

OBSERVAÇÕES CITOLÓGICAS EM CITRUS

V. Poliploidia em relação à densidade e ao tamanho dos estomas em *Citrus* e outros gêneros das *Aurantioideae*.

C. A. Krug
O. Bacchi

INTRODUÇÃO

O estudo da influência do número de cromosômios sôbre a densidade e o tamanho dos estomas nas fôlhas já tem sido realizado em numerosas plantas; de um modo geral, verificou-se que um aumento do número de cromosômios resulta num aumento do tamanho dos estomas e numa diminuição do seu número por unidade de área. Isto se explica pelo fato de as células, contendo núcleos poliplóides, serem, regra geral, de tamanho também maior do que as que possuem núcleos diplóides.

À natureza dos estomas em *Citrus* e outros gêneros da sub-família das *Aurantioideæ* já tem sido objeto de estudos por parte de vários investigadores. Assim, Reed e Hirano (12) se preocuparam, de preferência, com a densidade dos estomas nas fôlhas de *Citrus sinensis* e *C. limon*, chegando às seguintes conclusões: que êstes só são encontrados na face inferior das fôlhas; que existem grandes variações no seu tamanho na mesma fôlha; constataram a presença de áreas desprovidas de estomas em tôrno dos pêlos epidermais, das glândulas de óleo e de estomas muito grandes e, ainda, um arranjo radial dos estomas em tôrno daquelas glândulas e variações na sua densidade nas diversas regiões da fôlha, existindo poucos em sua base, um número máximo no centro e intermediário na ponta. Acharam, mais, que o aumento do tamanho das fôlhas e o sombreamento diminuem a densidade dos seus estomas. Hirano (5) examinou um grande número de representantes da sub-família das *Aurantioideæ*, procurando correlacionar o grau de densidade dos estomas com as condições ecológicas existentes nas regiões de origem ou nas zonas de mais fácil adaptação de cada um dêstes representantes. De modo geral concluiu que as espécies de *Citrus* com 500 ou mais estomas por mm² vegetam de preferência nos trópicos, portanto em clima úmido

e quente, e que aquelas com menos de 500 estomas por mm^2 são encontradas mais freqüentemente em regiões localizadas entre 23,5 e 44° latitude N e S do Equador, existindo, entretanto, várias exceções a esta regra. Verificou, mais, que é grande a variabilidade do número médio de estomas, por unidade de área, dentro de cada espécie, afastando-se os extremos de cada grupo de menos de 100 por mm^2 para *C. aurantium*, *C. junos* e *C. paradisi*; de 100 a 200 por mm^2 para *C. hystrix*, *C. limon*, *C. maxima* e *C. sinensis* e mais de 200 por mm^2 para *C. aurantifolia*, *C. medica* e *C. reticulata*. Entre os gêneros, as diferenças verificadas foram ainda muito maiores, tendo sido as médias mínimas e máximas encontradas, respectivamente, de $167 \pm 1,7$ por mm^2 para *Eremocitrus glauca* e $1.064 \pm 3,7$ para *Severinia buxifolia*.

Turrell e Klotz (14) estudaram os estomas na casca dos frutos da Washington Navel (*C. sinensis*), concluindo que a sua densidade é maior nos frutos pequenos e que em tôrno das glândulas de óleo o seu arranjo é também radial como observado por Reed e Hirano (12) nas fôlhas.

O presente trabalho foi iniciado pelo primeiro dos autores na Citrus Experiment Station, Riverside, Califórnia (USA) (*) e completado pelo outro autor na Secção de Citologia do Instituto Agronômico do Estado de São Paulo, em Campinas. Teve por finalidade: 1) tentar explicar, pela possível existência de tipos poliplóides, a razão da grande variabilidade do número de estomas encontrada, por unidade de área, por Hirano (5), e 2) tentar delinear um método simples de identificar mudas tri e tetraplóides em viveiros de *Citrus* pela determinação do tamanho dos seus estomas.

NÚMERO DE CROMOSÔMIOS E DENSIDADE DOS ESTOMAS

Com o intuito de verificar se a grande variabilidade na densidade dos estomas encontrada por Hirano (5), em numerosos representantes do gênero *Citrus* e outros gêneros próximos da mesma sub-família, talvez pudesse ser explicada, ao menos em certos casos, pela existência, neste material, de formas poliplóides, procedeu-se à realização de pesquisas bibliográficas, com o fim de conhecer a constituição citológica do material utilizado, e, também, à contagem do número de cromosômios em 18 dos indivíduos examinados por aquêle autor, todos existentes na coleção da Citrus Experiment Station de Riverside, Califórnia. As determinações do número de cromosômios, feitas por outros investigadores, em localidades

(*) Guggenheim Fellow 1940-41.

diferentes, naturalmente só podem ser interpretadas com certas reservas em relação à densidade dos estomas nas respectivas espécies, feitas exclusivamente em Riverside. As novas contagens foram efetuadas pelo primeiro dos autores, em meristemas de raízes obtidas de estacas na Estação Experimental acima referida.

No quadro I apresentamos o material estudado por Hirano (5) e os seus respectivos números de cromosômios:

QUADRO I

DENSIDADE DOS ESTOMAS (1) E NÚMERO DE CROMOSÔMIOS

C.E.S. n.º (2)	GÊNERO, ESPÉCIE OU VARIEDADE	N.º de estomas por mm ²	N.º DE CRO- MOSÔMIOS		AUTOR
			n	2n	
	<i>Citrus aurantifolia</i>				
564	Bearss Seedless Lime ..	326 ± 2,4	—	27	Krug 1943
391	Tahiti Lime	375 ± 3,2	—	27	Krug 1943 (3)
452	Kusai Lime	595 ± 2,8	—	18	Krug 1943
1710	Mexican Lime	514 ± 2,6	—	18	Krug 1943
1665-B	<i>C. junos</i>	429 ± 2,3	9	—	Nakamura 1934
432	<i>C. hystrix</i> (4)	550 ± 2,4	9	—	Krug 1943
2454	(fôlhas e frutos grandes)				
	<i>C. hystrix</i>	704 ± 3,5	—	18	Krug 1943
	(fôlhas pequenas, frutos pequenos, enrugados)				
	<i>C. limonia</i>				
400	Rough lemon (5)	552 ± 2,8	—	18	Krug 1943
1482	Sweet lemon (5)	635 ± 2,5	—	18	Krug 1943
	Eureka lemon (5)	636 ± 2,5	9	—	Longley 1925
584	Lisbon lemon (5)	743 ± 3,6	—	18	Krug 1943
	<i>C. nobilis</i>				
1852	Kunembo	377 ± 4,8	—	9	Nakamura 1934
277	Dancy (6)	415 ± 1,8	9	18	Longley 1925 Bacchi (não pu- blicado, 1943) (7)
—	Unshiu (Satsuma) (6) ..	445 ± 2,8	8	—	Osawa, 1912
594	King	463 ± 2,7	9	—	Frost (não publi- cado, 1927) e Nakamura, 1934
270	Cleopatra (6)	552 ± 3,7	—	18	Bacchi (não publi- cado, 1943) (7)
696	Kinokuni	582 ± 2,6	9	18	Nakamura 1934, Bacchi (não pu- blicado, 1943) (7)

