UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

VANESSA VOIGT

**Caracterização fenotípica e avaliação da expressão de genes envolvidos na
indução e no florescimento da laranjeira ‘x11’**

Piracicaba

2013

VANESSA VOIGT

**Caracterização fenotípica e avaliação da expressão de genes envolvidos na
indução e no florescimento da laranjeira ‘x11’**

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

**Dissertação apresentada ao Centro de Energia
Nuclear na Agricultura da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências**

**Área de concentração: Biologia na Agricultura e
no Ambiente**

Orientador: Dr. Rodrigo Rocha Latado

Piracicaba

2013

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Voigt, Vanessa

Caracterização fenotípica e avaliação da expressão de genes envolvidos na indução e no florescimento da laranjeira 'x11' / Vanessa Voigt; orientador Rodrigo Rocha Latado - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013. 109 f.: il

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Ambiente protegido (Plantas) 2. Desenvolvimento vegetal 3. Expressão gênica 4. Fisiologia vegetal 5. Floração 6. Genética molecular 7. Laranja 8. Melhoramento genético vegetal I. Título

CDU 634.31 : 581.145.1

Aos meus queridos pais,

Ademar (*in memorian*) e Elenira,

Pela imensa dedicação e por
nunca medirem esforços para a
minha formação.

DEDICO

Ao meu querido esposo, Luiz Fabiano,
pelo amor, apoio e companheirismo.

E a minha pequena, Laura o maior
presente que Deus me deu.

OFEREÇO

“O período de maior ganho de conhecimento e experiência é o período de maior dificuldade na vida de cada um”

Dalai Lama

AGRADECIMENTOS

- A Deus e aos amigos do plano espiritual pelo auxílio e por sempre me guiarem pelo caminho do bem.
- Ao Dr. Rodrigo Rocha Latado, pela orientação e confiança durante a minha formação acadêmica.
- Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) e ao Centro Apta Citros Sylvio Moreira (IAC) pela grande oportunidade de aprendizado.
- A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudo.
- À Profa Adriana Pinheiro Martinelli e ao Prof. Antonio Vargas de Oliveira Figueira por toda a infraestrutura disponibilizada para a realização dos trabalhos. Ajuda fundamental!
- Ao Prof. Idemauro Antonio Rodrigues de Lara do Departamento de Ciências Exatas da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), pelas análises estatísticas.
- Aos secretários da Pós-Graduação do Cena, em especial Fábio Oliveira e Daiane Vieira, e a bibliotecária Marília Garcia Henyei pela eficiência, compreensão e pelo auxílio.
- À Thaísa Tessutti Pinheiro pela paciência, ensinamentos e pelo imenso auxílio em vários momentos. Sou muito grata a você por tudo!
- À Mônica Lanzoni Rossi pela ajuda na realização dos trabalhos de microscopia de luz.
- Em especial aos meus amigos: Camila, Karina, Eveline, Fabrícia, Salete, Lucas, João Paulo e Jean Carlos pelos momentos de descontração, pela amizade e pelas idéias e atos que contribuíram para o meu desenvolvimento pessoal. Sucesso a vocês!
- Aos meus queridos amigos, Larissa e Leonardo, pela recepção e amizade e pelos muitos momentos de alegria passados na minha nova casa em Bebedouro. Vocês são especiais!
- Ao meu querido pai, mesmo distante se faz sempre presente pelos valores e princípios deixados a mim e por ser um exemplo de homem de bem. À minha querida mãe pela força, compreensão e dedicação, pelos conselhos e colos, pelo incentivo e amor imensurável e apoio incondicional as minhas decisões. Minha eterna gratidão a vocês por tudo que proporcionaram a mim e aos meus irmãos!
- Aos meus irmãos Everton, Ademilson e Evandro pela confiança e incentivo. As minhas cunhadas pela força. As minhas sobrinhas pelo convívio, amor sincero e pelos valiosos momentos de felicidade.
- À minha tia Emília pela presença e apoio e aos meus tios de coração, Áurea e Eugênio, por me acolher com tanto carinho e amor e pela constante torcida.
- Ao meu amado esposo, Luiz Fabiano pelas sábias palavras de incentivo e conforto para eu cumprir esta etapa em minha vida. E principalmente por compartilhar a sua vida comigo, pelo amor sempre demonstrado em cada gesto e por me fazer tão feliz sempre! À minha filhinha Laura por ter me escolhido para esta importante missão...aguardamos ansiosos a sua chegada!

