



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

DIVERSIDADE GENÉTICA E FENOTÍPICA EM 'FLYING DRAGON' (*Poncirus trifoliata* var. *monstrosa* (T. Ito)) MICROPROPAGADO

LETICIA ZONTA BAPTISTA

**Araras
2023**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

DIVERSIDADE GENÉTICA E FENOTÍPICA EM 'FLYING DRAGON' (*Poncirus trifoliata* var. *monstrosa* (T. Ito)) MICROPROPAGADO

LETICIA ZONTA BAPTISTA

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIÂNGELA CRISTOFANI-YALY

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE EM PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

Araras

2023

Zonta Baptista, Leticia

Diversidade genética e fenotípica em 'Flying Dragon'
(Poncirus trifoliata var. monstrosa (T. Ito))
micropropagado / Leticia Zonta Baptista -- 2023.
74f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São
Carlos, campus Araras, Araras

Orientador (a): Mariângela Cristofani-Yaly

Banca Examinadora: Sinara Oliveira de Aquino, Paulo
Hercílio Viegas Rodrigues

Bibliografia

1. Micropropagação. 2. Fidelidade genética. I. Zonta
Baptista, Leticia. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Helena Sachi do Amaral - CRB/8
7083



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias

Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Leticia Zonta Baptista, realizada em 29/08/2023.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Mariângela Cristofani-Yaly (IAC)

Profa. Dra. Sinara Oliveira de Aquino (CTC)

Prof. Dr. Paulo Hercílio Viegas Rodrigues (ESALQ/USP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados.

AGRADECIMENTOS

Primeiro agradeço à Deus por ser a luz que me guia.

Aos meus pais, Celma e Leonel, pelo amor incondicional, pelo exemplo excepcional de educação, bondade e resiliência, pelas palavras de incentivo e por serem meu porto seguro.

À minha irmã, Cintia, pela torcida e parceria. E ao meu cunhado, Fabiano, pelas risadas.

Ao meu marido, Matheus, que aceitou a missão de trilhar a vida comigo durante a execução desse trabalho, sendo paz nos momentos de turbulência.

À minha orientadora Dra. Mariângela Cristofani-Yaly, na qual não teria realizado essa conquista. Por ter me incentivado e aceitado meu convite de orientação de maneira tão espontânea e compreendendo, com muita paciência, todas as dificuldades desse caminho.

Ao Dr. Rodrigo Latado pela disposição e ajuda na realização das análises.

À Silvia e Vitor Cicolin que me receberam com tanto carinho em seu viveiro e compartilharam seus conhecimentos inesgotáveis sobre citros. Muito obrigada por tudo o que vocês fizeram e ainda fazem por mim.

Aos companheiros de trabalho do Laboratório de Biotecnologia do Centro de Citricultura Sylvio Moreira – IAC, que sempre me fizeram sentir bem-vinda desde o primeiro momento, exemplos de companheirismo e dedicação.

À Eduarda Fischer, amiga que o mestrado me trouxe e esteve ao meu lado, sempre positiva e me incentivando.

À Universidade Federal de São Carlos – Campus Araras, ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados e aos Docentes por todo o conhecimento que me foi passado.

E por último à empresa Agromillora – Produção e Comércio de Mudanças Vegetais e aos colegas de trabalho pelo incentivo ao retorno à vida acadêmica, mesmo após tantos anos de formação.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	04
2.1 Objetivo geral.....	04
2.2 Objetivos específicos	04
3. REVISÃO DA LITERATURA	05
3.1 Os citros.....	05
3.2 Porta-enxerto ‘Flying Dragon’	06
3.3 Métodos de propagação de mudas cítricas.....	07
3.3.1 Propagação por sementes.....	07
3.3.2 Propagação por estaquia.....	08
3.3.3 Enxertia.....	09
3.3.4 Interenxertia.....	10
3.3.5 Subenxertia.....	11
3.3.6 Micropropagação.....	12
3.4 Variação somaclonal.....	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 Micropropagação.....	18
4.1.1 Fase 0: Planta fornecedora de material inicial.....	18
4.1.2 Fase I: Estabelecimento <i>in vitro</i>	19
4.1.3 Fase II: Multiplicação.....	20
4.1.4 Fase III: Aclimatização.....	20
4.2 Produção de porta-enxerto cítricos por semente.....	21
4.3 Caracterização morfológica.....	22
4.4 Caracterização genética.....	23
4.4.1 Marcador molecular SSR (<i>Simple Sequence Repeat</i>)	24
i. Extração de DNA.....	24
ii. Marcadores moleculares SSR.....	25

4.4.2	Citometria de fluxo.....	26
4.5	Análises estatísticas.....	26
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1	Caracterização morfológica.....	28
5.2	Caracterização genética.....	30
5.2.1	Marcador molecular SSR (<i>Simple Sequence Repeat</i>)	30
5.2.2	Citometria de fluxo.....	32
6.	CONCLUSÕES.....	37
7.	LITERATURA CITADA.....	38
	APÊNDICES.....	54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Partes vegetais das plantas de referência para caracterização morfológica do 'Flying Dragon'	23
Tabela 2. Relação dos 30 primers de microssatélite usados para estabelecer o perfil molecular dos genótipos.....	25
Tabela 3. Tipo de propagação, altura, diâmetro de caule e número de folhas..	30
Tabela 4. Tipo de propagação, comprimento e largura dos folíolos e pecíolo..	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Produção de porta-enxerto cítrico poliembriônico como resultante da propagação via semente.....	8
Figura 2. Muda comercial enxertada via “T-invertido” em fase de crescimento	10
Figura 3. Muda comercial interenxertada em fase de crescimento ainda com porta-enxerto presente (caule curvado).....	11
Figura 4. Muda subenxertada em fase de crescimento em teste com dois porta enxertos adicionados pelo método de encostia.....	12
Figura 5. Representação do processo de multiplicação <i>in vitro</i> : A) Escolha do tipo do explante (semente, meristema apical, gema axilar, folha, caule ou raiz); B) Explante introduzido <i>in vitro</i> ; C) representação de algumas rotas de regeneração que podem ser escolhidas.....	14
Figura 6. Recipiente de vidro contendo meio de cultura e plantas de ‘Flying Dragon’ em multiplicação.....	14
Figura 7. Plantas fornecedoras de material vegetal inicial (PFMVI) de citros....	19
Figura 8. Tubo de ensaio contendo gema axilar já desenvolvida para ser transferida para frasco de vidro.....	20
Figura 9. Semeadura manual de porta-enxerto cítricos.....	22
Figura 10. Contagem de folhas entre a folha de referência e a de mesmo ângulo no caule de ‘Flying Dragon’.....	29
Figura 11. Etapas de produção de porta-enxerto ‘Flying Dragon’ micropropagado: A) Frasco de vidro contendo meio de cultura e microestacas em desenvolvimento; B) individualização de microestacas para multiplicação <i>in vitro</i> ; C) início do processo de enraizamento <i>ex vitro</i> após o plantio em ‘ <i>paper pot</i> ’; D) muda finalizada.....	29
Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 3%. Amplificação de DNA de Flying Dragon: 2 a 100 são plantas micropropagadas, S1 a S5 são amostras de sementes e MI 1 a 3 são materiais iniciais, utilizando marcadores microsatélites CCSM 154; CCSME 11; CCSME 126 e CCSME 50. Marcador de peso molecular = Ladder 100 pb.....	31
Figura 13. Histogramas de amostras de folhas de plantas de: A) citrumelo Swingle diplóide (2x); B) citrumelo Swingle tetraplóide (4X); C) amostras de trifoliata ‘Flying Dragon’.....	33

DIVERSIDADE GENÉTICA E FENOTÍPICA EM 'FLYING DRAGON' (*Poncirus trifoliata* var. *monstrosa* (T. Ito)) MICROPROPAGADO

Autora: LETICIA ZONTA BAPTISTA

Orientadora: Profa. Dra. MARIÂNGELA CRISTOFANI-YALY

RESUMO

A citricultura brasileira tem grande importância no agronegócio mundial, sendo que 41% da produção mundial de laranja advém de pomares nacionais. Com a entrada do HLB nos pomares, são necessárias novas estratégias para não haver perda de produtividade, como o plantio adensado. Devido à alta demanda de plantas e baixa oferta de sementes, a micropropagação de porta-enxertos cítricos entra como alternativa na produção de mudas, pois permite a produção clonal em massa em um espaço reduzido, não dependendo de sementes e eliminando a necessidade do descarte de embriões zigóticos germinado. Entretanto após passar por estresse contínuo exercido pela cultura de tecidos e às altas concentrações de reguladores de crescimento, o material pode apresentar alterações (epi)genéticas e/ou fenotípicas, chamadas variação somaclonal. Essas alterações podem ser caracterizadas em morfológicas, fisiológicas e moleculares apresentando modificações no nível de ploidia que podem ser identificadas por marcadores moleculares e citometria de fluxo. O objetivo deste trabalho foi estudar a possível variação morfológica e fenotípica de plantas de 100 plantas de 'Flying Dragon' submetidas ao processo de micropropagação durante mais de dois anos e 25 subcultivos em meio de cultura WPM e 100 plantas originárias de semente. Para a caracterização morfológica, foram executadas avaliações de coloração, margem foliar, presença de espinho, medição de altura e diâmetro de caule e área foliar. Para a caracterização genética foram utilizados marcadores moleculares SSR e citometria de fluxo. Foram utilizados 30 pares de primers microssatélites desenvolvidos previamente, em 100 plantas micropropagadas, 5 plantas produzidas por sementes e comparadas às 3 plantas FMVI. Para citometria foram utilizadas as mesmas 100 plantas micropropagadas, 10 plantas produzidas por sementes e comparadas às 3 plantas fornecedoras de material vegetal inicial. Os resultados morfológicos foram uniformes entre as amostras e entre as origens em comparação com a planta fornecedora de material inicial. Vinte e sete marcadores SSR amplificaram fragmentos, 19 (70%) permitiram a visualização de apenas um alelo (fragmento de DNA) e 8 amplificaram dois alelos. A análise de citometria de fluxo de 100 plantas micropropagadas e 100 plantas de sementes apresentou valores médios de volume nuclear de $171,43 \pm 8,99$ para as plantas vindas de sementes e $189,47 \pm 7,03$ para as micropropagadas. A conclusão com esses resultados é de que o processo de micropropagação por organogênese somática em plantas de 'Flying Dragon' após 25 subcultivos em meio de cultura WPM é estável.

Palavras-chave: Micropropagação, SSR, citometria, Flying Dragon.

GENETIC AND PHENOTYPIC DIVERSITY IN MICROPROPAGATED 'FLYING DRAGON' (*Poncirus trifoliata* var. *monstrosa* (T. Ito))

Author: LETICIA ZONTA BAPTISTA

Adviser: Prof. Dr. MARIÂNGELA CRISTOFANI-YALY

ABSTRACT

Brazilian citriculture is of great importance in world agribusiness since 41% world's orange production comes from national orchards. With the entry of HLB into orchards, new strategies are needed to avoid loss of productivity, such as high density. Due to the high demand of plants and low supply of seeds, micropropagation of citrus rootstocks is an alternative in the production of seedlings, as it allows clonal mass production in a reduced space, not depending on seeds and eliminating the need to discard germinated zygotic embryos. However, after undergoing continuous stress exerted by tissue culture and high concentrations of growth regulators, the material may show (epi)genetic and/or phenotypic changes, called somaclonal variation. These changes can be characterized as morphological, physiological, and molecular, showing changes in the ploidy level that can be identified by molecular markers and flow cytometry. The objective of this work was to study the possible morphological and phenotypic plant variation of 100 'Flying Dragon' plants submitted to the micropropagation process for more than two years and 25 subcultures in WPM culture medium and 100 plants originating from seed. For the morphological characterization, evaluations of color, leaf margin, presence of thorn, measurement of height and diameter of stem and leaf area were performed. For the genetic characterization SSR molecular markers and flow cytometry were used. 30 pairs of microsatellite primers, previously developed, were used in 100 micropropagated plants, 5 plants produced by seeds and compared to 3 FMVI plants. For cytometry, were used 100 micropropagated plants, 100 plants produced by seeds and compared to the 3 plants that provided initial plant material according to the availability of leaf material. The morphological results were uniform between samples and between origins compared to the source plant. Twenty-seven SSR markers amplified fragments, 19 (70%) allowed the visualization of only one allele (DNA fragment) and 8 amplified two alleles. The size of the amplified fragments ranged from 100 to 200 bp. Flow cytometry analysis of 100 micropropagated plants and 100 seed plants showed mean values of nuclear volume of 171.43 ± 8.99 for seed plants and 189.47 ± 7.03 for micropropagated ones. The conclusion with these results is that the process of micropropagation by somatic organogenesis in 'Flying Dragon' plants after 25 subcultures in WPM culture medium is stable.

Keywords: Micropropagation, SSR, cytometry, Flying Dragon

1 INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira é uma importante cadeia produtiva do agronegócio do país por se mostrar um setor organizado e competitivo. A produção está concentrada principalmente na região sudeste, com destaque para o cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo Mineiro e estima-se que a safra 23/24 deverá ser de 309,34 milhões de caixas de laranja de 40,8 kg (FUNDECITRUS, 2023).

Os citros, como a maioria das espécies de árvores frutíferas, são propagados vegetativamente pela enxertia da cultivar copa em cultivares de porta-enxertos, multiplicados por sementes, que foram selecionados por seu desempenho em diferentes condições edafoclimáticas ou por sua tolerância a doenças.

Na citricultura, os porta-enxertos são utilizados pois proporcionam boas características agrônômicas aos frutos produzidos. Pompeu Júnior (2008) destaca que estes, em geral, influenciam no desenvolvimento vegetativo da copa, precocidade de produção, época de maturação e peso dos frutos, capacidade de absorção, síntese e utilização de nutrientes, tolerância à salinidade, resistência à seca e ao frio, resistência ou tolerância às pragas e doenças. Portanto, a escolha do porta-enxerto é uma das decisões mais importantes para o estabelecimento de pomares comerciais de citros.

Apesar da grande diversidade e variedade de espécies de citros, a produção de porta-enxertos é restrita a um pequeno número de variedades. Segundo Conceição *et al.* (2019), citando dados não publicados da Coordenação de Defesa Agrícola, o limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck) e citrumelo 'Swingle' [*C. paradisi* Macfad. cv. Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] representaram,

respectivamente, 34,3% e 45% dos porta-enxertos utilizados para a produção de mudas de citros em São Paulo em 2017.

Com o surgimento e disseminação do Huanglongbing (HLB ou *greening*) novas estratégias de produção estão sendo avaliadas, entre elas, o plantio adensado pois é uma das doenças mais severas dos citros e que tem causado perdas econômicas substanciais em todo o mundo.

Para o cultivo adensado, é necessário que sejam utilizados porta-enxertos que induzam a cultivar copa a ter um porte menor. Plantas de menor vigor possuem maior eficiência produtiva por área de árvore, possibilitam elevadas densidades de plantio conduzindo à uma maior produção por unidade de área, facilitam a colheita, inspeção, pulverização e erradicação de plantas doentes, atendendo à demanda no controle de pragas, doenças e seus vetores (STUCHI *et al.*, 2012).

O *P. trifoliata* var. *monstrosa* cv 'Flying Dragon' é o único porta-enxerto verdadeiramente ananicante comercial conhecido atualmente, com uma redução de tamanho de cerca de 30% do porte da variedade copa, muito utilizado com lima ácida 'Tahiti' e limão 'Eureka', porém é incompatível com laranja Pera (*C. sinensis* L. Osbeck.) e tangor Murcott (*C. reticulata* Blanco × *C. sinensis* L. Osb.), a cultivar mais produzida no Brasil. Sua origem genética é uma provável mutação de *P. trifoliata*, conhecidos como 'Trifoliata' (POMPEU JÚNIOR, 2005; STUCHI; DONADIO; SEMPIONATO, 2003).

As mudas de citros são enxertadas em porta-enxertos produzidos por sementes devido à alta disponibilidade no mercado e preço baixo, em contrapartida, as sementes de 'Flying Dragon' apresentam cerca de 50% de poliembrionia (RODRIGUES *et al.*, 2015). Nos últimos anos, com a entrada da doença HLB, foi exigido o arranquio de plantas doentes, dentre elas, as sementeiras oficiais, havendo uma queda na oferta de sementes de todos os porta-enxertos no mercado, forçando o mercado citrícola a encontrar alternativas para produção de mudas. A micropropagação é uma possibilidade para o fornecimento de materiais vegetais (CARVALHO *et al.*, 2019).

A micropropagação consiste em uma técnica do cultivo de tecido *in vitro*, utilizada na multiplicação de porta-enxertos e que permite a manutenção das características de relevância agrícola, eliminando necessidade de eliminação de materiais oriundos de embrião zigóticos pela poliembrionia das sementes de citros (CARVALHO; SILVA; MEDEIROS, 2006).

Durante o processo de multiplicação *in vitro*, poderão ocorrer variações genéticas ou epigenéticas chamadas variações somaclonais. Essas alterações ocorrem por diversos motivos como composição do meio de cultivo, tempo em que o material é submetido ao processo *in vitro*, tipo do explante, rotas de regeneração do material, entre outras, além do genótipo, onde a cultura de ápices pode variar de 0 a 70% de resultantes com alterações somaclonais (KAEPLER; KAEPLER; RHEE, 2000; SMITH, 1988).

Conseqüentemente, a avaliação da estabilidade genética e epigenética das plantas micropropagadas é de extrema importância para garantir a eficiência do procedimento de micropropagação, confiabilidade e seu impacto na produção agrícola, para assim, poder representar uma alternativa mais eficiente e econômica à produção de mudas (DOBRÁNSKI; TEIXEIRA DA SILVA, 2010).

Existem diversas técnicas que podem ser utilizadas para o acompanhamento e garantir a estabilidade. Desde análises visuais da planta às análises moleculares. A análise molecular pode ser realizada por meio da técnica de amplificação de fragmentos de DNA (PCR) que utiliza marcadores moleculares para identificação de, por exemplo, fragmentos SSR (*Simple Sequence Repeats*) que são reproduzíveis, multialélicos e codominantes (BAYRAKTAR *et al.*, 2020; TIKENDRA; AMOM; NONGDAM, 2019).

A variação somaclonal em plantas regeneradas a partir de cultura de tecidos, via organogênese ou embriogênese somática, está frequentemente associada a anormalidades no conteúdo de ácido desoxirribonucleico (DNA) como aneuploidia e poliploidia, que podem ser identificadas pela citometria de fluxo, usando fluorocromo específico do ácido nucleico (SILVA *et al.*, 2004).

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Verificar, mediante utilização de marcadores moleculares microssatélites (SSR – *Simple Sequence Repeats*), citometria de fluxo e análise morfológica, se há diversidade genética e epigenética em plantas de porta-enxerto 'Flying Dragon' após passarem pelo processo de micropropagação com o intuito de produzir materiais estáveis comercialmente.

