’ são conservadas em ambientes livre de infecção natural e quando seu porte permite realizar enxertia, esta é realizada com borbulhas ou garfos de plantas infectadas. Empregando-se o ‘Galego’ como porta-enxerto, basta que ocorra soldadura entre os tecidos para que os sintomas de CTV se manifestem. No caso da laranja azeda, o primeiro crescimento da brotação é normal, porém, cerca de três

meses após a realização da enxertia irão manifestar-se os sintomas de CTV (Moreira et al., 1954). Ocorre forte amarelecimento das folhas novas e formação de folhas pequenas, que geralmente ficam retorcidas. Em casos mais severos, o crescimento é quase paralisado, observando-se definhamento da planta infectada três meses após a enxertia (Oberholzer, 1947; Grant & Costa, 1949; Costa et al., 1954a; McClean, 1960). A laranja azeda é mais adequada para a realização do teste, devido a maior facilidade de formação das mudas em viveiro, maior facilidade de enxertia e resposta dos sintomas mais evidenciados (Costa et al., 1954b).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos na área experimental do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (USP/ESALQ), em Piracicaba-SP, cujas coordenadas são de latitude 22°43’S e de longitude 47°38’W. O clima da região é tropical úmido com chuvas de verão, inverno seco, com temperatura média dos meses mais quente e frio de 22° e 16,9°C, respectivamente. A precipitação média anual é de 1.253 mm, sendo a umidade relativa do ar de 74% e a insolação média mensal de 201,5 horas/mês.

Os híbridos somáticos utilizados nos trabalhos foram: limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia* L. Osbeck) + laranja azeda (*C. aurantium* L.), laranja ‘Caipira’ (*C. sinensis* L. Osbeck) + limão ‘Cravo’ (*C. limonia* L. Osbeck), laranja ‘Caipira’ (*C. sinensis* L. Osbeck) + tangerina ‘Cleópatra’ (*C. reticulata* Blanco), laranja ‘Caipira’ (*C. sinensis* L. Osbeck) + limão ‘Volkameriano’ (*C. volkameriana* Pasquale), laranja ‘Caipira’ (*C. sinensis* L. Osbeck) + limão ‘Rugoso’ (*C. jambhiri* Lushington), tangerina ‘Cleópatra’ (*C. reticulata* Blanco) + limão ‘Volkameriano’ (*C. volkameriana* Pasquale), tangerina ‘Cleópatra’ (*C. reticulata* Blanco) + laranja azeda (*C. aurantium* L.), limão ‘Cravo’ (*C. limonia* L. Osbeck) + tangerina ‘Sunki’ (*C. sunki* Hort. ex. Tanaka), laranja ‘Ruby Blood’ (*C. sinensis* L. Osbeck) + limão ‘Volkameriano’ (*C. volkameriana* Pasquale), laranja ‘Rohde Red’ (*C. sinensis* L. Osbeck) + limão ‘Volkameriano’ (*C. volkameriana* Pasquale) e laranja ‘Valência’ (*C. sinensis* L. Osbeck) + *Fortunella obovata* (Costa et al., 2003; Mendes et al., 2001; Mendes da Glória et al., 2000).

3.1 Experimento 1: Propagação dos híbridos somáticos

Esse experimento foi conduzido em duas fases, sendo a primeira conduzida no período de enraizamento das estacas dos híbridos somáticos e a segunda no acompanhamento do crescimento das mudas, desde o transplante das estacas até o ponto em que pelo menos um dos híbridos somáticos atingisse 50% de suas mudas aptas à realização da enxertia.

3.1.1 Enraizamento das estacas

No mês de abril de 2003, plantas matrizes dos híbridos somáticos limão ‘Cravo’ + laranja azeda, laranja ‘Caipira’ + limão ‘Cravo’, laranja ‘Caipira’ + tangerina ‘Cleópatra’, laranja ‘Caipira’ + limão ‘Volkameriano’, laranja ‘Caipira’ + limão ‘Rugoso’, tangerina ‘Cleópatra’ + limão ‘Volkameriano’, tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda, limão ‘Cravo’ + tangerina ‘Sunki’, laranja ‘Ruby Blood’ + limão ‘Volkameriano’, laranja ‘Rohde Red’ + limão ‘Volkameriano’ e laranja ‘Valência’ + *Fortunella obovata*, mantidas em vasos e sob telado constituído por tela anti-afídica e sombrite de 50% de luminosidade, sofreram poda mediantemente severa, a fim de estimular novas brotações.

Seis meses após (outubro), foram retiradas estacas semilenhosas de ramos das plantas matrizes dos híbridos somáticos, padronizadas com 15 cm de comprimento, mínimo de três gemas e conservadas duas folhas na extremidade apical, cortadas ao meio. A base da estaca foi cortada em bisel simples, logo abaixo de uma gema e o ápice submetido a um corte reto.

Após o preparo das estacas, imergiu-se a base das estacas em solução de AIB (ácido indolbutírico - $C_{12}H_{13}NO_2$ - MERCK S.A.) na concentração de 1000 mg.L^{-1} , por 10 minutos. No preparo da solução, dissolveu-se o AIB em dez gotas de hidróxido de sódio (NaOH 0,5 N), com o intuito de facilitar a posterior homogeneização em água destilada.

Posteriormente, as estacas foram acondicionadas em bandejas de poliestireno expandido (isopor) de 72 células (células de formato piramidal invertida, orifício na base para escoamento de água e capacidade de 120 cm³ de substrato), preenchidas com substrato comercial Plantmax CitrusTM - substrato constituído de vermiculita expandida e materiais orgânicos de origem vegetal, colocando-se uma única estaca por célula.

O substrato utilizado foi analisado quanto suas propriedades físicas, verificando-se o volume de massa (39,20 g.mL⁻¹), densidade aparente (0,42 g.mL⁻¹), porosidade de aeração (46,50%) e água disponível às plantas (espaço preenchido por água - 53,71%), de acordo com a metodologia de Smith & Pokorny (1977), no Laboratório de análises físicas de substratos do Departamento de Produção Vegetal da USP/ESALQ.

As bandejas permaneceram em câmara de nebulização intermitente (temperatura de 25±5°C, UR média de 72%, tempo de aspersão de 20 segundos em intervalos de 10 minutos), sobre bancadas suspensas, por um período de 100 dias. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, composto por 11 tratamentos (híbridos somáticos), quatro repetições e unidade experimental constituída por 18 estacas, totalizando 792 estacas.

Posteriormente, avaliaram-se a porcentagem de estacas enraizadas, porcentagem de estacas calejadas, porcentagem de estacas brotadas, número médio de brotos, número médio de folhas, número médio de raízes emitidas da estaca, comprimento médio dos brotos e comprimento médio das raízes. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias ao teste Scott-Knott (1974), ao nível de 1% de probabilidade (Gomes, 2000). As análises foram realizadas pelo programa computacional Sistema para Análise de Variância - SISVAR (Ferreira, 2000). Foi ainda determinado o coeficiente de correlação parcial linear entre as variáveis observadas, ajustados para os tratamentos.

3.1.2 Crescimento das mudas

Após a avaliação das características pertinentes ao enraizamento, as estacas enraizadas e/ou com calos, foram separadas em um recipiente com capacidade de 3 L preenchido com água. Aleatoriamente, separaram-se 40 estacas de cada híbrido somático

para transplante em sacos plásticos com dimensões de 35 x 20 cm (capacidade de 5 L), contendo substrato comercial Rendmax CitrusTM, na base de 4 L de substrato (1,7 Kg de substrato), a fim de facilitar as adubações e irrigações, adicionado de Osmocote 22-04-08, na razão de 250 g do adubo/25 Kg de substrato.

O substrato utilizado também foi analisado quanto às suas propriedades físicas, verificando-se o volume de massa (48,23 g.mL⁻¹), densidade aparente (0,22 g.mL⁻¹), porosidade de aeração (34,51%) e água disponível às plantas (espaço preenchido por água – 35,19%), de acordo com a metodologia de Smith & Pokorny (1977), no Laboratório de análises físicas de substratos do Departamento de Produção Vegetal da USP/ESALQ.

Os recipientes foram mantidos sobre bancadas suspensas em casa-de-vegetação (modelo Van der Hoeven[®]), sendo umedecidos diariamente através de regas manuais. Após 15 dias do transplântio, foi selecionada apenas uma brotação por estaca, conduzindo-se esta em haste única. Para as estacas que não continham ainda brotação, aguardaram-se mais 15 dias para selecionar a brotação. Desbrotas periódicas foram realizadas para não comprometer o desenvolvimento da brotação selecionada.

Após um mês do transplântio, iniciaram-se as adubações semanais com os fertilizantes Nitrato de cálcio e Kristalon HydroTM (0,84 g.L⁻¹) e separadamente com Tenso Iron HydroTM (0,08 g.L⁻¹), sempre adicionando 125 mL da solução por recipiente. As mudas também foram estaqueadas, visando proporcionar crescimento da brotação mais ereto.

Mensalmente após o transplântio, foi realizada coleta dos seguintes dados: porcentagem de estacas vivas, porcentagem de estacas brotadas, comprimento médio da brotação, número médio de folhas e diâmetro médio da brotação a 5 cm acima do ponto de inserção da brotação na estaca, até 210 dias após o transplântio, totalizando sete coletas. No final do ensaio, foram ainda coletados os seguintes dados: porcentagem de plantas aptas à enxertia (diâmetro superior a 0,65 cm), massa seca média da brotação e massa seca média da raiz. Para a obtenção da massa seca, as raízes e a brotação foram separadas individualmente de cada estaca, colocadas em sacos de papel e secas em

estufa à temperatura de 70°C por um período de 72 horas, sendo posteriormente pesadas em balança analítica.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, composto por 11 tratamentos (híbridos somáticos), quatro repetições e unidade experimental constituída por dez estacas, totalizando 440 estacas. Para as análises efetuadas mensalmente, os dados foram analisados no esquema de parcela subdividida no tempo. As parcelas constituíram-se das estacas dos híbridos somáticos, representando o tratamento principal e o tempo constituiu as subparcelas, representando o tratamento secundário, composto por sete períodos (meses).

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias ao teste Scott-Knott (1974), ao nível de 1% de probabilidade (Gomes, 2000). As análises foram realizadas pelo programa computacional Sistema para Análise de Variância - SISVAR (Ferreira, 2000).

As temperaturas máxima e mínima da casa-de-vegetação foram coletadas diariamente durante o período do experimento, sempre às oito horas da manhã. A média das temperaturas semanais encontra-se na Figura 1.

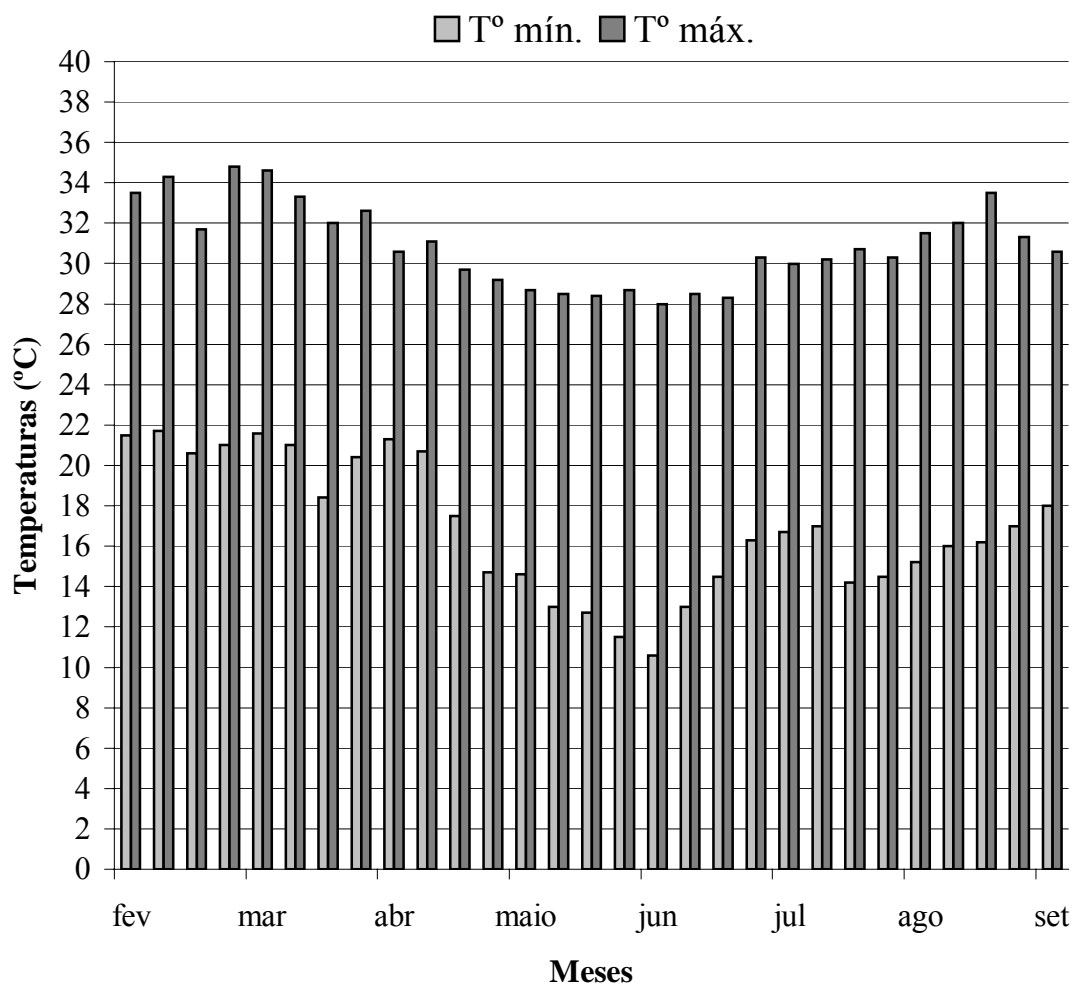


Figura 1 - Média semanal das temperaturas máxima e mínima na casa-de-vegetação, coletadas após o transplântio das estacas. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

Foi determinado o coeficiente de correlação parcial linear entre as variáveis observadas na última coleta de dados (porcentagem de estacas vivas e brotadas, número médio de folhas, comprimento médio das brotações e diâmetro médio da brotação) e ainda entre a massa seca das raízes e da brotação, ajustados para os tratamentos.

Uma amostra folhar de cada híbrido somático foi coletada de todas as plantas pertencentes a cada tratamento, para ser realizada a análise das concentrações de macro e micronutrientes no Laboratório do Departamento de Solos e Nutrição de Plantas, a fim

de verificar-se a possibilidade de diferentes respostas entre os híbridos somáticos frente aos teores nutricionais.

3.2 Reação dos híbridos somáticos a *Phytophthora nicotianae*

Híbridos somáticos laranja ‘Caipira’ + limão ‘Cravo’, laranja ‘Caipira’ + tangerina ‘Cleópatra’, laranja ‘Caipira’ + limão ‘Volkameriano’, laranja ‘Caipira’ + limão ‘Rugoso’, tangerina ‘Cleópatra’ + limão ‘Volkameriano’, tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda, limão ‘Cravo’ + tangerina ‘Sunki’, laranja ‘Ruby Blood’ + limão ‘Volkameriano’, laranja ‘Rohde Red’ + limão ‘Volkameriano’ e laranja ‘Valência’ + *Fortunella obovata*, oriundos de estacas semilenhosas retiradas de plantas matrizes mantidas em vasos e em ambiente protegido, foram conduzidos em haste única.

Sementes de tangerina ‘Sunki’ (*Citrus sunki* Hort. ex. Tan.), tangerina ‘Cleópatra’ (*C. reticulata* Blanco), limão ‘Cravo’ (*C. limonia* Osbeck), limão ‘Volkameriano’ (*C. Volkameriana* Pasq.), laranja azeda (*C. aurantium* L.), laranja ‘Caipira’ [*C. sinensis* (L.) Osbeck], *Poncirus trifoliata* ‘Davis A’ [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] e limão ‘Siciliano’ (*C. limon* L.), foram extraídas de frutos de plantas da coleção de germoplasma de citros USP/ESALQ, semeados em tubetes (formato cônico, constituído de plástico rígido de coloração preta, com estrias internas para facilitar o escoamento de água, em orifício contido na base; dimensão de 12 x 2,7 cm, capacidade de 125 cm³), contendo o substrato comercial Plantmax CitrusTM, sendo transplantados após 90 dias. Essas espécies foram selecionadas a fim de servirem como testemunha, devido a reação conhecida por *Phytophthora* spp.

Todas as mudas foram mantidas em sacos plásticos com dimensões de 32 x 24 cm (capacidade de 5 L), contendo substrato comercial Rendmax CitrusTM, adicionado de Osmocote 22-04-08, na razão de 250 g do adubo/25 Kg de substrato. Entretanto, o recipiente foi preenchido com até 4 L de substrato, para facilitar as adubações e irrigações.

Os recipientes foram mantidos sobre bancadas suspensas em telado constituído por tela anti-afídica e sombrite de 50% de luminosidade. Todas as mudas receberam

irrigações manuais diárias. Foram realizadas adubações semanais com os fertilizantes Nitrato de cálcio e Kristalon Hydro™ (0,84 g.L⁻¹) e separadamente com Tenso Iron Hydro™ (0,08 g.L⁻¹), sempre adicionando 125 mL da solução por recipiente. Desbrotas periódicas foram realizadas, para não haver prejuízos no desenvolvimento da haste principal, além de serem também estaqueados, visando proporcionar crescimento ereto.

Foram cedidos pelo Laboratório de Sanidade Animal e Vegetal de Sorocaba - Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Sorocaba da APTA regional, do Instituto Biológico (IB), dez isolados de *Phytophthora nicotianae* selecionados de viveiros e pomares do Estado de São Paulo entre os meses de novembro e dezembro de 2003 (Tabela 1), antes do início dos experimentos (janeiro de 2004), com o objetivo de selecionar um isolado agressivo, que expressasse com clareza sintomas de *Phytophthora nicotianae*.

Tabela 1. Isolados de *Phytophthora nicotianae* do Estado de São Paulo, identificação (LRS e IB) e data de isolamento. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

Nº Isolado*	Procedência	Município	Data do Isolamento
LRS 87/03	Viveiro	M. Azul Paulista-SP	12/12/2003
LRS 90/03	Viveiro	Bebedouro-SP	17/12/2003
LRS 93/03	Viveiro	Bebedouro-SP	28/11/2003
LRS 94/03	Viveiro	Bebedouro-SP	10/11/2003
LRS 95/03	Viveiro	Tabatinga - SP	16/11/2003
LRS 96/03	Viveiro	Tabatinga - SP	28/11/2003
LRS 97/03	Viveiro	Américo Brasiliense-SP	28/11/2003
LRS 98/03	Viveiro	Bady Bassit - SP	19/12/2003
LRS 99/03	Viveiro	M. Azul Paulista-SP	19/12/2003
LRS 104/03	Pomar	Candido Rodrigues-SP	15/12/2003

* Laboratório de Sanidade Animal e Vegetal de Sorocaba - Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Sorocaba da APTA regional, do Instituto Biológico (IB).

As colônias dos isolados de *Phytophthora nicotianae* de sete dias de idade, foram cultivadas em placas de Petri de 90 x 15 mm, em meio BDA (batata-dextrose-ágar). Foram realizadas duas inoculações de cada isolado em plantas de limão ‘Siciliano’ de oito meses de idade, possuindo cerca de 70 cm de altura, uma a 10 cm de altura e outra a

20 cm a partir do colo, em lados opostos, utilizando-se o método da agulha (Siviero, 2001).

Inicialmente, foram removidas as folhas até a altura de 30 cm do colo. Em seguida, a superfície do caule foi desinfetada com álcool 70%, realizando posteriormente uma incisão com agulha de ferro previamente imersa em álcool 96° GL por cinco segundos e flambada, até a profundidade de 3 mm. Em seguida, a extremidade da agulha foi raspada na borda da colônia de *Phytophthora nicotianae*, visando a aquisição de micélios do patógeno e colocada no local da incisão no caule da planta. Na zona do caule contendo o inóculo, colocou-se algodão umedecido com água destilada, em uma região de dois centímetros, passando-se duas voltas de esparadrapo cirúrgico composto de material ausente de zinco. As plantas foram mantidas sobre bancadas suspensas em telado constituído por tela anti-afídica e sombrite de 50% de luminosidade. Os algodões foram umedecidos diariamente com água destilada, sempre no período da manhã e as plantas receberam irrigações manuais diárias. As adubações foram cessadas durante esse período.

A avaliação foi realizada após 14 dias da inoculação, coletando-se os seguintes dados: comprimento e largura da lesão sob a casca e presença de goma. As médias de temperaturas registradas entre o período foram de 21°C a de mínima e 35°C a de máxima.

Após selecionado o isolado mais agressivo, objetivou-se re-isolar o patógeno, seguindo-se a técnica proposta por Erwin & Ribeiro (1996). Para isso, foram coletados quatro frutos maduros de limão ‘Siciliano’, sendo esses desinfetados com álcool 70%. Retirou-se um fragmento de 5 mm de diâmetro do albedo do fruto e no local foi inserido um anel de mesmo diâmetro, extraído da extremidade da lesão do isolado da planta de limão ‘Siciliano’, colocando-se por cima um pedaço de esparadrapo cirúrgico ausente de zinco. Foi utilizado apenas um anel por fruto. Posteriormente, os frutos foram colocados em uma caixa de isopor contendo quatro algodões umedecidos e vedou-se a caixa com parafilme, expondo a temperatura ambiente e na presença de luz.

Nove dias após, os frutos estavam praticamente tomados pelo patógeno. Assim, os frutos foram desinfetados com hipoclorito de sódio 1% por quinze minutos e em

seguida com álcool 70% por cinco minutos. Os frutos foram cortados cuidadosamente em câmara de fluxo laminar devidamente esterilizada, na Clínica do Departamento de Fitopatologia da USP/ESALQ. As sementes foram extraídas e colocadas individualmente em placas de Petri plásticas de 90 x 15 mm, contendo 25 mL do meio CA (cenoura-ágar - 200 g de cenoura triturada e peneirada, 20 g de ágar e um litro de água destilada, sendo o meio autoclavado à 121°C por 20 minutos) (Kaosiri et al., 1978). Em seguida, as placas foram vedadas com parafilme e colocadas em B.O.D à temperatura de 25°C na ausência de luz. Após cinco dias, foram selecionadas as placas que continham o maior crescimento micelial do patógeno e foram repicadas para placas de Petri contendo 25 mL do meio CA, sendo colocado apenas um fragmento de 0,25 cm², com o micélio diretamente em contato com o meio, mantidos nas mesmas condições em B.O.D.

No momento da instalação do ensaio, as plantas apresentavam nove meses de idade, cerca de 40-65 cm de comprimento e diâmetro ao redor de 40 a 55 mm (10 cm acima do colo para as mudas oriundas de sementes e a 10 cm acima da inserção da brotação da estaca dos híbridos somáticos). A diferença entre os tamanhos das plantas foi devido às características de vigor, pertinentes à cada genótipo.

3.2.1 Experimento 2: Reação dos híbridos somáticos à infecção de tronco por *Phytophthora nicotianae*

As plantas tiveram cinco cm da extremidade apical removida 15 dias antes do início do ensaio, pincelando-se o local da lesão com pasta bordaleza, a fim de induzir a produção de novos brotos e aumento do fluxo de seiva, tendo em vista que o estado de vegetação é importante em estudos de infecção de tronco por *Phytophthora nicotianae* (Rossetti & Bitancourt, 1951).

Foi utilizado o isolado que proporcionou a maior lesão nas plantas de limão ‘Siciliano’. Inicialmente, foram removidas as folhas até a altura de 30 cm e a superfície do caule foi desinfetada com álcool 70%. Foram realizadas duas inoculações por planta, a 10 e 20 cm de altura, em posições opostas, demarcados acima da região do colo para as

mudas oriundas de sementes e acima da inserção da brotação da estaca, para as mudas dos híbridos somáticos, utilizando-se o método da agulha (Siviero, 2001).

A incisão foi realizada com agulha de ferro previamente imersa em álcool 96° GL e flambada, até a profundidade de 3 mm. Em seguida, a extremidade da agulha foi raspada na borda de colônias de *Phytophthora nicotianae*, mantidos em Placas de Petri contendo meio CA, visando à aquisição de micélios do patógeno e colocada no local da incisão no caule da planta. A referida agulha produziu um orifício cuja a área obtida através da fórmula $\pi.r^2$, foi de 0,031 cm². Na zona do caule contendo o inóculo, colocou-se algodão umedecido com água destilada, em uma região de dois centímetros, passando-se duas voltas de esparadrapo cirúrgico composto de material ausente de zinco. As plantas foram mantidas sobre bancadas suspensas em telado constituído por tela anti-afídica e sombrite de 50% de luminosidade. Os algodões foram umedecidos diariamente com água destilada, sempre no período da manhã e as plantas receberam irrigações manuais diárias. As adubações foram cessadas durante esse período.

Igual procedimento foi adotado para as plantas-controle (inoculações sem o patógeno), com o intuito de apenas verificar visualmente se não ocorreriam lesões provocadas por outros patógenos. Porém, utilizando-se apenas quatro plantas de cada genótipo, totalizando-se 72 plantas. Para as inoculações, utilizou-se somente meio CA, sendo a metodologia de inoculação igualmente adotada, como descrito anteriormente.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, composto por 18 tratamentos (dez híbridos somáticos e oito cultivares testemunhas), seis repetições e unidade experimental constituída por quatro inoculações, totalizando 432 inoculações.

Durante a fase experimental, foram coletadas diariamente as temperaturas máximas e mínimas. As médias de temperaturas registradas entre o período foram de 20,12°C a de mínima e 34,52°C a de máxima.

A avaliação das plantas ocorreu após 25 dias da inoculação. Os dados coletados foram: porcentagem de goma, comprimento, largura e área média da lesão sobre e sob a casca (na superfície do lenho, diretamente sobre a zona cambial). As áreas foram plotadas em papel transparente, baseando-se na alteração da coloração provocada pela lesão e a leitura foi obtida através do medidor de área LICOR_R LI-3000. Ainda calculou-

se aumento do comprimento e área das lesões sob a casca dos genótipos em estudo em relação à testemunha resistente (*Poncirus trifoliata*).

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias ao teste Scott-Knott (1974), ao nível de 5% de probabilidade (Gomes, 2000). As análises foram realizadas pelo programa computacional Sistema para Análise de Variância - SISVAR (Ferreira, 2000).

3.2.2 Experimento 3: Reação dos híbridos somáticos à infecção de raízes por *Phytophthora nicotianae*

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, no esquema de parcela subdividida no espaço, com quatro repetições. As parcelas constituíram-se de plantas infestadas (I) e plantas controle (C), colocadas sob bancadas separadas, representando o tratamento principal. Os 18 genótipos (dez híbridos somáticos e oito cultivares testemunhas) constituíram as subparcelas, representando o tratamento secundário e foram distribuídos ao acaso nas parcelas. Cada subparcela foi composta de três plantas, dando um total de 12 plantas controle e 12 plantas infestadas, totalizando 432 plantas.

As plantas tiveram as adubações cessadas sete dias antes do início do ensaio, a fim de evitar-se condições inadequadas para o desenvolvimento do patógeno. Além disso, as desbrotas também foram cessadas, com o intuito de no final do ensaio determina-se com precisão às massas secas da parte aérea e do sistema radicular, para assim calcular as reduções ocasionadas pelo patógeno.

Como descrito anteriormente, foi utilizado o isolado que proporcionou a maior lesão nas plantas de limão ‘Siciliano’. Para a produção do inóculo com a finalidade da infestação do substrato, a produção de esporângios do patógeno para obtenção da suspensão de esporos, foi empregado o método abaixo descrito por Ribeiro & Baumer (1977), modificado por Feichtenberger et al. (1984). Discos de micélio de 0,25 cm² foram retirados das bordas de colônias do isolado mais agressivo, de quatro dias de idade, desenvolvidas em placas de Petri plásticas de 90 x 15 mm contendo 25 mL de CA

e transferidos para placas de Petri plásticas, de mesma dimensões, contendo o meio CA líquido diluído (2 mL de suco de cenoura, 8 mL de água destilada, autoclavados à 121°C por 20 minutos), colocando o micélio diretamente em contato com o meio. As placas contendo dez discos cada foram mantidas em B.O.D. à 25°C, sob condição de luz fluorescente contínua, durante 24 horas. Decorrido esse período, o meio cenoura líquido diluído foi removido com o auxílio de uma pipeta de Pasteur graduada de 10 mL, assepticamente, sendo substituído por 10 mL de água destilada autoclavada (121°C por 20 minutos). Em seguida, as placas foram mantidas por mais 48 horas na B.O.D. nas mesmas condições. O estresse nutricional induz a produção de esporângios. Placas de 90 x 15 mm com 25 mL de meio CA, contendo micélio do mesmo isolado, de sete dias de idade desenvolvidos em B.O.D. à 25°C sob regime de escuro, foram também obtidas para posterior preparação da mistura de propágulos. Lote de 15 placas de Petri contendo o meio CA líquido diluído, com os esporângios, foram colocadas em refrigerador (10-12°C) por 15 minutos, antes do preparo da mistura de propágulos, para induzir a liberação de zoósporos. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, o líquido (\pm 10 mL de suspensão de zoósporos) da placa de Petri foi retirado e transferido para erlenmeyer de 500 mL; os dez discos remanescentes e mais o conteúdo de uma placa de micélio do patógeno de sete dias de idade desenvolvidos em meio CA foram adicionados ao erlenmeyer e o volume final ajustado para 300 mL, completados com água destilada resfriada (\pm 4°C), agitados em rotação lenta por 30 minutos. A suspensão esporos foi dividida em duas partes, sendo colocada 150 mL por saco plástico contendo uma única planta (um erlenmeyer para dois sacos plásticos), o qual foi distribuída uniformemente. As plantas controle receberam somente água destilada, em igual volume.