RESUMO

VOIGT, V. **Caracterização fenotípica e avaliação da expressão de genes envolvidos na indução e no florescimento da laranjeira ‘x11’**. 2013. 109 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

A laranjeira ‘x11’ é um mutante espontâneo de laranja doce, com *seedlings* florescendo a partir do primeiro ou segundo ano de cultivo e plantas adultas podendo florescer em várias épocas num mesmo ano. Estas características tornam este mutante um excelente material para estudos de genômica funcional relacionado ao florescimento e a frutificação. Os objetivos deste trabalho foram caracterizar o florescimento da laranjeira ‘x11’ em quatro épocas do ano e acompanhar o desenvolvimento do meristema apical em gemas axilares de plantas adultas, em relação às plantas de ‘Valência’. Também foi avaliado o perfil de expressão dos genes envolvidos na indução e no florescimento em plantas adultas e juvenis das duas laranjeiras. Plantas adultas de ‘x11’ enxertadas em ‘Cravo’ e ‘Swingle’ foram podadas no outono, inverno, primavera e verão e, em seguida, realizou-se a caracterização do florescimento em ramos novos e a determinação da viabilidade e germinação *in vitro* de grãos de pólen. O acompanhamento morfo-anatômico do meristema apical foi realizado em quatro estádios das brotações axilares das duas laranjeiras após a poda de outono. A expressão dos genes integradores das vias de indução (*FT*, *SOC1* e *LFY*), genes repressores (*FLC*, *SVP* e *TFL1*) e os genes de identidade do meristema floral (*API*, *BAM* e *WUS*) foram analisados por RT-PCR em três estádios de desenvolvimento das brotações de plantas adultas e juvenis. A caracterização fenotípica do florescimento em ‘x11’ demonstrou que as podas de primavera e de outono induziram a formação de ramos com flores terminais, sendo que no outono ocorreu a formação de ramos vegetativos. A poda de inverno resultou em ramos multiflorais e a poda de verão flores abortadas. O número de dias até a formação de botões florais variou entre 5 e 20 dias após a poda, com ramos medindo entre 18 a 24 cm e número médio de folhas variando entre 9 e 12. A viabilidade e germinação *in vitro* de grãos de pólen foram maiores após a poda de inverno. Pelas análises morfo-anatômicas foi possível observar a diferenciação de botão floral em laranjeira ‘x11’ quando as brotações apresentavam 13 mm de comprimento. A análise de transcritos das plantas adultas de ‘x11’ no estágio 1 indicou maiores níveis de expressão nos genes *FT* e *TFL1* enquanto os genes *BAM* e *LFY* foram reprimidos em relação às plantas de ‘Valência’. No estágio 2, os genes *FT*, *LFY* e *BAM* apresentaram um maior número de transcritos, porém o gene *TFL1* teve um baixo número de transcritos quando comparado com plantas de ‘Valência’. No estágio 3, uma elevada expressão relativa foi observada no gene *LFY* nas plantas adultas de ‘x11’ em relação à ‘Valência’. As plantas juvenis de ‘x11’ nos três estádios não apresentaram grandes alterações de expressão dos nove genes em relação às plantas juvenis de ‘Valência’. A exceção foi para o gene *BAM*, que apresentou maiores expressões nos estádios 1 e 3, mas no estágio 2, sofreu repressão em relação a “Valência”.

Palavras-chave: *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. Florescimento precoce. Indução. Diferenciação floral. Genes do florescimento.

Palavras-chave: *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. Florescimento precoce. Indução. Diferenciação floral. Genes do florescimento.