2.2 Objetivos específicos para atender o objetivo geral

- a) Avaliar morfológicamente as plantas regeneradas por micropropagação e por sementes segundo o *Descriptors of Citrus* (1999);
- b) Analisar, através da utilização de 30 pares de *primers* microssatélites, a ocorrência de polimorfismos em 100 plantas oriundas de micropropagação;
- c) Analisar, através de citometria de fluxo, a ocorrência de aberrações cromossômicas nas plantas regeneradas por micropropagação e por sementes.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Os citros

Os citros são plantas da família *Rutaceae* e contém 150 gêneros, 2.000 espécies de laranjas, limões, tangerinas, pomelos entre outros, com poucas espécies verdadeiras, pois muitas são consideradas como híbridos interespecíficos, ou seja, possuem pouca variação genética, contudo apresentam muitas variações fenotípicas (BOWMAN; JOUBERT, 2020).

A maioria das espécies do gênero *Citrus* são diploides ($2n=18$) com número básico de cromossomos $x=9$. Há também plantas com um número diferente de cromossomos conhecidos como triploides ($2n=3x=27$) e tetraploides ($2n=4x=36$) de ocorrência natural, originadas tanto por fatores sexuais quanto somáticos. Os de origem sexual podem ser obtidos através da fusão de um gameta não reduzido com um haploide normal e de dois gametas não reduzidos.

Os poliploides (indivíduos com mais de um conjunto de cromossomos) de origem somática, ou 'poliploides espontâneos', podem aparecer através processos naturais de mutação através da duplicação de cromossomos em células nucleares e a falta de divisão durante a mitose, originando plantas tetraploides (CAMERON; FROST 1968, LEE, 1988; ZENG *et al.* 2006). A frequência de plantas poliploides espontâneas em citros é variável e parece estar sob controle genético e ambiental (BARRETT; HUTCHISON, 1978). No entanto, o fator ou fatores que influenciam a frequência de eventos de poliploidização permanecem desconhecidos, pois poucos estudos sobre o assunto têm sido publicados. Segundo Aleza *et al.* (2011), Guerra *et al.* (2016), Hussain *et al.* (2011), Otto e Whitton (2000), Saleh *et al.* (2008) a

duplicação dos cromossomos pode ser afetada por condições ambientais em campo tais como a temperatura ou em cultivo *in vitro* de tecidos, tais como a concentração de fitorreguladores.

3.2 Porta-enxerto ‘Flying Dragon’

Na última década ocorreu uma mudança significativa na citricultura na tentativa de diminuir os efeitos negativos da grande incidência de *greening* nos pomares. As combinações copa/porta-enxerto utilizadas hoje, visam principalmente, a possibilidade do adensamento do pomar para a redução da necessidade de mão-de-obra necessária, aumento da produção, aumento da competitividade e retorno financeiro (FUNDECITRUS, 2023; STUCHI; DONADIO; SEMPIONATO, 2003).

Variedades que permitam o adensamento devem ter características ananicas e que não prejudiquem a produtividade por área. O porta-enxerto ‘Flying Dragon’ (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. var. *monstrosa*) entrou em evidência por atender os atributos desejados, otimizando tratamentos culturais pelo menor vigor e ter diminuído as taxas sintomas de HLB em plantas enxertadas sobre esse porta-enxerto (STUCHI *et al.*, 2012; STUCHI; DONADIO; SEMPIONATO, 2003).

Além do porte ananicante, a variedade apresenta caule com crescimento tortuoso característico, espinhos curtos, pontiagudos e voltados para baixo. É caducifolia trifoliada com folíolos estreitos, pecíolo longo e de coloração verde-escura. Produz frutos pequenos, com casca grossa e rugosos (GIRARDI *et al.*, 2021).

É cultivar resistente ao frio, ao vírus da tristeza e morte súbita dos citros e nematoides, tolerante à gomose de *Phytophthora* e confere qualidade ao fruto enxertado, principalmente para limeira ácida ‘Tahiti’, porém é incompatível com laranjeira ‘Pera’ e tangor ‘Murcott’, limitando seu uso (MATTOS JUNIOR, *et al.*, 2005; MEDINA *et al.*, 2000), entretanto, a interenxertia pode ser utilizada para superar essa limitação.

O método mais comum de propagação do porta-enxerto ‘Flying Dragon’ é por sementes. As sementes podem ser coletadas de frutas maduras e semeadas em recipientes ou diretamente no solo. São de tamanho médio a grande, com taxa de poliembrionia chegando a 76% e uma média de 50%, de germinação irregular, variando de 4 a 6 semanas e de desenvolvimento lento em viveiro (CHENG;

ROOSE, 1995; GIRARDI, *et al.*, 2021; MADEMBA-SY, F., LEBEGIN, S., & DESPREZ, Z. L, 1999; PORTELLA *et al.*, 2015; PRAKASH; SHARMA, 2018).

3.3. Métodos de propagação de mudas cítricas

A adoção de novas tecnologias para a produção de variedades mais adaptadas aos diversos estresses ambientais como disponibilidade de água, mantendo rendimento de fruto e suco e o uso de práticas culturais avançadas relacionadas ao manejo nutricional das árvores, manejo de pomares com irrigação, controle pragas e doenças foram essenciais para a expansão da citricultura no Brasil (BOTEON; NEVES, 2005).

Os recentes avanços nas práticas culturais utilizadas para a produção de materiais básicos de propagação de porta-enxerto e mudas também foram essenciais para garantir o acompanhamento e aplicabilidade dessas novas tecnologias, garantindo a competitividade, a sustentabilidade e a eficiência da citricultura brasileira garantindo agregação de valor e superando dificuldades na colheita e automação (STUCHI, *et al.*, 2020)

3.3.1 Propagação por sementes

A multiplicação de citros por sementes tem sido de grande importância na evolução e dispersão dos citros em todo o mundo pela facilidade de transporte e durabilidade (MOREIRA; SALIBE, 1966).

A propagação sexuada por sementes foi inicialmente o método preferido para a produção comercial de mudas de citros. Até meados do século XIX, a maioria dos pomares cítricos brasileiros se originava de árvores derivadas da germinação direta de sementes (POMPEU JÚNIOR, 2005).

Atualmente, a propagação por sementes está limitada à produção de porta-enxertos. O alto grau de poliembrião facilita a propagação e a taxa de germinação e da quantidade de embriões é influenciada pelo tempo e condições de armazenamento das sementes e cultivar (CASTLE *et al.*, 1993; CARVALHO; SILVA, 2013; SOARES FILHO *et al.*, 2014).

Segundo Greve *et al.* (1991), as características desejáveis nos materiais a serem multiplicados são as características identificadas da 'planta-mãe' fornecedora de sementes, o que torna imprescindível e oneroso o processo de seleção de embriões nucelares após o desenvolvimento das plantas (Figura 1).



Figura 1. Produção comercial de porta-enxerto cítrico poliembriônico como resultante da propagação via semente.

3.3.2 Propagação por estaquia

Estacas são mudas propagadas vegetativamente e são clonais, ou seja, possuem a mesma identidade genética de suas árvores parentais, sendo seu uso considerado um método de propagação vegetativa (ANDRADE; MARTINS, 2003; ARAÚJO *et al.*, 1999).

A utilização de estacas para a produção de mudas de citros ainda é limitada. Webber (1948) relatou seu uso na produção de cidra (*C. medica* L.) na Sicília, Itália. Pompeu Júnior (2005) indicou que a técnica foi utilizada na Flórida, Estados Unidos da América (EUA), para obtenção de plantas de lima ácida 'Tahiti' (*C. latifolia* Tanaka), induzindo uma produção mais precoce em relação às plantas enxertadas. Estacas de lima ácida 'Tahiti' apresentaram sucesso de enraizamento superior a 90% sob nebulização (ARAÚJO *et al.*, 1999; PRATI *et al.*, 1999).

A produção de raízes adventícias por estacas enraizadas leva à formação de plantas com sistema radicular mais superficial do que o observado em plantas cultivadas a partir de sementes (CASTLE; YOUTSEY, 1977). As árvores enraizadas também podem ser semelhantes às árvores não enxertadas em termos de sua má adaptação a diferentes condições de solo e apresentam resistência ou tolerância variável a fatores abióticos e bióticos, como estresse hídrico, salinidade e gomose (WEBBER, 1948).

Por outro lado, estacas podem ser uma boa opção para a propagação de porta-enxertos em variedades com baixo número de sementes por fruto, como a tangerineira 'Sunki' (*C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka) (OLIVEIRA *et al.*, 2014; SARMIENTO; SCHWARZ; SOUZA, 2016). Estacas semilenhosas de citrumelo 'Swingle' (*C. paradisi* Macfad. × *P. trifoliata* (L.) Raf.) derivadas de material juvenil podem ser utilizadas para obtenção de porta-enxertos para produção de árvores enxertadas (MOURÃO FILHO; GIRARDI; COUTO, 2009).

Recentemente, procedimentos para aumentar a propagação de porta-enxertos por estacas de raízes foram avaliados na Flórida, visando propagar materiais sem sementes ou com baixa contagem de sementes para acelerar a produção de certos porta-enxertos e mudas para viveiros (BEESON JR.; SILVA, 2017a; 2017 b).

3.3.3 Enxertia

A enxertia é propagação vegetativa de mudas cítricas através da união de tecidos de duas plantas diferentes que continuam crescendo e se desenvolvendo como um único indivíduo, unindo características de interesse de ambas as plantas (MATTOS JUNIOR, *et al.*, 2005).

A grande maioria dos pomares comerciais de citros plantados no mundo é propagada por enxertia, havendo registros de enxertia ocorrendo em viveiros paulistas desde 1912. As vantagens do uso da enxertia em relação ao uso de mudas "pé-franco" são muitas, destacando-se a redução do período juvenil, a produção de árvores mais compactas que facilitam a colheita e o manejo e a adaptação da planta a condições desfavoráveis de solo e clima (DAVIES; ALBRIGO, 1994).

A rápida evolução da limpeza clonal dos citros com o uso da embrionia nucelar foi alcançada com o desenvolvimento e aprimoramento da técnica de enxertia de caule, que permite a recuperação de plantas sadias sem a indesejável juvenilidade e tem sido utilizado com sucesso para a recuperação ou prevenção da doença da morte súbita dos citros (GIRARDI; MOURÃO FILHO; PIEDADE, 2007; MURASHIGE *et al.*, 1972; NAVARRO; ROISTACHER; MURASHIGE, 1975; RIBEIRO *et al.*, 2014; PAIVA; CARVALHO, 1993).

Embora a enxertia tenha promovido o avanço da citricultura comercial no Brasil, poucos avanços na técnica foram relatados nos últimos anos (POMPEU JÚNIOR, 2005). De maneira geral, a enxertia em citros resulta em alta produtividade,

com praticamente 100% de sucesso quando realizada pela muda de gema em forma de “T invertido” (Figura 2).



Figura 2. Muda comercial enxertada via “T-invertido” em fase de crescimento.

Apesar de alguns estudos tenham avaliado alternativas de propagação, como a microenxertia de gemas (SKARIA, 2000), enxertia apical de caules (OLIVEIRA; DAMIÃO-FILHO; CARVALHO, 2002) e até enxertia de sementes (BAR- JOSEPH, *et al.*, 2011), a alta produtividade observada na enxertia tradicional pode ser um dos motivos pelos quais outros métodos foram desenvolvidos e/ou não são amplamente utilizados (HAYASHI *et al.*, 2012; OLIVEIRA; SCIVITTARO; VARGAS, 2004).

3.3.4 Interenxertia

Esta técnica de propagação vegetativa é necessária quando há incompatibilidade entre a copa e o porta-enxerto e consiste na utilização de um fragmento de uma cultivar-copa compatível com as duas variedades unindo ambas (Figura 3) que além de diminuir o vigor, pode aumentar a eficiência produtiva e melhorar a qualidade dos frutos (MATTOS JUNIOR, *et al.*, 2005).

É o caso da enxertia da laranjeira ‘Pera’ (*C. sinensis* (L.) Osbeck) sobre limão ‘Volkameriano’ (*C. volkameriana* V. Ten. e Pasq.), ou seleções de trifoliata (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) e alguns de seus híbridos, como o citrumelo ‘Swingle ’

(POMPEU JÚNIOR, 2005), porta-enxerto mais produzido no estado de São Paulo em 2022 (FUNDECITRUS, 2022). Quando essas combinações de copa/porta-enxerto são necessárias, é possível a fixação de um primeiro enxerto de laranja doce, por exemplo um enxerto de 'Valência' entre o 'Pera' e 'Swingle' (CARVALHO *et al.*, 2011; GIRARDI; MOURÃO FILHO, 2006).

Embora o custo de produção de mudas interenxertadas seja maior do que o das mudas convencionais, essa técnica tem possibilitado a produção de laranjeira 'Pera' em regiões com alto risco de morte súbita dos citros, como no norte do estado de São Paulo e no sul do Triângulo Mineiro em Minas Gerais (JESUS JUNIOR; BASSANEZI, 2004).



Figura 3. Muda comercial interenxertada em fase de crescimento ainda com porta-enxerto presente (caule curvado).

3.3.5 Subenxertia

É uma técnica de unificar tecidos por encostia de árvores já estabelecidas em campo (ou não) para atribuir à copa maneira de substituir o porta-enxerto danificado por algum trauma físico ou biológico, ou na produção de mudas em viveiro para superar a baixa adaptabilidade de um porta-enxerto às condições de umidade do solo do produtor (SETIN *et al.*, 2005; 2009).



Figura 4. Muda subenxertada em fase de crescimento em teste com dois porta enxertos adicionados pelo método de encostia.

3.3.6 Micropropagação

O uso da micropropagação teve início na década de 1980 com a propagação de plantas ornamentais, hortaliças e outras árvores frutíferas (KITTO, 1997; WINKELMANN; GEIER; PREIL, 2006). O cultivo de tecido *in vitro* tem sido utilizada na citricultura como uma importante ferramenta biotecnológica auxiliar e para a rápida multiplicação de novos materiais com características de interesse (CARVALHO; SILVA; MEDEIROS, 2006).

A propagação *in vitro* de porta-enxertos cítricos vem ganhando cada vez mais importância devido à tendência dos produtores em utilizar plantas mais compactas em densidades de plantio mais altas (AZEVEDO *et al.*, 2015). Considerando a alta demanda por variedades que permitam essas aplicações, a produção comercial de porta-enxertos cítricos por micropropagação tem sido realizada com sucesso (BORDAS *et al.*, 2016).

Avanços no desenvolvimento de protocolos de micropropagação para produzir porta-enxertos uniformes, de frutos com baixo número de sementes ou baixos percentuais de poliembrionia e germinação foram descritos por Carimi e De Pasquale (2003) e Tallón *et al.* (2012). Embora esse método aumente o custo de produção por árvore, ele pode garantir uniformidade e fidelidade genética, como em várias outras espécies já propagadas por esse método.

A técnica é um método de propagação vegetativa que permite a produção em larga escala de plantas geneticamente idênticas utilizando técnicas da cultura de tecidos vegetais e que elimina a necessidade de seleção de plantas devido à

poliembrionia e tornou-se uma importante ferramenta na produção de porta-enxertos de lenhosas frutíferas (CARVALHO; SILVA; MEDEIROS, 2006; GUPTA, *et al.*, 2020).

O sistema radicular das plantas produzidas sob esse sistema é constituído por uma ou mais raízes primárias e muitas raízes secundárias. Essas plantas caracterizam-se por apresentar sistema radicular ramificado e mais superficial, com maior suscetibilidade ao estresse hídrico, associando a técnica à pomares irrigados (CASTLE, 1980; XAVIER; COMÉRIO, 1997).

O método de propagação possui vantagens significativas como altas taxas de proliferação, redução do tempo de produção e garantia da qualidade genética das plantas e vantagem significativa para atender à crescente demanda por material vegetal de alta qualidade (ASADI, *et al.*, 2021; BAYRAKTAR, *et al.*, 2020; POMPEU JÚNIOR, 2005).

O início do processo de multiplicação é feito com a seleção de um explante adequado, como um pedaço de tecido vegetal (por exemplo, ponta de broto, broto axilar ou meristema) obtido de uma planta-mãe saudável (Figura 5). Os explantes são esterilizados e cultivados em meio estéril contendo nutrientes e reguladores que promovem o crescimento e desenvolvimento celular (CARVALHO; SILVA; MEDEIROS, 2006).

Depois que os explantes são estabelecidos *in vitro*, a etapa de propagação envolve a regeneração de brotos ou meristemas. O uso de reguladores de crescimento como citocininas e auxinas é essencial para induzir a proliferação celular e o desenvolvimento de novos brotos (Figura 6). Este processo permite a produção de várias plantas a partir de um único explante, dependendo da estabilidade genética no meio de cultura (POMPEU JÚNIOR, 2005).

Uma vez alcançada a multiplicação dos brotos, o próximo passo é o enraizamento e aclimatização das plantas *in vitro* ou *ex vitro*. Para promover a formação de raízes, o meio é modificado para incluir concentrações apropriadas de auxinas, como ácido indolbutírico (AIB) ou ácido naftalenoacético (ANA). O enraizamento bem-sucedido é crítico para a sobrevivência da planta (CARVALHO; SILVA; MEDEIROS, 2006).

Posterior ao enraizamento, inicia-se a fase de aclimatização que envolve a adaptação gradual das plantas às condições ambientais externas, como temperatura, umidade e intensidade luminosa em recipiente com substrato

adequado, onde continuam crescendo e se desenvolvendo (SIMONETTI *et al.*, 2015).

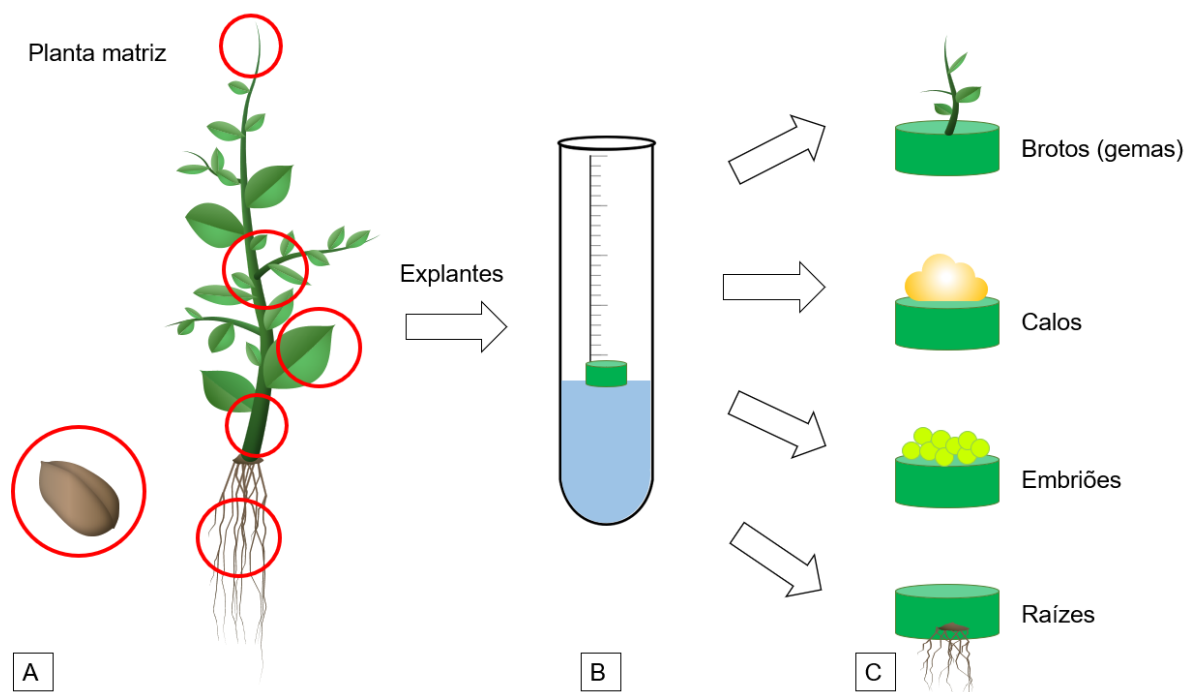


Figura 5. Representação do processo de multiplicação *in vitro*: A) Escolha do tipo do explante (semente, meristema apical, gema axilar, folha, caule ou raiz); B) Explante introduzido *in vitro*; C) representação de algumas rotas de regeneração que podem ser escolhidas.