Um dia antes da infestação, no mês de fevereiro de 2004, o substrato foi saturado com água até atingir a capacidade de campo. No dia da infestação, foram realizados oito orifícios no substrato de cada saco plástico, de 10 cm de profundidade com auxílio de um bastão de vidro, para facilitar a difusão da suspensão de esporos e causar alguns ferimentos as raízes. Esse procedimento também foi realizado nas plantas testemunhas.

Durante o ensaio, as mudas foram irrigadas periodicamente, porém com o cuidado de não ocorrer escoamento da água pelo fundo do saco plástico. Para isso, a

quantidade de água colocada em cada saco plástico foi monitorada por sacos plásticos de 32 x 24 cm, igualmente ao utilizado no acondicionamento das mudas, contendo 4 L de substrato Rendmax CitrusTM, adotando-se o método padrão de estufa (método gravimétrico), seguindo as recomendações de Bernardo (1986).

Primeiramente, saturou-se com água um saco plástico contendo 4 L do substrato e, posteriormente, deixou-se escorrer a água até atingir a Ucc (capacidade máxima de retenção de água). Em seguida, pesou-se o conjunto substrato + água + saco plástico e subtraiu-se o peso do saco (M1). O substrato foi cuidadosamente removido e distribuído em bekers de 1 L, colocados para secar em estufa à temperatura de 105°C por 24 h. Em seguida, foi pesado o substrato seco (M2), a fim de determinar-se a porcentagem de umidade.

Fórmula para determinar a umidade pelo método padrão:

$U (\%) = (M1 - M2)/M2 \times 100$, onde M = massa e U = umidade

- Capacidade do saquinho: 5 L de substrato, porém o valor adotado foi de 4 L;

- Dimensões: 32 x 24 cm;

- Tara do saquinho: 20,31 g

- Saquinho + substrato úmido: 2,820 Kg

- Saquinho + substrato seco: 1,420 Kg

- Ucc (Umidade na capacidade de campo) = 100%

- Upmp (Umidade no ponto de murcha permanente) = 0%

$U (\%) = (M1 - M2)/M2 \times 100$

$U = (2,820 - 20,31) - (1,420 - 20,31)/1,420 - 20,31 \times 100$

$U = 2799,69 - 1399,69/1399,69 \times 100 = 100\%$, ou seja, 1 g água/g solo

Ou seja, o valor encontrado entre a diferença do substrato saturado e substrato seco, em grama, é quanto se deve repor de água, em mL, para se chegar a umidade na capacidade de campo, pois, neste caso, a porcentagem de umidade em volume é igual a porcentagem de umidade em massa (U de 100% = 1 g água/g solo).

Colocou-se um recipiente preenchido com 4 L de Rendmax CitrusTM e saturou-se com água até atingir a máxima capacidade de retenção de água. Colocou-se o recipiente no telado onde estava o ensaio e deixou-se o substrato secar até atingir o mínimo de umidade requerida (60%), a fim de não promover condições desfavoráveis ao desenvolvimento do patógeno. Pesou-se o conjunto saco plástico + substrato + água remanescente, determinando-se a umidade crítica, adotando-se essa como padrão. A umidade crítica adotada foi de 60%, ou seja, peso do saco plástico + substrato + água remanescente de 2,260 Kg, o que exige a adição de 560 mL de água para chegar-se a Ucc (2,820 Kg). Essa condução do nível de umidade do solo de forma cíclica, ou seja, com variação da umidade do substrato entre a capacidade de campo e o nível crítico adotado de 60% de umidade no substrato, permitiria a aeração necessária para a respiração das raízes (Stolzy et al., 1965) e ainda propiciaria a formação de esporângios de *Phytophthora nicotianae* (Duniway, 1983).

Assim, espalharam-se oito sacos plásticos sob as bancadas do telado do ensaio, para promover o monitoramento diário do nível de água no substrato e determinar a quantidade e frequência de irrigação, evitando-se o escoamento de água para não lavar as estruturas do patógeno. Para isso, os oito sacos plásticos eram pesados diariamente em balança analítica e por diferença de volume, calculava-se a quantidade de água a colocar nos recipientes.

Durante a fase experimental, foram coletadas as temperaturas máximas e mínimas diariamente durante o período da manhã, sempre às oito horas., tirando-se média de cada dois dias (Figura 2).

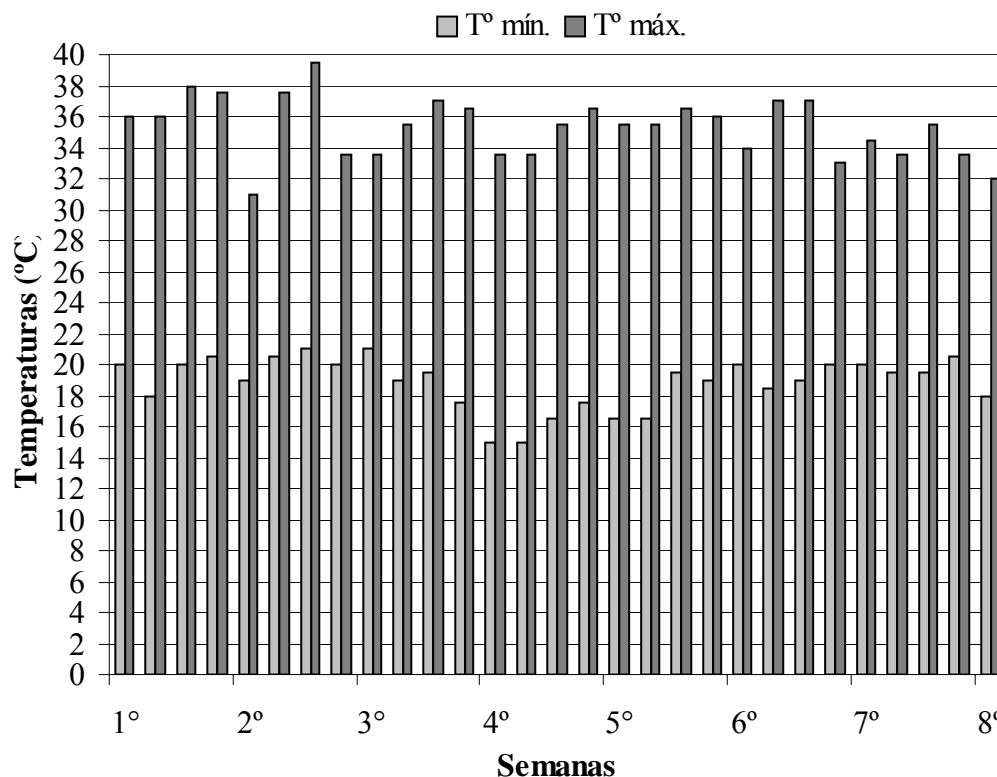


Figura 2 - Temperaturas máxima e mínima no telado, localizado o experimento de reação dos híbridos somáticos à infecção de raízes por *Phytophthora nicotianae*. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

No primeiro dia do ensaio foram medidas as alturas e diâmetros de todas as plantas. A cada 15 dias, foram também coletadas as alturas, estendendo-se a coleta dos dados até o final do ensaio, que ocorreu 60 dias após a infestação do substrato, totalizando cinco coletas de alturas.

No final do ensaio, as plantas foram removidas dos sacos plásticos e lavadas cuidadosamente em água corrente, sendo a operação realizada com uma repetição por vez, incluindo-se plantas infestadas (I) e controles (C). Foi realizada a avaliação da severidade da doença através de escala de notas de 1 a 5, por três pessoas (1 - sem redução e 5 - alta redução) em função da observação visual de redução do sistema radicular e aspectos qualitativos da parte aérea, calculando-se posteriormente a média das três observações, conforme proposto por Broadbent & Gollnow (1992). Colou-se

ainda o diâmetro médio, número médio de folhas, massa seca média da parte área e massa seca média das raízes. Para determinação da massa seca, o material vegetal foi cortado e colocado individualmente em sacos de papel e posto para secar em estufa à 70°C por 72 horas, sendo posteriormente pesado em balança analítica. Assim, pode-se comparar as cinco coletas de dados de alturas, o diâmetro inicial e final, o número médio de folhas, massa seca média da parte aérea e das raízes entre plantas controle e plantas infestadas, a diferença entre plantas controle e infestada (perdas) e o índice de redução, calculado pela expressão em módulo: (plantas infestada/plantas controle) – 1 x 100.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias ao teste Scott-Knott (1974), ao nível de 5% de probabilidade (Gomes, 2000). As análises foram realizadas pelo programa computacional Sistema para Análise de Variância - SISVAR (Ferreira, 2000).

3.3 Experimento 4: Reação dos híbridos somáticos ao CTV

Foram retiradas estacas semilenhosas de plantas matrizes dos híbridos somáticos laranja ‘Caipira’ + limão ‘Cravo’, laranja ‘Caipira’ + tangerina ‘Cleópatra’, laranja ‘Caipira’ + limão ‘Volkameriano’, laranja ‘Caipira’ + limão ‘Rugoso’, tangerina ‘Cleópatra’ + limão ‘Volkameriano’, tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda, limão ‘Cravo’ + tangerina ‘Sunki’, laranja ‘Ruby Blood’ + limão ‘Volkameriano’, laranja ‘Rohde Red’ + limão ‘Volkameriano’ e laranja ‘Valência’ + *Fortunella obovata*, mantidas em vasos e em ambiente protegido, enraizadas em câmara de nebulização intermitente e transplantadas 100 dias após o estaqueamento, sendo conduzidos uma única brotação em haste única. Sementes de limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia* Osbeck), laranja azeda (*C. aurantium* L.) e *Poncirus trifoliata* ‘Davis A’ [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], foram extraídas de frutos maduros coletados no pomar didático da USP/ESALQ, semeados em tubetes (formato cônico, constituído de plástico rígido de coloração preta, com estrias internas para facilitar o escoamento de água, em orifício contido na base; dimensão de 12 x 2,7 cm, capacidade de 125 cm³), contendo o substrato comercial Plantmax CitrusTM, sendo transplantados após 90 dias. Essas espécies foram

selecionadas a fim de servirem como testemunhas, por terem padrões conhecidos quanto ao comportamento em relação ao CTV.

Todas as mudas foram mantidas em sacos plásticos com dimensões de 32 x 24 cm (capacidade de 5 L), contendo substrato comercial Rendmax Citrus™, adicionado de Osmocote 22-04-08, na razão de 250 g do adubo/25 Kg de substrato. Porém, o recipiente foi preenchido com até 4 L de substrato, para facilitar as adubações e irrigações.

Os recipientes foram mantidos sobre bancadas suspensas em telado constituído por tela anti-afídica e sombrite de 50% de luminosidade. Todas as mudas receberam irrigações manuais diárias. Foram realizadas adubações semanais com os fertilizantes Nitrato de cálcio e Kristalon Hydro™ (0,84 g.L⁻¹) e separadamente com Tenso Iron Hydro™ (0,08 g.L⁻¹), sempre adicionando 125 mL da solução por recipiente, até o final do ensaio. Desbrotas periódicas foram realizadas, principalmente nos híbridos somáticos, para não haver prejuízos no desenvolvimento da haste principal, além de serem também estaqueados, visando proporcionar crescimento mais ereto. Além disso, foram realizadas quinzenalmente pulverizações com inseticidas específicos para o controle do pulgão preto (*Toxoptera citricidus*), garantindo-se assim sanidade das plantas e isenção do CTV.

Quando os híbridos somáticos e as plantas testemunhas apresentavam cerca de treze meses, 62-84 cm de comprimento e diâmetro ao redor de 68 a 91 mm (15 cm acima do colo para as mudas oriundas de sementes e a 10 cm acima da inserção da brotação da estaca dos híbridos somáticos), iniciou-se o ensaio. O método utilizado para testar a tolerância dos híbridos somáticos ao CTV foi o teste de transmissibilidade em estufa, por meio de união de tecidos (enxertia) (Moreira et al., 1954).

Foram cedidas pelo Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”, borbulhas de laranjeira ‘Valência’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] sadias e infectadas com estirpes fracas de CTV, oriundas de plantas matrizes localizadas em vasos sob telado constituído de tela anti-afídica. Antes da coleta dos dados, foi realizado teste ELISA nas matrizes infestadas com CTV para comprovar a presença do vírus (ELISA PTA, utilizado o anti-soro policlonal).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, no esquema de parcela subdividida no espaço, com quatro repetições. As parcelas constituíram-se de plantas infectadas com CTV (I) e plantas sadias (S), colocadas sob bancadas separadas, representando o tratamento principal. Os 13 genótipos (híbridos somáticos e plantas testemunhas) constituíram as subparcelas, representando o tratamento secundário e foram distribuídos ao acaso nas parcelas. Cada subparcela foi composta de três plantas, dando um total de 12 plantas sadias e 12 plantas infestadas, totalizando 312 plantas.

Foi realizada a enxertia pelo método de borbulhia em “T invertido”, colocando-se uma única borbulha por planta, a uma altura entre 10 a 15 cm do porta-enxerto, para as plantas testemunhas e a 10 cm à partir da inserção da brotação na estaca, para os híbridos somáticos, em julho de 2004. Após a realização da enxertia, envolveu-se a borbulha com fitilho plástico, sendo realizada desbrotas periódicas abaixo e acima da região de enxertia, a fim de não haver prejuízos na nutrição e soldadura das borbulhas. Após 25 dias, os fitilhos foram retirados e a parte aérea, cinco centímetro acima da borbulha, foi decapitada, para promover o forçamento da brotação da borbulha.

As avaliações do experimento iniciaram-se 30 dias após a retirada do fitilho, avaliando-se a porcentagem de borbulhas brotadas, número médio de folhas, comprimento médio da brotação e diâmetro médio da brotação, repetindo-se ainda essa avaliação aos 60 e aos 90 dias após a retirada do fitilho, sendo ainda efetuadas observações visuais nas últimas duas avaliações, após o primeiro fluxo de crescimento, a fim de detectar sintomas do CTV.

Assim, pode-se comparar os cinco parâmetros analisados nas três avaliações, entre plantas sadias e plantas infectadas. Calcularam-se ainda a diferença entre plantas sadias e infectada (perdas) e o índice de redução, obtido pela expressão em módulo: $(\text{plantas infectada/plantas sadias}) - 1 \times 100$, para o comprimento médio da brotação.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias ao teste Scott-Knott (1974), ao nível de 5% de probabilidade (Gomes, 2000). As análises foram realizadas pelo programa computacional Sistema para Análise de Variância - SISVAR (Ferreira, 2000).

No final do ensaio, todas as plantas de cada genótipo foram agrupadas, retirando-se um fragmento vegetal folhar, tanto das plantas sadias e plantas infectadas por CTV, para realização do teste ELISA, no Laboratório de Virologia Vegetal do Departamento de Fitopatologia da USP/ESALQ, a fim de detectar-se a presença do vírus nas plantas infectadas e ausência nas plantas sadias. O método utilizado foi o ELISA PTA, sendo utilizado o anti-soro policlonal cedido pelo Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”.

As temperaturas máxima e mínima do telado foram coletadas diariamente durante o período do experimento, sempre às oito horas da manhã. A média das temperaturas semanais encontra-se na Figura 3.

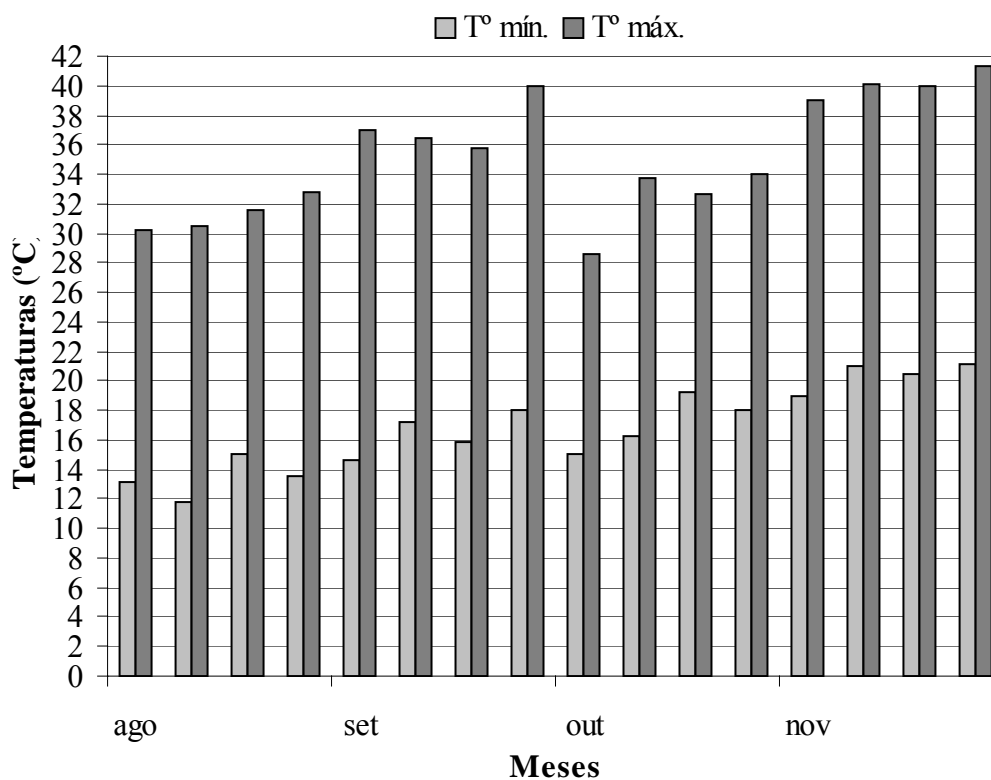


Figura 3 - Temperaturas máxima e mínima no telado, localizado o experimento de reação dos híbridos somáticos ao CTV. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento 1: Propagação dos híbridos somáticos

4.1.1 Enraizamento das estacas

Os híbridos laranja ‘Caipira’ + limão ‘Cravo’, laranja ‘Caipira’ + tangerina ‘Cleópatra’, laranja ‘Caipira’ + limão ‘Volkameriano’, laranja ‘Caipira’ + limão ‘Rugoso’, limão ‘Cravo’ + tangerina ‘Sunki’, laranja ‘Rohde Red’ + limão ‘Volkameriano’ e laranja ‘Valência’ + *Fortunella obovata* apresentaram maior porcentagem de enraizamento de suas estacas. O híbrido tangerina ‘Cleópatra’ + limão ‘Volkameriano’ ficou em posição intermediária e os híbridos limão ‘Cravo’ + laranja azeda, tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda e laranja ‘Ruby Blood’ + limão ‘Volkameriano’ apresentaram menor enraizamento. Comparando-se os resultados da porcentagem de estacas enraizadas com a porcentagem de estacas calejadas, percebe-se forte relação dos resultados, onde que os mesmos híbridos que apresentaram elevado enraizamento, também apresentaram elevado porcentagem de calos em suas estacas, a exceção do híbrido tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda, que apresentou baixo enraizamento (54,25%), porém elevada porcentagem de calos (92,75%) (Tabela 2).

As raízes formadas nas estacas são respostas ao traumatismo produzido pelo corte na base da estaca. Com a lesão ocasionada pelo corte, ocorre traumatismo nos tecidos do xilema e floema, seguido por um processo de cicatrização, formando-se, assim, uma capa de suberina, responsável pela redução da desidratação na área lesada. Nesta região, muitas vezes, é formada uma massa celular parenquimatosa e desorganizada, denominada calo (Fachinello et al., 1995; Torres & Caldas, 1990).

A presença de calos na base das estacas possui muitas vezes relação com a formação de raízes, apesar de serem eventos independentes, pelo motivo de ambos eventos necessitarem de condições adequadas idênticas para serem formados, ou seja, suas exigências são similares. Tem sido observado que, ao menos para as espécies de difícil enraizamento, a formação de raízes ocorre sobre o calo, podendo este, ainda, propiciar uma barreira contra o ataque de microorganismos (Pasqual et al., 2001).

Para o número médio de raízes emitidas da estaca, detectou-se que os híbridos laranja 'Caipira' + limão 'Volkameriano', tangerina 'Cleópatra' + limão 'Volkameriano' e limão 'Cravo' + tangerina 'Sunki' apresentaram superioridade entre os demais híbridos, que não diferiram estatisticamente entre si. Já para o comprimento médio das raízes, apenas os híbridos laranja 'Caipira' + tangerina 'Cleópatra' e laranja 'Rohde Red' + limão 'Volkameriano' destacaram-se entre os demais, apresentando comprimento médio de suas raízes maior que 4,18 cm. Na seqüência, os híbridos laranja 'Caipira' + limão 'Cravo', laranja 'Caipira' + limão 'Volkameriano', laranja 'Caipira' + limão 'Rugoso', tangerina 'Cleópatra' + limão 'Volkameriano' e laranja 'Ruby Blood' + limão 'Volkameriano' apresentaram comprimento médio de suas raízes na faixa de 3,37 a 3,81 cm, o híbrido limão 'Cravo' + tangerina 'Sunki' apresentou média de 2,92 cm e finalmente os híbridos limão 'Cravo' + laranja azeda, tangerina 'Cleópatra' + laranja azeda e laranja 'Valência' + *Fortunella obovata*, que apresentaram os menores comprimento médio das raízes, com resultados variando entre 1,63 a 2,15 cm (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem de estacas enraizadas (PEE), porcentagem de estacas calejadas (PEC), número médio de raízes emitidas da estaca (NRE) e comprimento médio das raízes (CMR, cm) de híbridos somáticos de citros. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

Híbridos Somáticos	Variáveis analisadas*			
	PEE	PEC	NRE	CMR
L. 'Cravo' + L. azeda	53,0 c	75,0 b	3,54 b	2,13 d
L. 'Caipira' + L. 'Cravo'	93,0 a	97,0 a	2,73 b	3,64 b
L. 'Caipira' + T. 'Cleópatra'	100,0 a	100,0 a	2,80 b	4,18 a
L. 'Caipira' + L. 'Volkameriano'	92,7 a	97,2 a	4,21 a	3,63 b
L. 'Caipira' + L. 'Rugoso'	98,5 a	100,0 a	2,98 b	3,62 b
T. 'Cleópatra' + L. 'Volkameriano'	72,2 b	80,5 b	4,66 a	3,81 b
T. 'Cleópatra' + L. azeda	54,2 c	92,7 a	3,35 b	1,63 d
L. 'Cravo' + T. 'Sunki'	87,5 a	95,7 a	4,52 a	2,92 c
L. 'Ruby Blood' + L. 'Volkameriano'	52,7 c	76,5 b	2,55 b	3,37 b
L. 'Rohde Red' + L. 'Volkameriano'	98,5 a	100,0 a	2,58 b	4,84 a
L. 'Valência' + <i>Fortunella obovata</i>	88,6 a	98,0 a	3,28 b	2,15 d
cv (%)	9,45	7,30	16,20	14,59

* Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem significamente entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 1% de probabilidade.

Com relação ao enraizamento das estacas dos híbridos somáticos, ficou evidenciado o elevado enraizamento, sendo que os híbridos que apresentaram melhores resultados obtiveram índices superiores a 87,5% de enraizamento. Em geral, os híbridos somáticos apresentam elevado enraizamento de suas estacas, tomando-se, por exemplo, o híbrido somático *Citrus deliciosa* + *Poncirus trifoliata*, que apresentou 90% de enraizamento de suas estacas (Ollitrault et al., 1998). Por outro lado, pesquisas relacionadas ao enraizamento de cultivares porta-enxertos utilizados na citricultura não evidenciaram alta porcentagem de enraizamento, a exemplo do limão 'Volkameriano' (65,86%), limão 'Cravo' (60,28%), citrumelo 'Swingle' (48,26%), tangerina 'Sunki' (11,3%), *Poncirus trifoliata* (13,6%) e *P. trifoliata* 'Fly Dragon' (3,11%) (Santos et al., 1987; Pio et al., 2002; Andrade & Martins, 2003). Com relação os cultivares copa, os resultados são baixos, principalmente para as laranjeiras 'Pêra' (3,8%) e 'Valência' (1,5%), a exceção dos limões e limas ácidas apresentam elevado potencial de

enraizamento (77,9% para o limão ‘Siciliano’ e 83% para a lima ácida ‘Tahiti’) (Santos et al., 1987; Rocha et al., 1988; Prati et al., 1999).

Talvez essa diferença de enraizamento das estacas dos híbridos somáticos em relação aos demais cultivares de citros, possa estar associada ao fato dos híbridos serem oriundos de material juvenil, sendo que estacas retiradas de plantas em que não atingiram ainda a fase reprodutiva apresentam maior capacidade de enraizamento (Fachinello et al., 1995).

Outro fato que possa ter ainda aumentado do enraizamento dos híbridos somáticos em estudo foi à poda mediamente severa realizada nas plantas matrizes antes da retirada das estacas, a fim de estimular novas brotações que dariam origem às estacas coletadas na execução do trabalho em pauta. Em espécies de difícil enraizamento, pode ser útil induzir rejuvenescimento, através da poda, para aumentar a capacidade de enraizamento (Hartmann et al., 2002).

Para as características pertinentes a parte aérea das estacas dos híbridos somáticos em estudo, denotou-se para a porcentagem de estacas brotadas que o limão ‘Cravo’ + tangerina ‘Sunki’ foi o híbrido que se destacou, entre os demais, com 89% de estacas brotadas; em um segundo grupo permaneceram os híbridos limão ‘Cravo’ + laranja azeda, laranja ‘Caipira’ + limão ‘Cravo’, laranja ‘Caipira’ + limão ‘Volkameriano’, tangerina ‘Cleópatra’ + limão ‘Volkameriano’ e laranja ‘Valência’ + *Fortunella obovata*, que não diferiram entre si; posteriormente, agruparam-se os híbridos laranja ‘Caipira’ + tangerina ‘Cleópatra’, laranja ‘Caipira’ + limão ‘Rugoso’ e laranja ‘Ruby Blood’ + limão ‘Volkameriano’, seguidos posteriormente dos híbridos laranja ‘Rohde Red’ + limão ‘Volkameriano’ e tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda, que apresentaram as menores porcentagem de brotação de suas estacas (22,25% e 8,5%, respectivamente) (Tabela 3). Conseqüentemente, esses dois últimos híbridos foram os que apresentaram o menor número médio de brotos, tendo como destaque para esta variável, novamente o híbrido limão ‘Cravo’ + tangerina ‘Sunki’, seguido da laranja ‘Ruby Blood’ + limão ‘Volkameriano’ e posteriormente dos híbridos limão ‘Cravo’ + laranja azeda, laranja ‘Caipira’ + limão ‘Cravo’, laranja ‘Caipira’ + tangerina ‘Cleópatra’, laranja ‘Caipira’ + limão ‘Volkameriano’ e laranja ‘Valência’ + *Fortunella*

obovata, que não diferiram estatisticamente entre si. Na seqüência, encontra-se ainda os híbridos laranja ‘Caipira’ + limão ‘Rugoso’ e tangerina ‘Cleópatra’ + limão ‘Volkameriano’.

Para o número médio de folhas, constatou-se novamente destaque do híbrido limão ‘Cravo’ + tangerina ‘Sunki’, mas que não diferiu nesta variável para os híbridos laranja ‘Caipira’ + limão ‘Cravo’, laranja ‘Caipira’ + limão ‘Volkameriano’, laranja ‘Caipira’ + limão ‘Rugoso’, laranja ‘Ruby Blood’ + limão ‘Volkameriano’ e laranja ‘Valência’ + *Fortunella obovata*. Novamente, o híbrido tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda apresentou resultado inferiores, em comparação aos demais. Já para o comprimento médio das brotações, o híbrido laranja ‘Rohde Red’ + limão ‘Volkameriano’ destacou-se entre os demais (média das brotações de 6,43 cm), seguido dos híbridos laranja ‘Caipira’ + limão ‘Volkameriano’, laranja ‘Caipira’ + limão ‘Rugoso’ e tangerina ‘Cleópatra’ + limão ‘Volkameriano’, que não diferiram entre si, seguidos posteriormente dos demais híbridos (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de estacas brotadas (PEB), número médio de brotos (NB), número médio de folhas (NF) e comprimento médio das brotações (CMB, cm) de híbridos somáticos de citros. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

Híbridos Somáticos	Variáveis analisadas*			
	PEB	NB	NF	CMB
L. ‘Cravo’ + L. azeda	66,7 b	1,83 c	5,45 b	2,22 c
L. ‘Caipira’ + L. ‘Cravo’	61,2 b	2,16 c	7,06 a	3,51 c
L. ‘Caipira’ + T. ‘Cleópatra’	41,5 c	1,86 c	5,82 b	3,16 c
L. ‘Caipira’ + L. ‘Volkameriano’	65,5 b	2,07 c	8,04 a	5,00 b
L. ‘Caipira’ + L. ‘Rugoso’	33,2 c	1,64 d	7,19 a	4,44 b
T. ‘Cleópatra’ + L. ‘Volkameriano’	59,7 b	1,60 d	4,69 b	4,58 b
T. ‘Cleópatra’ + L. azeda	8,5 d	1,00 e	2,37 c	3,08 c
L. ‘Cravo’ + T. ‘Sunki’	89,0 a	2,60 a	7,68 a	3,30 c
L. ‘Ruby Blood’ + L. ‘Volkameriano’	40,2 c	2,26 b	7,71 a	2,39 c
L. ‘Rohde Red’ + L. ‘Volkameriano’	22,2 d	1,31 e	5,31 b	6,43 a
L. ‘Valência’ + <i>Fortunella obovata</i>	54,0 b	1,96 c	7,56 a	2,91 c
cv (%)	23,83	11,94	18,66	26,67

* Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem significamente entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 1% de probabilidade.