(Continuação)

C.E.S. n.º (2)	GÊNERO, ESPÉCIE OU VARIEDADE	N.º de estomas por mm ²	N.º DE CRO- MOSÔMIOS		AUTOR
			n	2n	
138-B	<i>C. medica</i> Indian Citron	552 ± 2,2	—	18	Krug 1943
757	Phillipine Citron	623 ± 3,3	—	18	Krug 1943
601	Chinese lemon	643 ± 3,3	—	18	Krug (não publi- cado, 1941)
128	Italian Citron	873 ± 4,7	—	18	Krug 1943
1458	<i>C. mitis</i>	665 ± 7,7	9	18	Longley 1925 Bacchi 1940
—	Marsh	583 ± 3,2	9	—	Longley 1925
255	<i>C. sinensis</i> Lue Gim Gong Orange	402 ± 2,5	9	—	Nakamura 1934
—	Washington Navel Orange	458 ± 2,7	9	—	Nakamura 1934
282	Jaffa Orange	473 ± 1,8	9	—	Oppenheim and Frankel 1929
—	Valencia Orange	504 ± 2,7	9	—	Longley 1925
591	St. Michael Orange (pa- per rind)	531 ± 2,7	9	—	Frost 1925
299	Ruby Blood Orange....	533 ± 2,5	9	—	Frost (não publi- cado, 1927)
1455	<i>C. Webberi</i>	769 ± 6,0	—	18	Krug 1943
1484	<i>Microcitrus australasica</i> ..	407 ± 2,5	—	18	Krug 1943
268	<i>Fortunella margarita</i>	461 ± 3,3	9	—	Longley 1925
1484	<i>Microcitrus australasica</i> , var. <i>sanguinea</i>	485 ± 2,2	—	18	Krug 1943
—	<i>Poncirus trifoliata</i>	495 ± 3,8	9	—	Longley 1925
1432	<i>Balsamocitrus</i> (8) <i>gabonensis</i>	553 ± 2,3	—	18	Krug 1943
1450	<i>Citropsis Schweinfurthi</i> ...	589 ± 3,5	9	—	Longley 1925
1430	<i>Atalantia citroides</i>	697 ± 2,5	—	18	Krug 1943
1492	<i>Severinia buxifolia</i>	1064 ± 3,7	9	—	Longley 1925

(1) Extrato parcial das Tabelas III e IV de Hirano (5).

(2) N.º da Citrus Experiment Station.

(3) Confirmando determinação anterior, feita por Bacchi (1).

(4) Mais tarde identificada por W. T. Swingle como sendo *C. macroptera* Montr.(5) Variedades classificadas por Swingle (13) em *C. limon* (1) Burm.(6) Classificados por W. T. Swingle (13) em *C. reticulata* Blanco.

(7) Contagens feitas em material trazido por C. A. Krug e colhido nas árvores da Citrus Experiment Station, utilizadas por Hirano.

(8) Mais tarde identificada por W. T. Swingle como sendo *Afrægle gabonensis* (Swingle), Engler.

Pelos dados do quadro I, verifica-se que, com exceção de duas variedades de *Citrus aurantifolia*, todos os demais tipos examinados por Hirano (gêneros, espécies e variedades) possuem o mesmo número de cromossômicos, isto é, $2n = 18$. A extrema variabilidade na densidade dos estomas deve, portanto, ser atribuída, de preferência, às diferenças genéticas existentes, o que, aliás, é perfeitamente compreensível, dada a extrema variabilidade dos caracteres morfológicos e fisiológicos que se constata nos representantes de *Citrus* e demais gêneros das *Aurantioideæ*. O elevado grau de heterozigose verificado em muitas espécies de *Citrus* deve ser também responsável, em parte, pelas diferenças encontradas na densidade dos estomas, pois muitas das variedades deste gênero se originaram por "seedlings" ocasionais derivados de autofecundações ou hibridações naturais.

Examinemos, ainda, alguns casos em particular:

Citrus aurantifolia: As diferenças na densidade dos estomas, observadas entre o grupo das duas primeiras variedades (Bearss e Tahiti) e as duas outras (Kusai e Mexican) devem ser atribuídas, em grande parte, ao fato de aquelas serem triplóides e estas diplóides. A "Tahiti" provavelmente se deriva de uma lima ácida diplóide, cujos frutos os Estados Unidos importaram do Tahiti (15, 7), tendo-se originado a "Bearss" da "Tahiti", provavelmente, por um "seedling" nucelar (7). A diferença extremamente pequena, do número de estomas encontrados entre estas duas variedades, está, pois, plenamente explicada. Quanto à *Kusai Lime*, que destoa um tanto do grupo, cumpre notar que a sua posição na sistemática de *Citrus* ainda não está bem definida; Nakamura (9) a menciona como pertencente ao *C. limonia* e Webber (16) a classifica provisoriamente no grupo das "mandarins-limes" e *C. reticulata* Blanco. Não pertencendo, pois, ao *C. aurantifolia*, fica explicada a diferença no número dos seus estomas, quando comparada com a "Mexican Lime".

C. hystrix: A grande diferença encontrada entre os números de estomas nas duas espécies citadas por Hirano se explica pelo fato de divergirem elas profundamente sob ponto de vista morfológico, tendo sido a primeira (CES 432) recentemente classificada por Swingle como pertencendo ao *C. macroptera* Montr.

C. limonia: Das quatro variedades citadas, a que apresenta o menor número de estomas também destoa mais sob ponto de vista morfológico com frutos de coloração amarelo-alaranjada, casca sôlta e rugosa, tendo mesmo sido citada por Nakamura (9) como pertencendo a uma espécie distinta (*C. verucosa* Hort. ex Tanaka?). Chama-nos ainda a

atenção a grande diferença no número de estomas encontrado para as variedades "Eureca" e "Lisbon", morfológicamente muito semelhantes.

C. nobilis: Trata-se de um dos grupos mais heterogêneos de *Citrus*; dos seis tipos estudados por Hirano — todos com $2n=18$ — apenas as variedades "Kunembo" e "King" pertencem a esta espécie, de acôrdo com Swingle (13); o "Kinokuni", mencionado por Nakamura (9) como espécie diferente, e as demais pertencendo ao *C. reticulata* Blanco. Entretanto, mesmo reagrupando-se êstes tipos, de acôrdo com o critério acima, nota-se que são grandes as diferenças do número de estomas, mesmo dentro dêstes sub-grupos.

C. medica: O grupo das quatro variedades estudadas também se apresenta bem heterogêneo; apenas a última citada (Italian Citron) constitue uma cidra típica, apresentando as demais frutos de coloração amarelo-alaranjada de várias formas e tamanhos.