Figura 6. Recipiente de vidro contendo meio de cultura e plantas de 'Flying Dragon' em multiplicação.

O cultivo de tecidos oferece oportunidades para manipulação de materiais vegetais, permitindo a limpeza de materiais livre de doenças, introdução de características desejáveis por meio de técnicas de engenharia genética. Isso inclui a introdução de genes para resistência a doenças, tolerância ao estresse ambiental ou características agronômicas aprimoradas e conservação de banco de germoplasma (BAYRAKTAR, *et al.*, 2020; POMPEU JÚNIOR, 2005).

3.4. Variação Somaclonal

Após passar por estresse contínuo ou ter uma alta concentração de reguladores de crescimento no meio de cultivo, tempo no sistema *in vitro*, métodos de regeneração ou quantidade de subcultivos podem ocorrer alterações cromossômicas nas células vegetais e tecidos cultivados chamadas de variações somaclonais (BAYRAKTAR *et al.*, 2020; LARKIN; SCOWCROFT, 1981; REUVENI; ISRAELI, 1989; TIKENDRA; AMOM; NONGDAM, 2019).

A variação somaclonal pode ser um fenômeno transitório ou persistente. Em algumas culturas de tecidos, alterações genéticas e epigenéticas podem ocorrer, serem instáveis e não herdáveis e revertem-se ao seu estado original ao longo do tempo. Em outros casos, essas mudanças podem se estabilizar e serem transmitidas às gerações futuras, não sendo de interessante para pomares comerciais já que pode haver perda das características de interesse agrônomo como altura da planta, juvenildade, produtividade e resistência à doenças (RANJITH; RAO, 2021; TIKENDRA; AMOM; NONGDAM, 2019).

As alterações podem ser mutações pontuais, deleções, duplicações cromossômicas ou rearranjos que afetam a expressão gênica, levando à variação fenotípica nas plantas como diferenças na morfologia, crescimento, produção de metabólitos secundários e resistência a estresses bióticos e abióticos e (PHILLIPS; KAEPLER; PESCHKE, 1990).

A suscetibilidade na micropropagação à variação somaclonal é influenciada pelo tipo do explante utilizado, pela rota de regeneração escolhida além da espécie e até mesmo da cultivar. Gemas axilares de segmento nodais são as mais utilizadas por sua estabilidade (ASADI *et al.*, 2021; BAYRAKTAR *et al.*, 2020; PRAKASH; SHARMA, 2018; SADAT-HOSSEINI; VAHDATI; LESLIE, 2019; TIKENDRA; AMOM; NONGDAM, 2019). Plantas regeneradas via embriogênese somática de embrião nucelares de citros, podem apresentar modificações morfológicas, nível de ploidia,

porém em taxas muito pequenas ou não permanentes. Novos estudos indicam que o uso de gemas axilares apresentou de 0 a 10% de variação somaclonal e ocorreram com reguladores de crescimento de diversos tipos (HENAO-RAMÍREZ *et al.*, 2021).

O estudo da fidelidade genética é um pré-requisito para a manutenção da genética da planta-mãe em um pomar comercial e compreender os efeitos, diferenças e mecanismos da variação somaclonal é fundamental para o avanço da biotecnologia vegetal e a exploração desse fenômeno para o melhoramento das culturas (REUVENI; ISRAELI, 1989).

As variações somaclonais podem ser detectadas por várias técnicas que são amplamente categorizadas como morfológicas, fisiológicas/bioquímicas e moleculares. As técnicas moleculares, em particular, são uma ferramenta para detectar variação somaclonal de maneira rápida, ainda em fase inicial da produção, sem a necessidade de esperar a formação do pomar e início da produção de frutas (BAIRU; AREMU; VAN STADEN, 2011).

Segundo Lopes *et al.* (2016), as modificações genéticas que podem surgir durante a replicação do DNA são chamadas de polissomatia, endopoliploidia ou endoreplicação. A endopoliploidia ocorre em espécies com um genoma pequeno como modo de compensar pela falta de DNA, onde se divide o número de cromossomos sem haver divisão celular. A endoreplicação é um mecanismo para aumento de volume de tecido celular pela multiplicação de DNA. Polissomatia é a consequência da endoreplicação, são células somáticas encontradas por todo o organismo vegetal (OCHATT; PATAT-OCHATT; MOESSNER, 2011; SLIWINSKA; LUKASZEWSKA, 2004; TORRES-SILVA *et al.*, 2020).

A poliploidia, natural ou não, é quando a planta apresenta mais de dois conjuntos de cromossomos. Como resultado, a célula vegetal apresenta um aumento de tamanho e pode induzir à um desenvolvimento mais lento o que pode auxiliar na identificação visual de plantas modificadas (TOUCHELL; PALMER; RANNEY, 2020; VELASCO *et al.*, 2010; ZHANG; LIU; HU, 2016).

Os marcadores moleculares são comumente utilizados para estimar homogeneidade das plantas micropropagadas (ASADI *et al.*, 2021; HENAO-RAMÍREZ *et al.*, 2021; SUWAL; LAMICHHANE; GAUCHAN, 2021; YADAV *et al.*, 2019). Em sua maioria são baseados na amplificação de sequências de DNA com a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*: Reação em Cadeia da Polimerase), como marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified*

fragment Length Polymorphism) e SSR (*Simple Sequence Repeats*). Os marcadores moleculares permitem a identificação de alterações genéticas e a avaliação da diversidade genética em diferentes estágios da cultura de tecidos (LARKIN; SCOWCROFT, 1981; RAI *et al.*, 2012; SADAT-HOSSEINI; VAHDATI; LESLIE, 2019).

Os marcadores SSR ou Microsatélites são sequências de DNA curtas, com um a seis pares de base, repetidas lado-a-lado (em tandem). São simples de serem usados, necessitam de pouca quantidade de DNA, são eficientes, codominantes, multialélicos, ou seja, em eletroforese permitem a visualização de ambos alelos e alta reprodutibilidade técnica para identificação de polimorfismo entre plantas (LAKSHMANAN; REDDAMPALLI VENKATARAMAREDDY; NEELWARNE, 2007; TOKGÖZ; ALTAN, 2020; SUWAL; LAMICHHANE; GAUCHAN, 2021).

Contagens cromossômicas, bem como a detecção de variação do conteúdo de DNA usando citometria de fluxo, pode fornecer informações complementares sobre variação somaclonal. O procedimento consiste em avaliar o conteúdo de DNA nuclear em dados quantitativos, através da dispersão da luz e fluorescência das partículas em suspensão líquida do núcleo celular de folhas degradado por enzimas, que diferem pelo tamanho e complexidade formando picos proporcionais à quantidade de DNA nuclear (SILVA *et al.*, 2004; ESCOBEDO-GRACIA-MEDRANO *et al.*, 2018).

Para a contagem da ploidia de maneira rápida, confiável e exata, a citometria de fluxo é o método mais utilizado, pois além dessas vantagens, ele não é destrutivo, utiliza pouco material de amostra e é relativamente fácil (LOPES *et al.*, 2016; OLLITRAULT-SAMMARCELLI *et al.*, 1994; POLATÖZ; SEKER; KAYA, 2021).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi realizado em espaço privado cedido por uma empresa especializada em produção *in vitro* de porta-enxertos de frutíferas lenhosas, sediada na cidade de Brotas, interior do Estado de São Paulo, na latitude -22.3009 e longitude -48.0936, a uma altitude de 645 m, com clima subtropical úmido, Cfa segundo a classificação de Köppen.

A instrução de trabalho e o procedimento operacional padrão de propagação *in vitro* comercial de porta-enxertos é de propriedade intelectual da empresa e já estabelecido, por isso, a eficiência do meio de cultivo e do procedimento de multiplicação não foram avaliados nesse projeto e sim a possibilidade de surgimento de alterações epigenéticas e genóticas do material micropropagado.

4.1 Micropropagação

4.1.1 Fase 0: Planta fornecedora de material inicial

Plantas fornecedoras de material vegetal inicial (PFMVI), das quais são retiradas os explantes, foram estabelecidas em 2018, conforme normativa da Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo em casa de vegetação com tela antiafídeo, isoladas de qualquer material comercial, sobre bancadas acima do solo, individualizadas em vasos de 20 L com 100% de substrato pasteurizado de fibra de coco 'Golden Mix Granulado' (Amafibra, Grupo Sococo, Brasil) de textura fina, enxertadas seguindo mesmo protocolo de mudas cítricas comerciais, utilizando gemas axilares (borbulhas) do próprio porta-enxerto 'Flying Dragon' originárias do

Centro de Citricultura Sylvio Moreira do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) (Figura 7).

Após seu crescimento e emissão de novos ramos em 2019, cada muda foi analisada fitossanitariamente para HLB, CVC e *Phytophthora* e classificada como *true-to-type* por laboratórios oficiais e as primeiras introduções em cultura de tecidos foram feitas no mês de dezembro do mesmo ano.



Figura 7. Plantas fornecedoras de material vegetal inicial (PFMVI) de citros.

4.1.2 Fase I: Estabelecimento *in vitro*

Ramos em pleno desenvolvimento vegetativo com gemas axilares não totalmente maduras foram escolhidos para a introdução. Tiveram suas folhas e espinhos retirados *in loco* para diminuir a desidratação da gema e foram levados ao laboratório.

Os explantes foram lavados com detergente antisséptico e água corrente, cortados em pedaços menores e levados até à câmara de fluxo laminar unidirecional para o procedimento de 'Estabelecimento *in vitro*'. Os materiais, passaram por uma nova desinfestação superficial com álcool 70% por 15 segundos e banho subsequente de água com hipoclorito de sódio a 1% e duas gotas de detergente Tween 20® por 10 minutos e tríplice lavagem em água deionizada e autoclavada.

Em seguida, as gemas axilares foram individualizadas com auxílio de lâmina de bisturi e colocadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura WPM (Apêndice A; LLOYD; MCCOWN, 1980) utilizado em todas as fases da micropropagação, contendo fitoreguladores auxina e citocinina, conforme procedimento da empresa. O meio de cultura foi fabricado previamente e teve seu pH corrigido a 5,8 com KOH

e HCl e $8,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ágar como agente gelificante, autoclavado a 121°C por 20 minutos.

Os tubos de ensaio contendo as gemas individualizadas foram alocados em sala limpa para crescimento, com temperatura controlada a 25°C e fotoperíodo de 16 h de luz e 8 h de escuro, com lâmpadas LED. Quando os brotos se desenvolveram por completo, foram transferidos para um recipiente maior (Figura 8).



Figura 8. Tubo de ensaio contendo gema axilar já desenvolvida para ser transferida para frasco de vidro.

4.1.3 Fase II: Multiplicação

Frascos de vidro receberam o mesmo meio de cultura WPM para a multiplicação. Cada planta regenerada foi subdivida em pedaços menores como microestacas e novas brotações também foram individualizadas até completarem 25 a 30 plantas dentro de cada frasco. O procedimento foi repetido a cada duas semanas até atingirem volume de interesse para a aclimatização. O material escolhido para análise teve esse ciclo repetido 25 vezes ao longo de 23 meses, já que por decisões comerciais, o material permaneceu em dormência em frio, sem o processo de multiplicação, durante 8 meses.

4.1.4 Fase III: Aclimatização

Para a indução do enraizamento, foi acrescentado meio WPM sem agente gelificante e acrescentado carvão ativado em cada frasco com plantas e enviados para a casa de vegetação para iniciar o processo de aclimatização.

Os frascos permaneceram na casa de vegetação até as microestacas atingirem o tamanho de cerca de 5 cm de altura. Foram individualizadas com auxílio de uma lâmina de bisturi e plantadas em containers de papel chamados de *paper pot* ou 'Ellepot' (Ellegard) com fibra de coco.

As bandejas permaneceram um túnel de aclimatização com malha de alumínio para controlar a luminosidade e umidade relativa manualmente. A irrigação por aspersão no túnel possibilitou o enraizamento e aclimatização completa das plantas em cerca de 4 semanas.

Após esse período, as bandejas foram transferidas fora dos túneis para o ambiente aberto da casa de vegetação para completar seu crescimento até sua comercialização. Quando atingiram seu desenvolvimento completo, as plantas escolhidas foram as que apresentaram maiores diferenças na tortuosidade do caule, para o aumento da probabilidade de ocorrência de variações somaclonais.

4.2 Produção de porta-enxertos cítricos por semente

Os porta-enxertos produzidos por semente foram fornecidos por viveiro terceirizado na cidade de Engenheiro Coelho, Estado de São Paulo que segue as instruções normativas de produção de mudas cítricas da Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo e do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, garantindo a qualidade fitossanitária.

A semeadura foi feita em tubetes plásticos contendo cerca de 3 ou 4 sementes por recipiente com substrato de fibra de coco, em viveiro telado, acima do solo (Figura 9). Após sua germinação, as plantas foram selecionadas visualmente deixando apenas a planta nucelar, cópia idêntica da planta-mãe e descartando as plantas não desejadas.



Figura 9. Semeadura manual de porta-enxerto cítricos.

Atingindo o tamanho comercial, aos 4 meses, as plantas originárias de sementes foram levadas ao viveiro onde se encontravam as plantas micropropagadas e colocadas juntas para receberem todos os tratamentos fitossanitários e de crescimento iguais.

4.3 Caracterização morfológica

Uma análise visual foi realizada em relação à margem e formato do limbo foliar, tortuosidade, presença e formato de espinhos conforme o *Descriptors of Citrus* (1999). Foram feitas medições de altura e diâmetro de caule e comprimento e largura dos três folíolos da maior folha de cada planta. que se deram-se com paquímetro e régua graduada. Quantificaram-se quantas folhas alternadas são necessárias para uma volta completa e encontrar-se na mesma posição da folha de referência (Figura 10; Apêndice D).

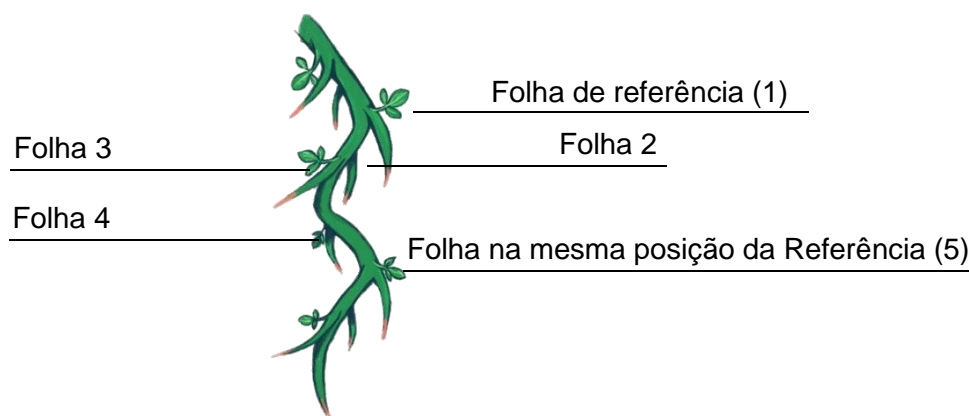




Figura 10. Contagem de folhas entre a folha de referência e a de mesmo ângulo no caule de 'Flying Dragon'.

Posteriormente à aclimatização, foram escolhidas aleatoriamente 100 plantas oriundas da micropropagação e 100 plantas produzidas via semente de origem de viveiro comercial de porta-enxertos cítricos com 4 meses de idade. Todas as plantas foram comparadas à planta de referência (Tabela 1), chamadas de plantas fornecedoras de material inicial (FMVI).

Tabela 1. Partes vegetais das plantas de referência para caracterização morfológica do 'Flying Dragon'.

Folha	Caule
<ul style="list-style-type: none"> - Coloração verde escuro - Trifoliada - Ovalada - Margem dentada - Alternadas - Pecíolo estreito e longo 	<ul style="list-style-type: none"> - Tronco fortemente tortuosos irregulares - Espinhos pequenos e curvos
	

4.4 Caracterização genética

Para a caracterização genética foram utilizados marcadores moleculares SSR e citometria de fluxo. Os marcadores moleculares microssatélites foram utilizados em 100 plantas micropropagadas, 5 plantas produzidas por sementes e ambas as origens comparadas às três plantas FMVI. Para citometria foram utilizadas 100 plantas micropropagadas, 100 plantas produzidas por sementes e comparadas às três plantas fornecedoras de MVI conforme a disponibilidade de material foliar para análise.

4.4.1 Marcadores moleculares SSR (*Simple Sequence Repeats*)

i. Extração de DNA

O DNA foi extraído baseado no Protocolo de Extração de DNA e RNA de Alta Qualidade para Espécies Ricas em Compostos Secundários do Comunicado Técnico 204 da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia (INGLIS; PAPPAS; GRATTAPAGLIA, 2016).

Foram preparadas, previamente, três fórmulas de soluções tampões para serem utilizadas durante a extração do DNA. A solução tampão de lavagem de sorbitol composta por 0,35 M de sorbitol, 100 mM TRIS pH 8,0, 5mM EDTA e 1% polivinilpirrolidona (PVP-40) e armazenada a 4°C. Foi acrescentado 1 mL de β -mercaptoetanol a cada 100 mL da solução na hora do seu uso. Ao tampão de lise celular CTBA (brometo de cetil trimetilamônio) 3% foi acrescentado com 0,2 mL β -mercaptoetanol para cada 100 mL de TRIS pH 8,0 100mM, NaCl 3M, EDTA 20mM e PVP-40 1%. Por último, foi preparada a solução de clorofórmio e álcool isoamílico (CIA) na proporção de 24:1.

Para o preparado do material vegetal, foram retiradas entre 5 e 10 folhas maduras do terço médio das plantas e foram desidratadas em sílica. O limbo foliar foi recortado em pedaços menores com auxílio de uma tesoura e colocadas em microtubo tipo *ependorf* de 2 mL e foram maceradas através do TissueLyser II (QIAGEN, Hilden, Germany) com auxílio de esferas de aço inox de 5 mm de diâmetro até serem reduzidas à um pó fino.