ABSTRACT

VOIGT, V. **Phenotypic characterization and evaluation of the expression of genes involved in the induction and flowering of 'x11' sweet orange.** 2013. 109 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

The 'x11' plant is a spontaneous mutant of sweet orange, with *seedlings* flowering from the first or second year of the growing and adult plants can flower several times a year. These features make this mutant into an excellent material for functional genomics studies related to flowering and fruiting. The present work aimed to characterize the flowering of 'x11' sweet orange in four seasons and to follow the development of the apical meristem in axillary buds of adult plants, compared to 'Valencia' sweet orange. In addition, the expression profile of genes involved in the induction and flowering was evaluated in adult and juvenile plants of the both sweet oranges. Adult plants of 'x11' grafted on 'Rangpur' and 'Swingle' were pruned in fall, winter, spring and summer, and then, the characterization of the flowering in new branches and the viability and *in vitro* germination of pollen grains were evaluated. The following morpho-anatomical apical meristem was carried out in four stages of the axillary sprouts in both sweet oranges after fall pruning. Gene expression of floral pathway integrators (*FT*, *SOC1*, and *LFY*), repressor genes (*FLC*, *TFL1* and *SVP*) and the genes of floral meristem identity (*API*, *BAM* and *WUS*) were analyzed by RT-PCR in three stages development of sprouting from juvenile and adult plants. Phenotypic characterization of flowering in 'x11' showed that the spring and fall pruning induced the formation of terminal branches with flowers, and the fall pruning also presented vegetative branches. The winter pruning resulted in multifloral branches and the summer pruning produced aborted flowers. The number of days up to the arising of flower buds ranged between 5 and 20 days after pruning, with branches measuring between 18 and 24 cm and number of leaves between 9 and 12. The viability and *in vitro* germination of pollen grains were higher after winter pruning. It was observed the differentiation of floral bud in 'x11' sweet orange by the morpho-anatomical analysis when the sprouting was 13 mm in length. The analysis of transcripts of the 'x11' adult plants in stage 1 showed higher levels of expression in *FT* and *TFL1* genes while the *BAM* and *LFY* genes were repressed in relation to 'Valencia' plants. In stage 2, *FT*, *LFY* and *BAM* genes had a larger number of transcripts, but the *TFL1* gene had a low number of transcripts compared with 'Valencia' plants. In stage 3, high expression was observed in *LFY* gene in 'x11' adult plants relation to the 'Valencia'. Juvenile plants of 'x11' in the three stages showed no significant changes of expression of nine genes in relation to juvenile plants of 'Valencia'. The exception was the *BAM* gene, which showed higher expression in stages 1 and 3, but in stage 2, had a repression when compared to 'Valencia'.

Key words: *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. Early flowering. Induction. Differentiation. Floral. Flowering genes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Plantas juvenis das laranjeiras ‘x11’ (à esquerda) e ‘Valência’ (à direita – controle)	20
Figura 2.	Vias que regulam a transição floral em <i>Arabidopsis</i> (BOSS et al., 2004).....	27
Figura 3.	Ramos com ápices caulinares podados e gemas nas axilas das folhas 20 dias após a poda, as quais posteriormente se desenvolveram nos ramos laterais.....	34
Figura 4.	Flor em estágio de antese (abertura recente das pétalas).	38
Figura 5.	Determinação do comprimento da brotação da gema axilar realizada por meio da medição da distância do ponto (A), intersecção da base da brotação com o ramo e o ponto (B), intersecção do maior primórdio foliar visível	41
Figura 6.	Amostras das brotações adultas (A-C) e juvenis (D-F) em três estádios de desenvolvimento, provenientes de gemas axilares da laranjeira ‘x11’ ..	44
Figura 7.	Valores mensais das temperaturas médias máxima (T.max), média (T.med) e mínima (T.min) verificadas durante o ano de 2011 e 2012	52
Figura 8.	Detalhe da estrutura reprodutiva mista unifloral (A-C) e multifloral (D-I)	57
Figura 9.	Detalhe da estrutura reprodutiva mista unifloral abortada (A-D) e vegetativa	59
Figura 10.	Porcentagem dos ramos novos com estruturas reprodutivas (uniflorais, multiflorais e abortadas) e estruturas vegetativas (sem flor) a partir das brotações das gemas laterais de laranjeira ‘x11’ enxertadas em limoeiro ‘Cravo’ e citrumeleiro ‘Swingle’, quando submetidas a quatro épocas de poda (primavera, verão, outono e inverno)	61
Figura 11.	Número de dias necessários para a ocorrência de 100% do florescimento em ramos novos de plantas de ‘x11’ enxertadas sobre limoeiro ‘Cravo’ e Citrumeleiro ‘Swingle’, quando submetidas a quatro épocas de poda	64
Figura 12.	Determinação dos valores médios dos comprimentos dos ramos e do número de folhas por ramo, de plantas de ‘x11’ sobre limoeiro ‘Cravo’ e Citrumeleiro ‘Swingle’, quando submetidas a quatro épocas de poda.....	66
Figura 13.	Determinação da porcentagem de grãos de pólen viável utilizando o carmim acético (2%) como corante (esquerda) e a porcentagem de grãos de pólen germinado in vitro (direita) da laranjeira ‘x11’ sobre dois porta-enxertos, em três épocas de poda ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.	
Figura 14.	(A) Flor da laranjeira ‘x11’ com antera de coloração normal; (B) Determinação da viabilidade de grãos de pólen pelo método do carmim acético (2%). I-grão de pólen inviável; V-grão de pólen viável.....	69
Figura 15.	Análise morfológica do desenvolvimento das brotações, provenientes de gemas axilares da laranjeira ‘x11’ adulta.....	71