C. sinensis: Tôdas as seis variedades são, aparentemente, diplóides, sendo, entretanto, acentuadas as diferenças morfológicas que apresentam.

Os demais gêneros mencionados no fim do quadro I são todos diplóides, caracterizando-se, entretanto, por profundas diferenças no seu tipo de crescimento e demais caracteres morfológicos e fisiológicos.

Em conclusão, pode-se, pois, afirmar que apenas em um dos grupos estudados (*Citrus aurantifolia*) é possível explicar as variações da densidade de estomas por diferenças no número de cromosômios.

NÚMERO DE CROMOSÔMIOS E TAMANHO DOS ESTOMAS

Como já foi dito atrás, a finalidade principal dêste estudo constitue uma tentativa de se delinear um método simples para diferenciar mudas triplóides e tetraplóides que, com certa freqüência, aparecem nos viveiros de *Citrus*.

1) Material e métodos

O material utilizado para determinação do tamanho dos estomas nos foi gentilmente fornecido pelo dr. H. B. Frost, do Departamento de Plant Breeding da Citrus Experiment Station, Riverside, Califórnia, com exceção do "Grapefruit McCarty" e o hipertriplóide, "Citron of Commerce", ambos existentes na coleção de *Citrus* da Estação Experimental de Limeira, do Instituto Agrônomo. Tôdas as determinações do número de cromosômios já tinham sido feitas anteriormente por Frost, no material de Riverside, e por Bacchi, no de Limeira.

Pela determinação do tamanho dos estomas, foram colhidas cêrca de 20 fôlhas desenvolvidas, aproximadamente do mesmo tamanho e expostas ao sol, da face sul de cada uma das árvores, escolhidas para tal fim, da coleção de *Citrus* de Riverside. As de Limeira foram cole-

tadas da mesma maneira, apenas de todos os lados das árvores. Levadas sem demora ao laboratório, ali se escolhiam as 10 mais uniformes de cada lote, cortando-se de cada fôlha um setor central e transversal de 2,5 cm de largura (fig. 1); tais setores eram fixados em solução "F-A-A" (Formalina: 5 cc; Ac. acético glacial: 5 cc; Alc. etílico 70%: 90 cc) por 24 horas; depois o fixador era substituído pelo álcool etílico 70%. Para exame dos estomas, foram feitos à mão livre, com auxílio de uma lâmina "gilette", 5 cortes, tangenciais, na epiderme inferior de cada setor, examinando-se, a seguir, êstes cortes montados sob lamínula e em água destilada. Utilizou-se, para tal fim, um microscópio Zeiss com objetiva de imersão 100 x e ocular milimetrada 7 x. Em cada corte foram feitas determinações em 4 estomas, medindo-se seu comprimento e largura. Tendo-se feito 5 cortes por fôlha e examinado, da mesma forma, 10 fôlhas, deduz-se que para cada planta foram executadas medições em 200 estomas. Para as medições evitavam-se sempre os estomas de tamanho muito maior, já descritos por Reed e Hirano (12), sendo, porém, os demais escolhidos ao acaso.

Para cada fôlha foi computada uma média da área dos estomas, calculando-se depois uma média geral para cada uma das plantas, baseada nas 10 médias parciais. A área foi calculada da seguinte forma: o produto comprimento x largura, em unidades da ocular, foi multiplicado por 0,785, admitindo-se que o estoma seja uma elipse; em seguida multiplicou-se êste produto por 2,776 para transformar a área calculada em micra². Para cada indivíduo também se efetuou a análise da variance, e a determinação de "F" com o fim de saber se as médias gerais podiam ser consideradas como representativas do material em estudos. Das 36 análises feitas, 10 apresentaram um êrro "dentro" maior do que "entre" e apenas 7 revelaram um valor de "F" acima do da tabela, sendo 6 para $P=50\%$ e 1 para $P=10\%$. A grande maioria das médias pode, pois, ser considerada como bem representativa, tendo sido, no geral, não significativa tanto a variação "entre" as fôlhas como "dentro" das fôlhas.

2) Resultados gerais obtidos

No quadro II apresentamos os resultados gerais das medições feitas: No quadro II e no gráfico 1 o material examinado foi coordenado em ordem decrescente de tamanho dos seus estomas, verificando-se

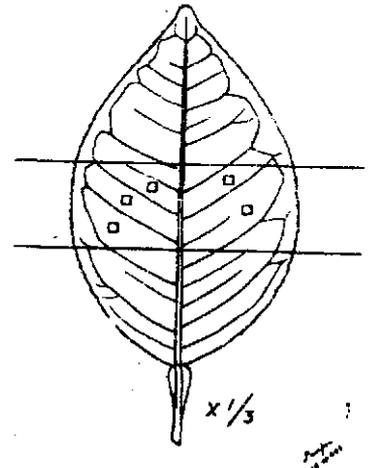


Fig. 1

Folha indicando o setor utilizado e a localização aproximada dos cortes tangenciais da epiderme.