Em cada tubo foi adicionado 1 mL da solução tampão de sorbitol para reduzir a quantidade de impurezas da amostra e misturado novamente por 10 segundos no macerador e foram centrifugados no equipamento Centrifuge 5415R Eppendorf a 5000 rcf por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o processo de lavagem com sorbitol foi repetido mais uma vez.

Em seguida, foram adicionados 700 μ L do tampão de extração CTAB 3% ao *pellet* de tecido vegetal e macerado novamente. Após a ressuspensão, os tubos foram incubados em banho-maria a 65°C por 45 minutos, resfriados em temperatura ambiente por 5 minutos e colocados em centrífuga a 5000 rcf por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo *ependorf* de 1,5 mL. Cada tubo recebeu 700 μ L da solução CIA e agitada por inversão durante 2 minutos, centrifugada a 5000 rcf por 10 minutos. A primeira fase aquosa foi transferida para

novo tubo, acrescentada de 50 µL de acetato de sódio 5,2 M a 300 µL de isopropanol gelado e mantido *overnight* a -20°C.

Após o período, o tubo foi descongelado, centrifugado por 10 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com etanol 70%, centrifugado por 10 minutos a 13.000 rpm e o processo de descarte de sobrenadante e lavagem de *pellet* foi repetido mais uma vez e deixado em temperatura ambiente para evaporação do etanol por cerca de 1 hora. Após a secagem, foi feita a ressuspensão em 50 µL de tampão Tris EDTA (TE) em cada tubo *ependorf* e incubados a 37°C por 30 minutos.

A quantificação de DNA foi feita para garantir a integridade da amostra por comprimento de onda em Espectrofotômetro Nanodrop ND-8000 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) com os resultados expressos no Apêndice B.

ii. Marcadores moleculares SSR

Foram disponibilizados 30 pares de *primers* SSR (Tabela 2), desenvolvidos a partir de informações de sequências expressas EST (*Expressed Sequence Tag-polymerase*) de citros – CitEST (PALMIERI *et al.*, 2007), além das sequências genômicas (NOVELLI *et al.*, 2006) selecionados a partir de 10 acessos de porta-enxertos trifoliatas e híbridos, todos de *loci* polimórficos de 50 a 300pb.

As reações de amplificação (PCR) foram conduzidas usando 100 ng de DNA em um volume total de 15 µL contendo 0,3 µL de cada *primer* (forward e reverse), 1,5 µL de tampão de reação (Buffer 10X contendo MgCl₂), 0,3 µL de *Taq*-polimerase (5U/µL), 1,2 µL de dNTP, 3,0 µL do DNA e água estéril completando o volume final.

Os termocicladores utilizados para a amplificação do DNA foram do modelo Vereti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, California, EUA) seguindo o programa de amplificação para os *primers* SSR ESTs de 95°C por 1 minuto, 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos por 30 ciclos e 3 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e 72°C por 7 minutos. Para *primers* genômicos foi utilizado as condições de 32 ciclos de 94°C por 5 segundos, 94°C por 1 minuto, 55°C por 30 segundos, 72°C por 1 minutos e 72°C por 4 minutos. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 3% com 6 µL brometo de etídio a cada 100 mL do gel. Ao final, para a visualização do gel, foi utilizado fotodocumentador para as análises de polimorfismo.

4.4.2 Citometria de fluxo

Para a caracterização das plantas quanto à ploidia, utilizou-se da técnica de citometria de fluxo. Para isso, as plantas foram acondicionadas na mesma casa de vegetação e receberam os mesmos tratamentos fitossanitários, irrigação e fertilizantes durante a execução do projeto, seguindo as normas de produção de mudas cítricas da Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo. Foram amostradas folhas jovens de cada planta retirados segmentos da lâmina foliar com tamanho aproximado de 1,0 cm², usando-se lâmina de aço para o corte. As suspensões nucleares das amostras foram isoladas a partir de e imersos de 1.000 µL tampão de extração. Posteriormente as suspensões foram coradas com 50 µL da solução corante do mesmo kit *Cy-Stain UV Precise T-DAPI* (Partec GmbH, Alemanha), que usa o 4-6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) como fluorocromo, filtradas com uma malha de 30 µm CellTrics disposable filter (Partec GmbH) e analisadas imediatamente com o equipamento Partec CyFlow Ploidy Analyzer DAPI (Partec GmbH, Alemanha), equipado com lâmpada UV-LED (365 nm *emission wavelength*) e um parâmetro ótico para detecção de fluorescência. As amostras foram avaliadas com o software *CyView* (Partec GmbH, Alemanha) com calibração *Gain* = 520 e *Low Level* (LL) = 0,70, resultando em histogramas. As amostras cujos coeficientes de variação (CV) situaram-se acima de 10% foram descartadas.

4.5 Análises estatísticas

O delineamento experimental para as análises morfológicas foi inteiramente casualizado e os dados submetidos à análise de variância e comparadas pelos testes de Scott Knott, com 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o programa SASM-Agri.

Tabela 2. Relação dos 30 primers de microssatélite usados para estabelecer o perfil molecular dos genótipos.

ID do loco	Repetição	Sequências do primer		nº de alelos	Tamanho estimado (bp)	Heterozigosidade		PIC
		Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')			Observada (Ho)	Esperada (Hexp)	
CCSM4	(AG)n	ttctcctcatctcgactcc	ccgatcttacgacgatcaaa	3	80 a 100	0.333	0.553	0.460
CCSM6	(AG)n	atctgtgtgaggactgaa	cctctattaatgtgcctg	4	200 a 250	0.625	0.699	0.621
CCSM11	(AG)n	tagaagctgtcttgtgatgt	atctagtgctactgaaccaa	3	100 a 200	0.125	0.481	0.378
CCSM12	(AG)n	gattgaatcttctgtagctc	atcatcatctagtgctactg	2	300 a 400	0.125	0.510	0.375
CCSM18	(AG)n	aacagttgatgaagagggaag	gtgattgctggtgctgctt	5	150 a 280	0.542	0.738	0.679
CCSM24	(GA)26	attgacagaagtctg	ccacttaactactctcct	2	100 a 200	0.000	0.511	0.374
CCSM29	(TGA)15(TTA)9	cgtagattgtgtccga	cacacttcacaatgttgcac	4	100 a 200	0.833	0.703	0.639
CCSM40	(GCAACA)10	acaagagtcgcaacaatc	gacaacagtggaatacc	2	100 a 200	0,046	0,098	0,093
CCSM46	(GCA)6(CAA)8	ataccttatcaagtaacacg	tcagaatgagtactagctcc	4	80 a 100	0.417	0.750	0.686
CCSM49	(CAA)9	accgatcagcagaagagg	ttgctgttgccttctgttg	2	80 a 100	0.167	0.156	0.141
CCSM70	(AG)10 AA(AG)11	gcaaggagtagtaatgtgg	ctcgtgtgcaagttgcat	4	120 a 150	0.571	0.599	0.498
CCSM-EST-11	(TC)12	ttcatggcagcttgagtttc	agtcattggaagccaaatgg	3	200 a 300	0.583	0.443	0.369
CCSM-EST-36	(TC)14	tgaagacgggtgtaatgcca	ggtttagttgccttgcctaaa	4	200 a 300	0.542	0.717	0.654
CCSM-EST-50	(ATAG)5	gttttgcttgccttgtgtcg	caaaccatctaaagcccaa	4	100 a 200	0.500	0.606	0.547
CCSM-EST-60	(ATC)8	cttggagaaacagcagagg	cgaattggaatcaaaggcat	3	100 a 200	0.542	0.657	0.567
CCSM-EST-89	(ATA)7	acttatctgcacccgacga	gaggctcgaagtacggag	3	50 a 300	0.625	0.550	0.480
CCSM-EST-42	(ATA)7	acttatctgcacccgacga	gaggctcgaagtacggag	4	200 a 400	0.500	0.642	0.579
CCSM-EST-126	(GTG)6	ggcggaagtattgaactgga	gctgcttccacgaagagacc	4	100 a 200	0.708	0.668	0.594
CCSM-EST-140	(CTC)8	accatcgaagactccgtcac	acgctttatcacgggttttg	2	100 a 200	0.292	0.311	0.258
CCSM-EST-142	(CCA)8	tgaagtcctccaagaaaagc	agtcagagccagagccagag	2	100 a 200	0.458	0.503	0.371
CCSM-EST-149	(TAA)8	ctgagccaaagggatgaaaa	tgggtttattgtgggctgt	3	100 a 200	0.542	0.595	0.514
CCSM-EST-159	(TTCTTG)4	tgggtcattgatgttgct	cacagatgcagaaggggatt	3	50 a 150	0.333	0.290	0.254
CCSM-EST-169	(ATGATC)4	acgtcgtagatcctgtgct	catacaccaaaacaccgtcca	2	200 a 300	0,244	0,215	0,191
CCSM-EST-187	(CTCCAC)4	cagggactcaaaacacgaca	tatgatgatggtgtgtcg	3	100 a 200	0.750	0.667	0.579
CCSM-EST-191	(CAG)9	gagggagtggctatgcaaga	tcgagattcaattgtgcac	3	100 a 200	0,388	0,468	0,402
CCSM-EST-194	(TGC)7	ggggagtgcatttgtgagat	tccagtggccattatacctg	4	80 a 200	0.583	0.596	0.530
CCSM-EST-198	(CGG)7	aaaaagaacaggagcaggca	agaaccacatgcagaaacc	2	100 a 200	0.625	0.439	0.337
CCSM-EST-200	(TTA)8	gaaatcccattctcccatt	cttcacagtccgcagcatta	2	80 a 100	0.417	0.496	0.368
CCSM-EST-201	(TA)15	agctaggggtccccagattc	ggcctccaagtacaacccaaa	3	100 a 200	0.167	0.584	0.509
CCSM-EST-207	(TAA)9	gacgtggcatttctctcg	ccacaaaggctcctcaactt	3	200 a 300	0.417	0.439	0.388
CCSM-EST-209	(AAT)12	gaagctcgccataatcaaa	gacgagaggtccagaaatcg	3	200 a 300	0.542	0.487	0.427
CCSM-EST-210	(CTTCAA)4	aacctcaactccctctcca	atgctaccatacagcacc	2	100 a 200	0.000	0.511	0.375
CCSM-EST-213	(TCC)8	gacgtgttctcaccgttt	cacgttattgtggcgatgac	3	100 a 200	0.625	0.616	0.530

Fonte: NOVELLI *et al.*, 2006.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização morfológica

Durante o presente estudo, não foram observadas modificações das características morfológica das plântulas obtidas *in vitro* por organogênese direta (Figura 11). As plantas analisadas não apresentaram diferenças na coloração, formato e borda de limbo foliar, pecíolo. Os espinhos e caules se mantiveram curvados e retorcidos (Apêndice D e E).

A eficiência da micropropagação do 'Flying Dragon' não foi o objetivo do trabalho, todavia os resultados de multiplicação, aclimatização e enraizamento são muito satisfatórios perante a produção comercial por sementes, pois mesmo após 25 subcultivos, as plantas micropropagadas avaliadas confirmaram os resultados encontrados por Starrantino *et al.* (1998) de que mesmo após 14 anos em meio de cultura, não foram encontradas mudanças fenotípicas ou genéticas em plantas de 'Flying Dragon'.

Essa estabilidade morfológica é um dos fatores essenciais para assegurar a clonagem de porta-enxertos, pois mantém a produtividade e qualidade do fruto em campo (CARVALHO *et al.*, 2019; DOMINGUES *et al.*, 1999). Uma técnica de avaliação é a caracterização fenotípica que pode ser considerada uma análise simples e de baixo custo, segundo Oliveira *et al.* (2002).

Na caracterização de ocorrência de poliplóides em citros, é possível observar um aumento de cerca de 20 a 25% do tamanho ou volume de suas células em comparação à uma planta diplóide, além de folhas mais espessas com tendência à coloração mais escura conforme relatos de Wright (1976), facilitando sua

identificação. Todavia, no presente trabalho, foram observadas diferenças apenas nas alturas das plântulas obtidas por micropropagação ($25,49 \pm 9,46$ cm) e as plântulas originadas de sementes ($21,84 \pm 2,64$ cm), sendo que a maior variação entre as plantas foi observada para as originadas por micropropagação.

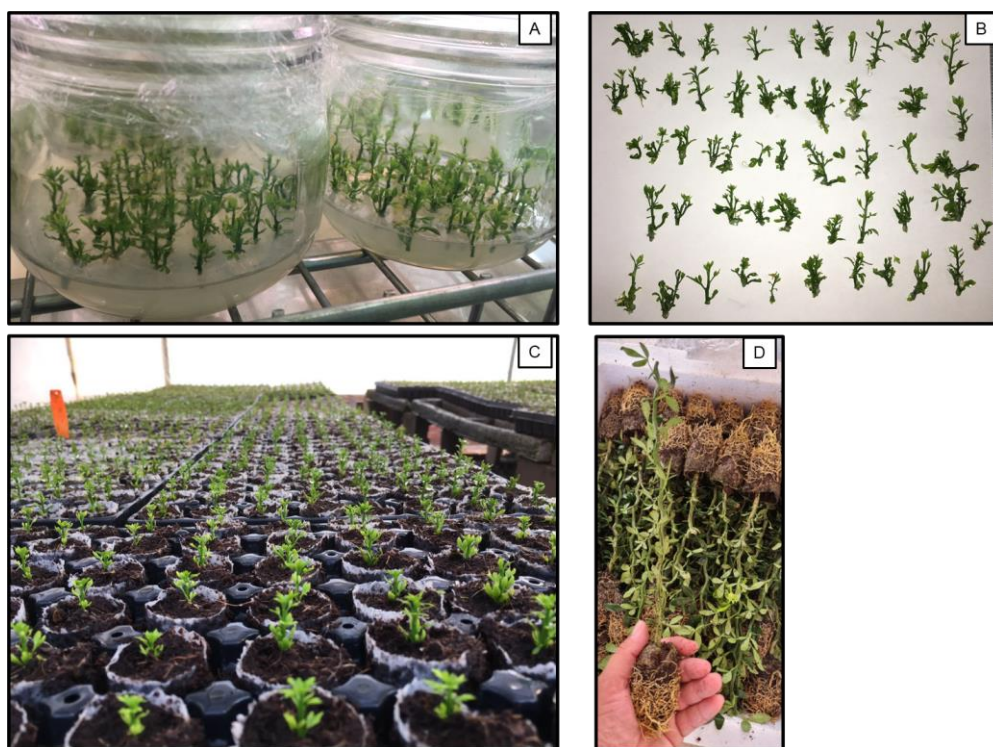


Figura 11. Etapas de produção de porta-enxerto 'Flying Dragon' micropropagado: A) Frasco de vidro contendo meio de cultura e microestacas em desenvolvimento; B) individualização de microestacas para multiplicação *in vitro*; C) início do processo de enraizamento *ex vitro* após o plantio em 'paper pot'; D) muda finalizada.

Essa maior uniformidade das plantas oriundas de sementes pode ser explicada pela seleção inicial feita em porta-enxertos comerciais para descartar embriões zigóticos (CARVALHO *et al.*, 2019; GARCÍA *et al.*, 1999).

Não foi observada diferença estatística no diâmetro entre as plantas nas duas condições, entretanto, o número médio de folhas nas plantas originadas por sementes foi estatisticamente maior (5,43) (Tabela 3). As plantas micropropagadas apresentaram comprimento dos folíolos e pecíolo (1,42 cm folíolo esquerdo, 2,06 cm folíolo central, 0,90 cm folíolo direito e 1,36 cm no pecíolo) menores que os encontrados nas plantas de origem de sementes (1,65 cm folíolo esquerdo, 2,34 cm folíolo central, 1,25 cm folíolo direito e 1,63 cm no pecíolo). Não foi observada

diferença estatística das larguras dos folíolos e pecíolo, com exceção ao folíolo direito, de ambas as origens (Tabela 4; Apêndices F e G).

Tabela 3. Tipo de propagação, altura, diâmetro de caule e número de folhas.

Tipo de propagação	Altura (cm)	Desvio padrão	Diâmetro (cm)	Desvio padrão	Número de folhas	Desvio padrão
Micropropagadas	25,50 a	9,47	3,40 a	0,55	4,00 b	0,00
Sementes	21,84 b	2,64	3,45 a	0,33	5,43 a	0,93

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p > 0,05$).

Tabela 4. Tipo de propagação, comprimento e largura dos folíolos e pecíolo.

Tipo de propagação	Comprimento				Largura			
	Folíolo Esquerdo	Folíolo Central	Folíolo Direito	Pecíolo	Folíolo Esquerdo	Folíolo Central	Folíolo Direito	Pecíolo
	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)
Micropropagadas	1,42b	2,06b	0,90b	1,36b	0,68 a	0,88 a	0,19 b	0,68a
Sementes	1,65a	2,34a	1,25a	1,63a	0,76 a	1,28 a	0,30a	0,78a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p > 0,05$).

5.2. Caracterização genética

5.2.1 Marcadores moleculares SSR

Foram avaliados 30 pares de *primers* SSR, analisados visualmente pela presença ou ausência de bandas no gel de agarose, dos quais três não amplificaram nenhum fragmento. Dos 27 pares de *primers* que amplificaram fragmentos, 19 (70%) permitiram a visualização de apenas um alelo (fragmento de DNA) e 8 amplificaram dois alelos. O tamanho dos fragmentos amplificados variou de 100 a 200 pb.

Pela composição do meio de cultura (WPM) e pelo número de subcultivos realizados *in vitro* (25 subcultivos), havia possibilidade de encontrar alterações no número de cromossomos como aneuploidia, seguindo relatos de Siragusa *et al.*, 2007, entretanto os perfis de bandas dos marcadores SSR utilizados revelaram o padrão de bandas igual ao das plantas fornecedoras de material inicial em todas as combinações de *primers*. O resultado pode ser observado em Figura 12, que representa algumas plantas da população avaliada. Com isso, pode-se concluir que

todas as 100 plantas micropropagadas apresentaram os mesmos padrões das plantas matrizes.

Os resultados de SSR obtidos não excluíram a ocorrência de outras alterações no genoma nuclear. No entanto, considerando a estabilidade morfológica das plantas propagadas *in vitro*, os resultados indicaram que o protocolo utilizado foi adequado e eficiente para a propagação *true-to-type* em larga escala dos genótipos estudados para fins comerciais.