A formação de raízes e brotações em estacas pode ser direta e indiretamente controlada por genes (Haissig & Reimenschneider, 1988). Segundo estes autores, o aspecto genético que influencia o processo de enraizamento de estacas não tem sido investigado. O potencial de uma estaca em formar raízes e brotações é variável com a espécie e cultivar, podendo ser feita uma classificação entre espécies ou cultivares de fácil, médio ou difícil capacidade de enraizamento, ainda que a facilidade de enraizamento seja resultante da interação de diversos fatores e não apenas do potencial genético (Fachinello et al., 1995).

Fato interessante constatado para as características pertinentes a parte aérea da estaca, foi à relação inversa entre número médio de brotos e o comprimento médio das brotações. Os quatro híbridos que se destacaram, entre os demais, para o comprimento médio das brotações (laranja 'Rohde Red' + limão 'Volkameriano', laranja 'Caipira' + limão 'Volkameriano', laranja 'Caipira' + limão 'Rugoso' e tangerina 'Cleópatra' + limão 'Volkameriano') apresentaram poucas brotações em suas estacas. Possivelmente, a ocorrência dessa inversão de resultados possa estar relacionada ao mesmo fato que levou a relação inversa dos resultados entre o número de raízes emitidas da estaca com o comprimento médio das raízes entre os híbridos somáticos, ou seja, a quantidade endógena de reservas ter favorecido o alongamento das poucas brotações inseridas nas estacas dos híbridos que apresentaram menores números médios de brotos (Fachinello et al., 1995; Veierskov, 1988).

Assim, através da correlação entre as variáveis estudadas na fase de enraizamento das estacas dos híbridos somáticos, pode-se verificar que houve correlação positiva entre as variáveis porcentagem de estacas enraizadas com porcentagem de estacas calejadas (Tabela 4), confirmando a relação entre essas duas variáveis encontradas na Tabela 2. Diferentemente da relação dos resultados entre a porcentagem de estacas enraizadas e com calos, não houve relação entre os resultados do número médio de raízes emitidas da estaca com o comprimento médio das raízes, uma vez que não foi constatada correlação entre essas duas variáveis. Possivelmente, essa independência entre essas duas variáveis pode estar relacionada a maior emissão de raízes nas estacas ter provocado menor alongamento das mesmas, uma vez que as raízes

são formadas apenas pela quantidade de reservas presentes endógenamente nas estacas, as reservas limitam-se a favorecer o pequeno número de raízes formadas, ocorrendo, assim, maior alongamento em estacas de menores números de raízes (Pio, 2002).

Outras correlações ainda observadas foram entre as variáveis porcentagem de estacas brotadas com porcentagem de estacas enraizadas e conseqüentemente, porcentagem de estacas brotadas com porcentagem de estacas calejadas (Tabela 4). Outra correlação entre variáveis que se pode confirmar, em relação à parte aérea das estacas, foi entre as variáveis porcentagem de estacas brotadas e número médio de brotos e esta última com o número médio de folhas, vindo a confirmar a relação encontrada em alguns híbridos para essas variáveis, como consta na Tabela 3.

Houve correlação negativa entre as variáveis comprimento médio das raízes e número médio de brotos, ou seja, quanto mais brotações as estacas possuem, menor o comprimento médio das raízes (Tabela 4). Assim, confirma-se a relação entre o gasto de reservas, utilizados na emissão de brotações, desfavorecendo o alongamento das raízes formadas. O alongamento das brotações não deve ser relacionada com o enraizamento, pois, muitas vezes, a brotação ao invés de contribuir, prejudica a iniciação radicular à medida que as brotações passam a competir por reservas da estaca, fazendo com que sejam exauridas, no favorecimento das brotações e não nas raízes (Howard et al., 1984).

Tabela 4. Coeficiente de correlação parcial linear (r) entre as variáveis observadas referentes ao enraizamento dos híbridos somáticos de citros, ajustados para os tratamentos. Porcentagem de estacas enraizadas (PEE), porcentagem de estacas calejadas (PEC), porcentagem de estacas brotadas (PEB), número médio de brotos (NB), número médio de folhas (NF), número médio de raízes emitidas da estaca (NRE), comprimento médio das brotações (CMB) e comprimento médio das raízes (CMR). USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

	PEE	PEC	PEB	NB	NF	NRE	CMB	CMR
PEE	-							
PEC	0,43*	-						
PEB	0,51*	0,56*	-					
NB	0,06	0,10	0,36*	-				
NF	-0,02	0,30	0,10	0,50*	-			
NRE	0,11	0,12	0,30	0,10	0,23	-		
CMB	-0,03	0,31	-0,05	-0,17	0,33	-0,19	-	
CMR	0,27	0,08	0,06	-0,33*	-0,03	0,07	0,08	-

* Correlação significativa ao nível de 5% de probabilidade.

Uma visão geral do enraizamento das estacas dos híbridos somáticos pode ser observada na Figura abaixo, podendo assim verificar com maior detalhe a formação das raízes em cada híbrido somático em estudo (Figura 4).



Figura 4 - Detalhe do sistema radicular das estacas dos híbridos somáticos L. 'Cravo' + L. azeda (A), L. 'Caipira' + L. 'Cravo' (B), L. 'Caipira' + T. 'Cleópatra' (C), L. 'Caipira' + L. 'Volkameriano' (D), L. 'Caipira' + L. 'Rugoso' (E), T. 'Cleópatra' + L. 'Volkameriano' (F), T. 'Cleópatra' + L. azeda (G), L. 'Cravo' + T. 'Sunki' (H), L. 'Ruby Blood' + L. 'Volkameriano' (I), L. 'Rohde Red' + L. 'Volkameriano' (J), L. 'Valência' + *Fortunella obovata* (K) e brotações das estacas (L). USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

4.1.2 Crescimento das mudas

Após o transplântio, verificou-se que apenas o híbrido tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda apresentou menor sobrevivência de suas estacas, permanecendo com 80% das estacas vivas aos 30 dias e 67,5% aos 60 dias. Já aos 90 dias, houve ainda pequena redução da taxa de sobrevivência desse híbrido (7,5%), notando-se ainda que o híbrido laranja ‘Valência’ + *Fortunella obovata* apresentou redução da taxa de sobrevivência, permanecendo com 76,7% de sobrevivência, registrando morte de 16,6% de estacas entre 60 e 90 dias após o transplântio. Aos 120 dias, não houve redução da porcentagem de sobrevivência desse híbrido, porém registrou-se redução de 2,5% para o híbrido tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda, apresentando 57,5% de estacas vivas. Já aos 150 dias, esse último não apresentou redução da taxa de sobrevivência, apenas pequena queda de sobrevivência para o híbrido laranja ‘Valência’ + *Fortunella obovata*. Porém, aos 180 dias, registrou-se novamente redução da porcentagem de sobrevivência do híbrido laranja ‘Valência’ + *Fortunella obovata* (3,4%) e ainda redução do híbrido limão ‘Cravo’ + laranja azeda, registrando-se 85% de estacas vivas. Dos 180 aos 210 dias após o transplântio, não houve redução da taxa de sobrevivência em nenhum dos híbridos em estudo, havendo estabilidade na sobrevivência das estacas (Tabela 5).

Analisando-se a porcentagem de estacas vivas dos híbridos somáticos ao longo do tempo, houve redução da porcentagem de estacas vivas em apenas três híbridos em estudo: tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda aos 60 dias, limão ‘Cravo’ + laranja azeda e laranja ‘Valência’ + *Fortunella obovata* aos 90 dias após o transplântio. Já os demais híbridos permaneceram com mais de 90% de suas estacas vivas até o final do ensaio (Tabela 5).

Embora alguns híbridos possuem redução da sobrevivência de suas estacas, a maioria apresenta grande taxa de estacas vivas após o transplântio. Como exemplo pode ser citado o híbrido somático *Citrus deliciosa* + *Poncirus trifoliata*, que apresentou 90% de enraizamento de suas estacas, permaneceu com 95% de sobrevivência ao transplântio (Ollitrault et al., 1998).

Tabela 5. Porcentagem de estacas vivas de híbridos somáticos de citros após o transplântio. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

Híbridos Somáticos	Dias após o transplântio*													
	30		60		90		120		150		180		210	
L. 'Cravo' + L. azeda	100,0	Aa	97,5	Aa	92,5	Ba	90,0	Ba	90,0	Ba	85,0	Bb	85,0	Bb
L. 'Caipira' + L. 'Cravo'	100,0	Aa	100,0	Aa	100,0	Aa	100,0	Aa	100,0	Aa	100,0	Aa	100,0	Aa
L. 'Caipira' + T. 'Cleópatra'	100,0	Aa	100,0	Aa	100,0	Aa	100,0	Aa	100,0	Aa	100,0	Aa	100,0	Aa
L. 'Caipira' + L. 'Volkameriano'	100,0	Aa	100,0	Aa	100,0	Aa	100,0	Aa	100,0	Aa	100,0	Aa	100,0	Aa
L. 'Caipira' + L. 'Rugoso'	100,0	Aa	100,0	Aa	100,0	Aa	100,0	Aa	100,0	Aa	100,0	Aa	100,0	Aa
T. 'Cleópatra' + L. 'Volkameriano'	97,5	Aa	97,5	Aa	97,5	Aa	97,5	Aa	97,5	Aa	97,5	Aa	97,5	Aa
T. 'Cleópatra' + L. azeda	80,0	Ab	67,5	Bb	60,0	Bc	57,5	Bc	57,5	Bd	57,7	Bd	57,7	Bd
L. 'Cravo' + T. 'Sunki'	100,0	Aa	100,0	Aa	100,0	Aa	100,0	Aa	100,0	Aa	100,0	Aa	100,0	Aa
L. 'Ruby Blood' + L. 'Volkameriano'	97,5	Aa	97,5	Aa	95,0	Aa	92,5	Aa	90,0	Ab	90,0	Ab	90,0	Ab
L. 'Rohde Red' + L. 'Volkameriano'	100,0	Aa	100,0	Aa	100,0	Aa	100,0	Aa	100,0	Aa	100,0	Aa	100,0	Aa
L. 'Valência' + <i>Fortunella obovata</i>	96,7	Aa	93,3	Aa	76,7	Bb	76,7	Bb	73,4	Bc	70,0	Bc	70,0	Bc
cv (%) Parcela (híbridos)							4,01							
cv (%) Subparcela (tempo)							6,84							

* Médias seguidas da mesma letra em maiúsculo na linha e em minúsculo na coluna, não diferem significamente entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 1% de probabilidade.

Para a porcentagem de estacas brotadas, houve grande emissão de brotações nas estacas dos híbridos somáticos após o transplântio, registrando-se mais de 82,5% de estacas brotadas para a maioria dos híbridos em estudos, a exceção da laranja ‘Ruby Blood’ + limão ‘Volkameriano’ (62,5%) e limão ‘Cravo’ + laranja azeda (10%). Aos 60 dias após, esses dois híbridos continuaram com menor porcentagem de estacas brotadas, em relação aos demais, sendo que houve um pequeno acréscimo para o híbrido tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda (17,5%). Noventa dias após o transplântio, além desses dois híbridos citados anteriormente, limão ‘Cravo’ + laranja azeda e laranja ‘Valência’ + *Fortunella obovata* apresentaram menores porcentagens de estacas brotadas em comparação aos demais, mantendo-se essa diferença, em relação aos demais, também aos 120 dias. A inclusão do híbrido laranja ‘Valência’ + *Fortunella obovata* está relacionada com a redução da taxa de sobrevivência registrada nesse período (Tabela 5). Aos 150 e 180 dias após o transplântio, os híbridos que apresentaram as menores porcentagens de estacas brotadas foram o laranja ‘Ruby Blood’ + limão ‘Volkameriano’, laranja ‘Valência’ + *Fortunella obovata* e tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda, incluindo-se apenas na última avaliação, aos 210 dias, novamente o híbrido limão ‘Cravo’ + laranja azeda. Ao final do ensaio, os demais híbridos apresentaram mais de 97,5% de suas estacas brotadas (Tabela 6).

Em relação ao comportamento dos híbridos à porcentagem de estacas brotadas ao longo do tempo, nota-se que o grande aumento da emissão das brotações correu aos 30 dias, mantendo-se constante até o final do ensaio, a exceção dos híbridos tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda e laranja ‘Ruby Blood’ + limão ‘Volkameriano’, que registraram aumento significativo até 90 dias após o transplântio, não se registrando diferenças, ao longo do tempo, até o final do ensaio (Tabela 6). Porém, o híbrido laranja ‘Valência’ + *Fortunella obovata* registrou redução de 16,6% de estacas brotadas aos 90 dias.

Tabela 6. Porcentagem de estacas brotadas de híbridos somáticos de citros após o transplântio. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

Híbridos Somáticos	Dias após o transplântio*							
	30	60	90	120	150	180	210	
L. 'Cravo' + L. azeda	82,5 Aa	85,0 Aa	82,5 Ab	80,0 Ab	82,5 Aa	85,0 Aa	82,5 Ab	
L. 'Caipira' + L. 'Cravo'	97,5 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	
L. 'Caipira' + T. 'Cleópatra'	95,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	
L. 'Caipira' + L. 'Volkameriano'	92,5 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	
L. 'Caipira' + L. 'Rugoso'	90,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	
T. 'Cleópatra' + L. 'Volkameriano'	97,5 Aa	97,5 Aa	97,5 Aa	97,5 Aa	97,5 Aa	97,5 Aa	97,5 Aa	
T. 'Cleópatra' + L. azeda	10,0 Cc	27,5 Bc	45,0 Ac	45,0 Ac	50,0 Ac	55,0 Ac	57,5 Ac	
L. 'Cravo' + T. 'Sunki'	97,5 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	
L. 'Ruby Blood' + L. 'Volkameriano'	62,5 Bb	62,5 Bb	77,5 Ab	75,0 Ab	72,5 Ab	75,0 Ab	77,5 Ab	
L. 'Rohde Red' + L. 'Volkameriano'	90,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	100,0 Aa	
L. 'Valência' + <i>Fortunella obovata</i>	90,0 Aa	90,0 Aa	73,4 Bb	76,7 Bb	73,4 Bb	70,0 Bb	70,0 Bb	
cv (%) Parcela (híbridos)				6,34				
cv (%) Subparcela (tempo)				11,75				

* Médias seguidas da mesma letra em maiúsculo na linha e em minúsculo na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 1% de probabilidade.

Para o comprimento médio da brotação, houve destaque aos 30 dias após o transplântio, para os híbridos laranja 'Caipira' + limão 'Volkameriano', tangerina 'Cleópatra' + limão 'Volkameriano', limão 'Cravo' + tangerina 'Sunki' e laranja 'Rohde Red' + limão 'Volkameriano', em relação aos demais. Os mesmos híbridos que apresentaram os melhores resultados na primeira avaliação, foram os que se destacaram no final do ensaio. Porém, os híbridos laranja 'Caipira' + limão 'Volkameriano' e laranja 'Rohde Red' + limão 'Volkameriano' foram os que apresentaram as maiores alturas (43,00 e 44,67 cm, respectivamente), seguidos dos híbridos tangerina 'Cleópatra' + limão 'Volkameriano' e limão 'Cravo' + tangerina 'Sunki' (38,56 e 36,90 cm, respectivamente), que não diferiram entre si. Os híbridos limão 'Cravo' + laranja azeda e tangerina 'Cleópatra' + laranja azeda apresentaram as menores alturas 210 dias após o transplântio, com altura média de suas brotações ao redor de 10 cm. Além do pequeno crescimento desses dois híbridos somáticos, em relação aos demais, aos 90 dias após o transplântio, o híbrido tangerina 'Cleópatra' + laranja azeda estabilizou-se em relação ao desenvolvimento médio de sua brotação (Tabela 7).

Para o número médio de folhas, os híbridos que se destacaram na primeira avaliação foram laranja 'Caipira' + limão 'Volkameriano', laranja 'Caipira' + limão 'Rugoso', tangerina 'Cleópatra' + limão 'Volkameriano', limão 'Cravo' + tangerina 'Sunki', laranja 'Ruby Blood' + limão 'Volkameriano', laranja 'Rohde Red' + limão 'Volkameriano' e laranja 'Valência' + *Fortunella obovata*. Igualmente ao ocorrido para o comprimento médio da brotação (Tabela 7), híbridos que se destacaram na primeira avaliação também vieram a apresentar os maiores números médios de folhas na última avaliação (210 dias), a exceção dos híbridos tangerina 'Cleópatra' + limão 'Volkameriano' e laranja 'Ruby Blood' + limão 'Volkameriano' (Tabela 8). De um modo geral, os híbridos que apresentaram destaque para o número médio de folhas foram laranja 'Caipira' + limão 'Volkameriano', laranja 'Caipira' + limão 'Rugoso', limão 'Cravo' + tangerina 'Sunki' e laranja 'Rohde Red' + limão 'Volkameriano'.

Em relação à análise ao longo do tempo, ficou evidenciado que o híbrido limão 'Cravo' + laranja azeda não apresentou diferença estatística para esta variável ao longo das avaliações, não se constatando assim ganhos significativos para o número médio de

folhas. Por outro lado, o híbrido tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda, que não apresentou bons resultados para o comprimento médio da brotação (Tabela 7), igualmente a este último híbrido citado, possuiu estabilidade para o número médio de folhas só aos 150 dias após o transplântio (Tabela 8).

Em relação ao diâmetro médio da brotação, os híbridos que apresentaram destaque em relação aos demais, 30 dias após o transplântio, foram laranja ‘Caipira’ + tangerina ‘Cleópatra’, laranja ‘Caipira’ + limão ‘Volkameriano’, laranja ‘Caipira’ + limão ‘Rugoso’, tangerina ‘Cleópatra’ + limão ‘Volkameriano’, limão ‘Cravo’ + tangerina ‘Sunki’ e laranja ‘Rohde Red’ + limão ‘Volkameriano’. Igualmente a observado anteriormente, para as variáveis comprimento médio da brotação e número médio de folhas (Tabelas 7 e 8, respectivamente), os híbridos que se destacaram, em relação aos demais, na primeira avaliação, também vieram a superar os demais, para esta variável na última avaliação. Nesse caso, houve destaque para os híbridos laranja ‘Caipira’ + limão ‘Volkameriano’ e laranja ‘Rohde Red’ + limão ‘Volkameriano’, que apresentaram as maiores médias do diâmetro da brotação (0,64 e 06 cm, respectivamente), seguidos dos híbridos laranja ‘Caipira’ + tangerina ‘Cleópatra’, laranja ‘Caipira’ + limão ‘Rugoso’, tangerina ‘Cleópatra’ + limão ‘Volkameriano’ e limão ‘Cravo’ + tangerina ‘Sunki’, que não diferiram entre si. Com relação às avaliações dessa variável ao longo do tempo, ficou evidenciado que os híbridos limão ‘Cravo’ + laranja azeda e, especialmente, tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda, obtiveram estabilidade no aumento do diâmetro médio da brotação apenas ao final de 180 e 210 dias, respectivamente. Porém, os híbridos laranja ‘Ruby Blood’ + limão ‘Volkameriano’ e laranja ‘Valência’ + *Fortunella obovata*, apresentaram estabilidade para esta variável já aos 120 dias após o transplântio (Tabela 9).

Tabela 7. Comprimento médio das brotações (cm) de híbridos somáticos de citros após o transplântio. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

Híbridos Somáticos	Dias após o transplântio*							
	30	60	90	120	150	180	210	
L. 'Cravo' + L. azeda	3,67 Bb	4,47 Bc	5,12 Bd	5,27 Be	5,25 Bd	7,17 Ad	10,04 Ae	
L. 'Caipira' + L. 'Cravo'	4,32 Eb	8,82 Db	11,42 Cc	12,02 Cc	15,65 Bb	27,32 Ab	28,80 Ac	
L. 'Caipira' + T. 'Cleópatra'	4,72 Db	8,10 Db	11,10 Cc	11,68 Cc	14,72 Cb	27,07 Bb	30,83 Ac	
L. 'Caipira' + L. 'Volkameriano'	7,92 Ea	13,50 Da	18,02 Ca	18,76 Ca	20,40 Ca	32,50 Ba	43,00 Aa	
L. 'Caipira' + L. 'Rugoso'	5,47 Eb	9,97 Da	13,38 Cb	15,90 Cb	20,52 Ba	30,95 Aa	33,35 Ac	
T. 'Cleópatra' + L. 'Volkameriano'	7,32 Ea	12,07 Da	17,78 Ca	18,52 Ca	20,86 Ca	33,95 Ba	38,56 Ab	
T. 'Cleópatra' + L. azeda	2,63 Bb	3,80 Bc	6,15 Ad	6,04 Ae	6,58 Ad	7,84 Ad	10,10 Ae	
L. 'Cravo' + T. 'Sunki'	6,42 Fa	11,42 Ea	14,28 Db	15,22 Db	19,10 Ca	31,67 Ba	36,90 Ab	
L. 'Ruby Blood' + L. 'Volkameriano'	3,90 Cb	7,35 Bb	9,24 Bc	9,05 Bd	9,86 Bc	18,81 Ac	21,47 Ad	
L. 'Rohde Red' + L. 'Volkameriano'	8,52 Ea	11,52 Ea	17,08 Da	18,78 Da	23,22 Ca	34,65 Ba	44,67 Aa	
L. 'Valência' + <i>Fortunella obovata</i>	4,23 Cb	6,67 Cb	8,03 Cd	8,58 Cd	11,74 Bc	16,70 Ac	18,60 Ad	
cv (%) Parcela (híbridos)				12,78				
cv (%) Subparcela (tempo)				16,47				

* Médias seguidas da mesma letra em maiúsculo na linha e em minúsculo na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 8. Número médio de folhas de híbridos somáticos de citros após o transplântio. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

Híbridos Somáticos	Dias após o transplântio*									
	30	60	90	120	150	180	210			
L. 'Cravo' + L. azeda	3,64	4,42	5,10	4,97	5,07	5,52	6,42	Ab	Ac	Ad
L. 'Caipira' + L. 'Cravo'	3,57	6,35	8,45	8,98	10,95	14,32	14,78	Eb	Cb	Bb
L. 'Caipira' + T. 'Cleópatra'	4,00	6,75	8,62	9,05	10,55	15,48	16,42	Eb	Cb	Bb
L. 'Caipira' + L. 'Volkameriano'	5,17	8,15	10,57	10,90	11,28	17,22	18,72	Da	Ba	Bb
L. 'Caipira' + L. 'Rugoso'	4,75	6,97	9,50	10,70	13,10	16,20	17,42	Ea	Ca	Ba
T. 'Cleópatra' + L. 'Volkameriano'	4,55	6,02	8,60	8,90	10,40	14,47	16,19	Ca	Cb	Bb
T. 'Cleópatra' + L. azeda	2,37	3,27	3,92	4,07	5,25	5,68	6,34	Bc	Bc	Ac
L. 'Cravo' + T. 'Sunki'	5,12	8,37	10,20	10,72	13,92	17,22	19,58	Fa	Ea	Ca
L. 'Ruby Blood' + L. 'Volkameriano'	4,22	6,60	7,15	7,30	9,05	12,93	14,09	Da	Cb	Bb
L. 'Rohde Red' + L. 'Volkameriano'	5,45	6,50	9,28	10,08	14,15	17,98	19,87	Ea	Eb	Ca
L. 'Valência' + <i>Fortunella obovata</i>	4,70	5,77	7,34	7,50	8,93	11,31	12,41	Ea	Eb	Cb
cv (%) Parcela (híbridos)					9,61					
cv (%) Subparcela (tempo)					13,32					

* Médias seguidas da mesma letra em maiúsculo na linha e em minúsculo na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 9. Diâmetro médio da brotação (cm) de híbridos somáticos de citros após o transplântio. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

Híbridos Somáticos	Dias após o transplântio*													
	30		60		90		120		150		180		210	
L. 'Cravo' + L. azeda	0,10	Cc	0,16	Bd	0,19	Bc	0,21	Bf	0,21	Be	0,24	Ae	0,24	Ae
L. 'Caipira' + L. 'Cravo'	0,16	Db	0,20	Dc	0,24	Cb	0,31	Bc	0,34	Ac	0,40	Ad	0,42	Ac
L. 'Caipira' + T. 'Cleópatra'	0,22	Da	0,22	Db	0,26	Cb	0,29	Cd	0,36	Bc	0,39	Bd	0,46	Ab
L. 'Caipira' + L. 'Volkameriano'	0,21	Ea	0,25	Da	0,34	Da	0,39	Ca	0,47	Ba	0,50	Bb	0,64	Aa
L. 'Caipira' + L. 'Rugoso'	0,19	Ea	0,21	Eb	0,25	Db	0,34	Cb	0,37	Bc	0,46	Ac	0,48	Ab
T. 'Cleópatra' + L. 'Volkameriano'	0,20	Ea	0,24	Ea	0,31	Da	0,36	Ca	0,41	Bd	0,44	Bc	0,48	Ab
T. 'Cleópatra' + L. azeda	0,10	Dc	0,13	Ce	0,21	Bc	0,24	Be	0,25	Be	0,26	Be	0,29	Ad
L. 'Cravo' + T. 'Sunki'	0,20	Da	0,22	Db	0,31	Ca	0,33	Bb	0,37	Bc	0,44	Ac	0,47	Ab
L. 'Ruby Blood' + L. 'Volkameriano'	0,16	Bb	0,19	Bc	0,22	Bc	0,25	Ae	0,25	Ae	0,26	Ae	0,29	Ad
L. 'Rohde Red' + L. 'Volkameriano'	0,23	Ea	0,24	Ea	0,32	Da	0,37	Da	0,42	Cb	0,56	Ba	0,60	Aa
L. 'Valência' + <i>Fortunella obovata</i>	0,20	Bb	0,24	Ba	0,25	Bb	0,28	Ad	0,29	Ad	0,31	Ae	0,31	Ad
cv (%) Parcela (híbridos)							11,74							
cv (%) Subparcela (tempo)							11,41							

* Médias seguidas da mesma letra em maiúsculo na linha e em minúsculo na coluna, não diferem significamente entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 1% de probabilidade.

No referente às três últimas variáveis em conjunto (comprimento médio das brotações, número médio de folhas e diâmetro médio da brotação), constatou-se que os híbridos laranja ‘Caipira’ + limão ‘Volkameriano’ e laranja ‘Rohde Red’ + limão ‘Volkameriano’ foram os que apresentaram destaque, entre os demais híbridos em estudo.

Houve correlação positiva entre as variáveis porcentagem de estacas brotadas e porcentagem de estacas vivas, comprimento médio da brotação e número médio de folhas, comprimento médio da brotação e diâmetro médio da brotação, 210 dias após o transplântio (Tabela 10). Assim, pode-se confirmar a superioridade dos híbridos laranja ‘Caipira’ + limão ‘Volkameriano’ e laranja ‘Rohde Red’ + limão ‘Volkameriano’ em relação aos demais, por este apresentarem destaque na última avaliação do comprimento médio da brotação, uma vez que essa variável correlaciona-se com o número médio de folhas, que por sua vez correlaciona-se com o diâmetro médio da brotação.

Uma visão geral das mudas referentes aos híbridos somáticos no final das avaliações contínuas pode ser observada na Figura abaixo, podendo assim verificar com maior detalhe o vigor das mudas (Figura 5).

Tabela 10. Coeficiente de correlação parcial linear (r) entre as variáveis observadas referentes ao aspecto propagativo dos híbridos somáticos de citros, ajustados para os tratamentos. Porcentagem de estacas vivas (PEV), porcentagem de estacas brotadas (PEB), número médio de folhas (NF), comprimento médio das brotações (CMB) e diâmetro médio da brotação (DB), 210 dias após transplântio. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

	PEV	PEB	NF	CMB	DB
PEV	-				
PEB	0,93*	-			
NF	0,17	0,26	-		
CMB	-0,01	0,02	0,70*	-	
DB	0,03	-0,01	0,05	0,34*	-

* Correlação significativa ao nível de 5% de probabilidade.



Figura 5 - Detalhe dos híbridos somáticos L. 'Caipira' + T. 'Cleópatra' (A), T. 'Cleópatra' + L. azeda (B), L. 'Ruby Blood' + L. 'Volkameriano' (C), L. 'Valência' + *Fortunella obovata* (D), L. 'Caipira' + L. 'Volkameriano' (E), L. 'Rohde Red' + L. 'Volkameriano' (F), L. 'Cravo' + L. azeda (G), L. 'Cravo' + T. 'Sunki' (H), T. 'Cleópatra' + L. 'Volkameriano' (I), L. 'Caipira' + L. 'Cravo' (J) e L. 'Caipira' + L. 'Rugoso' (K) após 210 dias do transplântio. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

O término da segunda Fase do experimento (crescimento das mudas), foi estabelecido quando um dos híbridos somáticos atingisse, pelo menos, 50% de suas mudas aptas à realização da enxertia. Assim, apenas dois híbridos somáticos atingiram esse ponto, laranja 'Caipira' + limão 'Volkameriano' e laranja 'Rohde Red' + limão 'Volkameriano', perfazendo a média de 52,5% e 50% de plantas aptas à realização da

enxertia, respectivamente. Posteriormente, enquadrou-se o híbrido laranja 'Caipira' + tangerina 'Cleópatra' e, posteriormente, os híbridos laranja 'Caipira' + limão 'Rugoso' e limão 'Cravo' + tangerina 'Sunki'. Já os demais híbridos somáticos, quase não atingiram alguma planta a ponto de realizar-se a enxertia de cultivares copa (Tabela 11). Vale ressaltar que, apesar de alguns híbridos não terem apresentado diâmetro suficiente para a realização da enxertia, não significa que estes não possuem características positivas em relação à performance no viveiro. Demais características, além dessas estudadas, devem ser consideradas, como por exemplo, o pegamento da enxertia, o desenvolvimento da cultivar copa e a compatibilidade.