QUADRO II
TAMANHO DOS ESTOMAS EM FORMAS CÍTRICAS DI-TRI- E TETRAPLÓIDES

N.º	Localização na C.E.S. (*)	V A R I E D A D E S	Espécies	N.º de cromossomos	Área dos estomas em micrã
42	SI-C1, 6	Imperial Grapefruit	<i>Citrus paradisi</i>	4x	402,1 ± 3,00
44	SI-G4,14	King Mandarin	<i>C. nobilis</i>	4x	395,6 ± 2,42
75	SI-D3,13	Hall Silver Grapefruit	<i>C. paradisi</i>	4x	389,3 ± 2,83
71	SI-D3,10	Willow Leaf Mandarin	<i>C. reticulata</i>	4x	389,2 ± 3,28
—	P-2-18A(**)	Grapefruit Mc Carly	<i>C. paradisi</i>	4x	387,8 ± 2,39
69	SI-D1,15	Dancy Tangerine	<i>C. reticulata</i>	4x	384,5 ± 3,86
64	SI-D2, 8	Ruby Orange	<i>C. sinensis</i>	4x	376,3 ± 2,08
62	SI-D11, 9	Paper Rind Orange (St. Michael)	<i>C. sinensis</i>	4x	376,1 ± 2,28
73	SI-D6,15	Seedy Marsh Grapefruit	<i>C. paradisi</i>	4x	360,8 ± 2,28
58	SI-C12, 1	Imperial Grapefruit (41) x Willow Leaf Mandarin (70)	<i>C. paradisi</i> x <i>C. reticulata</i>	3x	349,4 ± 2,08
59	SI-C12, 4	Maltese Oval Orange (50) x Seedy Marsh Grapefruit (72)	<i>C. sinensis</i> x <i>C. paradisi</i>	3x	334,7 ± 2,19
55	SI-C11, 8	Maltese Oval Orange (60) x King Mandarin (75)	<i>C. sinensis</i> x <i>C. nobilis</i>	3x	329,5 ± 3,28
53	SI-C11,13	Maltese Oval Orange (60) x Leaf Mandarin (70)	<i>C. sinensis</i> x <i>C. reticulata</i>	3x	325,7 ± 2,47
11	3A-26, 3	Bears Seedless Lime	<i>C. aurantiifolia</i>	3x	321,2 ± 1,83
—	—	"Citron of Commeros" (**)	ndo determinada	3x + 1	315,6 ± 1,61
12	3A-23, 3	Tahiti Lime	<i>C. aurantiifolia</i>	3x	307,7 ± 2,30
54	SI-C11,11	Maltese Oval Orange (60) x King Mandarin (75)	<i>C. sinensis</i> x <i>C. nobilis</i>	3x	306,6 ± 2,64
57	SI-C11, 3	Maltese Oval Orange (60) x Naletile Orange	<i>C. sinensis</i> x <i>C. sinensis</i>	3x	302,4 ± 2,19
56	SI-C11,6	Willow Leaf Mandarin (70) x Ruby Orange (65)	<i>C. reticulata</i> x <i>C. sinensis</i>	3x	293,6 ± 1,92
52	SI-C10,13	Willow Leaf Mandarin (70) x Dancy Tangerine (68)	<i>C. reticulata</i> x <i>C. reticulata</i>	3x	282,8 ± 1,92
47	3A-10, 2	Indian Citron	<i>C. medica</i>	2x	263,3 ± 1,67
41	SI-C1, 5	Imperial Grapefruit	<i>C. paradisi</i>	2x	262,1 ± 1,89
—	P2-19A(**)	Grapefruit McCarly	<i>C. paradisi</i>	2x	260,0 ± 1,75
44	SI-C10, 9	Hall Silver Grapefruit	<i>C. paradisi</i>	2x	257,6 ± 2,47
43	SI-C9, 1	Lisbon Lemon	<i>C. limon</i>	4x	254,3 ± 2,36
61	SI-D11,13	Lisbon Lemon	<i>C. limon</i>	2x	252,1 ± 1,83
67	D1-D11,13	Lisbon Lemon	<i>C. limon</i>	4x	250,1 ± 1,86
68	SI-D1,14	Dancy Tangerine	<i>C. reticulata</i>	2x	248,2 ± 2,05
70	SI-D3, 9	Willow Leaf Mandarin	<i>C. reticulata</i>	2x	246,2 ± 1,97
65	SI-D12, 6	Ruby Orange	<i>C. sinensis</i>	2x	246,1 ± 1,64
60	SI-D11,15	Maltese Oval Orange	<i>C. sinensis</i>	2x	244,8 ± 1,72
75	SI-G4,16	King Mandarin	<i>C. nobilis</i>	2x	244,3 ± 1,61
72	SI-D6,10	Seedy Marsh Grapefruit	<i>C. paradisi</i>	2x	243,3 ± 1,55
63	SI-D11, 8	Paper Rind Orange (St. Michael)	<i>C. sinensis</i>	2x	241,3 ± 1,58
66	SI-D10,12	Lisbon Lemon	<i>C. limon</i>	2x	234,8 ± 1,78
—	2-B32,15	Naletile Orange	<i>C. sinensis</i>	2x	219,9 ± 1,36

(*) C.E.S. = Citrus Experiment Station, Riverside, Califórnia.
(**) Obtidas na Est. Exp. de Limeira, São Paulo.

que este variou entre os extremos de 402,1 micra² para o "Imperial Grapefruit", e 219,9 micra² para a "Nafertile Orange", acusando, pois, este caráter uma grande variabilidade neste gênero.

3) Comparação entre grupos di- tri- e tetraplóides

Classificado o material na ordem acima mencionada, destacam-se em três grupos distintos, os di- tri- e tetraplóides, apresentando médias gerais de, respectivamente, 248,0 micra², 315,4 micra² e 384,6 micra². Comparando-se a variabilidade **dentro** de cada um destes três grupos, verificou-se que o valor de **F** é maior no caso dos triplóides, sendo, entretanto, também significativo para os outros dois grupos. Apesar de se constatar uma gradual diminuição da área dos estomas, do tetraplóide com área máxima até o diplóide de área mínima, não se verificou nos limites tetra- e triplóide e tri- e diplóide uma transgressão dos dados obtidos; apenas duas exceções se registaram: os ns. 43 e 67 "Lisbon Lemon", que, segundo Frost (inf. verbal), são dois enxertos procedentes de borbulhas derivadas de um único "seedling" nucelar tetraplóide. As folhas destes dois pés são grossas e coriáceas, idênticas aos demais tetraplóides até hoje estudados. Talvez estes indivíduos representem uma quimera com uma epiderme diplóide, sendo o restante do tecido tetraplóide, como já verificado por Frost e Krug (4) em material de *Citrus* de outra constituição. Interessante é notar que o grupo triplóide, apesar de geneticamente muito variável, pois encerra, além de 8 híbridos diversos, duas variedades triplóides de *C. aurantifolia* e um hipertriplóide ($3x + 1$), o "Citron of Commerce", se apresenta relativamente homogêneo.