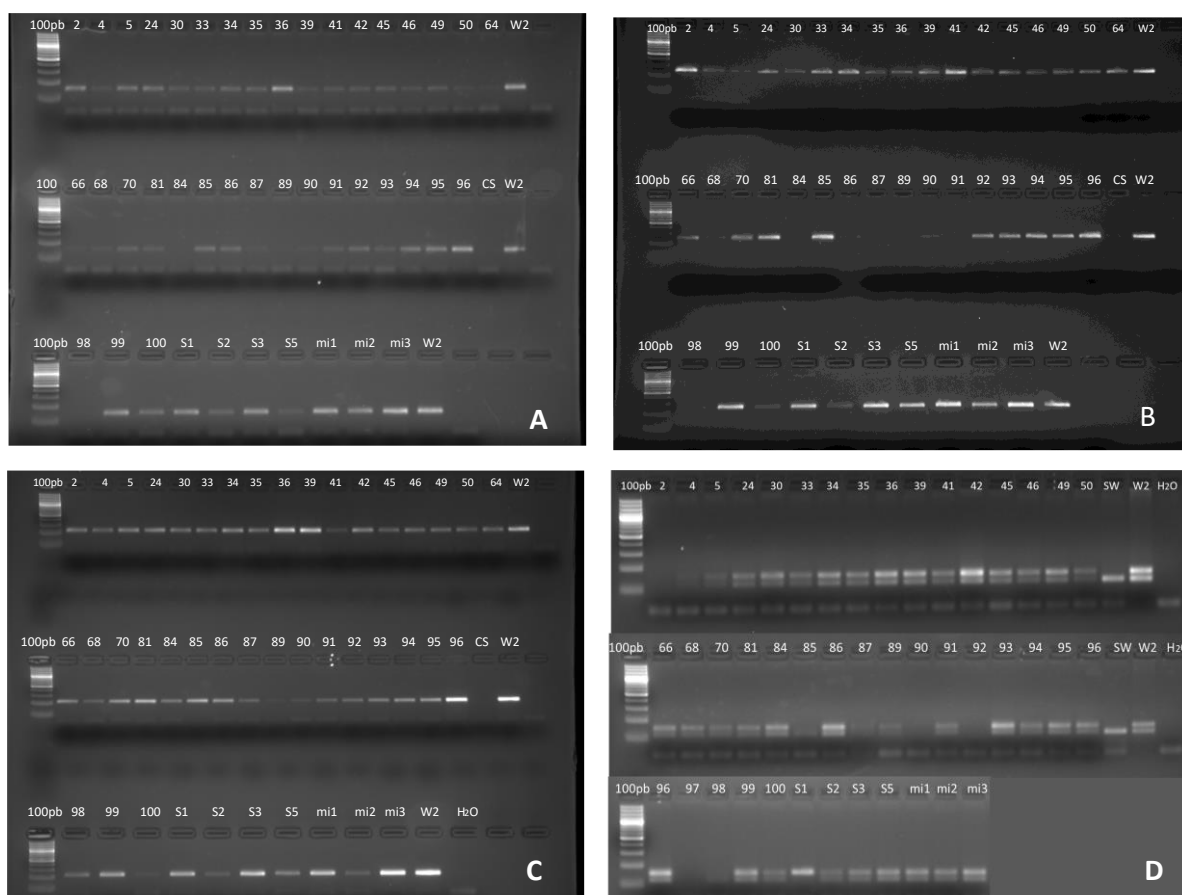


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 3%. Amplificação de DNA de 'Flying Dragon': 2 a 100 são plantas micropropagadas, S1 a S5 são amostras de sementes, MI 1 a 3 são materiais iniciais, CS = citrumelo Swingle e W2 = citrumelo W2 utilizando marcadores microssatélites (A) CCSM 154; (B) CCSME 11; (C) CCSME 126 e (D) CCSME 50. Marcador de peso molecular = Ladder 100 pb.

Um fator crítico na micropropagação e regeneração de plantas *in vitro* é avaliar sua fidelidade genética. Durante as condições de cultivo *in vitro* por períodos prolongados, as plantas regeneradas podem apresentar variação somaclonal, particularmente em plântulas regeneradas de calos (BAIRU; AREMU; VAN STADEN,

2011). Este fenômeno desperta maior preocupação na produção em larga escala de plantas cultivadas economicamente importantes ou na conservação de recursos genéticos. A variação somaclonal pode limitar a eficácia de qualquer programa de micropropagação onde é importante produzir material vegetal *true-to-type* (CARDOSO; GERALD; DA SILVA, 2018).

Assim, é fundamental avaliar a uniformidade genética de mudas propagadas *in vitro*. Isso pode ser obtido pela análise de DNA, sem a necessidade de informações das sequências de DNA, com a finalidade de confirmar se as plântulas são geneticamente idênticas à planta doadora de material vegetal (PALOMBI; DAMIANO, 2002).

No presente trabalho, todos os perfis SSR das plantas micropropagadas e regeneradas aclimatadas foram idênticos, ou seja, fiéis ao tipo das plantas doadoras, indicando sua homogeneidade genética. No entanto, deve-se enfatizar que, usando vários marcadores moleculares, incluindo SSRs, não é possível detectar efetivamente toda a variabilidade clonal originada por todas as possíveis mutações aleatórias ocorridas no genoma de *Citrus*. As espécies de *Citrus* têm genomas pequenos. Os *Citrus*, normalmente, são diplóides com nove pares de cromossomos. Ollitrault *et al.* (1994) encontraram variação significativa no tamanho do genoma entre as espécies de citros. Os maiores e menores genomas foram respectivamente *C. medica* L. (cidra, com valor médio de 398 Mb/genoma haploide) e *C. reticulata* Blanco (tangerina, com valor médio de 360 Mb/genoma haploide). Para *C. maxima* (Burm.) Merrill, a toranja, o valor foi intermediário com um genoma médio de 383 Mb/haploide.

5.2.2 Citometria de fluxo

A análise de citometria de fluxo de 100 plantas micropropagadas e 100 plantas de sementes apresentou valores médios de volume nuclear de $171,43 \pm 8,99$ para as plantas vindas de sementes e $189,47 \pm 7,03$ para as micropropagadas (Apêndice C).

Para efeito de comparação, foram incluídas amostras de folha de Citrumelo Swingle diplóide (Figura 13A) e tetraplóide (Figura 13B) cujos valores de volume nuclear foram por volta de 170 na planta diplóide e de 340 para tetraplóide. Amostras de Citrumelo Swingle foram utilizadas pois não havia disponibilidade de

plantas tetraplóides da variedade trifoliada ‘Flying Dragon’. A metodologia empregada foi a mesma para as duas variedades.

Dessa forma, com base na comparação com o Citrumelo Swingle, os histogramas de ‘Flying Dragon’ (Figura 13C) revelaram os mesmos padrões de volume nuclear de plantas diplóides. Assim, podemos concluir que todas as plantas avaliadas oriundas de micropropagação era diplóides (POLATÖZ; SEKER; KAYA, 2021).

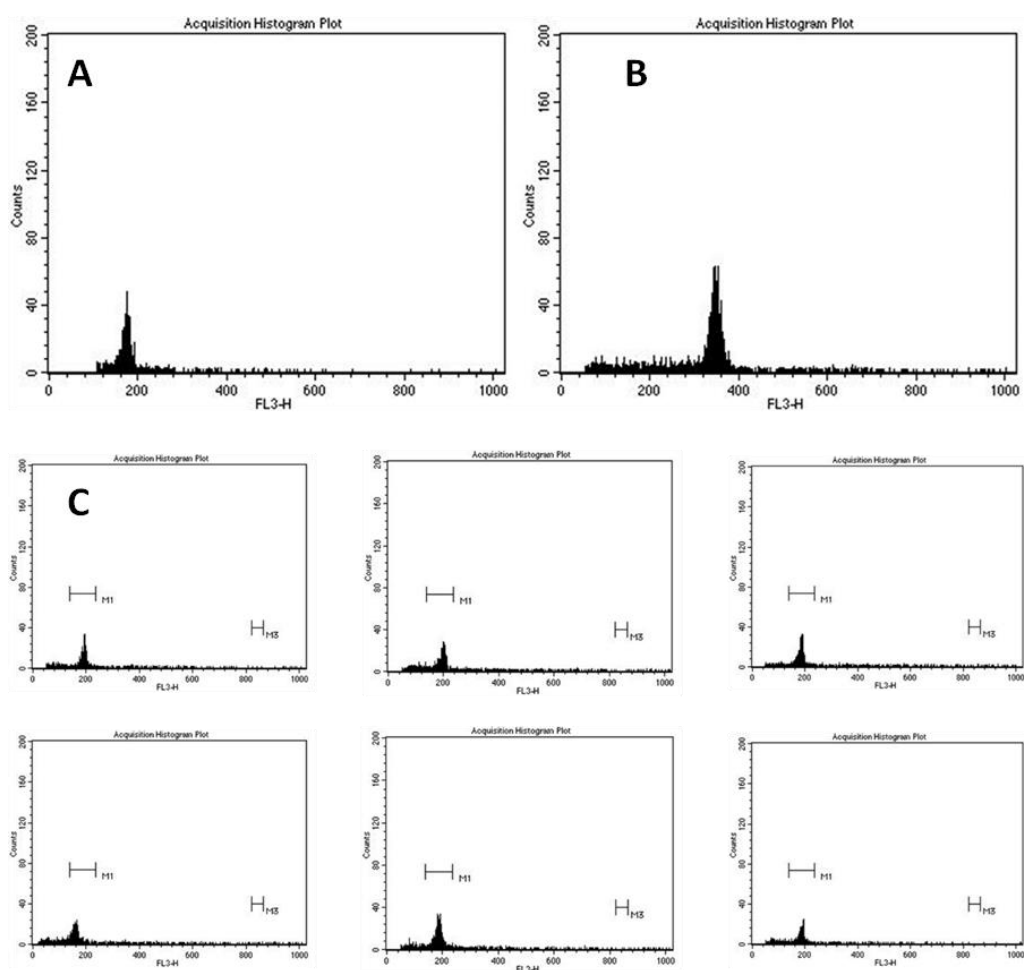


Figura 13. Histogramas de amostras de folhas de plantas de: A) citrumelo Swingle diplóide (2x); B) citrumelo Swingle tetraplóide (4X); C) amostras de trifoliata ‘Flying Dragon’.

As plantas originárias de sementes, apresentaram valores menores nos histogramas. Isso pode ser explicado ao fato delas terem permanecido em outro local durante os primeiros 4 meses de desenvolvimento. Isso está de acordo com Domingues *et al.* (1999). A poliploidia ocorre de maneira espontânea em sementes

de citros e a variação das leituras do volume nuclear podem se dar por esse motivo, corroborando com o estudo de Vijayakumari *et al.*, 2022.

Os cromossomos dos citros têm tamanho reduzido, não possibilitando afirmar se há plantas aneuplóides, pois para tal afirmação seria necessário repetir os experimentos com maior número de amostras das plantas mais distintas, pois essa variação é mais sutil (VIJAYAKUMARI *et al.*, 2022.; POLATÖZ; SEKER; KAYA, 2021).

A produção de plantas *true-to-type* por meio da propagação *in vitro* é um dos critérios mais importantes para qualquer protocolo de micropropagação para plantas de cultivos economicamente importantes. As técnicas de cultura de tecidos vegetais podem causar instabilidade genética devido a variações no nível de ploidia, mutações pontuais ou translocações, levando à variação somaclonal, que ocorre pelo uso de vários reguladores de crescimento no meio de cultivo (AZIZI *et al.*, 2020). Plantas regeneradas tendo como explantes gemas axilares e tecido meristemático têm mostrado menor variação genética com frequências entre 0-10% (SHERIF *et al.*, 2018; VINOTH E RAVINDHRAN, 2016).

No entanto, muitos autores relataram que as plantas regeneradas por meio da embriogênese somática mostraram uniformidade e integridade genética (Rai *et al.*, 2012). Por outro lado, Viehmannova *et al.* (2014) relataram a presença de modificação genética em plantas derivadas de embriões somáticos. A ocorrência da fase de calos durante a embriogênese somática indireta pode ser uma importante fonte de variação. De acordo com Bairu *et al.* (2011), uma fase de crescimento desorganizado na cultura de tecidos, o uso de reguladores de crescimento, o número e a duração de uma subcultura, o estresse e genótipo são fatores que aumentam a frequência de ocorrência de variação somaclonal.

Devido ao exposto acima, avaliar a estabilidade genética de plantas cultivadas *in vitro* é um requisito para a micropropagação de plantas. Na literatura, são encontrados vários trabalhos em que foram utilizados marcadores SSR, citometria de fluxo e caracterização morfológica para avaliar a homogeneidade genética e a estabilidade morfológica de plantas regeneradas *in vitro*. Henao-Ramírez *et al.* (2021), regeneraram plantas de cacau através da embriogênese somática a partir de calos e observaram estabilidade morfológica nas plantas regeneradas. Os autores utilizaram 13 pares de *primers* SSR. Os resultados de SSR obtidos não excluíram a ocorrência de outras alterações no genoma nuclear. No

entanto, considerando a estabilidade morfológica das plantas propagadas *in vitro*, os resultados indicaram que o protocolo utilizado foi adequado e eficiente para a propagação *true-to-type* em larga escala dos genótipos estudados para fins comerciais.

Prado *et al.* (2010) detectaram variantes somaclonais em plantas de *Vitis vinifera* L. regeneradas pela embriogênese somática por citometria de fluxo e marcadores microssatélites. Citometria de fluxo e análises de microssatélites foram usadas para avaliar a fidelidade ao tipo de plantas regeneradas pela embriogênese somática de seis importantes cultivares de videira. Plantas tetraploides e octoplóides foram regeneradas por embriogênese somática de todas as cultivares testadas. Portanto, é provável que esses poliploides tenham se originado da variação somaclonal. A análise de microssatélites de plantas regeneradas pela embriogênese somática mostrou genótipos *true-to-type* para todas as plantas, exceto seis plantas da variedade 'Torrontés'. Não houve uma relação clara entre a ocorrência das plantas regeneradas mutantes observadas e a composição do meio de indução de calos, o estágio de desenvolvimento das inflorescências, o tipo de explante utilizado para iniciar as culturas ou o tipo de germinação (precoce em meio de diferenciação ou normal em meio de germinação) em qualquer uma das cultivares testadas, exceto 'Torrontés'.

O processo de organogênese direta de plantas já é aplicado para outras espécies cítricas com resultados similares para 'Swingle', 'Limão Cravo', citrandarins e outros híbridos que têm alto êxito em todas as fases da produção apresentadas nesse trabalho, apresentado a produção *in vitro* como um método de propagação vegetativa alternativa à convencional pela larga escala (HENAO-RAMÍREZ *et al.*, 2021; NANDHAKUMAR *et al.*, 2017).

Ioannidis *et al.* (2022), avaliaram a estabilidade genética de plantas de *Cannabis sativa* L., regeneradas e obtidas por organogênese indireta a partir de calos, usando doze pares de *primers* SSR que produziram bandas reprodutíveis e claras, variando de 90 a 330 bp de tamanho, e resultaram na amplificação de um ou dois alelos, correspondendo a indivíduos homocigotos ou heterocigotos. Os produtos de amplificação SSR foram monomórficos em todas as plantas regeneradas e comparáveis às plantas-mães. O padrão monomórfico confirmou a homogeneidade genética das plantas cultivadas *in vitro* já que nenhuma variação somaclonal foi detectada nos 9 clones de cada uma das oito variedades para esses SSRs

específicos. Além disso, a morfologia geral das plantas aclimatadas também foi semelhante à das plantas-mães.

Marcadores SSR foram empregados para avaliar a uniformidade genética de plantas micropropagadas de *Helianthus verticillatus*, e sua estabilidade genética foi confirmada entre os regenerantes e suas respectivas plantas doadoras. Kakimzhanova *et al.* (2023) e Nowakowska *et al.* (2020) relataram que a análise de SSR confirmaram a homogeneidade genética de seu protocolo para micropropagação de *Malus sieversii*. Em outra espécie de *Malus*, *Malus niedzwetzkyana*, Nurtaza *et al.* (2021) usando *primers* SSR, não detectaram variação somaclonal entre a planta mãe e os clones micropropagados dessa espécie. Bandupriya *et al.* (2017) usando marcadores SSR, afirmaram que não houve variação somaclonal ou instabilidade genética nas plântulas que foram regeneradas de explantes de ovário de *Cocos nucifera* L.

Wanmei *et al.* (2009), avaliando a fidelidade genética de mudas regeneradas de videira, não detectou polimorfismo, indicando também a fidelidade de plantas regeneradas. Além disso, Pandey *et al.* (2012) avaliando a fidelidade genética em cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), descobriu que os padrões SSR das mudas regeneradas através da organogênese direta, eram idênticos aos da planta-mãe, indicando que organogênese adventícia direta não induziu variação somaclonal. Rai *et al.* (2012), avaliaram a fidelidade genética de plantas de *Psidium guajava* L. (goiabeira) desenvolvidas a partir de embriogênese somática usando seis pares de *primers* SSR, relataram que os produtos de amplificação foram monomórficos em todas as plantas regeneradas. Além disso, Wanmei *et al.* (2014), usando marcadores SSR, descobriram que todos os perfis de bandas de plântulas regeneradas de *Malus hupehensis* var. *pinyiensis* eram monomórficos e idênticos aos da planta doadora, mostrando a uniformidade genética das mudas cultivadas *in vitro*.

6. CONCLUSÕES

Durante mais de dois anos em meio de cultivo e com 25 subcultivos, a variedade 'Flying Dragon' se apresentou estável morfológicamente e geneticamente sem apresentar nenhuma alteração para os testes realizados.

Os 30 marcadores SSR no material utilizado no processo de micropropagação indicaram estabilidade genética, porém não descartam outros SSR modificados.

As técnicas de marcadores e citometria de fluxo são ferramentas úteis para análises de ploidia tanto em projetos de melhoramento, pesquisa quanto comercial.

Não houve possibilidade de garantir de ausência de aneuploidia pela citometria de fluxo e novas análises devem ser repetidas para excluir erros.

A técnica de micropropagação para porta-enxertos é necessária perante as altas demandas de plantas e escassez de sementes no mercado e segura perante as avaliações feitas.

7. LITERATURA CITADA

ALEZA, P.; FROELICHER, Y.; SCHWARZ, S.; AGUSTÍ, M.; HERNÁNDEZ, M.; JUÁREZ, J.; LURO, F.; MORILLON, R.; NAVARRO, L.; OLLITRAULT, P. Tetraploidization events by chromosome doubling of nucellar cells are frequent in apomictic citrus and are dependent on genotype and environment. **Annals of Botany**, v. 108, n. 1, p. 37-50, 2011.

ANDRADE, R. A.; MARTINS, A. B. G. Propagação vegetativa de porta-enxertos para citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 1, p. 134-136, 2003.

ARAÚJO, P. S. R.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; SILVA, J. A. F.; BARBANO, M. T. Enraizamento de estacas de limeira ácida 'Tahiti' coletadas em diferentes posições na árvore. **Scientia Agricola**, v. 56, n. 2, p. 357-361, 1999.

ASADI, N.; ZAREI, H.; HASHEMI-PETROUDI, S. H.; MOUSAVIZADEH, S. J. Micropropagation and assessment of somaclonal variation in *Galanthus transcaucasicus in vitro* plantlets. **Ornamental Horticulture**, v. 27, n. 4, p. 505–515, 2021.

AZEVEDO, F. A.; PACHECO, C. A.; SCHINOR, E. H.; CARVALHO, S. A.; CONCEIÇÃO, P. M. Produtividade de laranjeira Folha Murcha enxertada em limoeiro Cravo, sob adensamento de plantio. **Bragantia**, v. 74, n. 2, p.184-188, 2015.