Em relação à massa seca média da brotação, constatou-se que os híbridos laranja 'Caipira' + tangerina 'Cleópatra', laranja 'Caipira' + limão 'Volkameriano', laranja 'Caipira' + limão 'Rugoso', tangerina 'Cleópatra' + limão 'Volkameriano' e laranja 'Rohde Red' + limão 'Volkameriano' apresentaram maiores massas, em relação aos demais. No entanto, os híbridos laranja 'Caipira' + limão 'Cravo' e limão 'Cravo' + tangerina 'Sunki' se enquadraram seqüencialmente. Em relação à massa seca do sistema radicular, esses híbridos citados anteriormente, que tiveram destaque, entre os demais, para a massa seca da brotação, também apresentaram maiores massas de raízes. Em contrapartida, os demais híbridos (limão 'Cravo' + laranja azeda, tangerina 'Cleópatra' + laranja azeda, laranja 'Ruby Blood' + limão 'Volkameriano' e laranja 'Valência' + *Fortunella obovata*), apresentaram menores valores médios de massa seca da brotação e raiz (Tabela 11).

Para confirmar essa relação entre massa seca média da brotação e massa seca média da raiz, foi realizada análise de correlação para essas duas variáveis e constatou correlação positiva de 0,84, ou seja, quanto maior o valor de massa seca média da brotação, maior o valor de massa seca média da raiz. Assim, verifica-se que ambas variáveis possuem relação uma com a outra.

Tabela 11. Porcentagem de plantas aptas à enxertia (PPAE), massa seca média da brotação (MSB, g) e massa seca média da raiz (MSR, g) de híbridos somáticos de citros 210 dias após o transplante. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

Híbridos Somáticos	Variáveis analisadas*		
	PPAE	MSB	MSR
L. 'Cravo' + L. azeda	0 d	0,60 c	0,34 b
L. 'Caipira' + L. 'Cravo'	0 d	3,69 b	1,53 a
L. 'Caipira' + T. 'Cleópatra'	30,0 b	4,98 a	1,87 a
L. 'Caipira' + L. 'Volkameriano'	52,5 a	5,86 a	2,12 a
L. 'Caipira' + L. 'Rugoso'	25,0 c	5,30 a	1,90 a
T. 'Cleópatra' + L. 'Volkameriano'	33,8 b	5,54 a	1,90 a
T. 'Cleópatra' + L. azeda	0 d	1,26 c	0,67 b
L. 'Cravo' + T. 'Sunki'	22,5 c	3,91 b	1,74 a
L. 'Ruby Blood' + L. 'Volkameriano'	2,5 d	2,27 c	1,11 b
L. 'Rohde Red' + L. 'Volkameriano'	50,0 a	5,85 a	2,43 a
L. 'Valência' + <i>Fortunella obovata</i>	0 d	2,05 c	0,70 b
cv (%)	26,27	22,77	20,87

* Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem significamente entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 1% de probabilidade.

Em relação à análise foliar realizada ao final do ensaio, objetivou constatar possíveis discrepâncias das concentrações de macros e micronutrientes nos híbridos somáticos em estudo, que pudessem a vir ter desfavorecido algum híbrido em relação as variáveis analisadas, uma vez que a adubação realizada foi padrão para todas as plantas.

Vale ressaltar que até o momento não existem padrões nutricionais para mudas de citros, muito menos para porta-enxertos e híbrido somáticos. No entanto, alguns híbridos tiveram concentrações dos elementos analisados menores em relação aos demais. O híbrido limão 'Cravo' + laranja azeda apresentou menores valores de concentração para os micronutrientes cobre, manganês e zinco; o híbrido tangerina 'Cleópatra' + laranja azeda apresentou menores valores para os macronutrientes magnésio e enxofre e para os micronutrientes ferro e zinco; já o híbrido laranja 'Ruby Blood' + limão 'Volkameriano' apresentou apenas menor valor para o micronutriente

ferro e o híbrido laranja 'Valência' + *Fortunella obovata* apresentou menor valor para o macronutriente potássio e para o micronutriente zinco (Tabela 12).

Coincidentemente, esses híbridos foram os que apresentaram, no geral, inferioridade das características analisadas nesse ensaio, principalmente em relação as massa secas médias da brotação e da raiz.

As perdas de nutrientes nos contêineres das mudas estão muito associados ao manejo da irrigação e de nutrientes que podem ser aplicados através de fertilizantes sólidos solúveis e de liberação lenta (Boaventura et al., 2004). Por outro lado, experimentos recentes conduzidos em viveiros de mudas cítricas no Estado de São Paulo mostram que o manejo da água para otimizar a qualidade da muda cítrica deve ser feito para repor 125% da água necessária para saturar o recipiente, mostrando que é interessante que ocorra lixiviação para reduzir o excesso de sais presentes (Olic et al., 2001).

As pesquisas até agora conduzidas são ainda limitadas, havendo pouca informação disponível sobre demandas por nutrientes para as mudas e informações científicas para o diagnóstico de desordens nutricionais e interpretação de resultados de análise química de substratos, capazes de orientar o melhor manejo nutricional, melhor aproveitamento dos nutrientes aplicados e qualidade das mudas cítricas (Boaventura et al., 2004).

Tabela 12. Concentrações de macro e micronutrientes em folhas de híbridos somáticos de citros. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

Híbridos Somáticos	N	P	g.Kg ⁻¹				mg.Kg ⁻¹				
			K	Ca	Mg	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
L. 'Cravo' + L. azeda	37,8	2,5	19,6	21,9	2,9	2,7	39,8	151,1	108,9	47,8	31,5
L. 'Caipira' + L. 'Cravo'	29,8	3,0	17,3	22,3	2,9	2,0	23,1	176,4	110,1	62,1	42,0
L. 'Caipira' + T. 'Cleópatra'	27,9	2,8	19,1	14,0	3,0	2,3	28,9	168,1	92,0	64,7	32,9
L. 'Caipira' + L. 'Volkameriano'	32,8	3,2	21,4	24,6	4,1	2,8	41,0	235,4	148,0	61,4	38,0
L. 'Caipira' + L. 'Rugoso'	25,9	2,8	15,6	22,3	3,2	2,4	32,3	169,2	118,1	51,9	35,5
T. 'Cleópatra' + L. 'Volkameriano'	26,0	3,2	23,5	22,2	3,4	3,2	45,8	214,9	90,6	65,6	41,5
T. 'Cleópatra' + L. azeda	23,8	2,1	17,3	18,0	2,3	1,8	26,1	179,3	53,2	41,9	24,6
L. 'Cravo' + T. 'Sunki'	25,9	2,7	17,8	20,9	3,6	2,4	32,7	190,2	94,7	51,8	33,2
L. 'Ruby Blood' + L. 'Volkameriano'	24,2	2,1	17,3	15,4	3,0	2,4	45,4	158,6	61,1	51,2	32,7
L. 'Rohde Red' + L. 'Volkameriano'	26,2	2,8	22,2	21,9	3,0	2,5	33,4	267,8	110,0	76,9	41,5
L. 'Valência' + <i>Fortunella obovata</i>	25,3	2,1	10,5	20,9	3,8	2,4	25,1	217,0	123,0	68,0	29,5

4.2 Reação dos híbridos somáticos à infecção por *Phytophthora nicotianae*

O isolado LRS 95/03 proporcionou maiores valores dos comprimentos e larguras das lesões, além da presença de goma nas duas lesões, comportando-se como o mais agressivo, por expressar mais severidade nas plantas de limão ‘Siciliano’, em comparação aos outros isolados (Tabela 13). Assim, nos experimentos de *Phytophthora nicotianae* utilizou-se este isolado.

Tabela 13. Comprimento e largura de lesões sob a casca (mm) e presença de goma ocasionada por inoculações de diferentes isolados de *Phytophthora nicotianae* em caules de limão ‘Siciliano’. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

Isolado	Comprimento da lesão (mm)*	Largura da lesão (mm)	Presença de goma
1. LRS 93/03	27,0	7,0	Sim
	08,0	4,0	Não
2. LRS 95/03	28,0	15,0	Sim
	39,0	11,0	Sim
3. LRS 87/03	10,0	5,0	Sim
	7,0	4,0	Sim
4. LRS 90/03	20,0	12,0	Não
	7,0	3,0	Não
5. LRS 94/03	20,0	7,0	Sim
	5,0	5,0	Não
6. LRS 104/03	21,0	7,0	Sim
	3,0	3,0	Não
7. LRS 99/03	10,0	3,0	Não
	33,0	7,0	Sim
8. LRS 98/03	17,0	7,0	Sim
	3,0	3,0	Não
9. LRS 96/03	12,0	5,0	Sim
	5,0	3,0	Não
10. LRS 97/03	3,0	4,0	Não
	5,0	3,0	Não

* Primeira medida de cada isolado corresponde à inoculação em 10 cm de altura e a segunda em 20 cm.

4.2.1 Experimento 2: Reação dos híbridos somáticos à infecção de tronco por *Phytophthora nicotianae*

No que se refere aos parâmetros relacionados às quantificações das lesões ocasionadas pelas inoculações no caule dos híbridos somáticos e porta-enxertos, verificou-se para as plantas-controle, que receberam inoculações utilizando-se meio CA ausente de *Phytophthora nicotianae*, formação uma cicatriz no local da incisão, que na verdade se caracteriza pela hiperplasia de células da planta em torno da lesão, na tentativa de regenerar o tecido afetado ou ferido (Salgado & Amorim, 1995).

Quanto à quantificação das lesões para as plantas que receberam micélios do *P. nicotianae* nas incisões no caule, verificou-se que não houve diferença entre os genótipos em estudo, na comparação dos resultados da largura das lesões sobre e sob a casca da planta, a exceção para os híbridos somáticos tangerina ‘Cleópatra’ + limão ‘Volkameriano’, laranja ‘Ruby Blood’ + limão ‘Volkameriano’, laranja ‘Rohde Red’ + limão ‘Volkameriano’ e laranja ‘Caipira’ + limão ‘Volkameriano’. Estes híbridos não diferiram em relação a largura sobre a casca do porta-enxerto limão ‘Volkameriano’, considerado moderadamente susceptível a podridão do tronco. Entretanto, ficaram iguais a laranja ‘Caipira’, em relação a largura da lesão sob a casca, porta-enxerto este considerado susceptível (Feichtenberger, 2001) (Tabela 14).

Resultado discordante, em relação à literatura, foi a não diferença estatística dos porta-enxertos tangerina ‘Cleópatra’ e limão ‘Cravo’ (moderadamente susceptíveis) a laranja azeda, considerada resistente, para a largura da lesão, tanto sobre como sob a casca (Pompeu Júnior, 1991; Carlos et al., 1997; Feichtenberger, 2001) (Tabela 14).

Rossetti (1947) recomenda avaliar as lesões ocasionadas por *Phytophthora* spp. em trabalho experimentais sob a casca (na superfície do lenho, diretamente sobre a zona cambial), uma vez que o patógeno desenvolve-se sob o lenho da planta. Nas avaliações de resistência as infecções de tronco, as lesões devem ser medidas através da remoção da casca na área de inoculação (Feichtenberger, 2001).

Tabela 14. Largura (L) média de lesões sobre e sob a casca (mm) e porcentagem de goma ocasionadas por inoculações de *Phytophthora nicotianae* em caules de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

Genótipos	Variáveis analisadas*		
	L sobre a casca (mm)	L sob a casca (mm)	Porcentagem de goma
<i>Poncirus trifoliata</i>	2,25 a	1,98 a	0 a
L. azeda	2,60 b	2,60 b	12,5 b
T. 'Cleópatra' + L. azeda	3,51 d	3,36 d	20,8 b
T. 'Cleópatra'	2,80 b	2,67 b	45,8 c
L. 'Cravo'	2,87 b	2,75 b	54,1 d
T. 'Sunki'	3,44 c	3,16 c	50,0 d
L. 'Volkameriano'	3,38 c	3,27 c	41,6 c
L. 'Cravo' + T. 'Sunki'	3,66 d	3,44 d	45,8 c
T. 'Cleópatra' + L. 'Volkameriano'	3,15 c	3,50 d	41,6 c
L. 'Ruby Blood' + L. 'Volkameriano'	3,37 c	3,42 d	37,5 c
L. 'Rohde Red' + L. 'Volkameriano'	3,33 c	3,66 d	54,1 d
L. 'Caipira' + L. 'Volkameriano'	3,47 c	3,93 d	50,0 d
L. 'Caipira' + T. 'Cleópatra'	3,65 d	3,41 d	66,6 e
L. 'Caipira' + L. 'Cravo'	3,71 d	3,59 d	75,0 e
L. 'Caipira'	3,70 d	3,40 d	70,8 e
L. 'Caipira' + L. 'Rugoso'	3,20 c	3,02 c	83,3 e
L. 'Valência' + <i>Fortunella obovata</i>	3,33 c	3,13 c	70,8 e
L. 'Siciliano'	3,75 d	3,59 d	100,0 f
cv (%)	7,50	7,86	19,67

* Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem significamente entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Siviero (2001), estudando métodos de avaliação de lesões em inoculações de *P. nicotianae*, detectou que a área obtida relacionou-se positivamente com o comprimento da lesão no lenho, apresentando coeficientes de correlação de 0,90, sendo ainda observado que não houve correlação entre as medidas de comprimento e área da lesão com relação a largura da lesão. Araújo (1998) verificou correlação positiva entre o comprimento da lesão e a área de 0,98. No entanto, em trabalhos com podridão do colo em plantas jovens em inoculações em ambientes protegidos, é comum a utilização do comprimento das lesões para avaliar e quantificar a doença (Klotz et al., 1958; Afek & Sztajnberg, 1990; Matheron et al., 1998). O comprimento das lesões de *Phytophthora*

spp. é a medida representativa do desenvolvimento do patógeno em tronco de citros, uma vez que o crescimento da lesão está diretamente relacionada com o fluxo de seiva nos tecidos do xilema e floema (Rossetti & Bitancourt, 1951). Desta forma, as medidas das larguras das lesões não são apropriadas na classificação de resistência de porta-enxertos e novos genótipos em relação a *Phytophthora* spp.

A avaliação das lesões resultantes de inoculações de *Phytophthora* spp. deve ser feita medindo-se a área das lesões com o auxílio de planímetro (Klotz & Fawcett, 1930) ou pela medição do comprimento das lesões e quantificação da goma (Fawcett, 1923). A simples multiplicação da medida do comprimento pela largura, visando estimar a área de lesão provocada por *Phytophthora* spp., gera erros superestimando a área real entre 25 e 50% (Klotz & Fawcett, 1930).

Não foi observada presença de goma nas plantas de *Poncirus trifoliata* inoculadas com *P. nicotianae*. Por outro lado, constatou-se 100% de goma nas plantas de limão ‘Siciliano’. O *Poncirus trifoliata* é considerado como altamente resistente, as laranjas doces e limões verdadeiros são classificadas como altamente susceptíveis (Timmer & Menge, 1989). Para o porta-enxerto laranja ‘Caipira’, constatou-se 70,83% de plantas com goma, sendo que este não diferiu dos híbridos laranja ‘Caipira’ + tangerina ‘Cleópatra’, laranja ‘Caipira’ + limão ‘Cravo’, laranja ‘Caipira’ + limão ‘Rugoso’ e laranja ‘Valência’ + *Fortunella obovata*. Coincidentemente, todos estes apresentam uma laranja doce como parental. Por outro lado, os híbridos laranja ‘Caipira’ + limão ‘Volkameriano’, laranja ‘Rohde Red’ + limão ‘Volkameriano’ e laranja ‘Ruby Blood’ + limão ‘Volkameriano’, que também apresentam uma laranja doce como parental, apresentaram resultados superiores, em relação aos outros híbridos que foram citados anteriormente, apresentando-se resultados mais próximos ao outro parental envolvido, o limão ‘Volkameriano’ (Tabela 14).

A hibridação somática é um processo em que não existe segregação meiótica, resultando na expressão aditiva das características dominantes nos híbridos (Grosser & Gmitter Junior, 1990a; Ohgawara & Kobayashi, 1991). Assim, genes deletérios recessivos em parentais sob uma condição heterozigota, provavelmente permanecerão não expressos nos híbridos somáticos e características controladas por genes dominantes

ou co-dominantes em um dos parentais, terão grande probabilidade de se expressar no híbrido somático (Grosser & Gmitter Junior, 1990a).

Pode-se confirmar essa afirmação observando-se os resultados do híbrido tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda, que não diferiu para a presença de goma da laranja azeda, diferindo-se, porém da tangerina ‘Cleópatra’. Outro exemplo observado é o híbrido limão ‘Cravo’ + tangerina ‘Sunki’, que apresentou resultados superiores a ambos os parentais (Tabela 14).

Vale ressaltar que os primeiros sintomas da podridão do colo se manifestam com a morte e escurecimento de pequenas zonas da casca com exsudação de goma no tronco e colo dos porta-enxertos susceptíveis (Rossetti, 1947; Feichtenberger, 1990a; 1996).

Coincidentemente ao ocorrido para a largura das lesões (Tabela 14), verificou-se que não houve diferença para o comprimento da lesão sobre casca da planta para os híbridos somáticos tangerina ‘Cleópatra’ + limão ‘Volkameriano’, laranja ‘Ruby Blood’ + limão ‘Volkameriano’, laranja ‘Rohde Red’ + limão ‘Volkameriano’ e laranja ‘Caipira’ + limão ‘Volkameriano’, em relação a tangerina ‘Cleópatra’, considerada moderadamente susceptível a podridão do tronco. Porém, estes híbridos e a tangerina em questão, se comportaram igualmente ao limão ‘Volkameriano’, em relação ao comprimento da lesão sob a casca, porta-enxerto também considerado moderadamente susceptível (Feichtenberger, 2001), mas que estava em um grupo separado em relação a medida dessa variável sobre a casca. Outro relato de diferença em relação às medidas do comprimento da lesão sobre e sob a casca, é o caso do híbrido somático tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda, que ficou em posição intermediária entre seus parentais na quantificação do comprimento sobre a casca, mas não diferiu da laranja azeda dessa variável sob a casca (Tabela 15).

Para a área da lesão, os resultados obtidos entre os híbridos somáticos e os porta-enxertos, tanto sobre como sob a casca foram idênticos, a exceção da laranja azeda, que não diferiu do *Poncirus trifoliata* sobre a casca, diferindo-se, porém desse sob a casca. Assim sendo, os resultados para a área da lesão ficam mais próximos ao da literatura, que considera o *Poncirus trifoliata* como altamente resistente e a azeda como resistente (Feichtenberger, 2001).

Tabela 15. Comprimento (C) e área (A) média de lesões (mm) sobre e sob a casca ocasionadas por inoculações de *Phytophthora nicotianae* em caules de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

Genótipos	Variáveis analisadas*			
	C (mm)		A (mm)	
	Sobre a casca	Sob a casca	Sobre a casca	Sob a casca
<i>Poncirus trifoliata</i>	2,89 a	3,47 a	11,53 a	10,01 a
L. azeda	3,83 b	6,86 b	11,08 a	21,40 b
T. 'Cleópatra' + L. azeda	5,40 c	7,46 b	16,08 b	21,80 b
T. 'Cleópatra'	6,22 d	9,62 c	23,67 c	32,83 c
L. 'Cravo'	5,71 c	9,45 c	20,52 c	30,76 c
T. 'Sunki'	5,76 c	10,11 c	23,05 c	33,52 c
L. 'Volkameriano'	5,34 c	11,11 c	21,79 c	32,59 c
L. 'Cravo' + T. 'Sunki'	5,91 c	9,12 c	22,14 c	32,01 c
T. 'Cleópatra' + L. 'Volkameriano'	6,67 d	9,58 c	21,10 c	32,49 c
L. 'Ruby Blood' + L. 'Volkameriano'	6,15 d	9,23 c	20,04 c	30,66 c
L. 'Rohde Red' + L. 'Volkameriano'	6,79 d	10,63 c	21,89 c	31,69 c
L. 'Caipira' + L. 'Volkameriano'	6,66 d	11,11 c	21,65 c	33,93 c
L. 'Caipira' + T. 'Cleópatra'	7,85 e	12,48 d	26,57 d	38,53 d
L. 'Caipira' + L. 'Cravo'	7,63 e	12,29 d	24,97 d	38,51 d
L. 'Caipira'	7,74 e	12,94 d	27,33 d	41,20 d
L. 'Caipira' + L. 'Rugoso'	10,84 g	17,08 f	33,32 f	49,77 f
L. 'Valência' + <i>Fortunella obovata</i>	9,01 f	14,94 e	29,86 e	46,05 e
L. 'Siciliano'	10,98 g	45,66 g	43,74 g	151,11 g
cv (%)	9,92	12,39	12,46	7,84

* Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem significamente entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Coincidentemente, verificou-se que o resultado entre as áreas e os comprimentos da lesão sob a casca, entre os híbridos somáticos e os porta-enxertos em estudo, foram idênticos (Tabela 15). Assim, pode-se reforçar que a medida do comprimento da lesão sob a casca é a forma mais adequada em quantificar a podridão do colo ocasionada por *Phytophthora nicotianae*.

Em relação ao comportamento dos híbridos somáticos e porta-enxertos em estudo, ficou evidenciado que o *Poncirus trifoliata* apresentou os melhores resultados

(altamente resistente); em um segundo grupo, agruparam-se laranja azeda e tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda (resistentes); posteriormente, os porta-enxertos tangerina ‘Cleópatra’, limão ‘Cravo’, tangerina ‘Sunki’ e limão ‘Volkameriano’, os híbridos limão ‘Cravo’ + tangerina ‘Sunki’, tangerina ‘Cleópatra’ + limão ‘Volkameriano’, laranja ‘Ruby Blood’ + limão ‘Volkameriano’, laranja ‘Rohde Red’ + limão ‘Volkameriano’ e laranja ‘Caipira’ + limão ‘Volkameriano’ (moderadamente susceptíveis); em seguida, a laranja ‘Caipira’ e os híbridos laranja ‘Caipira’ + tangerina ‘Cleópatra’, laranja ‘Caipira’ + limão ‘Cravo’, laranja ‘Caipira’ + limão ‘Rugoso’ e laranja ‘Valência’ + *Fortunella obovata* (susceptíveis) e, finalmente, o limão ‘Siciliano’ (altamente susceptível) (Tabela 15). Para confirmar a classificação proposta, verifica-se que o aumento das lesões (comprimento e área), em relação ao *Poncirus trifoliata* ficou entre 1,98 e 2,18 para os genótipos resistentes (aumento de aproximadamente duas vezes); 2,63 e 3,39 para os genótipos moderadamente susceptíveis (aumento de aproximadamente três vezes); 3,6 e 4,97 para os genótipos susceptíveis (aumento de aproximadamente quatro vezes) e cerca de 14 vezes para o limão ‘Siciliano’ (altamente susceptível) (Tabela 16). Essa classificação está mais bem ilustrada na Figura 6.

Os resultados obtidos em relação aos porta-enxertos de padrões conhecidos, concordam com os encontrados em outros trabalhos, em que o *Poncirus trifoliata* ‘Davis A’ foi classificado como altamente resistente, o limão ‘Cravo’ como moderadamente susceptível e o limão ‘Siciliano’ como altamente susceptíveis a *P. nicotianae*, classificados através de inoculação em plantas de citros pelo método da agulha (Siviero et al., 2002b). Os resultados da reação de resistência/suscetibilidade dos porta-enxertos em campo citados na literatura (Feichtenberger, 1990a; 1996; 2001), estão em concordância com as reações encontradas nas inoculações desse trabalho.

Tabela 16. Aumento, em vezes, do comprimento (C) e área (A) das lesões sob a casca ocasionadas por inoculações de *Phytophthora nicotianae* em caules de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros em relação à testemunha resistente (*Poncirus trifoliata*). USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

Genótipos	Variáveis analisadas	
	C	A
<i>Poncirus trifoliata</i>	0	0
L. azeda	1,98	2,14
T. 'Cleópatra' + L. azeda	2,15	2,18
T. 'Cleópatra'	2,77	3,28
L. 'Cravo'	2,72	3,07
T. 'Sunki'	2,91	3,35
L. 'Volkameriano'	3,20	3,26
L. 'Cravo' + T. 'Sunki'	2,63	3,20
T. 'Cleópatra' + L. 'Volkameriano'	2,76	3,24
L. 'Ruby Blood' + L. 'Volkameriano'	2,66	3,06
L. 'Rohde Red' + L. 'Volkameriano'	3,06	3,17
L. 'Caipira' + L. 'Volkameriano'	3,20	3,39
L. 'Caipira' + T. 'Cleópatra'	3,60	3,85
L. 'Caipira' + L. 'Cravo'	3,54	3,85
L. 'Caipira'	3,73	4,12
L. 'Caipira' + L. 'Rugoso'	4,92	4,97
L. 'Valência' + <i>Fortunella obovata</i>	4,31	4,60
L. 'Siciliano'	13,16	15,10

Altamente resistente <i>Poncirus trifoliata</i>
Resistente L. azeda T. ‘Cleópatra’ + L. azeda
Moderadamente susceptível T. ‘Cleópatra’ L. ‘Cravo’ T. ‘Sunki’ L. ‘Volkameriano’ L. ‘Cravo’ + T. ‘Sunki’ T. ‘Cleópatra’ + L. ‘Volkameriano’ L. ‘Ruby Blood’ + L. ‘Volkameriano’ L. ‘Rohde Red’ + L. ‘Volkameriano’ L. ‘Caipira’ + L. ‘Volkameriano’
Susceptível L. ‘Caipira’ + T. ‘Cleópatra’ L. ‘Caipira’ + L. ‘Cravo’ L. ‘Caipira’ L. ‘Caipira’ + L. ‘Rugoso’ L. ‘Valência’ + <i>Fortunella obovata</i>
Altamente susceptível L. ‘Siciliano’

Figura 6 - Classificação de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros quanto à resistência e susceptibilidade a podridão do tronco ocasionado por *Phytophthora nicotianae*. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

Com relação aos híbridos somáticos, foi constatado que o híbrido tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda comportou-se como resistente, igualmente ao seu parental laranja azeda e diferentemente da tangerina ‘Cleópatra’, porta-enxerto considerado moderadamente susceptível. Igualmente ocorreu para os híbridos laranja ‘Ruby Blood’ + limão ‘Volkameriano’, laranja ‘Rohde Red’ + limão ‘Volkameriano’ e laranja ‘Caipira’ + limão ‘Volkameriano’, que apresentaram comportamento semelhante ao parental moderadamente susceptível, o limão ‘Volkameriano’, uma vez que o outro parental, a laranja doce, apresenta susceptibilidade a podridão do tronco. Por outro lado, laranja ‘Caipira’ + tangerina ‘Cleópatra’ e laranja ‘Caipira’ + limão ‘Cravo’, comportaram-se

como susceptíveis, igualmente ao parental laranja 'Caipira', uma vez que o outro parental desses híbridos é moderadamente susceptível.

A laranja doce tem despertado grande interesse como porta-enxertos, por induzir altas produções e boa qualidade de frutos, mas seu uso é muito limitado devido a sua alta suscetibilidade a *Phytophthora* spp. (Carpenter & Furr, 1962; Graham, 1990; 1995; Matheron et al., 1998). Sendo assim, expectativas são esperadas pelos híbridos somáticos laranja 'Ruby Blood' + limão 'Volkameriano', laranja 'Rohde Red' + limão 'Volkameriano' e laranja 'Caipira' + limão 'Volkameriano', que possam a vir propiciar bons resultados em campo.

Já os híbridos limão 'Cravo' + tangerina 'Sunki' e tangerina 'Cleópatra' + limão 'Volkameriano', laranja 'Caipira' + limão 'Rugoso' e laranja 'Valência' + *Fortunella obovata*, apresentaram resultados semelhantes ao de seus parentais.

Medina Filho et al. (2003), estudando o comportamento de diversos genótipos em relação à inoculação de *Phytophthora* spp. pelo método do disco, em plantas adultas de citros situadas no campo, verificaram que a área da lesão sob a casca do híbrido limão 'Cravo' x tangerina 'Sunki' não diferiu de ambos os progenitores.

A resistência genética é um dos métodos de controle que menos oneram o produtor, além de ser à base da exploração das principais plantas cultivadas. Assim, o uso de porta-enxertos resistentes constitui-se na medida mais importante de controle das podridões do colo provocada por *Phytophthora* spp. em citros (Feichtenberger et al., 1997).

Na escolha de um porta-enxerto, recomenda-se que pelo menos apresente moderada susceptibilidade a *Phytophthora* spp. (Feichtenberger, 1990a; 1996). Sendo assim, os híbridos somáticos tangerina 'Cleópatra' + laranja azeda, limão 'Cravo' + tangerina 'Sunki', tangerina 'Cleópatra' + limão 'Volkameriano', laranja 'Ruby Blood' + limão 'Volkameriano', laranja 'Rohde Red' + limão 'Volkameriano' e laranja 'Caipira' + limão 'Volkameriano' são promissores.