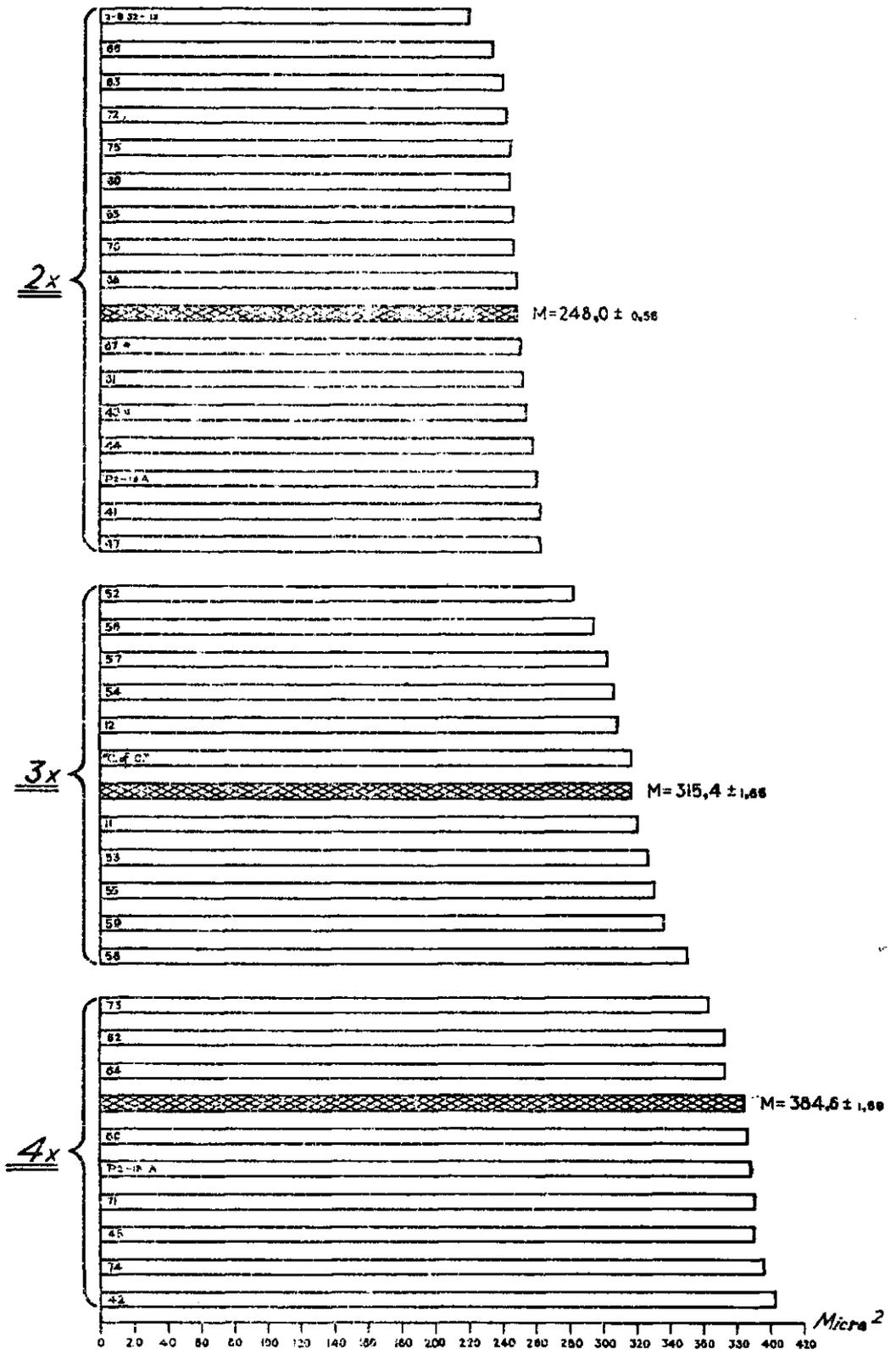
As diferenças encontradas entre as três médias gerais, correspondentes aos grupos di- tri- e tetraplóides, são altamente significantes:

	Diferenças (micra ²)	t
Tetraplóide e Triplóide:	69,2	27,6
Tetraplóide e Diplóide:	137,2	76,7
Triplóide e Diplóide:	68,0	34,7

Valores máximos de t da tabela (nf = ∞) P = 5% : 2,58
 = 2% : 2,33
 = 1% : 1,96

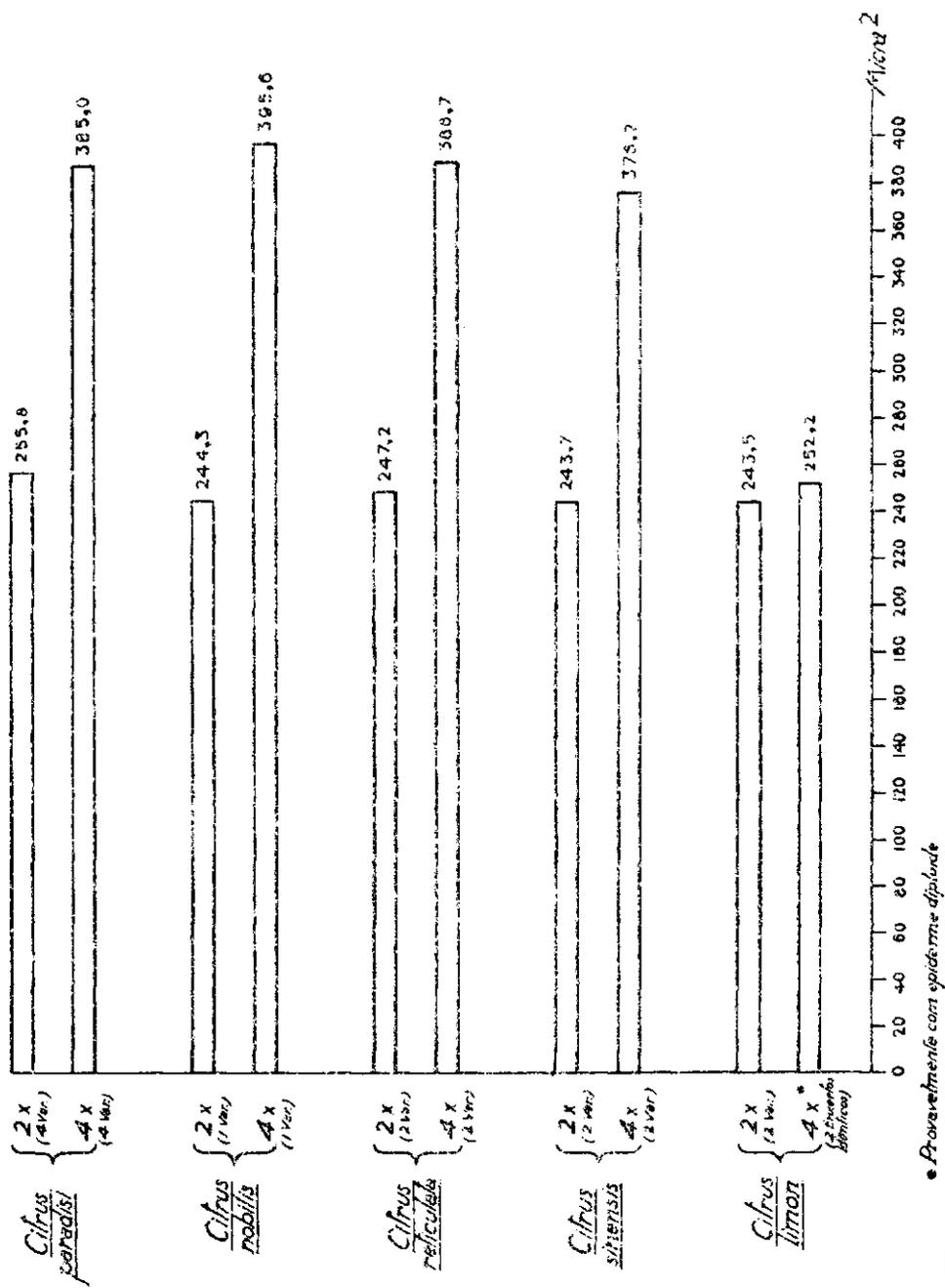
Analisando-se também as diferenças encontradas, respectivamente, entre o tetraplóide de área mínima e o triplóide de área máxima e ainda entre o triplóide de área mínima e o diplóide de área máxima, verifica-se que as duas diferenças encontradas ainda são estatisticamente significantes (respectivamente D = 11,4; t = 3,7 e D = 19,5; t = 7,4).