AZIZI, P.; HANAFI, M. M.; SAHEBI, M.; HARIKRISHNA, J. A.; TAHERI, S.; YASSORALIPOUR, A.; NASEHI, A. Epigenetic changes and their relationship to somaclonal variation: a need to monitor the micropropagation of plantation crops. *Functional Plant Biology*, v. 47, n. 6, p. 508-523, 2020.

BAIRU, M. W.; AREMU, A. O.; VAN STADEN, J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. ***Plant Growth Regulation***, v. 63, n. 2, p. 147–173, 2011.

BANDUPRIYA, H.; IROSHINI, W.; PERERA, S.; VIDHANAARACHCHI, V.; FERNANDO, S.; SANTHA, E.; GUNATHILAKE, T. Genetic fidelity testing using SSR marker assay confirms trueness to type of micropropagated coconut (*Cocos nucifera* L.) plantlets derived from unfertilized ovaries. ***The Open Plant Science Journal***, v. 10, n. 1, p. 46-54, 2017.

BAR-JOSEPH, M.; ROBERTSON, C.; HILF, M. E.; DAWSON, W. O. A novel method for Citrus propagation: Seed grafting. ***Journal of Horticultural Science & Biotechnology***, v. 86, n. 6, p. 616–618, 2011.

BARRETT, H. C.; HUTCHISON, D. J. Spontaneous tetraploidy in apomictic seedlings of Citrus. ***Economic Botany***, v. 32, n. 1, p. 27-45, 1978.

BAYRAKTAR, M.; HAYTA-SMEDLEY, S.; UNAL, S.; VAROL, N.; GUREL, A. Micropropagation and prevention of hyperhydricity in olive (*Olea europaea* L.) cultivar 'Gemlik'. ***South African Journal of Botany***, v. 128, p. 264-273, 2020.

BEESON J. R.; R. C.; SILVA, D. Development of a procedure to maximize production of hardy rootstocks of citrus using stem cuttings. ***American Journal of Plant Sciences***, v. 8, n. 11, p. 2837-2846, 2017a.

BEESON J. R.; R. C.; SILVA, D. Propagation of citrus rootstock cuttings success depends on season. ***Journal of Horticulture***, v. 4, n. 4, p. 213, 2017b.

BORDAS, M.; REDONDO, A.; BAPTISTA, L. Z.; TORRENTS, J. Efficient commercial micropropagation of new citrus rootstocks. *In: INTERNACIONAL CITRUS CONGRESS. INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE, Foz do Iguaçu-PR – Brazil September 18 - 23, 2016. Abstract Book.* p.99.

BOTEON, M.; NEVES, E. M. Citricultura brasileira: aspectos econômicos. *In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. Citros.* Instituto Agronômico e Fundag, 2005. p.19-36.

BOWMAN, K. D.; JOUBERT, J. Citrus rootstocks. *In: The genus citrus.* Woodhead Publishing, 2020. p. 105-127.

CAMERON, J. W.; FROST, H. B. Genetics, breeding and nuclear embryony. *In: REUTHER, L. B., WEBBER, H. The citrus industry.* Berkeley: University of California Press, 1968. p. 325-370.

CARDOSO, J. C.; GERALD, L. T. S.; DA SILVA, J. A. T. Micropropagation in the twenty-first century. *In: LOYOLA-VARGAS V. M., OCHOA-ALEJO N. Plant cell culture protocols, methods in molecular biology.* Humana Press, 2018. p.17-46.

CARIMI, F.; DE PASQUALE, F. Micropropagation of Citrus. *In: JAIN, S. M.; ISHII, K. Micropropagation of Woody Trees and Fruits.* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 589-619

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. A.; MEDEIROS, M. J. L. **Fatores inerentes à micropropagação.** Embrapa, 2006. p. 11-25. (Documentos, 148).

CARVALHO, S. A. D.; GIRARDI, E. A.; MOURÃO FILHO, F. D. A. A.; FERRAREZI, R. S.; COLETTA FILHO, H. D. Advances in citrus propagation in Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 41, n. 6, p. e-422, 2019.

CARVALHO, S. A.; DE NEGRI, J; MÜLLER, G. W; POMPEU JÚNIOR, J. Inter-enxertia e ocorrência de tristeza capão bonito em laranja Pera IAC 2000. **Tropical Plant Pathology**, v. 36 (suplemento), p. 1267, 2011.

CARVALHO, S. A.; SILVA, L. F. C. Monitoring the viability of citrus rootstocks seeds stored under refrigeration. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 1, p. 338-345, 2013.

CASTLE W. S. Fibrous root distribution of 'Pineapple' orange trees on rough lemon rootstock at three tree spacing. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v. 105, n. 3, p. 478-480, 1980.

CASTLE, W. S.; TUCKER, D. P. H.; KREZDORN, A. H.; YOUTSEY, C. O. **Rootstocks for Florida Citrus**. University of Florida. 1993. 92p.

CASTLE, W. S.; YOUTSEY, C. O. Root system characteristics of citrus nursery trees. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v. 90, p. 39-44, 1977.

CHENG, F. S.; ROOSE, M. L. Origin and inheritance of dwarfing by the citrus rootstock *Poncirus trifoliata* 'Flying Dragon'. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 120, n. 2, p. 286-291, 1995.

CONCEIÇÃO, P. M.; AZEVEDO, A.; ECKER, G. V.; CRISTOFANI, M. Physiological quality of citrandarins, *Poncirus trifoliata* and Sunki mandarin seeds. **Comunicata Scientiae**, v. 10, n. 4, p. 461-466, 2019.

DAVIES, F. S.; ALBRIGO, L. G. **Citrus**. CAB International. 1994. 254p.

DOBRÁNSZKI, J.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A. Micropropagation of apple — A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 4, p. 462–488, 2010.

DOMINGUES, E. T.; SOUZA, V. C.; SAKURAGUI, C. M.; POMPEU JÚNIOR, J.; PIO, R. M.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; SOUZA, J. P. Caracterização morfológica de tangerinas do banco de germoplasma de citros do Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC. **Scientia Agricola**, v. 56, n. 1, p.197-206, 1999.

ESCOBEDO-GRACIA-MEDRANO, R. M.; BURGOS-TAN, M. J.; KU-CAUICH, J. R.; QUIROZ-MORENO, A. Using flow cytometry analysis in plant tissue culture derived plants. *In*: LOYOLA-VARGAS V. M., OCHOA-ALEJO N. **Plant cell culture protocols, methods in molecular biology**. Humana Press, 2018. p.317-332

FUNDECITRUS. Fundo de Defesa da Citricultura. Inventário de árvores e estimativa da safra de laranja do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro. Araraquara-SP, 2022. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/2022_07_01_Inventario_e_Estimativa_do_Cinturao_Citricola_2022-2023.pdf>. Acesso em 30 mai. 2023.

FUNDECITRUS. Fundo de Defesa da Citricultura. Inventário de árvores e estimativa da safra de laranja do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro. Araraquara-SP, 2023. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/2023_05_10_Sum%C3%A1rio_Executivo_da_Estimativa_da_Safra_de_Laranja_2023-2024.pdf>. Acesso em 30 mai. 2023.

GARCÍA, R.; ASINS, M. J.; FORNER, J.; CARBONELL, E. A. Genetic analysis of apomixis in *Citrus* and *Poncirus* by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 99, p. 511-518, 1999.

GIRARDI, E. A.; AYRES, A. J.; GIROTTO, L. F.; PEÑA, L. Tree growth and production of rainfed Valencia sweet orange grafted onto trifoliolate orange hybrid rootstocks under Aw climate. **Agronomy**, v. 11, n. 12, p. 2533, 2021.

GIRARDI, E. A.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; PIEDADE, S. M. S. Desenvolvimento vegetativo e custo de produção de porta-enxertos de citros em recipientes para fins de subenxertia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 5, p. 679-687, 2007.

GIRARDI, E. A.; MOURÃO FILHO, F. A. A. Production of interstocked 'Pera' sweet orange nursery trees on 'Volkamer' lemon and 'Swingle' citrumelo rootstocks. **Scientia Agricola**, v. 63, n. 1, p. 5-10, 2006.

GREVE, A.; PRATES, H. S.; MÜLLER, G. W. Produção de borbulhas certificadas de

citros no Estado de São Paulo. *In*: RODRIGUEZ, O; VIÉGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J. **Citricultura brasileira**. Fundação Cargill, 1991. v.1, p. 302-317.

GUERRA, D.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; SCHWARZ, S. F.; WEILER, R. L.; DAHMER, N.; SOUZA, P. V. D. D. Tetraploidization in citrus rootstocks: effect of genetic constitution and environment in chromosome duplication. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 35-41, 2016.

GUPTA, N.; JAIN, V.; JOSEPH, M. R.; DEVI, S. A review on micropropagation culture method. **Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development**, Raipur, v. 8, n. 1, p. 86-93, 2020.

HAYASHI, S.; GIRARDI, E.A.; SILVA, S. R.; STUCHI, E.S.; CANTUARIAS-AVILÉS, T. Avaliação de fita fotodegradável para enxertia em mudas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.34, n.2, p.641-645, 2012.

HENAO-RAMÍREZ, A. M.; SALAZAR DUQUE, H. J.; CALLE TOBON, A. F.; URREA TRUJILLO, A. Determination of genetic stability in cacao plants (*Theobroma cacao* L.) derived from somatic embryogenesis using microsatellite molecular markers (SSR). **International Journal of Fruit Science**, v. 21, n. 1, p. 284-298, 2021.

HUSSAIN, S.; CURK, F.; OLLITRAULT, P.; MORILLON, R.; LURO, F. Facultative apomixis and chromosome doubling are sources of heterogeneity in citrus rootstock trials: Impact on clementine production and breeding selection. **Scientia Horticulturae**, v. 130, n. 4, p. 815-819, 2011.

INGLIS, P. W.; PAPPAS, M.; GRATTAPAGLIA, D. Protocolo de extração de DNA e RNA de alta qualidade para espécies ricas em compostos secundários. 2016.

INTERNATIONAL PLANT GENETIC RESOURCES INSTITUTE (IPGRI). Descriptors for Citrus (*Citrus* spp.). Disponível em: <<https://hdl.handle.net/10568/72733>>. Acesso em 30 mai. 2023.

IOANNIDIS, K.; TOMPROU, I.; MITSIS, V.; KOROPOULI, P. Genetic evaluation of in vitro micropropagated and regenerated plants of *Cannabis sativa* L. using SSR molecular markers. **Plants**, v. 11, n. 19, p. 2569, 2022.

JESUS JUNIOR, W.C.; BASSANEZI, R.B. Análise da dinâmica e estrutura de focos da morte súbita dos citros. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n. 4, p.399-405, 2004.

KAEPLER, S.M.; KAEPLER, H.; RHEE, Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 43, p.179-188, 2000.

KAKIMZHANOVA, A.; DYUSSEMBEKOVA, D.; NURTAZA, A.; YESSIMSEITOVA, A.; SHEVTSOV, A.; LUTSAY, V.; RAMANKULOV, Y.; KABIEVA, S. An efficient micropropagation system for the vulnerable wild apple species, *Malus sieversii*, and confirmation of its genetic homogeneity. **Erwerbs-Obstbau**, v. 65, p. 621-632, 2023.

KITTO, S. L. Commercial micropropagation. **HortScience**, v. 32 n.6, p. 1012-1014, 1997.

LAKSHMANAN, V.; REDDAMPALLI VENKATARAMAREDDY, S.; NEELWARNE, B. Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of banana using RAPD and ISSR markers. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 106-113, 2007.

LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 60, p. 197-214, 1981.

LEE, L. S. Citrus polyploidy-origins and potential for cultivar improvement. **Australian Journal of Agricultural Research**, Clayton, v. 39, n. 4, p. 735-747, 1988.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagators Society Proceedings**, v. 30, p. 421-427, 1980.

LOPES, C. A.; DIAS, G. M. G.; PIO, L. A. S.; SILVEIRA, F. A.; RODRIGUES, F. A.; PASQUAL, M. Indução de calos, potencial embriogênico e estabilidade genética em pitaia vermelha. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 11, n. 1, p. 21–25, 2016.

MADEMBA-SY, F.; LEBEGIN, S.; DESPREZ, Z. L. Utilisation de Poncirus trifoliata 'Flying Dragon' comme porte-greffe nanifiant des agrumes sous climat tropical. **Fruits**, v. 54, n. 5, p. 299-310, 1999.

MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (ed). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, 2005. 958 p.

MEDINA, C. L.; MULLER, G.; FIGUEIREDO, J. D.; SALIBE, A. Porta-enxerto 'Flying Dragon' em plantios adensados de lima-ácida Tahiti. **Citricultura Atual**, Cordeirópolis, v. 3, n. 14, p. 8-10, 2000.

MOREIRA, S.; SALIBE, A. A. Importância, produção e seleção de clones nucelares de citros. **Ciência e Cultura**, v.17, n. 2, p.187, 1966.

MOURÃO FILHO, F. A. A.; GIRARDI, E. A.; COUTO, H. T. Z. 'Swingle' citrumelo propagation by cuttings for citrus nursery tree production or inarching. **Scientia Horticulturae**, v. 120, n. 2, p. 207-212, 2009.

MURASHIGE, T.; BITTERS, W. P.; RANGAN, T. S.; NAUER, E. M.; ROISTACHER, S.N.; HOLLIDAY, B.P. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free citrus clones. **HortScience**, v. 7, n. 2, p. 118-119. 1972.

NANDHAKUMAR, N.; SOORIANATHASUNDARAM, K.; SUDHAKAR, D.; KUMAR, K. K. Genetic fidelity analysis in the micropropagated banana derived from immature primordial male flower bud. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 4, p. 1759-1769, 2017.

NAVARRO, L.; ROISTACHER, C. N.; MURASHIGE, T. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. **Journal American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 100, n. 5, p. 471-479, 1975.

NOVELLI, V. M.; CRISTOFANI, M.; SOUZA, A. A.; MACHADO, M. A. Development and characterization of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 1, p. 90-96, 2006.

NOWAKOWSKA, M.; PAVLOVIĆ, Ž.; NOWICKI, M.; BOGGESS, S.L.; TRIGIANO, R.N. In vitro propagation of an endangered *Helianthus verticillatus* by axillary bud proliferation. **Plants**, v. 9, n. 6, p. 712, 2020.

NURTAZA, A.; MAGZUMOVA, G.; YESSIMSEITOVA, A.; KARIMOVA, V.; SHEVTSOV, A.; SILAYEV, D.; LUTSAY, V.; RAMANKULOV, Y.; KAKIMZHANOVA, A. Micropropagation of the Endangered Species *Malus niedzwetzkyana* for Conservation Biodiversity in Kazakhstan. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 57, p. 965–976, 2021.

OCHATT, S. J.; PATAT-OCHATT, E. M.; MOESSNER, A. Ploidy level determination within the context of *in vitro* breeding. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 104, n. 3, p. 329–341, 2011.

OLIVEIRA, A. C.; NOVELLI, V. M.; GARCIA, A. N.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M. A. Identification of citrus hybrids through the combination of a leaf apex morphology and SSR markers. **Euphytica**, v. 128, p. 397-403, 2002.

OLIVEIRA, E. R. M.; RODRIGUES, M. J. S.; DANTAS, A. C. V. L.; SOARES FILHO, W. S.; GIRARDI, E. A. Indolbutiric acid effect on the rooting and plant growth of 15 citrus rootstocks propagated by cuttings. **Citrus Research e Technology**, v. 35, n. 1, p. 35-43, 2014.

OLIVEIRA, I. V. M., DAMIÃO-FILHO, C. F.; CARVALHO, S. A. Enxertia em citros por substituição de ápice caulinar. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 744-747, 2002.

OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B.; VARGAS, J. R. Fita plástica e fita degradável na enxertia de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 2, p. 564-566, 2004.

OLLITRAULT, P.; DAMBIER, D.; LURO, F.; DUPERRAY, C. Nuclear genome size variations in Citrus. **Fruits**, v. 49, n. 6, p. 390–393, 1994.

OLLITRAULT-SAMMARCELLI, F.; LEGAVE, J. M.; MICHAUX-FERRIERE, N.; HIRSCH, A. M. Use of flow cytometry for rapid determination of ploidy level in the genus *Actinidia*. **Scientia Horticulturae**, v. 57, n. 4, p. 303–313, 1994.

OTTO, S. P.; WHITTON, J. Polyploid incidence and evolution. **Annual review of genetics**, v. 34, n. 1, p. 401-437, 2000.

PAIVA, L. V.; CARVALHO, S. A. Alternativa para promoção de crescimento in vivo de microenxertos de citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, n. 9, p.1085-1099, 1993.

PALMIERI D. A.; NOVELLI, V. M.; BASTIANEL, M.; CRISTOFANI-YALY, M.; ASTÚA-MONGE, G.; CARLOS, E. F.; OLIVEIRA, A. C.; MACHADO, M. A. Frequency and distribution of microsatellites from ESTs of Citrus. *CitrusEST. Genetics and Molecular Biology*, v. 30, p. 1009-1018, 2007.

PALOMBI, M.; DAMIANO, C. Comparison between RAPD and SSR Molecular Markers in Detecting Genetic Variation in Kiwifruit (*Actinidia deliciosa* A. Chev). **Plant Cell Reports**. v. 20, p. 1061–1066, 2002.

PANDEY, R.; SINGH, S.; RASTOGI, J.; SHARMA, M.; SINGH, R. Early Assessment of Genetic Fidelity in Sugarcane (*Saccharum officinarum*) Plantlets Regenerated

through Direct Organogenesis with RAPD and SSR Markers. **Australian Journal of Crop Science**. v. 6, n. 4, p. 618–624, 2012.

PHILLIPS, R. L.; KAEPLER, S. M.; PESCHKE, V. M. Do we understand somaclonal variation? *In*: Progress in Plant Cellular and Molecular Biology: Proceedings of the VIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Amsterdam, The Netherlands, 24–29 June 1990. **Springer Netherlands**, 1990. p. 131-141.

POLATÖZ, S.; SEKER, M.; KAYA, Ç. **Determination of Genome Size Differentiation and Ploidy Levels in Some Citrus Rootstock Populations**. Disponível em: <<https://www.researchsquare.com/article/rs-1106171/v1>>. Acesso em: 29 jul. 2022.

POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. *In*: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**. Instituto Agronômico e Fundag, 2005. p.61-104.

POMPEU JUNIOR, J.; BLUMER S. Laranjeiras e seus porta-enxertos nos viveiros de mudas cítricas do Estado de São Paulo em 2004-2007. **Laranja**, v. 29, n. 1-2, p. 35-50, 2008.

PORTELLA, C. R.; MARINHO, C. S.; AMARAL, B. D.; CARVALHO, W. S. G.; CAMPOS, G. S.; SILVA, M. P. S. D.; SOUSA, M. C. D. Desempenho de cultivares de citros enxertadas sobre o trifoliato 'Flying Dragon' e limoeiro 'Cravo' em fase de formação do pomar. **Bragantia**, v. 75, n. 1, p.70-75, 2015.