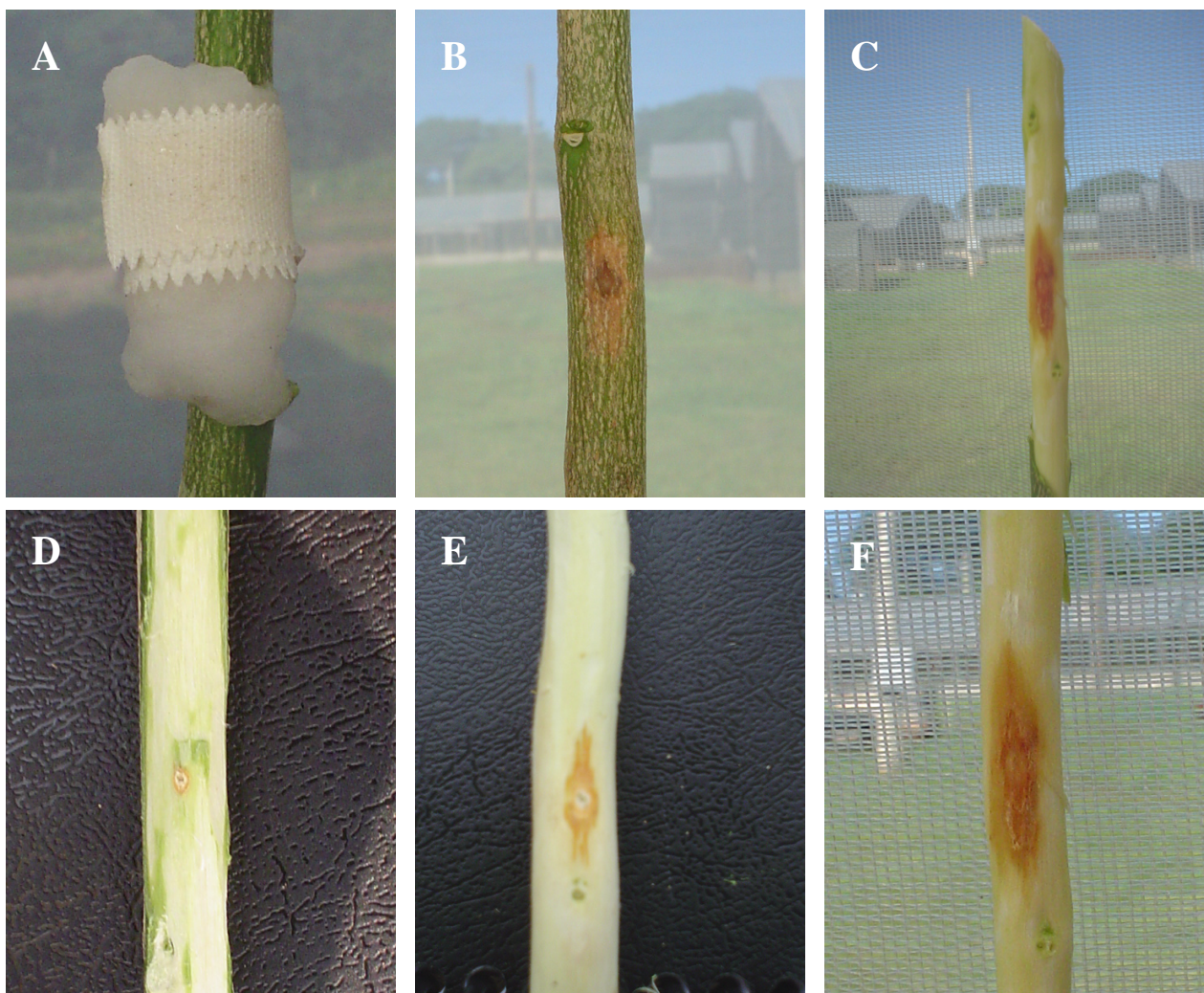


Figura 7 - Algodão umedecido para favorecer o desenvolvimento de *Phytophthora nicotianae* (A); Detalhe da lesão sob a casca (B) e sob o lenho (C); Comparação de porta-enxerto resistente (D), mediantemente susceptível (E) e altamente susceptível (F) a podridão do tronco ocasionada por *Phytophthora nicotianae*. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

4.2.2 Experimento 3: Reação dos híbridos somáticos à infecção de raízes por *Phytophthora nicotianae*

Com relação a comparação entre as alturas coletadas quinzenalmente, entre plantas controle e plantas infestadas com *Phytophthora nicotianae*, ficou evidente que não houve diferença até o final do ensaio para os porta-enxertos *Poncirus trifoliata* e limão ‘Volkameriano’ e para os híbridos somáticos tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda, limão ‘Cravo’ + tangerina ‘Sunki’, laranja ‘Caipira’ + limão ‘Rugoso’, laranja ‘Caipira’ + limão ‘Cravo’, tangerina ‘Cleópatra’ + limão ‘Volkameriano’, laranja ‘Rohde Red’ + limão ‘Volkameriano’ e laranja ‘Ruby Blood’ + limão ‘Volkameriano’. Com relação aos três últimos híbridos citados, o bom desempenho pode estar relacionado a um de seus parentais, limão ‘Volkameriano’, que também apresentou bons resultados, uma vez que outros parentais envolvidos na hibridação, a tangerina ‘Cleópatra’ e a laranja doce, apresentaram diferenças de altura entre plantas controle e plantas infestadas já aos 15 dias após a infestação do substrato com *P. nicotianae*. Igualmente, pode ser relatado para o híbrido laranja ‘Caipira’ + limão ‘Rugoso’, que embora a laranja doce seja intolerante a podridão das radículas, o limão ‘Rugoso’ apresenta melhor desempenho que o limão ‘Volkameriano’ em relação à podridão das raízes (Castle et al., 1993). Outras plantas que apresentaram diferenças de forma mais precoce foi a tangerina ‘Sunki’, limão ‘Siciliano’ e o híbrido laranja ‘Valência’ + *Fortunella obovata*, que apresentaram diferenças de alturas aos 30 dias após a infestação. Já a laranja azeda, limão ‘Cravo’ e os híbridos laranja ‘Caipira’ + tangerina ‘Cleópatra’ e laranja ‘Caipira’ + limão ‘Volkameriano’ apresentaram diferenças nas alturas somente aos 60 dias após a infestação (Tabela 17).

Fato interessante foi o constatado para os híbridos tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda, limão ‘Cravo’ + tangerina ‘Sunki’ e laranja ‘Caipira’ + limão ‘Cravo’, por apresentarem melhores resultados que ambos os parentais envolvidos nas hibridações. Já a laranja ‘Caipira’ + limão ‘Volkameriano’ se comportou de forma intermediária em relação aos seus parentais.

Tabela 17. Altura média (cm) de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros cultivados em substrato com e sem *Phytophthora nicotianae*, comparando-se plantas controle (C) e infestadas (I), no momento da infestação e a cada 15 dias. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

Genótipos	Altura (cm)*									
	Início		15 dias		30 dias		45 dias		60 dias	
	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I
<i>Poncirus trifoliata</i>	44,75 A	44,85 A	50,05 A	49,00 A	53,35 A	52,50 A	55,72 A	54,90 A	57,60 A	55,90 A
L. azeda	48,57 A	48,22 A	52,60 A	51,05 A	55,87 A	52,55 A	57,27 A	53,47 A	59,70 A	53,72 B
L. 'Volkameriano'	76,92 A	76,82 A	85,42 A	81,72 A	88,52 A	85,75 A	89,25 A	87,35 A	92,30 A	89,40 A
L. 'Cravo'	57,87 A	58,00 A	64,92 A	61,95 A	71,27 A	64,92 B	74,12 A	69,70 A	78,10 A	71,62 B
T. 'Cleópatra'	53,40 A	53,62 A	66,75 A	61,17 B	73,05 A	66,67 B	77,20 A	72,27 B	78,95 A	73,42 B
T. 'Sunki'	44,45 A	45,67 A	56,60 A	52,90 A	61,62 A	55,70 B	65,60 A	59,02 B	71,02 A	61,02 B
L. 'Caipira'	39,12 A	38,32 A	43,60 A	39,57 B	48,80 A	41,92 B	51,72 A	42,90 B	54,17 A	43,65 B
L. 'Siciliano'	64,95 A	65,67 A	69,87 A	68,17 A	73,75 A	69,55 B	77,00 A	70,60 B	80,35 A	71,45 B
T. 'Cleópatra' + L. azeda	18,15 A	18,47 A	20,00 A	19,45 A	21,35 A	20,22 A	22,37 A	21,22 A	23,25 A	21,82 A
T. 'Cleópatra' + L. 'Volkameriano'	39,92 A	38,95 A	42,82 A	40,60 A	45,37 A	42,45 A	47,17 A	43,82 A	49,80 A	45,32 A
L. 'Cravo' + T. 'Sunki'	34,17 A	33,57 A	36,95 A	35,10 A	40,30 A	37,45 A	43,00 A	39,52 A	45,45 A	40,52 A
L. 'Caipira' + T. 'Cleópatra'	34,02 A	34,12 A	36,85 A	35,62 A	40,45 A	37,52 A	43,12 A	39,37 A	46,35 A	41,15 B
L. 'Caipira' + L. 'Rugoso'	30,62 A	31,32 A	33,37 A	32,72 A	36,87 A	35,17 A	40,47 A	37,75 A	43,40 A	40,07 A
L. 'Caipira' + L. 'Volkameriano'	50,65 A	50,57 A	56,00 A	54,75 A	60,55 A	58,32 A	64,55 A	61,62 A	68,47 A	63,22 B
L. 'Caipira' + L. 'Cravo'	36,35 A	36,27 A	38,35 A	37,55 A	41,47 A	39,05 A	43,32 A	40,12 A	45,12 A	41,05 A
L. 'Rohde Red' + L. 'Volkameriano'	36,35 A	37,22 A	40,60 A	39,30 A	44,22 A	42,00 A	46,82 A	44,55 A	49,72 A	46,62 A
L. 'Ruby Blood' + L. 'Volkameriano'	34,65 A	34,40 A	37,97 A	35,62 A	40,12 A	37,32 A	42,20 A	38,97 A	44,05 A	40,55 A
L. 'Valência' + <i>Fortunella obovata</i>	23,45 A	23,27 A	25,10 A	24,67 A	26,90 A	21,80 B	27,50 A	21,35 B	28,47 A	20,37 B
cv (%) Parcela (genótipos)		5,76		5,12		4,50		5,03		4,81
cv (%) Subparcela (infestação)		6,36		5,71		5,92		6,21		6,66

* Médias seguidas da mesma letra na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Ao final de 60 dias da infestação, não houve diferenças entre as plantas controle e infestadas para o diâmetro das plantas, para os porta-enxertos *Poncirus trifoliata* e limão 'Volkameriano' e para os híbridos somáticos tangerina 'Cleópatra' + laranja azeda, tangerina 'Cleópatra' + limão 'Volkameriano', limão 'Cravo' + tangerina 'Sunki', laranja 'Caipira' + limão 'Cravo' e laranja 'Ruby Blood' + limão 'Volkameriano', ambos que também não haviam apresentado diferença ao final do ensaio para a altura.

Para os híbridos laranja 'Caipira' + limão 'Rugoso' e laranja 'Rohde Red' + limão 'Volkameriano', que não apresentaram diferenças entre alturas das plantas controle e plantas infestadas, vieram a apresentar diferenças entre o diâmetro das plantas. Por outro lado, laranja azeda, tangerina 'Cleópatra' e laranja 'Caipira' + limão 'Volkameriano', que tiveram diferenças em relação a altura, não apresentaram diferenças entre o diâmetro. Os demais apresentaram diferenças em ambas variáveis (Tabela 18).

Araújo (1998), não verificou diferenças de alturas e diâmetros entre plantas controle e plantas infestadas com *Phytophthora nicotianae*, para os porta-enxertos laranja azeda, tangerina 'Sunki', limão 'Cravo' e tangerina 'Cleópatra'. Essa controvérsia de resultados pode estar associada ao fato que o desenvolvimento das infecções pode ser influenciado por outras variáveis como idade, vigor, estado nutricional, além da temperatura, o que poderia através de interações complexas, modificar a resposta dos diferentes porta-enxertos (Carvalho, 2000).

Vale ressaltar que não houve diferença entre as alturas e diâmetros entre plantas controle e plantas infestadas no início do experimento, ressaltando que as plantas dos 18 genótipos em estudo apresentavam certa homogeneidade antes de se iniciar o ensaio (Tabelas 17 e 18).

Tabela 18. Diâmetro médio (cm) de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros cultivados em substrato com e sem *Phytophthora nicotianae*, comparando-se plantas controle (C) e infestadas (I), no momento da infestação e ao final do ensaio. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

Genótipos	Diâmetro (cm)*			
	Início		60 dias	
	C	I	C	I
<i>Poncirus trifoliata</i>	0,32 A	0,33 A	0,43 A	0,44 A
L. azeda	0,41 A	0,41 A	0,55 A	0,53 A
L. 'Volkameriano'	0,68 A	0,66 A	0,85 A	0,83 A
L. 'Cravo'	0,45 A	0,46 A	0,65 A	0,60 B
T. 'Cleópatra'	0,36 A	0,39 A	0,51 A	0,50 A
T. 'Sunki'	0,38 A	0,38 A	0,57 A	0,50 B
L. 'Caipira'	0,46 A	0,46 A	0,68 A	0,61 B
L. 'Siciliano'	0,66 A	0,65 A	0,83 A	0,77 B
T. 'Cleópatra' + L. azeda	0,23 A	0,24 A	0,30 A	0,28 A
T. 'Cleópatra' + L. 'Volkameriano'	0,34 A	0,34 A	0,53 A	0,49 A
L. 'Cravo' + T. 'Sunki'	0,33 A	0,33 A	0,42 A	0,40 A
L. 'Caipira' + T. 'Cleópatra'	0,34 A	0,34 A	0,52 A	0,44 B
L. 'Caipira' + L. 'Rugoso'	0,31 A	0,31 A	0,58 A	0,52 B
L. 'Caipira' + L. 'Volkameriano'	0,45 A	0,44 A	0,63 A	0,60 A
L. 'Caipira' + L. 'Cravo'	0,34 A	0,34 A	0,51 A	0,48 A
L. 'Rohde Red' + L. 'Volkameriano'	0,43 A	0,41 A	0,62 A	0,57 B
L. 'Ruby Blood' + L. 'Volkameriano'	0,33 A	0,34 A	0,47 A	0,43 A
L. 'Valência' + <i>Fortunella obovata</i>	0,34 A	0,34 A	0,47 A	0,41 B
cv (%) Parcela (genótipos)		4,23		1,59
cv (%) Subparcela (infestação)		7,01		6,12

* Médias seguidas da mesma letra na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Para o número de folhas, apenas houve diferenças entre plantas controle e infestadas para laranja azeda, laranja 'Caipira' + tangerina 'Cleópatra', laranja 'Caipira' + limão 'Rugoso', laranja 'Valência' + *Fortunella obovata*, tangerina 'Sunki, laranja 'Caipira' e limão 'Siciliano'. No entanto, apenas esses últimos três cultivares apresentaram diferenças em relação a massa seca média da parte aérea, uma vez que era esperado uma contínua relação entre perdas dos genótipos intolerantes a podridão das radículas de forma padrão para todas as variáveis relacionadas a parte aérea (Tabela 19).

Outra controvérsia é o ocorrido para a massa seca média das raízes, onde o limão ‘Volkameriano’, limão ‘Cravo’ + tangerina ‘Sunki’ e laranja ‘Ruby Blood’ + limão ‘Volkameriano’ tiveram diferenças entre plantas controle e infestadas, uma vez que estes genótipos não vieram a apresentar quaisquer diferenças entre plantas controle e plantas infestadas em relação aos atributos associados a parte aérea.

Tabela 19. Número médio de folhas (NF), massa seca média da parte aérea (MSPA, g) e massa seca média das raízes (MSR, g) de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros cultivados em substrato com e sem *Phytophthora nicotianae*, comparando-se plantas controle (C) e infestadas (I) ao final de 60 dias. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

Genótipos	Variável analisada*					
	NF		MSPA (g)		MSR (g)	
	C	I	C	I	C	I
<i>Poncirus trifoliata</i>	33,40 A	35,45 A	2,95 A	2,88 A	1,49 A	1,44 A
L. azeda	53,85 A	47,05 B	14,80 A	13,40 A	5,94 A	5,25 A
L. ‘Volkameriano’	69,40 A	64,98 A	25,37 A	24,63 A	15,78 A	14,70 B
L. ‘Cravo’	54,50 A	48,92 A	10,53 A	9,32 A	6,84 A	5,81 B
T. ‘Cleópatra’	52,25 A	47,82 A	9,93 A	9,31 A	3,66 A	3,18 A
T. ‘Sunki’	71,32 A	62,60 B	13,42 A	10,44 B	4,04 A	2,94 B
L. ‘Caipira’	62,75 A	53,62 B	13,53 A	9,92 B	6,47 A	4,35 B
L. ‘Siciliano’	86,77 A	76,35 B	26,45 A	22,55 B	11,74 A	8,63 B
T. ‘Cleópatra’ + L. azeda	15,92 A	13,87 A	3,53 A	3,15 A	2,57 A	2,24 A
T. ‘Cleópatra’ + L. ‘Volkameriano’	34,50 A	30,37 A	10,19 A	9,49 A	4,70 A	4,01 A
L. ‘Cravo’ + T. ‘Sunki’	36,45 A	32,35 A	6,51 A	5,61 A	3,51 A	2,60 B
L. ‘Caipira’ + T. ‘Cleópatra’	39,52 A	30,40 B	9,49 A	7,84 A	3,76 A	2,79 B
L. ‘Caipira’ + L. ‘Rugoso’	40,92 A	32,87 B	8,00 A	7,07 A	2,92 A	2,32 A
L. ‘Caipira’ + L. ‘Volkameriano’	42,40 A	36,82 A	14,96 A	13,70 A	7,77 A	6,64 B
L. ‘Caipira’ + L. ‘Cravo’	35,95 A	31,72 A	8,61 A	7,95 A	3,37 A	2,80 A
L. ‘Rohde Red’ + L. ‘Volkameriano’	31,77 A	26,62 A	11,00 A	9,76 A	5,07 A	3,99 B
L. ‘Ruby Blood’ + L. ‘Volkameriano’	33,32 A	27,22 A	9,24 A	7,87 A	4,85 A	3,70 B
L. ‘Valência’ + <i>Fortunella obovata</i>	28,15 A	16,07 B	4,76 A	3,12 A	1,82 A	0,73 B
cv (%) Parcela (genótipos)	3,06		11,34		10,94	
cv (%) Subparcela (infestação)	11,40		13,52		13,36	

* Médias seguidas da mesma letra na linha, não diferem significamente entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

O comprometimento de grande parte de radículas e raízes ativas, onde estão concentradas os pêlos absorventes e a falta de reposição de novas raízes como ocorre nos cultivares intolerantes, afetam diretamente a absorção de nutrientes do substrato, com sintomas reflexos na parte aérea (Feichtenberger, 1996). Acrescenta-se ainda que durante a fase experimental, as adubações foram suspensas, para não comprometer o desenvolvimento do patógeno.

Com relação às perdas de alturas médias, avaliadas quinzenalmente, obtidas pela diferença entre plantas controle e plantas infestadas, verificou-se que aos 15 dias após a infestação, houve redução para os porta-enxertos limão 'Volkameriano', limão 'Cravo', tangerina 'Cleópatra', tangerina 'Sunki' e laranja 'Caipira'. Nota-se que alguns híbridos somáticos, como a tangerina 'Cleópatra' + limão 'Volkameriano', limão 'Cravo' + tangerina 'Sunki' e laranja 'Ruby Blood' + limão 'Volkameriano', apresentaram índice de redução na faixa desses porta-enxetos citados anteriormente, mas não diferiram dos genótipos que não apresentaram perdas (Tabela 20).

Trinta dias após a infestação, houve inclusão do limão 'Siciliano' ao grupo que apresentou perdas aos 15 dias, formando-se ainda um grupo intermediário e com superioridade apenas para o *Poncirus trifoliata* e tangerina 'Cleópatra' + laranja azeda. Porém, o limão 'Volkameriano' situou-se nesse grupo intermediário. Esses resultados novamente não concordam com o índice de redução, onde apenas o *Poncirus trifoliata* apresentou baixo índice e a laranja 'Caipira' e o híbrido laranja 'Valência' + *Fortunella obovata* grandes perdas, sendo os demais genótipos apresentando índices entre 3,13% e 9,61%. Detecta-se aos 45 dias, que, provavelmente, houve emissão de novas radículas de alguns genótipos, frente a infestação do patógeno, uma vez que apenas os porta-enxertos tangerina 'Sunki, laranja 'Caipira' e o limão 'Siciliano' e o híbrido laranja 'Valência' + *Fortunella obovata* registraram perdas significativas. Porém, pelo índice de redução, observa-se que o limão 'Siciliano' apresentou apenas 8,31% de redução. Esse resultado para a perda de altura repetiu-se aos 60 dias, apenas incluindo-se o limão 'Cravo'. Porém, nota-se, novamente, discordância para índice de redução, onde poderia-se agrupar-se com maiores perdas a laranja azeda, tangerina 'Sunki, laranja 'Caipira', limão

‘Siciliano’, limão ‘Cravo’ + tangerina ‘Sunki’, laranja ‘Caipira’ + tangerina ‘Cleópatra’ e separadamente laranja ‘Valência’ + *Fortunella obovata* (Tabela 20).

Já para o diâmetro, constatou-se que aos 60 dias após a infestação do substrato, que não houve redução para o *Poncirus trifoliata*. Em um grupo intermediário aos genótipos que apresentaram maiores perdas, situam-se laranja azeda, limão ‘Volkameriano’, tangerina ‘Cleópatra’, tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda, tangerina ‘Cleópatra’ + limão ‘Volkameriano’, limão ‘Cravo’ + tangerina ‘Sunki’, laranja ‘Caipira’ + limão ‘Volkameriano’ e laranja ‘Caipira’ + limão ‘Cravo’. Nova discordância é notada para o índice de redução, onde poderia separar desse grupo tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda e tangerina ‘Cleópatra’ + limão ‘Volkameriano’ (Tabela 21).

Somente os resultados de perdas e índice de redução para as alturas e diâmetro dos genótipos em estudo, não são suficientes para julgá-los como tolerantes ou intolerantes a podridão das raízes e radículas, já que o *Phytophthora nicotianae* causa infecções nas raízes e apenas espera-se que os prejuízos no sistema radicular sejam refletidos na parte aérea das plantas. Resultados semelhantes foram obtidos por Araújo (1998), que verificou que apenas os parâmetros relacionados a altura e diâmetro, frente a infestação com *P. nicotianae*, foram sensíveis a ponto de obter-se classificação quanto a tolerância a infestação desse patógeno as microtangerinas em estudo.

Vale ainda frisar que todas as espécies cítricas são capazes de terem suas raízes e radículas infectadas por *P. nicotianae* (Carpenter & Furr, 1962; Broadbent, 1969; Graham, 1990), até plantas de *Poncirus trifoliata* (‘Davis A’ e ‘Rich 6-16’), consideradas como altamente tolerantes apresentaram muito pouca redução de raízes e da parte aérea (Medina Filho et al., 2004). Assim, a tolerância do porta-enxerto está relacionada diretamente à sua capacidade de emitir novas raízes/radiculas frente ao ataque do patógeno no solo (Graham, 1995).

Vale ressaltar mais uma vez que não houve diferença entre as perdas de alturas e diâmetros entre plantas controle e plantas infestadas no início do experimento, reforçando-se que realmente as plantas dos 18 genótipos em estudo apresentavam homogeneidade antes de se iniciar o ensaio (Tabelas 20 e 21).

Tabela 20. Perda de altura média (cm) obtida pela diferença (C - I) entre plantas controle (C) e infestadas (I) e índice de redução (IR, %) de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros em detrimento à infestação ao substrato com *Phytophthora nicotianae*, no momento da infestação e a cada 15 dias até o final do ensaio. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

Genótipos	Altura (cm)*													
	Início		15 dias		30 dias		45 dias		60 dias					
	C - I	C - I	IR (%)	C - I	IR (%)	C - I	IR (%)	C - I	IR (%)					
<i>Poncirus trifoliata</i>	0,50	a	1,10	a	2,09	0,87	a	1,59	1,12	a	1,47	2,45	a	2,95
L. azeda	0,40	a	2,30	a	2,95	3,32	b	5,94	3,80	a	6,64	4,47	a	10,02
L. 'Volkameriano'	0,42	a	3,70	b	4,33	2,77	b	3,13	2,80	a	2,13	2,90	a	3,14
L. 'Cravo'	0,20	a	3,37	b	4,57	6,35	c	8,91	4,42	a	5,96	6,62	b	8,30
T. 'Cleópatra'	0,75	a	5,57	b	8,36	6,37	c	8,73	5,10	a	6,39	5,52	a	7,00
T. 'Sunki'	0,32	a	3,70	b	6,54	5,92	c	9,61	6,57	b	10,03	10,00	b	14,08
L. 'Caipira'	0,90	a	3,95	b	9,24	6,87	c	14,10	8,82	b	17,05	11,10	b	19,42
L. 'Siciliano'	0,07	a	1,70	a	2,43	4,20	c	5,69	7,47	b	8,31	8,90	b	11,08
T. 'Cleópatra' + L. azeda	0,35	a	0,75	a	2,75	1,12	a	5,29	1,15	a	5,14	1,42	a	6,15
T. 'Cleópatra' + L. 'Volkameriano'	1,17	a	2,22	a	5,18	2,92	b	6,44	3,35	a	9,22	4,47	a	9,00
L. 'Cravo' + T. 'Sunki'	0,85	a	1,85	a	5,01	2,85	b	7,07	4,27	a	8,09	4,92	a	10,85
L. 'Caipira' + T. 'Cleópatra'	0,12	a	1,22	a	3,34	2,92	b	7,24	3,75	a	8,70	5,20	a	11,22
L. 'Caipira' + L. 'Rugoso'	0	a	0,65	a	1,95	1,70	b	4,61	2,72	a	6,72	3,32	a	7,67
L. 'Caipira' + L. 'Volkameriano'	0,50	a	1,25	a	2,23	2,22	b	3,68	2,92	a	4,54	5,25	a	7,67
L. 'Caipira' + L. 'Cravo'	0,17	a	0,80	a	2,09	2,42	b	5,84	3,20	a	7,39	4,07	a	9,02
L. 'Rohde Red' + L. 'Volkameriano'	0	a	1,30	a	3,20	2,22	b	5,02	2,27	a	4,85	3,10	a	6,23
L. 'Ruby Blood' + L. 'Volkameriano'	0,55	a	2,35	a	6,19	2,80	b	6,98	3,22	a	7,65	3,25	a	7,95
L. 'Valência' + <i>Fortunella obovata</i>	0,57	a	1,37	a	1,71	5,93	c	18,96	7,07	b	22,36	9,50	b	28,45
cv (%)	84,52		33,71		-	26,27		-	27,28		-	21,77		-

* Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem significamente entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 21. Perda de diâmetro médio (cm) obtida pela diferença (C - I) entre plantas controle (C) e infestadas (I) e índice de redução (IR, %) de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros em função da infestação ao substrato com *Phytophthora nicotianae*, no momento da infestação e ao final do ensaio. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

Genótipos	Diâmetro (cm)*			
	Início	60 dias		IR (%)
	C - I	C - I		
<i>Poncirus trifoliata</i>	0,01 a	0 a		0
L. azeda	0,01 a	0,02 b		3,64
L. 'Volkameriano'	0,02 a	0,01 b		2,35
L. 'Cravo'	0,01 a	0,04 c		7,69
T. 'Cleópatra'	0 a	0,02 b		1,96
T. 'Sunki'	0,01 a	0,07 c		12,28
L. 'Caipira'	0,01 a	0,07 c		10,29
L. 'Siciliano'	0,01 a	0,06 c		7,23
T. 'Cleópatra' + L. azeda	0,01 a	0,03 b		6,67
T. 'Cleópatra' + L. 'Volkameriano'	0,01 a	0,03 b		7,55
L. 'Cravo' + T. 'Sunki'	0,01 a	0,02 b		4,76
L. 'Caipira' + T. 'Cleópatra'	0,01 a	0,08 c		15,38
L. 'Caipira' + L. 'Rugoso'	0 a	0,06 c		10,34
L. 'Caipira' + L. 'Volkameriano'	0,01 a	0,02 b		4,76
L. 'Caipira' + L. 'Cravo'	0,01 a	0,03 b		5,88
L. 'Rohde Red' + L. 'Volkameriano'	0,01 a	0,05 c		8,06
L. 'Ruby Blood' + L. 'Volkameriano'	0 a	0,04 c		8,51
L. 'Valência' + <i>Fortunella obovata</i>	0,01 a	0,05 c		12,77
cv (%)	84,29	30,24		-

* Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem significamente entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Com relação ao número de folhas, menor perda foi obtida com o *Poncirus trifoliata* e posteriormente o híbrido tangerina 'Cleópatra' + laranja azeda. Porém, maiores perdas foram registradas para os porta-enxertos tangerina 'Sunki', laranja 'Caipira' e limão 'Siciliano' e para os híbridos somáticos laranja 'Caipira' + tangerina 'Cleópatra', laranja 'Caipira' + limão 'Rugoso' e laranja 'Valência' + *Fortunella obovata*. Para o índice de redução, vale ressaltar que limão 'Volkameriano' e tangerina 'Cleópatra' atingiram apenas 6,37% e 8,48% de redução, respectivamente (Tabela 22).