Gráfico nº 1
Área dos estomas em formas citricas di-tri-e tetraplóides



* Lisbon Lemon 4x provavelmente com epiderme 2x

Gráfico nº 2
 Comparação da área média dos estomas de di-
 tetrapóides da mesma espécie



4) Comparação entre diplóides e tetraplóides da mesma espécie

Analisando-se, comparativamente, os dados destes grupos, chegou-se à conclusão de que as diferenças existentes, tanto entre pares de indivíduos como entre as médias de diplóides e tetraplóides, dentro de cada espécie, são muito significantes. O material examinado presta-se especialmente para estas comparações, uma vez que o dr. H. B. Frost nos pôs à disposição uma série de indivíduos irmãos, isto é, cada diplóide possui o seu correspondente tetraplóide, ambos sempre originários da mesma planta-mãe; apenas no caso do King Mandarin, o diplóide e o tetraplóide provêm de duas plantas, representando uma delas, entretanto, um enxerto da outra, constituindo, pois, o mesmo material genético. Examinemos, a seguir, o material, separadamente por espécie (quadro III e gráfico 2):

QUADRO III

COMPARAÇÃO DA ÁREA DE ESTOMAS DE DIPLÓIDES E TETRAPLÓIDES DA MESMA ESPÉCIE

ESPÉCIE	VARIEDADE	DIFERENÇA, NA ÁREA, ENTRE DI- E TETRAPLÓIDES (micra ²)
<i>C. paradisi</i>	Imperial	140,0
	Hall Silver	131,7
	McCarty (1)	127,0
	Seedy Marsh	117,5
	Média	129,1
<i>C. nobilis</i>	King mandarin (1)	151,3
<i>C. reticulata</i>	Willow Leaf mandarin	143,0
	Dancy Tangerine	136,3
	Média	139,7
<i>C. sinensis</i>	Ruby Orange	130,2
	Paper Rind Orange	134,8
	Média	132,5
<i>C. limon</i>	Lisbon Lemon	8,7 (2)

(1) Os tetraplóides e diplóides não provêm de uma única planta-mãe.

(2) Diferença estatisticamente não significativa pelo fato de as plantas tetraplóides, possuírem, provavelmente, uma epiderme **diplóide**.

Com exceção do *C. limon*, as diferenças verificadas, entre a área dos estomas dos diplóides e dos tetraplóides, são, pois, bem constantes, oscilando apenas entre os limites de 117,5 a 151,3 micra², sendo sempre estatisticamente significantes.

5) Comparação entre os extremos dentro de cada espécie e grupo di- e tetraplóide

Examinemos ainda a variabilidade dentro de cada um destes grupos :

QUADRO IV

COMPARAÇÃO ENTRE OS EXTREMOS DENTRO DE CADA ESPÉCIE E GRUPO DI- E TETRAPLÓIDE

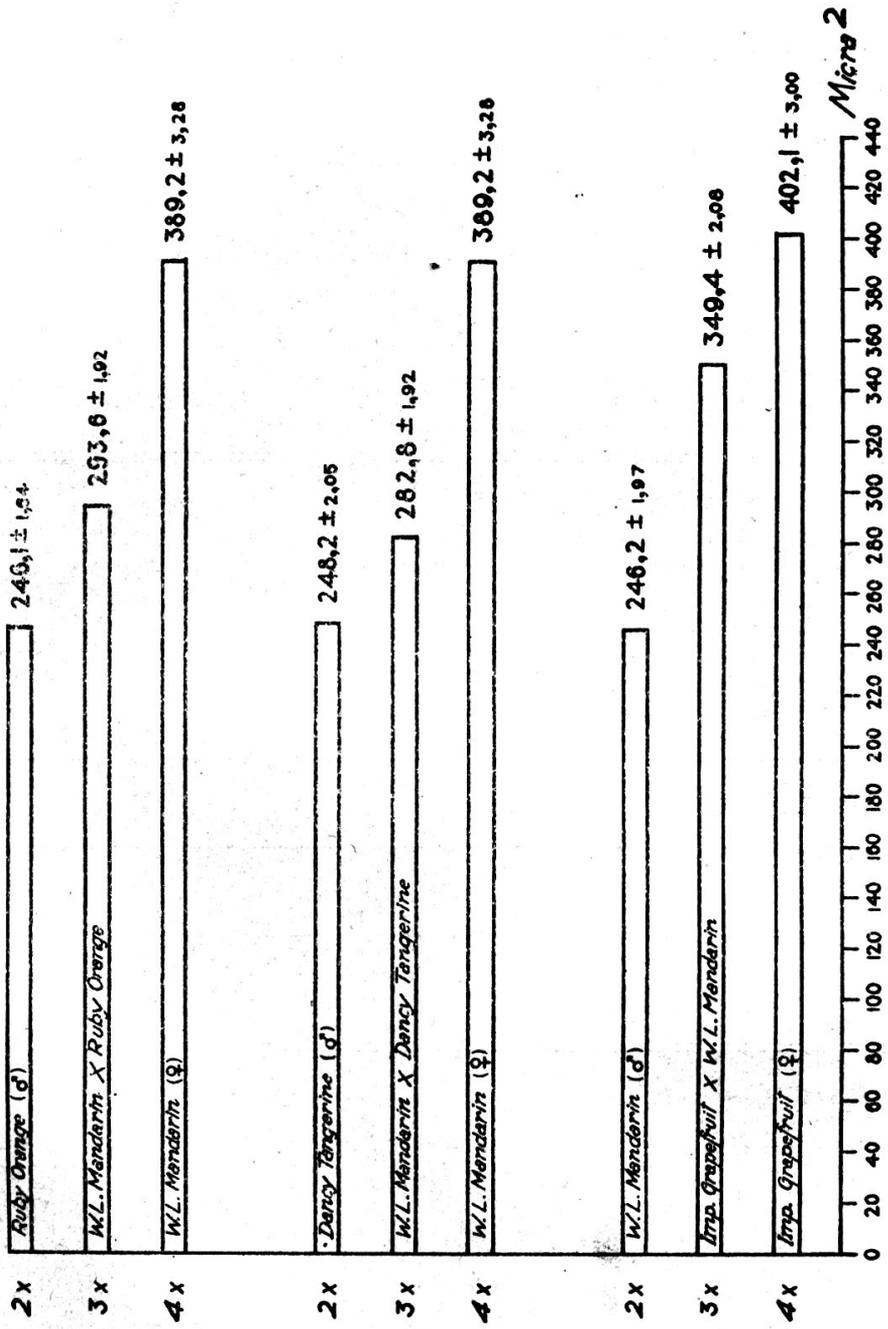
ESPÉCIE	N.º de variedades	N.º de cromosômios	Diferenças entre os extremos (micra ²)	t
<i>C. paradisi</i>	4	2x	18,8	7,7*
	4	4x	41,3	10,9*
<i>C. reticulata</i>	2	2x	2,0	0,69
	2	4x	4,7	0,92
<i>C. sinensis</i>	4	2x	26,2	12,3*
	2	4x	0,2	0,06
<i>C. limon</i>	2	2x	17,3	6,7*
	2	4x	4,2	1,4

Dos oito grupos examinados, quatro apresentam diferenças estatisticamente significantes entre os seus extremos, acusando os demais valores de *t* inferiores aos da tabela, mesmo para $P = 1\%$.