PRADO, M. J.; RODRIGUEZ, E.; REY, L.; GONZÁLEZ, M. V.; SANTOS, C.; REY, M. Detection of somaclonal variants in somatic embryogenesis-regenerated plants of *Vitis vinifera* by flow cytometry and microsatellite markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 103, p. 49-59, 2010.

PRAKASH, S.; SHARMA, S. Micropropagation of citrus rootstock. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 4, p. 1513-1517, 2018.

PRATI, P.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; DIAS, C. T. S.; SCARPARE 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.

RAI, M.K.; PHULWARIA, M.; GUPTA, A.K.; SHEKHAWAT, N.; JAISWAL, U. Genetic homogeneity of guava plants derived from somatic embryogenesis using SSR and ISSR markers. **Plant Cell Tissue Organ Cult (PCTOC)**, v. 111, p. 259–264, 2012.

RANJITH, P.; RAO, M. S.; Breeding for drought resistance. *In: Plant breeding-current and future views*. IntechOpen, 2021. p. 161-171.

REUVENI, O.; ISRAELI, Y. Measures to reduce somaclonal variation in *in vitro* propagated bananas. *In: International Symposium on the Culture of Subtropical and Tropical Fruits and Crops*. 1989. p. 307-314.

RIBEIRO, R. V.; ESPINOZA-NÚÑEZ, E.; POMPEU JUNIOR, J.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MACHADO, E. C. Citrus rootstocks for improving the horticultural performance and physiological responses underconstraining environments. *In: AHMAD P., WANI, M. R.; AZOOZ, M.M.; TRAN, L.S.P. Improvement of Crops in the Era of Climatic Changes*, v. 1, p. 1.37, 2014.

RODRIGUES, M. J. D. S.; LEDO, C. A. D. S.; GIRARDI, E. A.; ALMEIDA, L. A. D. H.; SOARES FILHO, W. D. S. Caracterização de frutos e propagação de porta-enxertos híbridos de citros em ambiente protegido. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 2, p. 457-470, 2015.

SADAT-HOSSEINI, M.; VAHDATI, K.; LESLIE, C. A. Germination of Persian walnut somatic embryos and evaluation of their genetic stability by ISSR fingerprinting and flow cytometry. **HortScience**, v. 54, n. 9, p. 1576-1580, 2019.

SALEH, B.; ALLARIO, T.; DAMBIER, D.; OLLITRAULT, P.; MORILLON, R. Tetraploid citrus rootstocks are more tolerant to salt stress than diploid. **Comptes rendus biologiques**, v. 331, n. 9, p. 703-710, 2008.

SARMIENTO, A. I. P.; SCHWARZ, S. F.; SOUZA, P. V. D. Condições de cultivo de la planta matriz y uso del ácido indolbutírico en la propagación del mandarina 'Sunki' por estaquilla. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 38, n.2, e-334, 2016.

SETIN, D. W.; CARVALHO, S. A.; MATTOS JUNIOR, D. Crescimento inicial e estado nutricional da laranja 'Valência' sobre porta-enxertos múltiplos de limoeiro 'Cravo' e citrumeleiro 'Swingle'. **Bragantia**, v. 68, n. 2, p. 397-406, 2009.

SETIN, D. W.; CARVALHO, S. A.; MATTOS JUNIOR, D. Recipientes e substratos à base de fibra de coco na produção de mudas de laranja 'Valência' sobre limoeiro 'Cravo'. **Laranja**, v. 26, n.2, p.337-348, 2005.

SHERIF, N. A.; FRANKLIN BENJAMIN; J. H.; SENTHIL KUMAR, T.; RAO, M. V. Somatic embryogenesis, acclimatization and genetic homogeneity assessment of regenerated plantlets of *Anoectochilus elatus* Lindl., an endangered terrestrial jewel orchid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 132, p. 303–316, 2018.

SILVA, T. L.; REIS, A.; HEWITT, C.; ROSEIRO, J. C. Citometria de fluxo: funcionalidade celular on-line em bioprocessos. *In*: **Boletim de Biotecnologia**, vol. 77, p. 32-40, 2004.

SIMONETTI, L. M.; CRISTOFANI-YALY, M.; BARROS, V. L. N. P.; SCHINOR, E. H.; FADEL, A. L.; SOUSA, M. C.; LEONEL, S.; TECCHIO, M. A. Porta-enxertos alternativos para cultivo de laranja Valência na região sudoeste do estado de São Paulo. **Citrus Research & Technology**, v. 36, n. 2, p. 49-58, 2015.

SKARIA, M. A microbudding technique for biological Indexing and ultra-high density. **Fourteenth IOCV Conference**. Short Communications, p.411-413. 2000.

SLIWINSKA, E.; LUKASZEWSKA, E. Polysomaty in growing *in vitro* sugar-beet (*Beta vulgaris* L.) seedlings of different ploidy level. **Plant Science**, v. 168, n. 4, p. 1067–1074, 2005.

SMITH, M. K. A Review of factors influencing the genetic stability of Micropropagated bananas. **Fruits**, v. 43, n.4, p. 219-223, 1988.

SOARES FILHO, W. S.; SOUZA, U.; LEDO, C. A. A.; SANTANA, L. G. L.; PASSOS, O. S. Poliembrionia e potencial de obtenção de híbridos em citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.36, n.4, p.950-956, 2014.

STARRANTINO, A.; REIORGIATO RECUPERO, G.; TERRANOVA, G.; CARUSO, A.; RUSSO MARIA, P.; MICALIZIO, L.; RUSSO, G. Ability of 'Flying Dragon' trifoliolate orange to maintain high *in vitro* regenerative potential and polymorphism analysis by RAPD markers. **Fruits**, v. 53, n. 5, p. 319-324, 1998.

STUCHI, E. S.; DONADIO, L. C.; SEMPIONATO, O. R. Performance of Tahiti lime on *Poncirus trifoliata* var. *monstrosa* Flying Dragon in four densities. **Fruits**, v. 58, n. 1, p. 1-5, 2003.

STUCHI, E. S.; GIRARDI, E. A.; SEMPIONATO, O. R.; REIFF, E. T., DA SILVA; S. R.; PAROLIN, L. G. Trifoliata flying dragon: porta-enxerto para plantios adensados e irrigados de laranjeiras doces de alta produtividade e sustentabilidade. Cruz das Almas: **Embrapa Mandioca e Fruticultura**, 2012. (Comunicado técnico, 152).

STUCHI, E. S.; GIRARDI, E. A.; SILVA, S. R.; SEMPIONATO, O. R.; PAROLIN, L. G.; MÜLLER, G. W.; DONADIO, L. C. Desempenho de clones pré-imunizados de laranjeiras Valência e Natal no Norte do Estado de São Paulo. **Citrus Research & Technology**, v. 41, p. 1-10, 2020.

SUWAL, M. M.; LAMICHHANE, J.; GAUCHAN, D. P. Assessment of genetic stability of micropropagated *Bambusa balcooa* Roxb. using RAPD marker. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 81-95, 2021.

TALLÓN, C. I.; PORRAS, I.; PÉREZ-TORNERO, O. Efficient propagation and rooting of three citrus rootstocks using different plant growth regulators. **In Vitro Cellular e Developmental Biology-Plant**, v. 48, n. 5, p. 488–499, 2012.

TIKENDRA, L.; AMOM, T.; NONGDAM, P. Molecular genetic homogeneity assessment of micropropagated *Dendrobium moschatum* Sw. - A rare medicinal orchid, using RAPD and ISSR markers. **Plant Gene**, v. 19, 2019.

TOKGÖZ, H. B.; ALTAN, F. Callus induction and micropropagation of *Lilium candidum* L. using stem bulbils and confirmation of genetic stability via SSR-PCR. **International Journal of Secondary Metabolite**, v. 7, n. 4, p. 286-296, 2020.

TORRES-SILVA, G.; MATOS, E. M.; CORREIA, L. F.; FORTINI, E. A.; SOARES, W. S.; BATISTA, D. S.; OTONI, C.G.; AZEVEDO, A. A.; VICCINI, L. F.; KOEHLER, A. D.; RESENDE, S. V.; SPECHET, C. D.; OTONI, W. C. Anatomy, flow cytometry, and X-ray tomography reveal tissue organization and ploidy distribution in long-term *in vitro* cultures of *Melocactus* species. **Frontiers in plant science**, v. 11, p. 1314, 2020.

TOUCHELL, D. H.; PALMER, I. E.; RANNEY, T. G. *In vitro* Ploidy Manipulation for Crop Improvement. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 722, 2020.

VELASCO, R. *et al.* The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). **Nature Genetics**, v. 42, n. 10, p. 833–839, 2010.

VIEHMANNNOVA, I.; BORTLOVA, Z.; VITAMVAS, J.; CEPKOVA, H. P.; ELIASOVA, K., SVOBODOVA, E.; TRAVNICKOVA, M. Assessment of somaclonal variation in somatic embryo derived plants of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. And Endl.) H. Robinson] using inter simple sequence repeat analysis and flow cytometry. **Electron Journal Biotechnology**, v. 17, p. 102–106, 2014.

VIJAYAKUMARI, N.; LAHANE, Y. B.; REKHA, A. Ploidy analysis among Citrus mutants using leaf meristematic tissue. **Journal of Horticultural Sciences**, v. 17, n. 1, p. 34-40, 2022.

VINOTH A.; RAVINDHRAN R. Efficient plant regeneration of watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.) via somatic embryogenesis and assessment of genetic fidelity using

ISSR markers. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, v. 52, n. 1, p. 107–115, 2016.

WANMEI, J.; JING, D.; YUANHUA, W. Genetic fidelity of regeneration adventitious shoots in grape through organogenesis. **Molecular Plant Breeding**, v. 7, p. 375–379, 2009.

WANMEI, J.; WANG, Y.; WANG, H. Adventitious Shoot Regeneration from Leaves of Apple Rootstock 'Pingyitiancha' (*Malus hupehensis* var. *pinyiensis*) and Genetic Fidelity of Regenerated Plantlets Using SSR Markers. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 94, n. 8, p. 1345–1354, 2014.

WEBBER, H. J. Nursery methods. *In*: BATCHELOR, L. D.; WEBBER, H. J. **The citrus industry**. Berkeley: University of California Press, 1948. p. 1-68.

WINKELMANN, T.; GEIER, T.; PREIL, W. Commercial *in vitro* plant production in Germany in 1984-2004. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 86, p.319-327, 2006.

WRIGHT, J. W. 1976. Introduction to forest genetics, pp. 201-202. **Academic Press**, New York

XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Enraizamento *ex vitro* de gemas de *Eucalyptus* spp. Multiplicadas e alongadas *in vitro*. **Scientia Forestalis**, n. 51, p. 29-36, 1997.

YADAV, V.; SHAHZAD, A.; AHMAD, Z.; SHARMA, S.; PARVEEN, S. Synthesis of nonembryonic synseeds in *Hemidesmus indicus* R. Br.: Short term conservation, evaluation of phytochemicals and genetic fidelity of the regenerants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 138, p. 363-376, 2019.

ZENG, S. H.; CHEN, C. W.; HONG, L.; LIU, J. H.; DENG, X. X. *In vitro* induction, regeneration and analysis of autotetraploids derived from protoplasts and callus treated with colchicine in *Citrus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 87, p. 85-93, 2006.

ZHANG, J. Z.; LIU, S. R.; HU, C. G. Identifying the genome-wide genetic variation between precocious trifoliate orange and its wild type and developing new markers for genetics research. **DNA Research**, v. 23, n. 4, p. 403–414, 2016.

APÊNDICES

Apêndice A. Composição básica do meio de cultura WPM utilizado para a micropropagação do porta-enxerto 'Flying Dragon' adaptado segundo Lloyd & McCown (1980).

Macronutrientes	mg.L⁻¹
NH ₄ NO ₃	400
CaCl ₂	72,5
Ca (NO ₃) ₂	386
MgSO ₄	180,5
KH ₂ PO ₄	170
K ₂ SO ₄	990
Micronutrientes	mg.L⁻¹
FeNaEDTA	36,7
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ .H ₂ O	16,9
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
Vitaminas	mg.L⁻¹
Myo-Inositol	100
Tiamina	1,0
Piridoxina	1,0
Ácido nicotínico	1,0
Glicina	1,0

Apêndice B. Resultados de quantificação de DNA em Espectrofotômetro Nanodrop ND-8000 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) das amostras.

Amostra	Conc.	260/280	260/230	Amostra	Conc.	260/280	260/230
1	1258	1,91	1,85	55	725,5	1,37	0,94
2	2303	1,94	1,92	56	661,8	1,48	0,88
3	1355	1,92	1,85	57	1898	1,46	0,66
4	852,3	1,81	1,64	58	1052	1,44	0,53
5	793,4	1,88	2,21	59	1575	1,33	0,52
6	1009	1,92	1,95	60	1675	1,35	0,89
7	1131	1,97	1,94	61	1295	1,6	1,01
8	1187	1,95	1,93	62	236,6	1,99	2,11
9	1525	1,95	2,05	63	548,6	1,91	1,02
10	305,6	1,93	2,27	64	989,5	1,75	0,97
11	1010	1,94	2,33	65	1891	1,37	0,64
12	718,5	1,89	2,02	66	1087	1,71	1,15
13	1141	1,96	2,19	67	1457	1,83	1,22
14	1177	1,94	1,98	68	1190	1,67	0,91
15	939,1	1,96	2	69	997,6	1,87	1,52
16	1078	1,86	1,71	70	1686	1,87	1,52
17	1803	1,92	1,94	71	882,5	1,57	0,74
18	2050	1,97	2,29	72	1178	1,91	1,55
19	931,1	1,96	1,9	73	410,6	1,65	0,9
20	626,3	1,88	1,84	74	829,4	1,46	0,57
21	1198	1,93	2,07	75	881,5	1,78	0,95
22	1290	1,92	2,15	76	603,5	1,5	0,92
23	2186	1,96	2,1	77	326,4	1,89	1,28
24	1053	1,91	1,77	78	952,4	1,78	1,17
25	943,2	1,97	2,2	79	447,3	1,63	0,85
26	1779	1,92	1,72	80	846,6	1,6	0,76
27	2285	1,96	2,03	81	173,3	1,94	1,6
28	1271	2,03	2,1	82	793,6	1,33	0,48
29	1380	1,87	1,49	83	685,6	1,71	1,05
30	1050	1,91	1,84	84	665,4	1,98	1,7
31	1359	1,91	1,54	85	915,8	1,71	0,88
32	1056	1,9	1,4	86	870,1	1,94	1,7
33	2179	1,94	1,97	87	815,3	1,77	0,97
34	903,1	1,96	1,78	88	308,1	1,65	0,8
35	1121	1,94	2	89	699	1,71	1,06
36	1505	1,92	1,68	90	758,9	1,51	0,61
37	1789	1,74	1,04	91	657,9	1,75	1,08
38	1987	1,53	0,71	92	1113	2,04	1,61
39	926,1	1,94	1,92	93	957,6	1,65	0,77
40	843,3	1,79	1,08	94	680,9	1,67	1
41	1456	1,94	1,87	95	472,3	1,88	1,34
42	730,1	1,98	2,13	96	464,5	1,97	1,73
43	1988	1,49	0,72	97	1279	1,11	0,4
44	1690	1,69	1	98	1266	1,09	0,38
45	1432	1,64	0,79	99	1367	1,29	0,45
46	1551	1,94	1,96	100	795	1,61	0,7
47	666,3	1,82	1,48	MVI1	1581	1,82	1,34
48	1525	1,93	1,72	MVI2	742,5	1,82	1,43
49	997,8	1,95	1,9	MVI3	1549	1,41	0,58
50	1854	1,48	0,7	Semente 1	492,1	2	2,06
51	1451	1,95	1,72	Semente 2	632,3	1,59	0,91
52	1409	1,83	1,32	Semente 3	589,6	1,55	0,82
53	1203	1,57	0,76	Semente 4	393	1,23	0,56
54	1278	1,76	1,09	Semente 5	575,4	1,83	1,22

Apêndice C. Resultados da citometria de fluxo Partec CyFlow Ploidy Analyzer DAPI (Partec GmbH, Alemanha).

Plantas micropropagadas				Plantas por sementes			
Amostra	Resultado	Amostra	Resultado	Amostra	Resultado	Amostra	Resultado
Planta 1	186,39	Planta 46	190,84	Planta 1	162,01	Planta 48	160,74
Planta 2	183,71	Planta 47	183,48	Planta 2	163,28	Planta 49	161,81
Planta 3	187,62	Planta 49	183,44	Planta 3	159,33	Planta 51	173,76
Planta 4	186,73	Planta 50	197,73	Planta 4	167,00	Planta 52	163,88
Planta 5	185,79	Planta 51	190,85	Planta 5	171,89	Planta 53	161,80
Planta 6	183,11	Planta 54	186,28	Planta 6	186,18	Planta 54	170,14
Planta 7	190,66	Planta 55	184,84	Planta 7	166,59	Planta 55	166,32
Planta 8	185,83	Planta 56	188,39	Planta 8	181,62	Planta 58	162,58
Planta 9	190,94	Planta 57	186,48	Planta 11	171,45	Planta 59	173,19
Planta 10	191,12	Planta 58	196,13	Planta 12	164,56	Planta 60	166,60
Planta 11	181,49	Planta 59	197,44	Planta 13	181,52	Planta 61	162,07
Planta 13	189,72	Planta 60	196,65	Planta 14	171,05	Planta 62	162,55
Planta 14	182,71	Planta 61	188,40	Planta 15	178,09	Planta 66	173,27
Planta 15	189,90	Planta 69	195,49	Planta 16	167,78	Planta 69	167,29
Planta 16	191,35	Planta 70	181,52	Planta 17	179,54	Planta 71	163,15
Planta 19	186,84	Planta 73	178,62	Planta 18	173,06	Planta 72	167,63
Planta 20	186,92	Planta 74	183,73	Planta 19	162,21	Planta 73	175,51
Planta 23	186,89	Planta 75	181,18	Planta 20	171,34	Planta 74	162,96
Planta 24	183,96	Planta 76	181,95	Planta 22	160,64	Planta 75	165,98
Planta 25	186,76	Planta 77	182,88	Planta 23	193,11	Planta 76	170,79
Planta 26	160,34	Planta 78	178,22	Planta 25	164,26	Planta 77	173,48
Planta 27	183,90	Planta 79	178,04	Planta 26	193,95	Planta 78	169,97
Planta 28	189,62	Planta 80	182,40	Planta 27	177,68	Planta 81	159,16
Planta 29	160,56	Planta 81	189,76	Planta 28	181,38	Planta 83	162,71
Planta 30	183,27	Planta 82	182,40	Planta 29	163,50	Planta 84	175,39
Planta 31	185,92	Planta 84	178,99	Planta 30	163,77	Planta 85	162,03
Planta 32	196,42	Planta 85	186,70	Planta 31	177,10	Planta 86	165,26
Planta 35	185,83	Planta 86	191,91	Planta 32	161,57	Planta 89	160,92
Planta 36	182,74	Planta 87	182,41	Planta 34	160,43	Planta 90	164,32
Planta 37	191,86	Planta 89	184,15	Planta 37	181,93	Planta 91	173,87
Planta 38	203,04	Planta 90	196,53	Planta 38	164,63	Planta 93	162,31
Planta 39	187,82	Planta 92	186,52	Planta 39	163,20	Planta 96	186,23
Planta 42	183,36	Planta 94	191,22	Planta 41	169,82	Planta 97	166,30
Planta 44	191,36	Planta 96	195,08	Planta 44	178,25	Planta 98	161,69
Planta 45	203,95	Planta 97	183,86	Planta 46	162,24	Planta 99	162,93
				Planta 47	162,70	Planta 100	179,99
Material Inicial							
Amostra	Resultado						
MI1	187,02						
MI2	188,17						
MI3	191,94						

Apêndice D. Levantamento de dados morfológicos de caule de plantas micropropagadas.