Tabela 22. Perda do número médio de folhas (NF), massa seca média da parte aérea (MSPA, g) e massa seca média das raízes (MSR, g) obtida pela diferença (C - I) entre plantas controle (C) e infestadas (I) e índice de redução (IR, %) de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros em função da infestação ao substrato com *Phytophthora nicotianae*, ao final de 60 dias. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

Genótipos	Variável analisada*					
	NF		MSPA (g)		MSR (g)	
	C - I	IR (%)	C - I	IR (%)	C - I	IR (%)
<i>Poncirus trifoliata</i>	0,32 a	0	0,08 a	2,37	0,05 a	3,36
L. azeda	6,80 c	12,63	1,40 c	9,46	0,69 c	11,62
L. 'Volkameriano'	4,42 c	6,37	1,26 c	2,92	1,07 c	6,84
L. 'Cravo'	5,57 c	10,24	1,21 c	11,49	1,02 c	15,06
T. 'Cleópatra'	4,42 c	8,48	0,63 b	6,24	0,48 b	13,11
T. 'Sunki'	8,72 d	12,23	2,98 e	22,21	1,10 c	27,23
L. 'Caipira'	9,12 d	14,55	3,61 e	26,68	2,22 d	32,77
L. 'Siciliano'	10,42 d	12,01	3,90 e	14,74	3,11 e	26,49
T. 'Cleópatra' + L. azeda	2,05 b	12,88	0,38 b	10,76	0,33 b	12,84
T. 'Cleópatra' + L. 'Volkameriano'	4,12 c	11,97	0,70 b	6,87	0,70 c	14,68
L. 'Cravo' + T. 'Sunki'	4,10 c	11,25	0,90 c	13,82	0,91 c	25,93
L. 'Caipira' + T. 'Cleópatra'	9,12 d	23,08	1,64 c	17,39	0,97 c	25,80
L. 'Caipira' + L. 'Rugoso'	8,05 d	19,67	0,93 c	11,63	0,59 b	20,55
L. 'Caipira' + L. 'Volkameriano'	5,57 c	13,16	1,26 c	8,42	1,13 c	14,54
L. 'Caipira' + L. 'Cravo'	4,22 c	11,77	0,67 b	7,67	0,57 b	16,91
L. 'Rohde Red' + L. 'Volkameriano'	5,90 c	16,21	1,24 c	11,27	1,10 c	21,30
L. 'Ruby Blood' + L. 'Volkameriano'	6,10 c	18,31	1,37 c	14,83	1,15 c	23,71
L. 'Valência' + <i>Fortunella obovata</i>	12,53 d	42,91	2,01 d	34,45	1,11 c	59,89
cv (%)	19,42	-	17,56	-	17,42	-

* Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem significamente entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Para a massa seca média da parte aérea, verificou-se que menor perda foi obtida com o *Poncirus trifoliata*, sendo posteriormente agrupados a tangerina 'Cleópatra' e os híbridos tangerina 'Cleópatra' + laranja azeda, tangerina 'Cleópatra' + limão 'Volkameriano' e laranja 'Caipira' + limão 'Cravo'. Observa-se ainda que a tangerina 'Cleópatra', tangerina 'Cleópatra' + limão 'Volkameriano' e laranja 'Caipira' + limão 'Cravo' se mantiveram com índices de redução baixo, incluindo-se ainda limão 'Volkameriano' e laranja 'Caipira' + limão 'Volkameriano', que registraram índices de

redução de 2,92% e 8,42%, respectivamente. Em contrapartida, maiores perdas foram registradas para a tangerina ‘Sunki’, laranja ‘Caipira’ e limão ‘Siciliano’, notando-se ainda elevado índice de redução para o híbrido laranja ‘Valência’ + *Fortunella obovata* (34,45%). Já para a perda da massa seca média das raízes, novamente o *Poncirus trifoliata* registrou menor perda, sendo em seguida agrupados tangerina ‘Cleópatra’, tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda, laranja ‘Caipira’ + limão ‘Cravo’ e laranja ‘Caipira’ + limão ‘Rugoso’, sendo que este último registrou elevado índice de redução da massa das raízes (20,55%). Vale ressaltar ainda o destaque do limão ‘Volkameriano’, com índice de redução da massa das raízes de apenas 6,84% (Tabela 22).

O índice de redução (IR) mostra-se bastante apropriado para a classificação de genótipos quanto às perdas provocadas por *Phytophthora nicotianae* no sistema radicular e na parte aérea (Medina Filho et al., 2004). Porém, não basta apenas classificar os genótipos quanto ao índice de redução, uma vez que não há diferenças estatísticas que comprovem tais diferenças entre genótipos em estudo. Mas, este índice é ferramenta fundamental no auxílio da classificação de possíveis tolerâncias frente a infestação das raízes por *P. nicotianae*, sendo ideal analisar juntamente as perdas (diferença entre plantas controle e infestadas) e o índice de redução.

Para a severidade de podridões das radículas, a análise de observação visual de redução do sistema radicular e aspectos qualitativos da parte aérea, revelou que o *Poncirus trifoliata* não demonstrou diferença expressiva entre as plantas controle e infestadas; em um segundo grupo, situou-se os porta-enxertos limão ‘Volkameriano’ e tangerina ‘Cleópatra’ e os híbridos tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda, tangerina ‘Cleópatra’ + limão ‘Volkameriano’, laranja ‘Caipira’ + limão ‘Volkameriano’ e laranja ‘Caipira’ + limão ‘Cravo’. Maiores diferenças foram notadas entre as plantas de tangerina ‘Sunki, laranja ‘Caipira’, limão ‘Siciliano’ e laranja ‘Valência’ + *Fortunella obovata* (Tabela 23).

Tabela 23. Severidade de podridão das radículas em detrimento à infestação ao substrato com *Phytophthora nicotianae* em porta-enxertos e híbridos somáticos de citros, através da comparação visual entre plantas controle (C) e infestadas (I), ao final de 60 dias. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

Genótipos	Severidade* (nota)**
<i>Poncirus trifoliata</i>	1,00 a
L. azeda	3,57 c
L. 'Volkameriano'	2,32 b
L. 'Cravo'	3,57 c
T. 'Cleópatra'	2,15 b
T. 'Sunki'	4,00 d
L. 'Caipira'	4,10 d
L. 'Siciliano'	3,75 d
T. 'Cleópatra' + L. azeda	2,00 b
T. 'Cleópatra' + L. 'Volkameriano'	2,35 b
L. 'Cravo' + T. 'Sunki'	3,17 c
L. 'Caipira' + T. 'Cleópatra'	3,57 c
L. 'Caipira' + L. 'Rugoso'	3,17 c
L. 'Caipira' + L. 'Volkameriano'	2,52 b
L. 'Caipira' + L. 'Cravo'	2,60 b
L. 'Rohde Red' + L. 'Volkameriano'	2,92 c
L. 'Ruby Blood' + L. 'Volkameriano'	3,07 c
L. 'Valência' + <i>Fortunella obovata</i>	4,90 e
cv (%)	11,24

* Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem significamente entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

** Escala de notas (de 1 = sem redução visual a 5 = alto nível de redução visual).

Analisando-se todas as variáveis em estudo, relacionando-se as perdas obtidas pela diferença entre plantas controle e infestadas e os índices de redução, juntamente com a severidade do patógeno, frente às reduções visuais observadas entre plantas controle e infestadas, foi proposta a classificação dos porta-enxertos e híbridos somáticos em altamente tolerantes, tolerantes, moderadamente tolerantes e intolerantes (Figura 8).

Altamente tolerante	<i>Poncirus trifoliata</i>
Tolerante	L. 'Volkameriano' T. 'Cleópatra' T. 'Cleópatra' + L. 'Volkameriano' T. 'Cleópatra' + L. azeda L. 'Caipira' + L. 'Volkameriano' L. 'Caipira' + L. 'Cravo'
Moderadamente tolerante	L. azeda L. 'Cravo' L. 'Cravo' + T. 'Sunki' L. 'Caipira' + T. 'Cleópatra' L. 'Caipira' + L. 'Rugoso' L. 'Rohde Red' + L. 'Volkameriano' L. 'Ruby Blood' + L. 'Volkameriano'
Intolerante	T. 'Sunki' L. 'Caipira' L. 'Siciliano' L. 'Valência' + <i>Fortunella obovata</i>

Figura 8 - Classificação de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros quanto à tolerância e intolerância a podridão das raízes e radículas ocasionado por *Phytophthora nicotianae*. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

Para maior compreensão, detalhe do sistema radicular de plantas consideradas como altamente tolerantes, tolerantes, moderadamente tolerantes e intolerantes, frente a podridão das raízes e radículas por *Phytophthora nicotianae*, encontram-se na Figura 9.

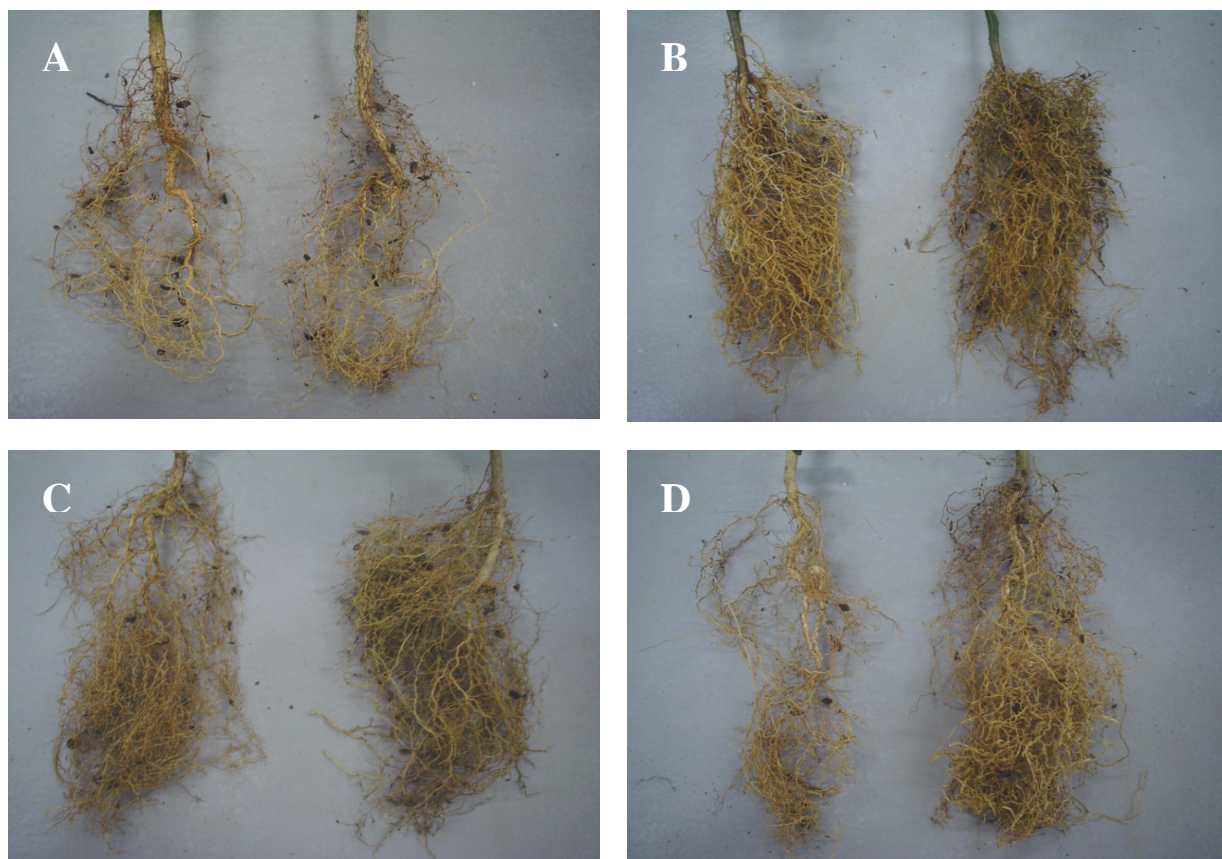


Figura 9 - Comparação de porta-enxerto altamente tolerante (A), tolerante (B), moderadamente tolerante (C) e intolerante (D) a podridão das raízes e radicelas ocasionado por *Phytophthora nicotianae*. Planta da esquerda infestada e da direita sadia (controle). USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

Estudos histológicos de raízes infetadas mostram menor colonização inter e intracelular nos tecidos de porta-enxertos tolerantes, em comparação aos tecidos de porta-enxertos intolerantes, sugerindo que a tolerância se deve na inibição do crescimento de *Phytophthora* spp. (Widmer et al., 1998). A nível bioquímico, várias são as investigações associando compostos tipo fitoalexinas às reações de defesa das plantas cítricas a *Phytophthora* spp., porém, como discutido por Siviero (2001), ainda são pouco estudadas as relações com genótipos específicos. De outra forma, Graham (1990; 1995) estudou variedades de porta-enxertos em relação à infecção de raízes, avaliando a tolerância pela capacidade de regeneração das mesmas na presença de elevadas

populações do patógeno. Aparentemente todas as variedades de citros são infestadas em inoculações artificiais (Carpenter & Furr, 1962; Broadbent, 1969; Graham, 1990).

Vale ressaltar os bons resultados obtidos nesse trabalho com os porta-enxertos tangerina ‘Cleópatra’ e limão ‘Volkameriano’. Porém, a classificação desses dois porta-enxertos vem a discordar com a literatura, que propõem a seguinte ordem de tolerância dos porta-enxertos em função da capacidade de regeneração de suas raízes em solos infestados com *Phytophthora* spp.: *Poncirus trifoliata* e citrumelo ‘Swingle’ > citrange ‘Carrizo’ > laranja azeda > limão ‘Rugoso’, limão ‘Volkameriano’ e limão ‘Cravo’ > tangerina ‘Cleópatra’ > laranja ‘Pineapple’ (Castle et al., 1993). Porém, esta escala não pode ser adotada como padrão, uma vez que existem outros trabalhos que discordam desses resultados. Timmer et al. (1991) não verificaram diferenças na redução de massa de radículas em solos infestados com *P. nicotianae* entre tangerina ‘Cleópatra’ e citrange ‘Carrizo’, considerando-se esses como tolerantes, enquanto o limão ‘Volkameriano’ apresentou comportamento intermediário. Graham (1990) classificou o *Poncirus trifoliata* e citrumelo ‘Swingle’ como tolerantes, citrange ‘Carrizo’ como intolerante e limão ‘Volkameriano’ como intermediários. Carvalho (2000) e Feichtenberger (2001) consideram os porta-enxertos limão ‘Cravo’, laranja azeda, tangerina ‘Sunki’ e tangerina ‘Cleópatra’ como moderadamente tolerantes à podridão das raízes e radículas. Fale frisar que a tangerina ‘Sunki’ se comportou como intolerante, sendo essa coerente com outras literaturas (Carpenter & Furr, 1962; Zitko et al., 1991; Medina Filho et al., 2004).

O fator que pode contribuir para variações nas respostas é a utilização de diferentes espécies do patógeno nos testes. A resposta do porta-enxerto a uma espécie de *Phytophthora* não deve ser a mesma para outras espécies (Matheron et al., 1998). É necessário considerar ainda que o desenvolvimento das infecções pode ser influenciado por outras variáveis como idade, vigor, estado nutricional, além da temperatura, o que poderia através de interações complexas, modificar a resposta dos diferentes porta-enxertos (Carvalho, 2000).

Com relação aos híbridos somáticos, bons resultados foram obtidos para o híbrido tangerina ‘Cleópatra’ + limão ‘Volkameriano’, o que era esperado, uma vez que ambos os parentais envolvidos foram tolerantes a *P. nicotianae* nesse trabalho. Para os

híbridos tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda e laranja ‘Caipira’ + limão ‘Volkameriano’, a tolerância desses híbridos em relação à podridão das raízes e radículas, se deve aos parentais tangerina ‘Cleópatra’ e limão ‘Volkameriano’, que foram tolerantes, apesar do outro parental envolvido na hibridação ter sido menos tolerante a infestação do patógeno. Característica adicional foi obtida com o híbrido laranja ‘Caipira’ + limão ‘Cravo’, que se comportou superior em relação a ambos parentais.

A hibridação somática via fusão de protoplastos, objetiva em produzir híbridos alotetraplóides, onde os híbridos produzidos carregam a carga genética de ambos os parentais, somando as características hortícolas desejáveis (Grosser & Gmitter Junior, 1990a).

Para alguns porta-enxertos de citros, nem sempre há boa relação entre a resistência às infecções de tronco e a tolerância às podridões de raízes por *P. nicotianae* (Furr & Carpenter, 1961). Quanto a laranja azeda, é conhecida sua alta resistência à gomose de tronco; porém, é pouco tolerante à podridão de raízes (Furr & Carpenter, 1961; Carpenter & Furr, 1962; Grimm & Hutchison, 1973; Graham, 1990).

Relacionando-se os resultados obtidos para os porta-enxertos e híbridos somáticos quanto à podridão do tronco e à podridão das raízes e radículas ocasionada por *Phytophthora nicotianae*, verificou-se que o híbrido tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda foi resistente a podridão do tronco e tolerante a podridão das radículas; já os porta-enxertos tangerina ‘Cleópatra’, limão ‘Volkameriano’, tangerina ‘Cleópatra’ + limão ‘Volkameriano’ e laranja ‘Caipira’ + limão ‘Volkameriano’, classificados como tolerantes a podridão das radículas, comportaram-se como moderadamente susceptíveis a podridão do tronco. Fato interessante foi constatado para o híbrido laranja ‘Caipira’ + limão ‘Cravo’, que comportou-se como tolerante a podridão das radículas e como susceptível a podridão do tronco. Assim, verifica-se que nem sempre há boa relação entre a resistência às infecções de tronco e a tolerância às podridões de raízes por *Phytophthora* spp., não devendo assim analisar novos genótipos de citros apenas através das infecções do tronco e sim também analisar a podridão das raízes e radículas, para

assim obter informações quanto ao comportamento dos genótipos frente a essas duas doenças importantes ocasionadas por *Phytophthora* spp.

4.3 Experimento 4: Reação dos híbridos somáticos ao CTV

O teste ELISA realizado em todas as plantas pertencentes ao ensaio revelou que as plantas que foram enxertadas com borbulhas sadias foram negativas para o teste e as plantas enxertadas com borbulhas infectada pelo CTV apresentaram resultado positivo.

Para a porcentagem borbulhas brotadas, constatou-se que apenas a laranja azeda e os híbridos somáticos laranja 'Caipira' + tangerina 'Cleópatra', tangerina 'Cleópatra' + laranja azeda e laranja 'Valência' + *Fortunella obovata* apresentaram diferenças significativas entre as plantas que receberam borbulhas sadias e infectadas pelo CTV, já aos 30 dias após a retirada do fitilho (Tabelas 24).

Tabela 24. Porcentagem de borbulhas brotadas de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros, comparando-se plantas saudas (S) e infectadas (I) com CTV aos 30, 60 e 90 dias após a retirada do filhinho do enxerto. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

Genótipos	Porcentagem de borbulhas brotadas*					
	30 dias		60 dias		90 dias	
	S	I	S	I	S	I
L. azeda	100,00 A	75,25 B	100,00 A	75,25 B	100,00 A	75,25 B
<i>Poncirus trifoliata</i>	67,00 A	67,00 A	67,00 A	67,00 A	67,00 A	67,00 A
L. 'Cravo'	91,75 A	100,00 A	91,75 A	100,00 A	91,75 A	100,00 A
L. 'Caipira' + L. 'Cravo'	75,25 A	58,75 A	75,25 A	58,75 A	75,25 A	58,75 A
L. 'Caipira' + T. 'Cleópatra'	91,75 A	75,25 B	91,75 A	75,25 B	100,00 A	75,25 B
L. 'Caipira' + L. 'Volkameriano'	91,75 A	75,25 A	91,75 A	75,25 A	91,75 A	75,25 A
L. 'Caipira' + L. 'Rugoso'	100,00 A	83,50 A	100,00 A	83,50 A	100,00 A	83,50 A
T. 'Cleópatra' + L. 'Volkameriano'	100,00 A	83,50 A	100,00 A	83,50 A	100,00 A	83,50 A
T. 'Cleópatra' + L. azeda	100,00 A	75,25 B	100,00 A	75,25 B	100,00 A	75,25 B
L. 'Cravo' + T. 'Sunki'	75,25 A	75,25 A	75,25 A	75,25 A	75,25 A	75,25 A
L. 'Ruby Blood' + L. 'Volkameriano'	83,50 A	75,25 A	83,50 A	75,25 A	83,50 A	75,25 A
L. 'Rohde Red' + L. 'Volkameriano'	75,25 A	75,25 A	75,25 A	75,25 A	75,25 A	75,25 A
L. 'Valência' + <i>Fortunella obovata</i>	67,00 A	34,00 B	58,75 A	34,00 B	58,75 A	34,00 B
cv (%) Parcela (genótipos)	22,40		21,52		20,37	
cv (%) Subparcela (infecção)	17,00		17,62		17,10	

* Médias seguidas da mesma letra na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Vale ressaltar que essa variável apenas expressa resultados referentes ao pegamento da enxertia, não sendo um parâmetro adequado para julgar a tolerância ou intolerância de genótipos em relação ao CTV, apesar da laranja azeda, porta-enxerto intolerante ao vírus da tristeza, ter apresentado diferenças entre as plantas saudas e infectadas.

Com relação ao número de folhas, não houve quaisquer diferenças entre as plantas saudas e infectadas aos 30 dias, porém aos 60 dias, ocorreu diferença significativa para a laranja azeda. Já aos 90 dias, constataram-se diferenças entre as plantas saudas e infectadas para a laranja azeda e para os híbridos somáticos tangerina 'Cleópatra' + laranja azeda e laranja 'Valência' + *Fortunella obovata* (Tabela 25). Para o comprimento médio da brotação, apenas a laranja azeda e os mesmos híbridos

somáticos citados anteriormente, apresentaram diferenças significativas, porém já aos 60 dias, apesar de não ter sido constatado diferenças aos 30 dias (Tabela 26). Com relação ao diâmetro médio da brotação, os resultados se igualam aos demais parâmetros analisados, onde se verificou diferença significativa entre plantas saudas e infectadas aos 30 dias para o híbrido tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda e aos 60 e 90 dias para esse mesmo híbrido somático e incluindo-se ainda laranja ‘Valência’ + *Fortunella obovata* e a laranja azeda (Tabela 27).

Tabela 25. Número médio de folhas de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros, comparando-se plantas saudas (S) e infectadas (I) com CTV aos 30, 60 e 90 dias após a retirada do fitilho do enxerto. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

Genótipos	Número médio de folhas*					
	30 dias		60 dias		90 dias	
	S	I	S	I	S	I
L. azeda	12,72 A	13,49 A	22,41 A	15,20 B	27,91 A	15,79 B
<i>Poncirus trifoliata</i>	6,00 A	6,50 A	7,75 A	9,00 A	17,75 A	19,50 A
L. ‘Cravo’	16,20 A	14,74 A	25,00 A	23,04 A	34,46 A	33,00 A
L. ‘Caipira’ + L. ‘Cravo’	16,95 A	18,15 A	27,66 A	28,75 A	36,87 A	33,62 A
L. ‘Caipira’ + T. ‘Cleópatra’	14,66 A	14,62 A	23,08 A	23,79 A	33,79 A	31,54 A
L. ‘Caipira’ + L. ‘Volkameriano’	14,87 A	15,00 A	22,16 A	22,83 A	34,71 A	30,70 A
L. ‘Caipira’ + L. ‘Rugoso’	14,41 A	14,95 A	25,33 A	23,12 A	34,16 A	31,91 A
T. ‘Cleópatra’ + L. ‘Volkameriano’	15,16 A	15,47 A	24,50 A	24,63 A	32,49 A	33,00 A
T. ‘Cleópatra’ + L. azeda	16,66 A	13,50 A	22,74 A	19,16 A	41,17 A	25,54 B
L. ‘Cravo’ + T. ‘Sunki’	13,12 A	13,12 A	18,75 A	19,62 A	25,95 A	27,16 A
L. ‘Ruby Blood’ + L. ‘Volkameriano’	19,66 A	19,54 A	28,04 A	28,50 A	42,87 A	40,62 A
L. ‘Rohde Red’ + L. ‘Volkameriano’	14,79 A	13,79 A	21,83 A	21,62 A	31,33 A	30,95 A
L. ‘Valência’ + <i>Fortunella obovata</i>	7,62 A	7,33 A	13,87 A	10,00 A	18,50 A	11,33 B
cv (%) Parcela (genótipos)	5,12		11,02		12,38	
cv (%) Subparcela (infecção)	15,16		11,97		12,33	

* Médias seguidas da mesma letra na linha, não diferem significamente entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 26. Comprimento médio da brotação (cm) de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros, comparando-se plantas sadias (S) e infectadas (I) com CTV aos 30, 60 e 90 dias após a retirada do fitilho do enxerto. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

Genótipos	Comprimento médio da brotação (cm)*					
	30 dias		60 dias		90 dias	
	S	I	S	I	S	I
L. azeda	17,16 A	13,91 A	37,97 A	17,17 B	49,16 A	17,41 B
<i>Poncirus trifoliata</i>	5,62 A	5,97 A	7,75 A	11,31 A	19,12 A	23,62 A
L. 'Cravo'	23,58 A	21,49 A	41,29 A	39,75 A	59,41 A	53,28 A
L. 'Caipira' + L. 'Cravo'	25,16 A	26,12 A	44,39 A	45,87 A	66,25 A	61,25 A
L. 'Caipira' + T. 'Cleópatra'	20,37 A	17,50 A	39,95 A	35,20 A	58,91 A	53,41 A
L. 'Caipira' + L. 'Volkameriano'	19,16 A	17,87 A	33,95 A	30,25 A	52,21 A	47,16 A
L. 'Caipira' + L. 'Rugoso'	17,50 A	17,49 A	33,41 A	28,58 A	52,33 A	47,12 A
T. 'Cleópatra' + L. 'Volkameriano'	21,49 A	19,29 A	36,11 A	34,25 A	57,50 A	55,38 A
T. 'Cleópatra' + L. azeda	20,66 A	17,00 A	36,25 A	22,33 B	57,24 A	22,95 B
L. 'Cravo' + T. 'Sunki'	14,16 A	15,37 A	23,12 A	24,66 A	30,79 A	33,62 A
L. 'Ruby Blood' + L. 'Volkameriano'	28,16 A	26,95 A	43,87 A	43,87 A	73,29 A	69,87 A
L. 'Rohde Red' + L. 'Volkameriano'	15,29 A	12,62 A	30,00 A	29,12 A	56,12 A	51,00 A
L. 'Valência' + <i>Fortunella obovata</i>	4,12 A	4,66 A	14,37 A	8,33 B	21,12 A	10,00 B
cv (%) Parcela (genótipos)	13,46		11,75		7,34	
cv (%) Subparcela (infecção)	17,44		14,88		14,27	

* Médias seguidas da mesma letra na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 27. Diâmetro médio da brotação (cm) de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros, comparando-se plantas sadias (S) e infectadas (I) com CTV aos 30, 60 e 90 dias após a retirada do fitilho do enxerto. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

Genótipos	Diâmetro médio da brotação (cm)*					
	30 dias		60 dias		90 dias	
	S	I	S	I	S	I
L. azeda	0,31 A	0,27 A	0,41 A	0,35 B	0,57 A	0,38 B
<i>Poncirus trifoliata</i>	0,15 A	0,14 A	0,26 A	0,22 A	0,31 A	0,34 A
L. ‘Cravo’	0,37 A	0,34 A	0,49 A	0,49 A	0,55 A	0,55 A
L. ‘Caipira’ + L. ‘Cravo’	0,44 A	0,41 A	0,54 A	0,55 A	0,66 A	0,65 A
L. ‘Caipira’ + T. ‘Cleópatra’	0,36 A	0,37 A	0,55 A	0,51 A	0,63 A	0,61 A
L. ‘Caipira’ + L. ‘Volkameriano’	0,41 A	0,39 A	0,52 A	0,50 A	0,59 A	0,62 A
L. ‘Caipira’ + L. ‘Rugoso’	0,36 A	0,32 A	0,48 A	0,42 A	0,59 A	0,53 A
T. ‘Cleópatra’ + L. ‘Volkameriano’	0,37 A	0,35 A	0,50 A	0,48 A	0,59 A	0,59 A
T. ‘Cleópatra’ + L. azeda	0,38 A	0,32 B	0,50 A	0,38 B	0,61 A	0,43 B
L. ‘Cravo’ + T. ‘Sunki’	0,32 A	0,31 A	0,40 A	0,40 A	0,45 A	0,49 A
L. ‘Ruby Blood’ + L. ‘Volkameriano’	0,46 A	0,41 A	0,60 A	0,61 A	0,77 A	0,72 A
L. ‘Rohde Red’ + L. ‘Volkameriano’	0,34 A	0,29 A	0,49 A	0,46 A	0,57 A	0,58 A
L. ‘Valência’ + <i>Fortunella obovata</i>	0,23 A	0,22 A	0,31 A	0,25 B	0,33 A	0,25 B
cv (%) Parcela (genótipos)	9,25		7,23		9,69	
cv (%) Subparcela (infecção)	12,00		11,18		11,49	

* Médias seguidas da mesma letra na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Para melhor visualizar a diferença entre plantas sadias e infectadas pelo CTV, optou-se em incluir a Figura abaixo, onde se situa a esquerda uma planta infectada e a direita uma planta sadia, uma ao lado da outra, para cada genótipo estudado neste trabalho (Figuras 10 e 11). Assim, pode-se observar a maior diferença entre a laranja azeda e os híbridos somáticos tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda e laranja ‘Valência’ + *Fortunella obovata* (Figuras 10-A, 10-F e 11-K, respectivamente).