6) Comparação entre os híbridos triplóides e os seus ascendentes di- e "tetraplóides"

A-pesar do fato de todos os híbridos triplóides mencionados no quadro II terem sido derivados de cruzamentos entre formas **diplóides**, julgamos ser lícita a comparação entre cada um destes híbridos e as suas respectivas formas parentais diplóides e "tetraplóides", pois aceitamos a hipótese de Frost (3) de que tais híbridos são triplóides, pelo fato de o gâmeto feminino se derivar de um tecido nucelar tetraplóide, provavelmente originário por mutação somática. O "ascendente" 4x, utilizado para as comparações, é sempre constituído pela forma tetraplóide derivada da mesma progênie da qual provém o respectivo diplóide.

Gráfico n.º 3
 Comparação da área das estomas de três híbridos triploides com a das seus ascendentes diploides e tetraploides



Dos oito híbridos triplóides estudados, três podem ser comparados com ambos os ascendentes, os demais apenas com um deles, pois, infelizmente, não existia na coleção de Riverside a forma tetraplóide do "Maltese Oval Orange", que entrou em 5 destes cruzamentos como ♀.

Examinemos, no quadro V e no gráfico 3, as diferenças observadas na área dos estomas.

QUADRO V

COMPARAÇÃO ENTRE OS HÍBRIDOS TRIPLÓIDES E OS SEUS ASCENDENTES DI-
E "TETRAPLÓIDES"

N.º	V A R I E D A D E S	N.º de cromos.	Diferenças na área (micra ²)	t
65	Ruby Orange (♂).....	2x	47,5	18,8
56	Willow Leaf Mandarin x Ruby Orange	3x	95,6	25,2
71	Willow Leaf Mandarin (♀).....	4x		
68	Dancy Tangerine (♂).....	2x		
52	Willow Leaf Mandarin x Dancy Tangerine ..	3x	34,6	12,3
71	Willow Leaf Mandarin (♀).....	4x	106,4	28,0
70	Willow Leaf Mandarin (♂).....	2x		
58	Imperial Grapefruit x Willow Leaf Mandarin.	3x	103,2	36,1
42	Imperial Grapefruit (♀).....	4x	52,7	14,4
55	Maltese Oval Orange x King Mandarin	3x	85,2	23,3
75	King Mandarin (♂).....	2x		
53	Maltese Oval Orange x Willow Leaf Mandarin..	3x	79,5	25,2
70	Willow Leaf Mandarin(♂).....	2x		
54	Maltese Oval Orange x King Mandarin	3x	62,3	20,2
75	King Mandarin(♂)	2x		
57	Maltese Oval Orange x Nafertile Orange....	3x	82,5	32,0
—	Nafertile Orange(♂)	2x		
59	Maltese Oval Orange x Seedy Marsh Grapefruit	3x	91,4	34,1
72	Seedy Marsh Grapefruit(♂)	2x		
55	Maltese Oval Orange x King Mandarin	3x	22,9	5,44
54	Maltese Oval Orange x King Mandarin	3x		

Sem uma única exceção, tôdas as diferenças constatadas são estatisticamente significantes. O valor de **t** foi apenas igual a 5,44, no caso da comparação da área dos estomas de dois indivíduos híbridos triplóides (Maltese Oval Orange x King Mandarin) da mesma ascendência.

7) Discussão

Analisando-se os dados obtidos, chega-se à conclusão de que os três grupos di- tri- e tetraplóides apresentam áreas médias de estomas bem diferentes; nos limites dos grupos, di- e triplóides e também tri- e tetraplóides, entretanto, as diferenças observadas são menores do que as dentro de cada um deles. Comparando-se, porém, os representantes di- e tetraplóides de cada uma das variedades observadas, notam-se apreciáveis diferenças, que, para o material examinado, variaram entre 117,5 a 151,3 micra². Mesmo que não haja dúvida de que um determinado indivíduo seja tetraplóide, a determinação da área dos estomas servirá, pois, para confirmar tal hipótese ou revelará que a folha, apesar de ser grossa e coriácea, possui aparentemente uma epiderme diplóide, como, provavelmente, é o caso dos dois indivíduos "Lisbon Lemon" (ns. 43 e 67) examinados.

Pelo quadro IV verifica-se ainda que a área dos estomas é também variável dentro da mesma espécie e grupo di- e tetraplóide, quando se comparam, neste sentido, variedades diferentes. As diferenças encontradas não são, entretanto, estatisticamente significantes em metade dos casos examinados.

A possibilidade de se poder diferenciar **triplóides** de diplóides e tetraplóides é para o geneticista e melhorador de plantas cítricas ainda mais importante do que diferenciar tetraplóides dos diplóides. Comparando-se os dados dos quadros III e V, nota-se, como era de se esperar, que as diferenças entre os triplóides e os seus respectivos di- e tetraplóides são bem menores do que aquelas entre di- e tetraplóides. Estes resultados indicam que a determinação da área dos estomas numa planta de constituição citológica desconhecida resolverá, com razoável grau de certeza, se ela é tri- ou tetraplóide, baseando-se nas diferenças encontradas quando comparada com a área do respectivo diplóide, pois, no material ora examinado, a diferença **máxima** di- a triplóide (103,2 micra², Willow Leaf Mandarin 2x e Imperial Grapefruit x Willow Leaf Mandarin 3x), não atingiu a diferença **mínima** di- a tetraplóide (117,5 micra² para o Seedy Marsh Grapefruit).

Conclue-se, pois, que a determinação da área dos estomas pode ser útil ao geneticista para diferenciar as plantas di- tri- e tetraplóides, mesmo no grupo de plantas cítricas, extremamente variável sob todos os pontos de vista.

RESUMO

No presente trabalho dois aspectos diversos são analisados referentes às relações entre poliploidia e os caracteres dos estomas em *Citrus* e outros gêneros próximos. Na primeira parte analisam-se os dados apresentados por Hirano (5) sobre a densidade dos estomas em numerosos representantes da sub-família das *Aurantioidae* à luz da sua constituição citológica. Esperava-se poder explicar a grande variabilidade desta densidade, pela possível existência de formas poliplóides. A contagem dos cromossômios de muitas plantas por êle utilizadas na Estação Experimental de Riverside, Califórnia, e uma extensa pesquisa bibliográfica, visando esclarecer a constituição cromossômica daquelas variedades, espécies e gêneros que não puderam ser analisados, revelaram, porém, que, provavelmente, apenas no grupo de *Citrus aurantifolia* Swingle, existem duas variedades triplóides, sendo tôdas as demais diplóides. Somente naquele caso é que a variabilidade na densidade dos estomas pôde ser explicada pela diferença no número de cromossômios. No restante do material estudado por Hirano, as diferenças no número de estomas por unidade de área devem ser atribuídas, de preferência, à grande variabilidade da constituição genética.