Amostra	Altura (cm)	Diâmetro (mm)	Espinhos	Tortuos. anormal	Número de folhas	Amostra	Altura (cm)	Diâmetro (mm)	Espinhos	Tortuos. anormal	Número de folhas
Planta 1	39,0	3,6	Presente	-	4	Planta 52	41,8	3,5	Presente	-	4
Planta 2	34,5	3,8	Presente	-	4	Planta 53	31,6	3,8	Presente	-	4
Planta 3	31,9	2,1	Presente	-	4	Planta 54	24,4	3,1	Presente	-	4
Planta 4	33,0	3,6	Presente	-	4	Planta 55	13,9	3,8	Presente	-	4
Planta 5	35,6	3,3	Presente	-	4	Planta 56	22,0	3,3	Presente	Sim	4
Planta 6	26,2	2,9	Presente	-	4	Planta 57	12,9	3,0	Presente	-	4
Planta 7	21,1	3,0	Presente	-	4	Planta 58	15,8	2,9	Presente	-	4
Planta 8	22,4	3,0	Presente	-	4	Planta 59	13,4	2,7	Presente	-	4
Planta 9	19,2	3,0	Presente	-	4	Planta 60	41,4	3,8	Presente	-	4
Planta 10	15,5	2,6	Presente	-	4	Planta 61	37,8	3,1	Presente	-	4
Planta 11	22,1	2,3	Presente	-	4	Planta 62	15,4	3,1	Presente	-	4
Planta 12	23,4	3,3	Presente	Sim	4	Planta 63	17,5	2,2	Presente	-	4
Planta 13	26,6	3,1	Presente	-	4	Planta 64	40,8	3,8	Presente	-	4
Planta 14	26,2	3,3	Presente	-	4	Planta 65	19,6	3,6	Presente	-	4
Planta 15	16,2	2,5	Presente	-	4	Planta 66	28,0	4,2	Presente	-	4
Planta 16	15,1	2,7	Presente	-	4	Planta 67	34,6	3,6	Presente	-	4
Planta 17	30,5	3,4	Presente	-	4	Planta 68	43,4	4,0	Presente	-	4
Planta 18	26,0	3,1	Presente	-	4	Planta 69	38,0	4,2	Presente	-	4
Planta 19	30,0	2,5	Presente	-	4	Planta 70	46,8	4,1	Presente	-	4
Planta 20	19,0	3,2	Presente	-	4	Planta 71	12,4	3,4	Presente	-	4
Planta 21	29,5	3,1	Presente	Sim	4	Planta 72	38,6	4,5	Presente	-	4
Planta 22	34,0	3,4	Presente	-	4	Planta 73	14,6	3,2	Presente	-	4
Planta 23	20,5	2,5	Presente	-	4	Planta 74	22,5	4,2	Presente	Sim	4
Planta 24	26,0	4,1	Presente	-	4	Planta 75	28,4	4,2	Presente	-	4
Planta 25	23,0	2,7	Presente	Sim	4	Planta 76	39,9	3,9	Presente	-	4
Planta 26	23,0	2,7	Presente	-	4	Planta 77	15,8	3,1	Presente	-	4
Planta 27	13,5	2,8	Presente	-	4	Planta 78	35,8	4,0	Presente	-	4
Planta 28	10,0	3,0	Presente	-	4	Planta 79	37,9	4,1	Presente	-	4

Planta 29	16,0	2,8	Presente	-	4	Planta 80	15,0	3,4	Presente	-	4
Planta 30	22,5	3,0	Presente	-	4	Planta 81	37,7	4,2	Presente	-	4
Planta 31	11,0	2,7	Presente	-	4	Planta 82	12,5	4,0	Presente	-	4
Planta 32	10,0	2,3	Presente	-	4	Planta 83	13,9	3,3	Presente	-	4
Planta 33	33,0	3,8	Presente	-	4	Planta 84	32,4	4,0	Presente	-	4
Planta 34	29,5	3,7	Presente	-	4	Planta 83	13,9	3,3	Presente	-	4
Planta 35	29,5	3,1	Presente	-	4	Planta 84	32,4	4,0	Presente	-	4
Planta 36	35,0	4,2	Presente	Sim	4	Planta 85	16,9	3,7	Presente	-	4
Planta 37	29,0	3,5	Presente	Sim	4	Planta 86	37,8	3,8	Presente	-	4
Planta 38	12,0	2,8	Presente	Sim	4	Planta 87	14,4	3,1	Presente	-	4
Planta 39	32,0	4,0	Presente	-	4	Planta 88	14,7	3,4	Presente	-	4
Planta 40	24,0	3,0	Presente	-	4	Planta 89	22,3	4,0	Presente	-	4
Planta 41	32,5	3,5	Presente	-	4	Planta 90	15,9	3,6	Presente	-	4
Planta 42	26,5	2,7	Presente	-	4	Planta 91	25,4	3,3	Presente	-	4
Planta 43	14,0	3,7	Presente	-	4	Planta 92	25,9	3,5	Presente	-	4
Planta 44	10,0	2,7	Presente	Sim	4	Planta 93	15,2	4,4	Presente	-	4
Planta 45	30,0	3,8	Presente	Sim	4	Planta 94	26,3	3,8	Presente	-	4
Planta 46	38,0	4,1	Presente	-	4	Planta 95	37,5	3,9	Presente	-	4
Planta 47	33,0	3,5	Presente	-	4	Planta 96	15,0	3,4	Presente	-	4
Planta 48	40,0	4,2	Presente	-	4	Planta 97	20,5	3,3	Presente	-	4
Planta 49	30,8	3,3	Presente	-	4	Planta 98	35,6	4,1	Presente	Sim	4
Planta 50	31,5	4,0	Presente	-	4	Planta 99	16,0	3,5	Presente	-	4
Planta 51	35,7	3,8	Presente	-	4	Planta 100	15,3	3,2	Presente	-	4

Legenda: Tortuos. = tortuosidade do caule mais acentuada que o normal esperado da planta 'Flying Dragon'

Apêndice E. Levantamento de dados morfológicos de caule de plantas originárias de semente.

Amostra	Altura (cm)	Diâmetro (mm)	Número de folhas	Espinhos	Amostra	Altura (cm)	Diâmetro (mm)	Espinhos	Número de folhas
Planta 1	25,5	4,0	6	Presente	Planta 52	21,9	3,6	Presente	6
Planta 2	21,1	4,1	6	Presente	Planta 53	22,4	3,5	Presente	6
Planta 3	23,6	4,2	6	Presente	Planta 54	19,8	3,2	Presente	5
Planta 4	22,1	4,1	6	Presente	Planta 55	21,8	3,6	Presente	4
Planta 5	30,1	3,7	4	Presente	Planta 56	23,1	3,5	Presente	4
Planta 6	20,3	3,7	4	Presente	Planta 57	22,1	3,4	Presente	6
Planta 7	19,6	3,0	6	Presente	Planta 58	21,2	3,5	Presente	5
Planta 8	22,2	3,5	5	Presente	Planta 59	22,0	3,6	Presente	6
Planta 9	21,4	3,4	6	Presente	Planta 60	22,3	3,6	Presente	6
Planta 10	22,1	3,1	6	Presente	Planta 61	20,9	3,1	Presente	6
Planta 11	21,5	3,8	6	Presente	Planta 62	19,5	3,0	Presente	6
Planta 12	21,9	3,0	6	Presente	Planta 63	21,9	3,2	Presente	6
Planta 13	21,9	3,8	6	Presente	Planta 64	19,3	3,1	Presente	3
Planta 14	19,5	3,5	6	Presente	Planta 65	21,0	3,8	Presente	6
Planta 15	19,3	3,5	4	Presente	Planta 66	20,5	3,3	Presente	6
Planta 16	20,8	3,9	5	Presente	Planta 67	19,4	3,8	Presente	6
Planta 17	21,4	3,6	5	Presente	Planta 68	20,5	3	Presente	6
Planta 18	21,4	3,3	4	Presente	Planta 69	19,2	3,1	Presente	3
Planta 19	21,9	3,3	6	Presente	Planta 70	18,5	3,3	Presente	6
Planta 20	22,5	4,0	6	Presente	Planta 71	21,0	3,3	Presente	6
Planta 21	27,0	4,1	6	Presente	Planta 72	21,5	3,7	Presente	6
Planta 22	21,4	3,7	6	Presente	Planta 73	20,0	3,1	Presente	6
Planta 23	21,5	3,5	4	Presente	Planta 74	20,6	3,4	Presente	6
Planta 24	22,9	3,7	6	Presente	Planta 75	22,5	3,7	Presente	6
Planta 25	22,0	3,5	6	Presente	Planta 76	20,6	3,3	Presente	6
Planta 26	19,5	2,7	5	Presente	Planta 77	20,6	3,5	Presente	6
Planta 27	22,0	3,2	6	Presente	Planta 78	21,3	3,7	Presente	6
Planta 28	23,2	3,5	6	Presente	Planta 79	27,7	3,4	Presente	6

Planta 29	25,2	3,4	4	Presente	Planta 80	32,3	2,4	Presente	6
Planta 30	21,3	3,6	3	Presente	Planta 81	18,0	3,6	Presente	5
Planta 31	19,2	3,5	5	Presente	Planta 82	19,9	3,8	Presente	4
Planta 32	21,5	3,2	4	Presente	Planta 83	19,0	3,0	Presente	6
Planta 33	19,5	3,5	4	Presente	Planta 84	22,5	3,7	Presente	6
Planta 34	21,3	4,1	6	Presente	Planta 83	21,4	3,3	Presente	3
Planta 35	18,4	3,3	4	Presente	Planta 84	20,5	3,6	Presente	6
Planta 36	20,3	3,7	6	Presente	Planta 85	28,8	3,4	Presente	4
Planta 37	22,1	3,2	6	Presente	Planta 86	19,1	3,0	Presente	4
Planta 38	20,6	3,0	6	Presente	Planta 87	22,2	3,4	Presente	3
Planta 39	19,4	3,4	6	Presente	Planta 88	26,0	3,3	Presente	6
Planta 40	20,3	3,4	6	Presente	Planta 89	21,2	3,4	Presente	6
Planta 41	19,0	3,8	6	Presente	Planta 90	28,1	3,2	Presente	6
Planta 42	20,6	3,3	6	Presente	Planta 91	26,9	3,0	Presente	6
Planta 43	19,6	3,3	5	Presente	Planta 92	27,9	3,5	Presente	6
Planta 44	21,4	3,9	6	Presente	Planta 93	19,8	3,3	Presente	5
Planta 45	27,0	3,1	4	Presente	Planta 94	28,4	2,7	Presente	6
Planta 46	22,6	3,8	6	Presente	Planta 95	20,4	3,1	Presente	6
Planta 47	22,9	3,6	6	Presente	Planta 96	21,2	3,3	Presente	6
Planta 48	19,6	3,1	6	Presente	Planta 97	21,7	3,7	Presente	6
Planta 49	20,4	3,3	6	Presente	Planta 98	22,6	3,9	Presente	6
Planta 50	18,9	3,2	4	Presente	Planta 99	21,9	3,6	Presente	6
Planta 51	22,5	3,7	6	Presente	Planta 100	22,4	3,5	Presente	6

Legenda: Tortuos. = tortuosidade do caule mais acentuada que o normal esperado da planta 'Flying Dragon.

Apêndice F. Levantamento de dados morfológicos de folhas de plantas micropropagadas.

Amostra	Cor*	Margem	Formato	Comprimento (cm)				Largura (cm)			
				Folíolo Esquerdo	Folíolo Central	Folíolo Direito	Peciolo	Folíolo Esquerdo	Folíolo Central	Folíolo Direito	Peciolo
Planta 1	VE	Dentada	Ovalada	2	2,7	1,1	1,9	0,9	1,2	0,4	0,9
Planta 2	VE	Dentada	Ovalada	1,7	2,3	1	1,2	0,9	1,1	0,3	0,9
Planta 6	VE	Dentada	Ovalada	1,5	2,4	0,8	1,5	0,9	1,1	0,2	0,9
Planta 7	VE	Dentada	Ovalada	1,9	2,8	1,5	2,0	1,0	1,2	0,4	1,1
Planta 14	VE	Dentada	Ovalada	1,4	2,0	0,7	1,4	0,7	1,0	0,1	0,7
Planta 24	VE	Dentada	Ovalada	1,0	1,7	0,7	1,0	0,5	0,6	0,1	0,5
Planta 25	VE	Dentada	Ovalada	1,0	1,2	0,7	1,0	0,5	0,5	0,1	0,5
Planta 28	VE	Dentada	Ovalada	1,0	0,9	0,5	0,8	0,4	0,4	0,1	0,3
Planta 32	VE	Dentada	Ovalada	1,8	2,5	1,2	1,7	1,1	1,2	0,3	1,1
Planta 33	VE	Dentada	Ovalada	1,2	2,0	0,7	1,2	0,5	0,9	0,2	0,5
Planta 35	VE	Dentada	Ovalada	1,5	2,2	1,0	1,6	0,7	1,0	0,1	0,9
Planta 36	VE	Dentada	Ovalada	1,7	2,5	1,0	1,8	0,8	1,1	0,2	0,9
Planta 37	VE	Dentada	Ovalada	1,9	2,1	0,8	1,5	0,5	0,9	0,1	0,6
Planta 38	VE	Dentada	Ovalada	1,4	2,4	1,2	1,5	0,9	1,2	0,2	0,9
Planta 39	VE	Dentada	Ovalada	1,4	2,5	0,9	1,4	0,9	1,1	0,2	0,8
Planta 40	VE	Dentada	Ovalada	1,6	2,1	1,1	1,1	0,5	0,8	0,2	0,6
Planta 41	VE	Dentada	Ovalada	2,0	2,2	1,1	2,0	0,8	1,1	0,3	0,9
Planta 42	VE	Dentada	Ovalada	1,5	2,3	0,9	1,1	0,6	0,9	0,2	0,6
Planta 45	VE	Dentada	Ovalada	0,9	1,4	0,9	1,3	0,5	0,6	0,3	0,5
Planta 46	VE	Dentada	Ovalada	1,1	1,7	0,8	1,0	0,6	0,6	0,1	0,5
Planta 47	VE	Dentada	Ovalada	1,0	1,6	0,6	1,0	0,4	0,5	0,1	0,4
Planta 88	VE	Dentada	Ovalada	0,9	1,4	0,8	0,9	0,4	0,5	0,1	0,4
Planta 89	VE	Dentada	Ovalada	1,0	1,5	0,6	0,8	0,5	0,5	0,1	0,3
Planta 93	VE	Dentada	Ovalada	1,1	2,2	0,9	1,5	0,6	0,8	0,1	0,6
Planta 94	VE	Dentada	Ovalada	2,0	2,9	1,0	2,0	0,9	1,3	0,3	0,8

*Legenda: VE = Verde Escuro

Apêndice G. Levantamento de dados morfológicos de folhas de plantas originárias de semente.

Amostra	Cor*	Margem	Formato	Comprimento (cm)				Largura (cm)			
				Folíolo Esquerdo	Folíolo Central	Folíolo Direito	Pecíolo	Folíolo Esquerdo	Folíolo Central	Folíolo Direito	Pecíolo
Planta 1	VE	Dentada	Ovalada	1,9	2,3	1,2	2,0	0,8	1,0	0,3	0,9
Planta 2	VE	Dentada	Ovalada	1,8	2,2	1,3	1,7	0,6	1,0	0,3	0,7
Planta 6	VE	Dentada	Ovalada	1,8	2,5	1,5	1,9	0,8	1,1	0,4	0,8
Planta 7	VE	Dentada	Ovalada	1,9	2,4	1,2	1,1	0,8	1,0	0,4	0,8
Planta 14	VE	Dentada	Ovalada	2,1	2,9	1,0	2,0	1,0	1,2	0,3	1,0
Planta 24	VE	Dentada	Ovalada	1,6	2,1	1,3	1,0	0,8	0,9	0,3	0,7
Planta 25	VE	Dentada	Ovalada	1,7	2,4	1,4	1,8	0,8	1,0	0,3	0,8
Planta 28	VE	Dentada	Ovalada	1,7	2,3	1,2	1,8	0,8	0,9	0,3	0,8
Planta 32	VE	Dentada	Ovalada	1,8	2,1	1,0	1,9	0,8	1,1	0,4	0,8
Planta 33	VE	Dentada	Ovalada	2,0	2,8	0,9	2,0	0,8	1,1	0,4	1,0
Planta 35	VE	Dentada	Ovalada	2,0	2,5	1,3	1,8	0,7	0,9	0,4	0,8
Planta 36	VE	Dentada	Ovalada	1,1	2,3	1,2	1,2	0,8	0,9	0,3	0,7
Planta 37	VE	Dentada	Ovalada	1,9	2,1	1,8	1,9	0,8	1,0	0,3	0,8
Planta 38	VE	Dentada	Ovalada	1,7	2,4	1,2	1,7	0,7	1,0	0,3	0,8
Planta 39	VE	Dentada	Ovalada	1,8	2,3	1,4	1,8	0,7	0,9	0,3	0,7
Planta 40	VE	Dentada	Ovalada	1,2	2,3	1,4	1,6	0,8	9,0	0,3	0,7
Planta 41	VE	Dentada	Ovalada	1,6	2,2	1,9	1,9	0,7	0,8	0,3	0,8
Planta 42	VE	Dentada	Ovalada	1,1	2,3	1,3	1,2	0,7	1,0	0,3	0,8
Planta 45	VE	Dentada	Ovalada	1,6	2,1	1,2	1,1	0,8	0,8	0,3	0,7
Planta 46	VE	Dentada	Ovalada	1,1	2,3	1,1	1,1	0,7	0,8	0,2	0,6
Planta 47	VE	Dentada	Ovalada	1,4	2,1	1,2	1,5	0,7	0,9	0,3	0,7
Planta 88	VE	Dentada	Ovalada	1,5	2,1	0,8	1,5	0,7	0,8	0,2	0,7
Planta 89	VE	Dentada	Ovalada	1,7	2,3	1,2	1,7	0,8	1,0	0,3	0,8
Planta 93	VE	Dentada	Ovalada	1,5	2,6	1,1	1,7	0,8	1,0	0,2	0,8
Planta 94	VE	Dentada	Ovalada	1,8	2,5	1,2	1,9	0,8	1,0	0,3	0,9

*Legenda: VE = Verde Escuro