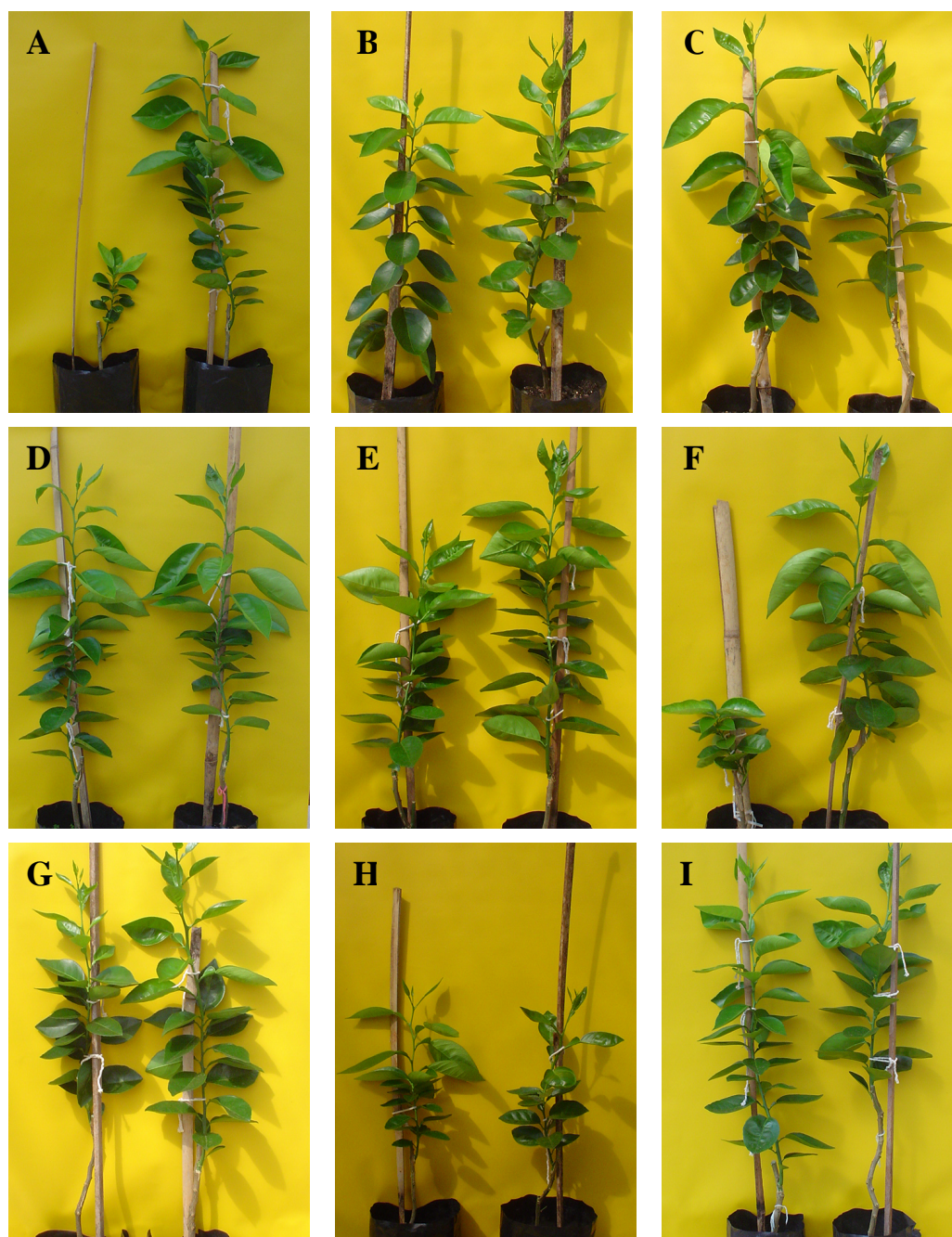


Figura 10 - Comparação entre as plantas de laranja azeda (A), L. 'Caipira' + T. 'Cleópatra' (B), L. 'Caipira' + L. 'Cravo' (C), L. 'Caipira' + L. 'Rugoso' (D), L. 'Caipira' + L. 'Volkameriano' (E), T. 'Cleópatra' + L. azeda (F), T. 'Cleópatra' + L. 'Volkameriano' (G), L. 'Cravo' + T. 'Sunki' (H) e L. 'Rohde Red' + L. 'Volkameriano' (I), infectadas com CTV (esquerda) e sadias – controle (direita). ESALQ/USP, Piracicaba-SP, 2004



Figura 11 - Comparação entre as plantas de L. 'Ruby Blood' + L. 'Volkameriano' (J), L. 'Valência' + *Fortunella obovata* (K), L. 'Cravo' (L) e *Poncirus trifoliata* (M) infectadas com CTV (esquerda) e sadias – controle (direita). USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

Com relação às perdas do comprimento médio da brotação, em relação ao tempo, nota-se que a laranja azeda e os híbridos somáticos tangerina 'Cleópatra' + laranja azeda e laranja 'Valência' + *Fortunella obovata* apresentaram diferenças entre 30, 60 e 90 dias, verificando-se que a redução da altura da brotação foi progressiva, ou seja, a cada mês a diferença entre plantas sadias e infectadas foi maior para esses genótipos. Fato interessante foi observado para o híbrido laranja 'Caipira' + limão 'Cravo', ocorrendo diferença aos 90 dias, sendo que aos 30 e 60 dias não foi constatada diferença (Tabela 28). Em relação às diferenças entre os híbridos somáticos e as plantas testemunha, verificou-se que aos 30 dias não ocorreu diferença, porém, aos 60 dias, o híbrido

tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda e a laranja azeda diferiram-se dos demais (13,92 e 20,79 cm, respectivamente). Já aos 90 dias, essa diferença aumentou para 31,21 e 31,74 cm, respectivamente, incluindo-se ainda o híbrido laranja ‘Valência’ + *Fortunella obovata*, que apresentou perda de 11,50 cm, devido a presença do CTV. Já os demais híbridos somáticos e o limão ‘Cravo’ e *Poncirus trifoliata*, não apresentaram perdas significativas, demonstrando-se assim tolerância ao CTV.

Tabela 28. Comprimento médio da brotação (cm) de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros, comparando-se a diferença entre plantas sadias (S) e infectadas (I) com CTV (perdas) aos 30, 60 e 90 dias após a retirada do fitilho do enxerto. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

Genótipos	Comprimento médio da brotação (cm)*					
	30 dias		60 dias		90 dias	
L. azeda	3,25	Ca	20,79	Bc	31,74	Ac
<i>Poncirus trifoliata</i>	0,25	Aa	0,37	Aa	1,00	Aa
L. ‘Cravo’	2,08	Aa	1,54	Aa	6,13	Aa
L. ‘Caipira’ + L. ‘Cravo’	0,50	Ba	0,42	Ba	5,00	Aa
L. ‘Caipira’ + T. ‘Cleópatra’	2,87	Aa	2,33	Aa	5,49	Aa
L. ‘Caipira’ + L. ‘Volkameriano’	1,37	Aa	3,07	Aa	5,04	Aa
L. ‘Caipira’ + L. ‘Rugoso’	0,67	Aa	4,85	Aa	5,21	Aa
T. ‘Cleópatra’ + L. ‘Volkameriano’	2,70	Aa	2,04	Aa	2,50	Aa
T. ‘Cleópatra’ + L. azeda	5,66	Ca	13,92	Bb	31,21	Ac
L. ‘Cravo’ + T. ‘Sunki’	1,12	Aa	1,21	Aa	0,62	Aa
L. ‘Ruby Blood’ + L. ‘Volkameriano’	1,42	Aa	1,08	Aa	3,42	Aa
L. ‘Rohde Red’ + L. ‘Volkameriano’	2,67	Aa	1,37	Aa	5,12	Aa
L. ‘Valência’ + <i>Fortunella obovata</i>	0,87	Ca	6,62	Ba	11,50	Ab
cv (%) Parcela (genótipos)			22,70			
cv (%) Subparcela (infecção)			34,97			

* Médias seguidas da mesma letra em maiúsculo na linha e em minúsculo na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Com relação ao índice de redução para o comprimento médio da brotação, verificou-se que aos 30 dias após a retirada do fitilho, que a laranja azeda e os híbridos tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda e laranja ‘Rohde Red’ + limão ‘Volkameriano’ apresentaram maiores índices de redução. Porém, ficou evidenciado aos três meses após a realização da enxertia, ou seja, próximo aos 60 dias após a retirada do fitilho, que a

laranja azeda e os híbridos somáticos tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda e laranja ‘Valência’ + *Fortunella obovata* já demonstraram certa intolerância ao CTV, uma vez que aos 90 dias o índice de redução foi maior ainda, detectando-se assim a paralisação do crescimento da brotação da laranja ‘Valência’ infectada com CTV, sobre os porta-enxertos laranja azeda e os híbridos tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda e laranja ‘Valência’ + *Fortunella obovata*, que apresentaram índice de redução de 64,58%, 59,9% e 52,65%, respectivamente. Nota-se ainda que os demais genótipos tiveram índice de redução inferior ao limão ‘Cravo’ aos 90 dias, porta-enxerto considerado tolerante ao CTV (Carlos et al., 1997) (Tabela 29).

Tabela 29. Resultado do índice de redução (%) para o comprimento médio da brotação (cm) de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros aos 30, 60 e 90 dias após a retirada do fitilho do enxerto. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

Genótipos	Índice de redução (%) do comprimento médio da brotação (cm)		
	30 dias	60 dias	90 dias
L. azeda	18,93	54,78	64,58
<i>Poncirus trifoliata</i>	0	0	0
L. ‘Cravo’	8,86	3,72	10,31
L. ‘Caipira’ + L. ‘Cravo’	0	0	7,54
L. ‘Caipira’ + T. ‘Cleópatra’	4,91	11,88	9,33
L. ‘Caipira’ + L. ‘Volkameriano’	6,73	10,89	9,67
L. ‘Caipira’ + L. ‘Rugoso’	0,05	14,45	9,95
T. ‘Cleópatra’ + L. ‘Volkameriano’	10,23	2,76	3,68
T. ‘Cleópatra’ + L. azeda	17,71	38,40	59,90
L. ‘Cravo’ + T. ‘Sunki’	0	0	9,99
L. ‘Ruby Blood’ + L. ‘Volkameriano’	3,55	0	4,66
L. ‘Rohde Red’ + L. ‘Volkameriano’	17,46	2,93	9,12
L. ‘Valência’ + <i>Fortunella obovata</i>	0	42,03	52,65

Com relação aos sintomas visuais da intolerância da laranja azeda e dos híbridos tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda e laranja ‘Valência’ + *Fortunella obovata*, aos 60 dias, a brotação da cultivar copa já apresentou sintomas de CTV, observando-se clorose das folhas velhas e amarelecimento das brotações novas, como ilustrado na Figura 12.

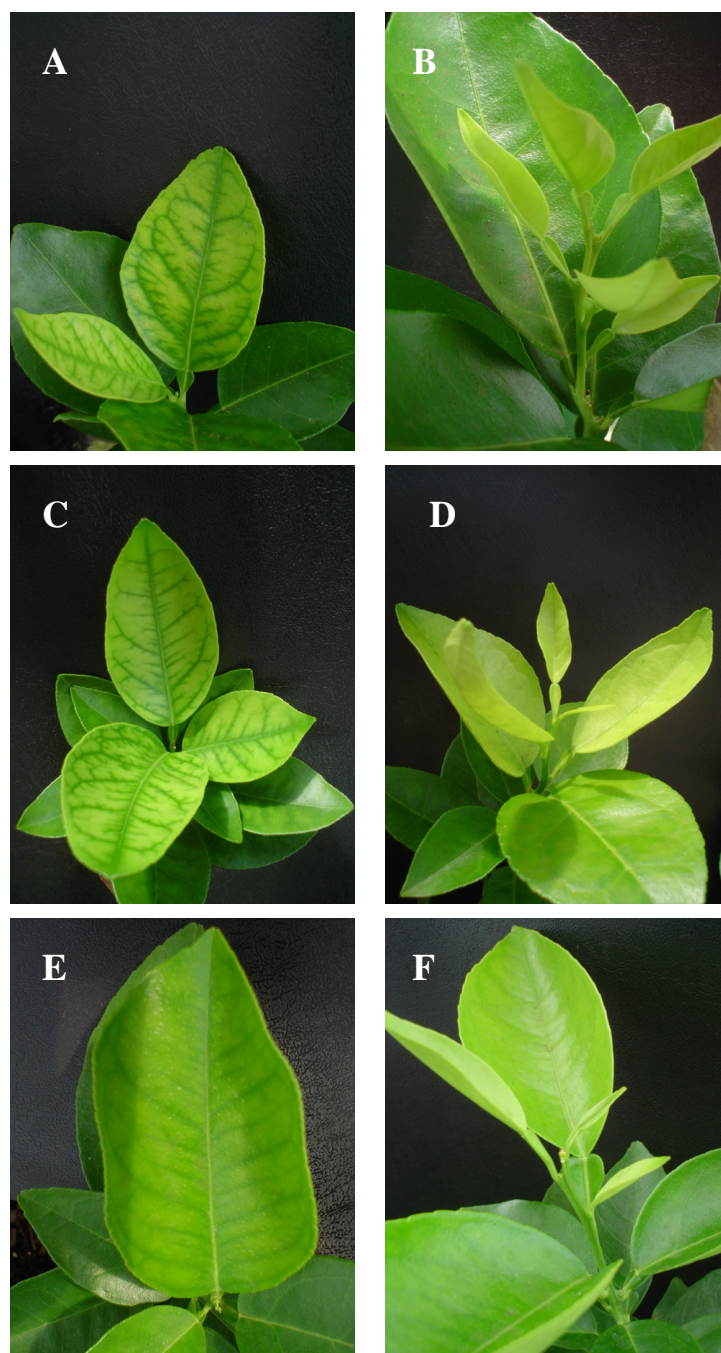


Figura 12 - Folhas velhas e brotação de laranja azeda (A e B) e dos híbridos somáticos T. 'Cleópatra' + L. azeda (C e D) e L. 'Valência' + *Fortunella obovata* (E e F) com sintomas de CTV. USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

Assim, a laranja azeda e os híbridos somáticos tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda e laranja ‘Valência’ + *Fortunella obovata* foram classificados como intolerantes ao CTV (Figura 13).

Tolerante	<p><i>Poncirus trifoliata</i> L. ‘Cravo’ L. ‘Caipira’ + L. ‘Cravo’ L. ‘Caipira’ + T. ‘Cleópatra’ T. ‘Cleópatra’ + L. ‘Volkameriano’ L. ‘Caipira’ + L. ‘Volkameriano’ L. ‘Caipira’ + L. ‘Rugoso’ L. ‘Cravo’ + T. ‘Sunki’ L. ‘Ruby Blood’ + L. ‘Volkameriano’ L. ‘Rohde Red’ + L. ‘Volkameriano’</p>
Intolerante	<p>L. azeda T. ‘Cleópatra’ + L. azeda L. ‘Valência’ + <i>Fortunella obovata</i></p>

Figura 13 - Classificação de porta-enxertos e híbridos somáticos de citros quanto à tolerância e intolerância ao vírus da tristeza dos citros (CTV). USP/ESALQ, Piracicaba-SP, 2004

Os resultados obtidos nesse trabalho foram de acordo com a literatura. Ocorreu forte amarelecimento das folhas novas e formação de folhas pequenas, que geralmente ficam retorcidas três meses após a enxertia. Em casos mais severos, o crescimento é quase paralisado, observando-se definhamento da planta infectada (Oberholzer, 1947; Grant & Costa, 1949; Costa et al., 1954a; McClean, 1960).

Enxertos de laranja ‘Valência’ sobre a laranja azeda, realizados com borbulhas de plantas localizadas no campo, principiavam sintomas de declínio de um a três meses após a realização da enxertia (Oberholzer, 1947). Grant & Costa (1949), demonstraram que o broto do enxerto proveniente de borbulhas portadoras do CTV, da cultivar Barão sobre o porta-enxerto laranja azeda, era, a princípio, aparentemente sadio, mas já começava a demonstrar sintomas de tristeza cerca de três meses após a enxertia.

Com relação aos híbridos somáticos que demonstraram intolerância ao CTV, provavelmente o híbrido laranja ‘Valência’ + *Fortunella obovata* foi intolerância ao vírus devido a parental *Fortunella* sp., uma vez que híbridos de *Fortunella* sp. apresentam intolerância ao CTV (Bennet & Costa, 1949). Com relação ao híbrido tangerina ‘Cleópatra’ + laranja azeda, a possibilidade de ter ocorrido à intolerância desse híbrido ao CTV, possivelmente é devido ao parental laranja azeda, classificado como intolerante. Vale ressaltar que nem todos híbridos somáticos que possuem como um dos parentais a laranja azeda é sempre intolerante ao CTV, uma vez que os híbridos somáticos laranja azeda + citrange Carrizo, laranja azeda + limão ‘Volkameriano’ e laranja azeda + limão ‘Cravo’ foram tolerância ao vírus da tristeza, porém, para o híbrido laranja azeda + ‘Fly Dragon’, houve susceptibilidade ao CTV, apesar do *Poncirus trifoliata* ‘Fly Dragon’ ser tolerante ao vírus (Grosser & Chandler, 2000; Grosser et al., 1996; Grosser et al., 1998a).

5 CONCLUSÕES

1) No enraizamento das estacas, os híbridos laranja 'Caipira' + tangerina 'Cleópatra', laranja 'Caipira' + limão 'Volkameriano', limão 'Cravo' + tangerina 'Sunki' e laranja 'Rohde Red' + limão 'Volkameriano' foram os que apresentaram melhores resultados;

2) Para o crescimento e desenvolvimento das estacas, os híbridos laranja 'Caipira' + limão 'Volkameriano' e laranja 'Rohde Red' + limão 'Volkameriano' foram os que apresentaram melhor desenvolvimento;

3) Os híbridos somáticos tangerina 'Cleópatra' + laranja azeda, limão 'Cravo' + tangerina 'Sunki', tangerina 'Cleópatra' + limão 'Volkameriano', laranja 'Ruby Blood' + limão 'Volkameriano', laranja 'Rohde Red' + limão 'Volkameriano' e laranja 'Caipira' + limão 'Volkameriano' foram satisfatórios em relação à resistência a podridão do tronco ocasionada por *Phytophthora nicotianae*;

4) Os híbridos somáticos tangerina 'Cleópatra' + limão 'Volkameriano', tangerina 'Cleópatra' + laranja azeda, laranja 'Caipira' + limão 'Volkameriano' e laranja 'Caipira' + limão 'Cravo' apresentaram tolerância a podridão das raízes e radículas ocasionado por *Phytophthora nicotianae*;

5) Apenas os híbridos tangerina 'Cleópatra' + laranja azeda e laranja 'Valência' + *Fortunella obovata* apresentaram intolerância ao vírus da tristeza dos citros.

ANEXO

ANEXO A**Composição dos fertilizantes utilizados nas adubações****1. Nitrato de cálcio**

N	15,5%
Ca	19,0%

2. Kristalon Hydro™

N	20,0%
P ₂ O ₅	8,0%
K ₂ O	8,0%
MgO	2,0%
B	0,025%
Cu	0,01%
Fe	0,07%
Mn	0,04%
Mo	0,004%
Zn	0,025%

3. Tenso Iron Hydro™

Fe	6,0%
----	------

Composição do adubo de liberação lenta Osmocote (22-04-08)

N	22,0%
P ₂ O ₅	4,0%
K ₂ O	8,0%
Mg	0,25%
S	3,0%
B	0,02%
Cu	0,05%
Fe	1,0%
Mo	0,001%
Zn	0,05%

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE CITROS - ABECITRUS.
www.abecitrus.com.br (17 out. 2004).

AFEK, U.; SZTEJNBERG, A. A rapid method for evaluating citrus seedlings for resistance to foot rot caused by *Phytophthora citrophthora*. **Plant Disease**, v.74, p.66-68, 1990.

AGUILAR-VILDOSO, C.I.; POMPEU JÚNIOR, J. Inoculação de *Phytophthora parasitica* em caules de variedades cítricas pelo método do palito. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.240, 1997.

ALVARENGA, A.A. **Substâncias de crescimento e regulação do desenvolvimento vegetal**. Lavras: UFLA, 1990. 59p.

ALVARENGA, L.R. de; CARVALHO, V.D. de. Uso de substâncias promotoras de enraizamento de estacas frutíferas. **Informe Agropecuário**, v.9, n.101, p.47-55, maio 1983.

AMARO, A.A.; MAIA, M.L. Produção e comércio de laranja e de suco no Brasil. **Informações Econômicas**, v.27, n.7, p.11-23, 1997.

- AMORIM, E.P.R. Controle biológico de *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* Dastur e *Phytophthora citrophthora* (Smith & Smith) Leonian em plântulas de citros. Botucatu, 1997. 111p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.
- ANDRADE, R.A. de; MARTINS, A.B.G. Propagação vegetativa de porta-enxertos para citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, n1, p.134-136, abr. 2003.
- ARAÚJO, J.R.G. Caracterização química, bioquímica e horticultural de microtangerinas (*Citrus* spp.), de valor potencial como porta-enxertos. Botucatu, 1998. 155p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.
- BAR-JOSEPH, M.; ROISTACHER, C.N.; GARNSEY, S.M.; GUMPF, D.J. A review on tristeza, an ongoing threat to citriculture. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 5., Tokyo, 1981. **Proceedings**. Okitsu: International Society of Citriculture, 1982. v.1, p.419-423.
- BAR-JOSEPH, M.; GARNSEY, S.M.; GONSALVES, D.; MOSCOVITZ, M.; PURCIFULL, D.E.; CLARK, M.F.; LOEBENSTEIN, G. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of citrus tristeza virus. **Phytopathology**, v.69, n.2, p.190-194, 1979.
- BARRETT, H.C.; RHODES, A.M. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. **Systematic Botany**, v.1, p.105-136, 1976.
- BARTNICKI-GARCIA, S.; WANG, M.C. Biochemical aspects of morphogenesis in *Phytophthora*. In: ERWIN, D.C.; BARTNICKI-GARCIA, S.; TSAO, P.H. (Ed.). **Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology**. St. Paul: APS Press, 1983. p.121-137.

- BENGOCHEA, T.; DODDS, J.H.A. **Plant protoplast**: a biotechnological tool for plant improvement. Cambridge: Capman & Hall, 1986. 90p.
- BENNETT, C.W.; COSTA, A.S. Tristeza disease of citrus. **Journal of Agricultural Research**, v.78, n.8, p.207-237, 1949.
- BERNARDO, S. **Manual de Irrigação**. 4. ed. Viçosa: UFV, 1986. 488p.
- BINSFELD, P.C. Transferência genômica parcial. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n.8, p.86-88, 1999.
- BOAVA, L.P.; SIVIERO, A.; MASUDA, Y.; FURTADO, E.L.; MACHADO, M.A. Resistência de citrandarins e citranges a *Phytophthora parasitica*. **Laranja**, v.24, n.1, p.135-144, 2003.
- BOAVENTURA, P.R.R.; QUAGGIO, J.A.; ABREU, M.F.; BATAGLIA, O.C. Balanço de nutrientes na produção de mudas cítricas cultivadas em substrato. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, n.2, p.300-305, ago. 2004.
- BORDIGNON, R.; MEDINA FILHO, H.P.; MÜLLER, G.W.; SIQUEIRA, W.J. A tristeza dos citros e suas implicações no melhoramento genético de porta-enxertos. **Bragantia**, v.62, n.3, p.345-355, 2003.
- BROADBENT, P. Observation on the mode of infection of *Phytophthora citrophthora* in resistant and susceptible citrus rootstocks. In: PROCEEDINGS OF FIRST INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., Riverside, 1969. **Proceedings**. Riverside: USDA, 1969. p.1207-1210.

- BROADBENT, P. *Phytophthora* diseases of citrus: a review. **Proceedings of International Society of Citriculture**, v.3, p.986-992, 1977.
- BROADBENT, P.; GOLLNOW, B.I. Selecting disease-tolerant citrus rootstocks for Australia. **Proceedings of International Society of Citriculture**, v.2, p.758-764, 1992.
- CARLOS, E.F.; STUCCHI, E.S.; DONADIO, L.C. **Porta-enxertos para a Citricultura Paulista**. Jaboticabal: Funep, 1997. 47p. (Boletim Citrícola n. 1/1997).
- CARNEIRO, V.T.C.; CONROI, T.; BARROS, L.M.G.; MATSUMOTO, K. Protoplastos: cultura e aplicações. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1999. p.413-458.
- CARPENTER, J.B.; FURR, J.R. Evaluation of tolerance to root rot caused by *Phytophthora parasitica* in seedlings of *Citrus* a related genera. **Phytopathology**, v.52, p.1277-1285, 1962.
- CARREIRA, C. **Informe preliminar sobre una enfermedad nueva comprobada en los citrus de Bella Vista (Corrientes)**. Buenos Aires: Ministério de Agricultura, 1933. p.275-280. (Boletín Mensual, 34).
- CARVALHO, M.R.T. de. Reação de porta-enxertos híbridos de citros à infecção de tronco e raízes por *Phytophthora parasitica*. Campinas, 2000. 87 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
- CARVALHO, S.A.; BAPTISTA, C.R.; MÜLLER, G.W.; SILVERIO, J.L. Caracterização biológica de isolados do vírus da tristeza dos citros. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, n.1, p.79-84, 1997.

- CASTLE, W.S.; TUCKER, D.P.H.; KREZDORN, A.H.; YOUTSEY, C.O. **Rootstocks for Florida citrus: rootstocks selection – the first step to success.** 2. ed. Lake Alfred: University of Florida, 1993. 92p.
- COFFIN, R.S.; COUTTS, R.H.A. The clostero-viruses, capilloviruses and other similar viruses: a short review. **Journal of General Virology**, v.74, p.1475-1483, 1993.
- COSTA, A.S. Present status of the tristeza disease of citrus in South America. **F.A.O. Plant Protection Bulletin**, v.4, p.97-105, 1956.
- COSTA, A.S.; GRANT, T.J.; MOREIRA, S. Behavior of various citrus rootstock scion combination following inoculation with mild and severe strains of tristeza virus. **Proceedings of Florida State Horticultural Science**, v.67, p.26-30, 1954a.
- COSTA, A.S.; GRANT, T.J.; MOREIRA, S. Reação da laranja Azeda à tristeza. **Bragantia**, v.13, n.17, p.199-217, 1954b.
- COSTA, M.A.P. de C.; MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, F. de A.A. Somatic hybridization for improvement of citrus rootstock: production of five new combinations with potential for improved disease resistance. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.43, p.1151-1156, 2003.
- CRISTOFANI, M. Mapas de ligação de *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. cv. Rubidoux e localização do gene de resistência ao vírus da tristeza. Piracicaba, 1997. 140p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

- CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A. Utilização de marcadores moleculares na identificação e determinação da freqüência de embriões zigóticos. **Laranja**, v.19, n.1, p.159-166, 1998.
- CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A.; GRATTAPAGLIA, D. Genetic linkage maps of *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. and mapping of citrus tristeza virus resistance gene. **Euphytica**, v.109, n.1, p.25 - 32, 1999.
- CUNHA SOBRINHO, A.P. da; SOARES FILHO, W.S.; PASSOS, O.S. **Porta-enxerto para citros**. Cruz das almas: EMBRAPA/CNPMPF, 1980. 9p. (EMBRAPA. Circular Técnica, 3).
- DAVINO, M.; GAMBERINI, O.; AREDDIA, R.; ALDARESI, S.F. Field effectiveness of fosetyl-Al against citrus root rot and Brown rot. **Bulletin OEPP**, v.20, p.133-137, 1990.
- DAVIS, F.; ALBRIGO, L. **Citrus**. Wallingford: CAB International, 1994, 245p.
- DESJARDINS, P.R.; WALLACE, J.M.; LANGUE, C.T.; DRAKE, R.J. The suppression of tristeza virus symptoms in Mexican lime seedlings by heat treatment. **Plant Disease**, v.41, p.230, 1957.
- DUNIWAY, J.M. Role of physical factors in the development of *Phytophthora* diseases. In: ERWIN, D.C.; BARTNICKI-GARCIA, S.; TSAO, P.H. (Ed.). **Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology**. St. Paul: APS Press, 1983. p.175-187.
- ERWIN, D.C.; RIBEIRO, O.K. **Phytophthora diseases worldwide**. St. Paul: APS Press, 1996. 562p.

FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E.; FORTES, G.R. de L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2. ed. Pelotas: UFPel, 1995. 178p.

FAO. **FAOSTAT: STATISTICS DATABASE**. <http://apps.fao.org> (16 out. 2004).

FAWCETT, H.S. Gummosis on citrus. **Journal of Agricultural Research**, v.24, p.235-255, 1923.

FAWCETT, H.S.; BITANCOURT, A.A. Occurrence, pathogenicity and temperature relations of *Phytophthora* species on citrus in Brazil and other South American countries. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.11, p.107-119, 1940.

FEICHTENBERGER, E. Gomose de *Phytophthora* dos citros. **Laranja**, v.11, p.97-122, 1990a.

FEICHTENBERGER, E. Control of *Phytophthora* gummosis of citrus with systemic fungicides in Brazil. **Bulletin OEPP**, v.20, p.139-149, 1990b.

FEICHTENBERGER, E. **Manejo ecológico de gomose de *Phytophthora* dos citros**. São Paulo: Rhodia Agro, 1996. 41p.

FEICHTENBERGER, E. Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. In: LUZ, E.D.M.N.; SANTOS, A.F. dos; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J.L. **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Livraria Editora Rural, 2001. p.283-342.

FEICHTENBERGER, E.; ZENTMEYER, G.A.; MENGE, J.A. Identity of *Phytophthora* isolated from milkweed vine. **Phytopathology**, v.17, p.50-55, 1984.

FEICHTENBERGER, E.; MÜLLER, G.W.; GUIRADO, M. Doenças dos citros. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1997. p.261-296.