Na segunda parte apresentam-se os resultados de uma detalhada análise sobre a área dos estomas e a sua variabilidade em formas cítricas di- tri- e tetraplóides, numa tentativa de separar êstes poliplóides sem recorrer à contagem dos cromossômios. Um total de 36 indivíduos pertencendo a 5 espécies diferentes foram estudados. Agrupando-se os valores obtidos em ordem decrescente de área dos estomas, verifica-se uma série contínua, associando-se, entretanto, os di- tri- e tetraplóides em três grupos separados. Notaram-se diferenças estatisticamente significantes tanto entre as médias dos três grupos, como entre os limites extremos de grupos consecutivos e também dentro dêles. A variabilidade dêste caráter também se manifesta dentro de cada uma da maioria das espécies e grupos di- e tetraplóides. Apesar disso, entretanto, chegou-se à conclusão de que a determinação da área dos estomas poderá ser útil mesmo no caso em que se queira separar triplóides de tetraplóides, da mesma progênie, conhecendo-se a área dos estomas das respectivas formas diplóides em idênticas condições de meio.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos são devidos ao dr. H. B. Frost, da Citrus Experiment Station, Riverside, Califórnia, por ter gentilmente pôsto à disposição das pesquisas atrás relatadas variado material da sua valiosa coleção

de *Citrus*; ao dr. L. D. Batchelor, diretor daquela Estação Experimental, por ter facilitado a execução do início destas investigações, e ao sr. Francisco Juliano Filho, da Secção de Citologia do Instituto Agronômico, pelo auxílio que prestou na determinação de área dos estomas.

SUMMARY

In the present article two aspects dealing with the relations of polyploidy and stomata characters in *Citrus* and related genera are dealt with. First the data of Hirano (5) concerning stomata density in numerous forms of the sub-family *Aurantioidæ* are analysed in relation to their chromosomal constitution. It was thought that the great variability of stomata number per unit area, could possibly be explained by differences in chromosome numbers. Chromosome counts of numerous plants utilized by Hirano at the Citrus Exp. Sta., Riverside, California, were made and all available bibliographical informations concerning the cytological constitution of those species and genera were gathered, whose chromosomes could not be counted at Riverside; it was concluded that all types studied by Hirano, have 18 somatic chromosomes except for two varieties of *Citrus aurantifolia*, Swingle, which are triploid. This was the only instance in which differences in chromosome numbers were primarily responsible for the differences in stomata density. In the rest of the material the variability of this character must be due to differences in genetic constitution.

In the succeeding chapters the results of a detailed analysis of stomata area and its variability in diploid, triploid and tetraploid *Citrus* forms are presented; this was done in order to find a simple method of identifying these polyploids without making actual chromosome counts. A total of 36 individuals of 5 different species were examined. Listing the average stomata areas, starting with the largest and finishing with the smallest, a continuous series is obtained, the diploids, triploids and tetraploids being however associated in three groups, no overlapping from one group to the other having been noticed. Significant differences have been found not only between the general averages of the three groups, but also between the extremes at the limits of two succeeding groups and also in each of them. Conspicuous variability of this character is also noticed in each of most of the species and its diploid and tetraploid groups. In spite of this variability it is concluded that the determination of stomata area can be useful to geneticists and plant breeders working with *Citrus*, even when one has to distinguish between triploids and tetraploids in the same progeny, if one knows the stomata area of the related diploids grown under identical circumstances.

LITERATURA CITADA

1. Bacchi, O. Observações citológicas em *Citrus*. I. Número de cromossomos de algumas espécies e variedades. *Jornal de Agronomia, Piracicaba*, 3: 249-258. 1940.
2. Frost, H. B. The chromosomes of *Citrus*. *Jour. Wash. Acad. Sci.* 15: 1-3. 1925.
3. Frost, H. B. The Genetics and Cytology of *Citrus*. *Current Science Special Number on Genetics*. 1938.
4. Frost, H. B. e C. A. Krug. Diploid --- Tetraploid periclinal chimeras as bud variants in *Citrus*. *Genetics* 27: 619-634. 1942.
5. Hirano, E. Relative abundance of stomata in *Citrus* and some related genera. *Bot. Gaz.* 92 (3): 296-310. 1931.

6. **Krug, C. A.** Chromosome numbers in the sub-family Aurantioideae with special reference to the genus *Citrus*. *Bot. Gaz.* **104** (4) : 602-611. 1943.
7. **Krug, C. A. e O. Bacchi.** Triploid *Citrus* Varieties. *Jour. Heredity* **34** (9) : 277-283. 1943.
8. **Longley, A. E.** Polycary, polyspory and polyploidy in *Citrus* and *Citrus* relatives. *Jour. Wash. Acad. Sci.* **15** : 347-351. 1925.
9. **Nakamura, Miyewo.** A preliminary report on the chromosome number, pollen sterility and the formation of abnormal pollen tetrads in *Citrus*.¹ *Bull. Kagoshima Coll. Agr. For.* **1** : 11-14. 1934.
(*Cit. Plant Breed. Abstr.* **7** : 234. 1937).
10. **Oppenheim, J. D. e O. H. Frankel.** Investigations into the fertilization of the Jaffa Orange. *Genetica* **11** : 369-374. 1929.
11. **Osawa, J.** Cytological and experimental studies in *Citrus*. *Jour. Coll. Agr. Imp. Univ. Tokyo* **4** : 83-116. 1912.
12. **Reed, H. S. e E. Hirano.** The density of stomata in *Citrus* leaves. *Jour. Agr. Res.* **43** (3) : 209-222. 1931.
13. **Swingle, W. T.** The Botany of *Citrus* and its wild relatives. In Webber, H. J. et al. *The Citrus Industry*. Univ. of California Press, Berkeley. 1943.
14. **Turrell, F. M. e L. J. Klotz.** Density of stomata and oil glands and incidence of water spot in the rind of Washington Navel Orange. *Bot. Gaz.* **101** (4) : 862-871. 1940.
15. **Webber, H. J.** Limes (Trabalho mimeografado). *Citrus Exp. Sta. Riverside, Califórnia*, 1940.
16. **Webber, H. J.** *The Citrus Industry*. Vol. I. Chapter III. Univ. of California.¹ Press 1943.

Nota : Infelizmente não foi possível aos autores obter uma cópia do trabalho de **Lapin, V. K. and V. G. Telouch :** Size and number of stomata in diploid and polyploid forms in *Citrus*, *Poncirus* and *Fortunella*. *Compt. Rend. (Dok.) Acad. Sci. U.S.S.R.* **27** (4) : 365-368. III. 1940 — *Biol. Abstr.* **15** (6) : 11781. 1941.