FEICHTENBERGER, E.; ROSSETTI, V.V.; POMPEU JÚNIOR, J.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; FIGUEIREDO, J. Evaluation of tolerance to *Phytophthora* species in scion rootstock combination of citrus in Brazil – A review. **Proceedings of International Society of Citriculture**, v.2, p.854-858, 1992.

FERREIRA, D.F. Análise estatística por meio do SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., São Carlos, 2000. **Anais**. São Carlos: UFSCar, 2000. p.255-258.

FERRI, C.P. Enraizamento de estacas de citrus. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.19, n.1, p.113-121, abr. 1997.

FIGUEIREDO, J.O. Variedades copa de valor comercial. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A.A. (Ed.). **Citricultura Brasileira**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v.1, p.228-264.

FIGUEIREDO, S.L.B.; KERSTEN, E.; SCHUCH, M.W. Efeito do estiolamento parcial e do ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento de estacas de goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg). **Scientia Agricola**, v.52, n.1, p.167-171, jan./abr. 1995.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual 2004**: anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo, 2004. p.241-283.

- FORNER, J.B.; FORNER-GINER, M.A. Programa de melhoramento de porta-enxertos cítricos na Espanha. In: DONADIO, L.C.; STUCHI, E.S. (Ed.). In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS, Melhoramento, 7., Bebedouro: EECB, 2002. p.82-95.
- FROST, H.B.; SOOST, R.K. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J. (Ed.). **The Citrus Industry**. Berkeley: University of California Press, 1968. v.2. p.290-324.
- FUNDECITRUS. **Fundo de Defesa da Citricultura**. www.fundecitrus.com.br (16 out. 2004a).
- FUNDECITRUS. **Revista do Fundecitrus**, v.123, p.12-13, jul./ago. 2004b.
- FURR, J.R.; CARPENTER, J.B. Program for breeding citrus rootstocks tolerant to *Phytophthora* root rot. **Proceedings of Florida State Horticultural Society** v.18, p.18-23, 1961.
- GIACOMETTI, D.C. Stem-pitting threat to Brazil citrus. **California Citrograph**, v.46, p.243-244, 1961.
- GIACOMETTI, D.C. Taxonomia das espécies cultivadas de citrus baseada em filogenética. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A.A. (Ed.). **Citricultura Brasileira**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v.1, p.99-115.
- GMITTER JUNIOR, F.G.; HU, X.L. The possible role of Yunnan, China, in the origin of contemporary *Citrus* species (Rutaceae). **Economic Botany**, v.44, p.267-277, 1990.

- GMITTER JUNIOR, F.G.; GROSSER, J.W.; MOORE, G.A. Citrus. In: HAMMERSCHLAG, F.A.; LITZ, R.E. (Ed.). **Biotechnology of perennial fruit crops**. Cambridge: University Press, 1992. cap.14, p.335-369.
- GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. 14. ed. Piracicaba: USP/ESALQ, 2000. 477p.
- GRAHAM, J.H. Evaluation of tolerance of citrus rootstocks to *Phytophthora* root rot in chlamydospore-infested soil. **Plant Disease**, v.74, p.743-746, 1990.
- GRAHAM, J.H. Root regeneration and tolerance of citrus rootstocks to root rot caused by *Phytophthora nicotianae*. **Phytopathology**, v.85, n.1, p.111-117, 1995.
- GRAHAM, J.H.; TIMMER, L.W. *Phytophthora* disease of citrus. In: KUMMER, J. (Ed.). **Plant diseases of international importance**. New Jersey: Prentice-Hall, 1992. v.3, p.205-269.
- GRAHAM, J.H.; CASTLE, W.S. Screening of citrus genotypes for tolerance to *Phytophthora* root rot in chlamydospore-infested soil. In: CONGRESS INTERNATIONAL OF SOCIETY OF CITRUS NURSERMEN, 4., Johannesburg, 1993. **Proceedings**. Johannesburg: ISCN, 1993. p.307-315.
- GRANT, T.J.; COSTA, A.S. A progress reports on studies of tristeza disease of citrus in Brazil. 1. Behavior of 2 number of varieties as stocks for sweet orange and grapefruit, and a scions over sour orange rootstocks, when inoculated with the tristeza virus. **Proceedings of Florida State Horticultural Society**, v.61, p.20-33, 1949.
- GRANT, T.J.; COSTA, A.S. A mild strain of the tristeza virus of citrus. **Phytopathology**, v.41, n.2, p.114-122, 1951.

- GRIMM, G.R.; ALEXANDER, A.F. Citrus leaf pieces as traps for *Phytophthora parasitica* from soil slurries. **Phytopathology**, v.63, p. 540-541, 1973.
- GRIMM, G.R.; HUTCHISON, D.J. A procedure for evaluating resistance of citrus seedlings to *Phytophthora parasitica*. **Plant Disease**, v.57, n.8, p.669-672, 1973.
- GROSSER, J.W. Tissue culture e biotechnology: additional research tools for citrus improvement. In: REUTHER, W.; CALAVAN, E.C.; CARMAN, G.E. (Ed.). **The Citrus Industry**. Berkeley: University of California Press, 1985. v.5. p.35-36.
- GROSSER, J.W. Citrus scion and rootstock improvement via somatic hybridization. **Acta Horticulturae**, n.336, p.297-305, 1993.
- GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G. Protoplast fusion and citrus improvement. **Plant Breeding Reviews**, v.8, p.339-374, 1990a.
- GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G. Somatic hybridization of *Citrus* with wild relatives for germplasm enhancement and cultivar development. **HortScience**, v.25, n.2, p.147-151, 1990b.
- GROSSER, J.W.; CHANDLER, J.L. Somatic hybridization of high yield, cold-hardy and disease resistant parent for citrus rootstock improvement. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v.75, n.6, p.641-644, 2000.
- GROSSER, J.W.; CHANDLER, J.L. Hibridação somática no melhoramento de porta-enxertos para citros. In: DONADIO, L.C.; STUCHI, E.S. (Ed.). In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS, Melhoramento, 7., Bebedouro: EECB, 2002. p.141-147.

- GROSSER, J.W.; GARNSEY, S.M.; HALLIDAY, C. Assay of sour orange somatic hybrid rootstocks for quick-decline disease caused by citrus tristeza virus. **Proceedings of International Society of Citriculture**, v.1, p.353-359, 1996.
- GROSSER, J.W.; OLLITRAUT, P.; OLIVARER-FUSTER, O. Somatic hybridization in *Citrus*: an effective tool to facilitate variety improvement. In **Nitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.36, p.434-449, 2000.
- GROSSER, J.W.; LOUZADA, E.S.; GMITTER JUNIOR, F.G.; CHANDLER, J.L. Somatic hybridization of complementary citrus rootstocks: five new hybrids. **HortScience**, v.29, n.7, p.812-813, 1994.
- GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G.; CASTLE, W.S.; CHANDLER, J.L. Production and evaluation of citrus somatic hybrid rootstocks: progress report. **Proceedings of Florida State Horticultural Society**, v.108, p.140-143, 1995.
- GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G.; CASTLE, W.S.; CHANDLER, J.L. Somatic hybridization: a new approach to citrus rootstock improvement. **Fruits**, v.53, n.5, p.331-334, 1998a.
- GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G.; SESTO, F.; DENG, X. X.; CHANDLER, J. L. Six new somatic citrus hybrids and their potential for cultivar improvement. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 117, n. 1, p. 169-173, 1992.
- GROSSER, J.W.; JIANG, J.; LOUZADA, E.S.; CHANDLER, J.L.; GMITTER JUNIOR, F.G. Somatic hybridization, an integral component of citrus cultivar improvement: II. Rootstock improvement. **HortScience**, v.33, n.6, p.1060-1061, 1998b.

- GROSSER, J.W.; JIANG, J.; MOURÃO FILHO, F. de A.A.; LOUZADA, E.S.; BAERGEN, J.L.; CHANDLER, J.L.; GMITTER JUNIOR, F.G. Somatic hybridization, an integral component of citrus cultivar improvement: I. Scion improvement. **HortScience**, v.33, n.6, p.1057-1059, 1998c.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JUNIOR, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 7. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 880p.
- HAISSIG, B.E.; REIMENSCHNEIDER, E.D. Genetic effects on adventitious rooting. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKLHA, N. (Ed.). **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Discorides Press, 1988. p.47-60.
- HENDERSON, C.T.; HUTCHISON, D.J.; GARNSEY, S.M. Rapid production of zoospores of *Phytophthora parasitica* for citrus germless screening. **Phytopathology**, v.76, p.1143, 1986.
- HODGSON, R.W. Horticultural varieties of *Citrus*. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California Press, 1967. v.1. p.431-591.
- HOWARD, B.H.; HARRISON-MURRAY, R.S.; MALKEZIE, K.A.D. Rooting responses to wounding winter cutting of M-26 apple rootstock. **Journal of Horticulture Science**, v.59, n.2, p.131-139, Apr. 1984.
- HUME, H.H. **A cultura das plantas cítricas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1952. 562p.
- JANICK, J.A. **A ciência da horticultura**. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1966. 485p.

- KAOSIRI, T.; ZENTMEYER, G.A.; ERWIN, D.C. Stalk length as a taxonomic criterion for *Phytophthora palmivora* isolate from cacao. **Canadian Journal of Botanic**, v.56, p.1730-1738, 1978.
- KARASEV, A.V.; BOYKO, V.P.; GOWDA, S.; NIKOLAEVA, O.V.; HILF, M.E.; KOONIN, E.V.; NIBLETT, C.L.; CLINE, K.; GUMPF, D.J.; LEE, R.F.; GARNSEY, S.M.; LEWANDOWSKI, D.J.; DAWSON, W.O. Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome. **Virology**, v.208, p.511-520, 1995.
- KITAJIMA, E.W.; SILVA, D.M.; OLIVEIRA, A.R.; MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S. Electron microscopial investigations of tristeza. In: CONFERENCE OF INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 3., Gainesville, 1965. **Proceedings**. Gainesville: International Organization of Citrus Virologists, 1965. p.1-9.
- KLOTZ L.J.; FAWCETT, H.S. The relative resistance of varieties and species of citrus to *Pythiacystis* gummosis and other bark diseases. **Journal of Agricultural Research**, v.2, p.415-425, 1930.
- KLOTZ, L.J.; De WOLFE, T.A.; WONG, P.P. Influence of two varieties of citrus scions on the pathogenic of three isolates *Phytophthora parasitica* to sweet orange rootstocks. **Phytopathology**, v.58, p.520-521, 1958.
- KOLLER, L.; SOPRANO, E. Porta-enxertos para citros em Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, p.523-528, 1992.
- KUNITAKE, H.; MII, M. Somatic embryogenesis in *Citrus* species. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Somatic embryogenesis and syntetic seed**. I. Berlin: Springer-Verlag, 1995. cap.3, p.280-298.

- LEE, R.F.; BAKER, P.S.; ROCHA-PEÑA, M.A. **The Citrus Tristeza Virus (CTV)**. Ascot: International Institute of Biological Control, 1994. 145p.
- LI, K.B.; YONG, S.; WU, R.J.; XU, J.; KE, C. The purification of citrus tristeza virus. **Virologia Sinica**, v.5, n.3, p.312-316, 1990.
- LING, J.T.; NITO, N.; IWAMASSA, M.; KUNITAKE, H. Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic callus of Satsuma. *Alexandria*, v.25, n.8, p.970-972, 1990.
- LOUZADA, E.S.; GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G.; NIELSEN, B.; CHANDLER, J.L.; DENG, X.X.; TUSA, N. Eight new somatic hybrids citrus rootstocks with potential for improvement disease resistance. **HortScience**, v.27, n.9, p.1033-1036, 1992.
- LUTZ, A.; MENGE, J.A. Population fluctuations and the numbers and types of propagules of *Phytophthora parasitica* that occur in irrigated citrus groves. **Plant Disease**, v.75, p.173-179, 1991.
- LUZ, E.D.M.N.; MATSUOKA, K. *Phytophthora*: fungo, protista ou chromista? In: LUZ, E.D.M.N.; SANTOS, A.F. dos; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J.L. **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Livraria Editora Rural, 2001. p.1-22.
- MACHADO FILHO; J.A.; SIQUEIRA, D.L. de; SALOMÃO, L.C.C.; PEREIRA, W.E. **Características dos principais porta-enxertos de citros**. Viçosa: Pró-Reitoria de Extensão e Cultura, 2003. 22p. (UFV. Boletim de extensão, 45).

- MATHERON, M.E.; WRIGHT, G.C.; PORCHAS, M. Resistance to *Phytophthora citrophthora* and *Phytophthora parasitica* and nursery characteristics of several citrus rootstocks. **Plant Disease**, v.82, n.11, p.1217-1225, 1998.
- McCLEAN, A.P.D. Seedling yellow in South African citrus trees. **African Journal Agricultural Science**, v.3, p.259-279, 1960.
- MEDINA FILHO, H.P.; BORDIGNON, R.; SIQUEIRA, W.J.; FEICHTENBERGER, E.; CARVALHO, M.R.T. Tolerância de híbridos e de clones de porta-enxertos de citros à infecção de raízes por *Phytophthora nicotianae*. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.2, p.169-178, mar./abr. 2004.
- MEDINA FILHO, H.P.; BORDIGNON, R.; SIQUEIRA, W.J.; FEICHTENBERGER, E.; CARVALHO, M.R.T.; TEÓFILO SOBRINHO, J. Resistência de clones e híbridos de porta-enxertos de citros à gomose de tronco causada por *Phytophthora parasitica*. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, n.5, p.534-540, set./out. 2003.
- MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, F. de A.A.; FARIAS, P.C. de M.; BENEDITO, V.A. Citrus somatic hybridization with potential for improved blight and CTV resistance. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.37, p.490-495, 2001.
- MENDES DA GLÓRIA, F.J.; MOURÃO FILHO, F. de A.A.; MENDES, B.M.J. Plant regeneration from protoplast of brazilian citrus cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.4, p.727-732, 2000.
- MENEGHINI, M. Sobre a natureza e transmissibilidade da doença “tristeza” dos citros. **O Biológico**, v.12, p.285-287, 1946.

- MITCHELL, D.J.; KANNWISCHER-MITCHELL, M.E. *Phytophthora*. In: SINGLETON, L.L.; MIHAIL, J.D.; RUSH, C.M. (Ed.). **Methods for research on soil borne phytopathogenic fungi**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1993. p.31-38.
- MOREIRA, S. Observação sobre a tristeza dos citros ou podridão das radículas. **O Biológico**, v.8, p.269-272, 1942.
- MOREIRA, S. Um novo problema para nossa citricultura. **Revista de Agricultura**, v.35, n.2, p.77-81, 1960.
- MOREIRA, S. Histórico da citricultura no Brasil. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F. (Ed). **Citricultura Brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1980. v.1, p.1-28.
- MOREIRA, S.; COSTA, A.S.; GRANT, T.J. Conhecimentos atuais sobre a tristeza dos citros. **Revista de Agricultura**, v.24, n.11-12, p.335-345, 1949.
- MOREIRA, S.; COSTA, A.S.; GRANT, T.J. Métodos para identificação e controle da tristeza dos citros. **Bragantia**, v.13, n.19, p.223-237, 1954.
- MOTOMURA, T.; HIDAKA, T.; MORIGUCHI, T.; AKIHAMA, T.; OMURA, M. Intergeneric somatic hybrids between *Citrus* and *Atalantia* or *Severinia* by eletrofusion and recombination of mitochondrial genomes. **Breeding Science**, v.45, p.309-314, 1995.
- MOURÃO FILHO, F. de A.A. Produção de híbridos somáticos em citros. **Laranja**, v.17, n.1, p.179-197, 1996.

- MOURÃO FILHO, F. de A.A.; MENDES, B.M.J. Hibridação somática para melhoramento de porta-enxertos em São Paulo. In: DONADIO, L.C.; STUCHI, E.S. (Ed.). In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS, Melhoramento, 7., Bebedouro: EECB, 2002. p.134-140.
- MOURÃO FILHO, F. de A.A.; GROSSER, J.W.; GMITTER JUNIOR, F.G. New tetraploid breeding parents for triploid seedless *Citrus* cultivar development. **Fruit Varieties Journal**, v.50, p.76-80, 1996.
- MOURÃO FILHO, F. de A.A.; MENDES, B.M.J.; DONADIO, L.C. Citros. In: BRUCKNER, C.H. (Ed.). **Melhoramento de fruteiras tropicais**. Viçosa: UFV, 2002. cap.6, p.177-224.
- MÜLLER, G.W. A tristeza dos citros. **Summa Phytopathologica**, v.2, p.245-263, 1976.
- MÜLLER, G.W. Moléstia de vírus e micoplasma de citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F. (Ed). **Citricultura Brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1980. v.2, p.565-607.
- MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S.; POMPEU JÚNIOR, J. Importância do porta-enxerto em relação à tristeza e outras moléstias dos citros no Brasil. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS, 1., Bebedouro: EECB, 1990. p.223-231.
- MÜLLER, G.W.; CARVALHO, S.A.; GUIRADO, N. Indexação para viroses das matrizes de citros do Centro de Citricultura Sylvio Moreira – xiloporose. **Laranja**, v.15, n.2, p.213-220, 1994.
- NEVES, E.M. **Competitividade da Agroindústria citrícola brasileira**: vantagens comparativas e o dilema das barreiras comerciais. Piracicaba: ESALQ, 1996. 125p. (Relatório de Pesquisa para CNPq).

- NEVES, E.M.; BOTEON, M. Impactos alocativos distributivos na citricultura. **Preços Agrícolas**, n.136, p.3-6, 1998.
- NEVES, E.M.; DAYOUB, M.; DRAGONE, D.S.; NEVES, M.F. Citricultura brasileira: efeitos econômicos-financeiros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, n.2, p.432-436, ago. 2001.
- NICOLOSI, E.; DENG, Z.N.; GENTILE, A.; LA MALFA, S.; CONTINELLA, G.; TRIBULATO, E. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.100, p.1155-1166, 2000.
- NORMAN, P.A.; SUTTON, R.A.; SELHIME, A.G. Further evidence that tristeza virus is transmitted semi persistently by the melon aphid. **Journal Economy Entomology**, v.65, p.593-594, 1972.
- OBERHOLZER, P.C.J. Bitter-Seville rootstock problem. **Farming in South Africa**, v.22, p.489-495, 1947.
- OHGAWARA, T.; KOBAYASHI, S. Application of protoplast fusion to *Citrus* breeding. **Food Biotechnology**, v.5, n.2, p.169-184, 1991.
- OHGAWARA, T.; KOBAYASHI, S.; OHGAWARA, E.; UCHIMIYA, H.; ISHII, S. Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.71, p.1-4, 1985.

- OLIC, F.B.; MOURÃO FILHO, F. de A.A.; GRAF, C.C.D.; GIRARDI, E.A.; SALVO, J.G.; COELHO, R.D. Vegetative growth of containerized citrus nursery trees subjected to five levels of irrigation. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF CITRUS NURSERYMEN, 6., Ribeirão Preto, 2001. **Proceedings**. Ribeirão Preto: SBF, 2001. p.131-133.
- OLLITRAULT, P.; DAMBIER, D.; FROELICHER, Y.; BAKRY, F.; AUBERT, B. Rootstock breeding strategies for the mediterranean citrus industry: the somatic hybridization potential. **Fruits**, v.53, n.5, p.335-344, 1998.
- PASQUAL, M.; CHALFUN, N.N.J.; RAMOS, J.D.; VALE, M.R. do; SILVA, C.R. de. R. e. **Fruticultura Comercial**: Propagação de plantas frutíferas. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 137p.
- PERMAR, T.A.; GARNSEY, S.M. Comparison of biological indexing and immunological assays for identifying severe Florida isolates of citrus tristeza virus. In: CONFERENCE OF INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 11., Riverside, 1991. **Proceedings**. Riverside: International Organization of Citrus Virologists, 1991. p.56-59.
- PIO, R. Ácido indolbutírico e sacarose no enraizamento de estacas apicais e desenvolvimento inicial da figueira (*Ficus carica* L.). Lavras, 2002. 109p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras.
- PIO, R.; RAMOS, J.D.; GONTIJO, T.C.A.; CARRIJO, E.P.; COELHO, J.H.C.; ALVARES, B.F.; MENDONÇA, V. Enraizamento de estacas dos porta-enxertos de citros 'Fly Dragon' e 'Trifoliata'. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.8, n.3, p.195-198, set./dez. 2002.

- PLATT, R.G.; OPTIZ, K.W. Propagation of Citrus. In: REUTHER, W. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California Press, 1973. v.3. p.1-47.
- POMPEU JÚNIOR, J. Porta-enxertos. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A.A. (Ed.). **Citricultura Brasileira**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v.1, p.265-280.
- POMPEU JÚNIOR, J.; FIGUEIREDO, J.O.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; JORGE, J.P.N.; JACON, J.R. Competição de clones de limão 'Cravo' e de limão 'Volkameriano' como porta-enxertos para laranja 'Natal'. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 8., Brasília, 1986. **Anais**. Brasília: SBF, 1986. p.147-151.
- PRATI, P.; MOURÃO FILHO, F. de A.A.; DIAS, C.T. dos S.; SCARPARI FILHO, J.A. Estaquia semi-lenhosa: um método rápido e alternativo para a produção de mudas de lima ácida 'Tahiti'. **Scientia Agricola**, v.56, n.1, p.185-190, 1999.
- RETUERMA, M.L.; PRICE, W.C. Evidencia de que el virus tristeza es transmitido por estilete. **Boletim Fitossanitário de la FAO**, v.20, n.5, p.111-114, 1972.
- RIBEIRO, O.K. Physiology of asexual sporulation and spore germination in *Phytophthora*. In: ERWIN, D.C.; BARTNICKI-GARCIA, S.; TSAO, P.H. (Ed.). **Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology**. St. Paul: APS Press, 1983. p.55-70.
- RIBEIRO, O.K.; BAUMER, J.S. Techniques for sporangia production of *Phytophthora megasperma* isolates. **Phytophthora Newsletter**, v.5, p.42-43, 1977.

- ROCHA, A.C. da; TAVARES, E.D.; SANDRINI, M.; CARVALHO, S.A. de; SILVA, L.F.C. da. Propagação de três espécies de citros através do enraizamento de estacas verdes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.10, n.2, p.31-33, 1988.
- RONDÓN, A.; HUNG, G.; REYES, F.; SOLORZANO, R. Reacción de patrones cítricos a *Phytophthora nicotianae* B. de Haan. var. *parasitica* (Dastur) Waterh., en condiciones de umbráculo. **Agronomia Tropical**, v.43, p.117-125, 1993.
- ROSSETTI, V.V. Estudos sobre a “gomose de *Phytophthora*” dos citros: I. suscetibilidade de diversas espécies cítricas a algumas espécies de *Phytophthora*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.18, p.97-124, 1947.
- ROSSETTI, V.V. **Manual ilustrado de doenças dos citros**. Piracicaba: FEALQ/Fundecitrus, 2001. 207p.
- ROSSETTI, V.V.; BITANCOURT, A.A. Estudos sobre a gomose de *Phytophthora* dos citros II: Influência do estado de vegetação do hospedeiro nas lesões experimentais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.20, p.73-94, 1951.
- SALGADO, C.L.; AMORIM, L. Sintomatologia. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Ceres, 1995. v.1, p.212-223.
- SALIBE, A.A. Importância do porta-enxerto na citricultura. In: ENCONTRO NACIONAL DE FRUTICULTURA, 5., Rio de Janeiro, 1975. **Anais**. Rio de Janeiro: PESAGRO-RIO/SBF, 1975. 14p.
- SAMPAIO, V.R.; BARBIN, D.; SOBRINHO, J.T.; POMPEU JÚNIOR, J. Alporquia em *Citrus sinensis* Osbeck. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 4., Salvador, 1977. **Anais**. Salvador: SBF, 1977. p.169-176.

SANTOS, R. de F.A. dos; VILLAS BOAS, R.M.F.; SALIBE, A.A. Estudos sobre o enraizamento de estacas de citros com aplicação de agentes de efeito hormonal. . In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9., Campinas, 1987. **Anais**. Campinas: SBF, 1987. v.1, p.387-393.

SCHNEIDER, H. The anatomy of tristeza virus infected citrus. In: WALLACE, J.W. (Ed.). **Citrus Virus Diseases**. California: Barkeley, 1951. p.73-84.

SCORA, R.W. On the history and origin of Citrus. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v.102, p.369-375, 1975.

SCORA, R.W.; KUMAMOTO, J.; SOOST, R.K.; NAUER, E.M. Contribution to the origin of the grapefruit, *Citrus paradisi* (Rutaceae). **Systematic Botany**, v.7, p.170-177, 1982.

SCOTT, A.J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v.30, p.507-512, Sept. 1974.

SIMÃO, S. **Tratado de Fruticultura**. Piracicaba: FEALQ, 1998. 760p.

SMITH, G.S., HUTCHISON, D.J.; HENDERSON, T. Screening sweet orange citrus cultivars for relative susceptibility to *Phytophthora* foot rot. **Proceedings Florida State Horticultural Society**, v.110, p.64-66, 1987.

SMITH, R.C.; POKORNY, F. **A physical characterization of some potting substrates in commercial nurseries**. s.l., s.p., 1977, 8p.

- SIVIERO, A. Avaliação de métodos de inoculação de *Phytophthora parasitica* e mapeamento de QTLs de resistência em híbridos de *Citrus sunki* x *Poncirus trifoliata* à gomose. Botucatu, 2001. 114p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.
- SIVIERO, A.; FURTADO, E.L.; MACHADO, M.A. Métodos de inoculação e avaliação de doenças causadas por *Phytophthora* em citros. **Laranja**, v.23, n.1, p.203-219, 2002a.
- SIVIERO, A.; FURTADO, E.L.; BOAVA, L.P.; BARBASSO, D.V.; MACHADO, M.A. Avaliação de métodos de inoculação de *Phytophthora parasitica* em plântulas e plantas jovens de citros. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, n.6, p. 574-580, 2002b.
- SOOST, R.K.; CAMERON, J.W. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Ed.). **Advances in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1975. p.507-540.
- STOLZY, L.H.; LETEY, J.; KLOTZ, L.J.; LABANAUSKAS, C.K. Water and aeration as factors in root decay of *Citrus sinensis*. **Phytopathology**, v.55, p.270-275, 1965.
- SWINGLE, W.T.; REECE, P.C. The botany of citrus and its wild relatives. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California Press, 1967. v.1. p.190-430.
- TIMMER, L.W.; MENGE, J.A. *Phytophthora* induced disease. In: WHITESIDE, J.O.; GARNSEY, S.M.; TIMMER, L.W. (Ed.). **Compendium of citrus diseases**. St. Paul: APS Press, 1989. p.22-24.

- TIMMER, L.W.; AGOSTINI, J.P.; GRAHAM, J.N.; CASTLE, W.S. Relationship of citrus rootstock to *Phytophthora* root rot and populations of *Phytophthora parasitica*. **Proceedings of International Society of Citriculture**, v.104, p.173-178, 1991.
- TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. 433p.
- TORREY, J.G. Endogenous and exogenous influences on the regulation of lateral root formation. In: JACKSON, M B. (Ed.). **New root formation in plants and cuttings**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1996. p.31-66.
- TSAO, P.H.; GARBER, M.J. Methods of soil infestation, watering and assessing degree of root infection for greenhouse in situ ecological studies with citrus *Phytophthora*. **Plant Disease**, v.44, n.6, p.710-715, 1960.
- TSAO, P.H.; OCANA, G. Selective isolation of species of *Phytophthora* from natural soils on an improved antibiotic medium. **Nature**, v.23, p.636-638, 1969.
- VARDI, A.; SPIEGEL-ROY, P. Plant regeneration from Citrus protoplasts: variability in methodological requirements among cultivars and species. **Theoretical and Applied Genetics**, v.62, p.171-176, 1982.
- VARDI, A.; GALUN, E. Isolation and culture of citrus protoplasts. In: BAJAJ, P.S. (Ed.). **Plant protoplasts and genetic engineering**. Berlin: Springer-Verlag, 1989. cap.2, p.147-159. (biotechnology in Agriculture and Forestry, 8).
- VARDI, A.; SPIEGEL-ROY, P.; GALUN, E. Citrus cell culture: isolation of protoplasts, plating densities, effect of mutagens and regeneration of embryos. **Plant Science Letters**, v.4, p.231-236, 1974.

VEIERSKOV, B. Relations between carbohydrates and adventitious root formation. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKLHA, N. (Ed.). **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Discorides Press, 1988. p.70-78.

VIÉGAS, F.C.P.; GUIMARÃES, J.A.B. Citrus fruit for processing in Brazil. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF FRUIT JUICE, 11., São Paulo, 1991. **Anais**. São Paulo: SBF, 1991. p.1-27.

WIDMER, T.L.; GRAHAM, J.H.; MITCHELL, D.J. Histological comparison of fibrous root infection of disease-tolerant and susceptible citrus hosts by *Phytophthora nicotianae* and *P. palmivora*. **Phytopathology**, v.88, p.389-395, 1998.

WUTSCHER, H.K. **Citrus rootstocks**. Lake Alfred: University of Florida, 1991. 15p.

ZAFARRI, G.R.; KOLLER, O.L.; STUKER, H. Efeito do ácido 2,4 diclorofenoxiacético e do ácido indolbutírico sobre o enraizamento de estacas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.15, n.2, p.39-44, ago. 1993.

ZITKO, S.E., TIMMER, L.W.; SANDLER, H.A. Isolation of *Phytophthora* pathogenic to citrus in Florida. **Plant Disease**, v.75, p.532-535, 1991.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)