Figura 16.	Análise anatômica do desenvolvimento do meristema apical das brotações, provenientes de gemas axilares da laranjeira ‘x11’ adulta	72
Figura 17.	Temperaturas máxima, média e mínima semanal verificada entre abril e junho de 2012, pelo monitoramento realizado pelo equipamento HOBO na casa de vegetação	74
Figura 18.	Análise morfológica do desenvolvimento das brotações, provenientes de gemas axilares da laranjeira ‘Valência’	76
Figura 19.	Análise anatômica do desenvolvimento do meristema apical das brotações, provenientes de gemas axilares da ‘Valência’	77
Figura 20.	Temperatura máxima, média e mínima semanal verificada entre junho e agosto de 2012 de acordo com o monitoramento realizado pelo equipamento HOBO na casa de vegetação.....	80
Figura 21.	RNA total das brotações das laranjeiras ‘Valência’ (controle ‘C’) e ‘x11’, obtido pelo Kit de extração (1º repetição biológica)	81
Figura 22.	Amplificação das amostras das brotações das laranjeiras ‘Valência’ (‘C’) e ‘x11’ com o iniciador de referência <i>Rpl45</i> (1º repetição biológica)	82
Figura 23.	Expressão relativa dos genes integradores do florescimento em plantas adultas (coluna esquerda) e juvenis (coluna direita) da laranjeira ‘x11’ em relação ao controle ‘Valência’	88
Figura 24.	Expressão relativa dos genes repressores do florescimento em plantas adultas de (coluna esquerda) e juvenis (coluna direita) da laranjeira ‘x11’ em relação ao controle ‘Valência’	92
Figura 25.	Expressão relativa dos genes de identidade do meristema em plantas adultas (coluna esquerda) e juvenis (coluna direita) da laranjeira ‘x11’ em relação ao controle ‘Valência’	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Protocolo para infiltração em historesina (RODRIGUEZ; WETZSTEIN, 1998)	42
Tabela 2.	Gene selecionados envolvidos no florescimento em citros, número de acesso do GeneBank, referência e nomenclatura utilizada.	46
Tabela 3.	Resumo do número de horas de frio abaixo de 13 °C (NHF) e variação das temperaturas médias mínima (mín), média (méd) e máxima (máx), durante o período de pré-florescimento e diferenciação floral de laranjeira 'x11', além da duração dos períodos nas diferentes épocas de poda.	54
Tabela 4.	Avaliação do número total de brotações (NB), vegetativas (BV), reprodutivas (BR), mistas uniflorais (MU), mistas multiflorais (MM) e mista uniflora abortada (MA) emitidas durante o florescimento das laranjeiras adultas de 'x11' e da 'Valência' (controle)	81
Tabela 5.	Descrição dos iniciadores específicos (alvos) de citros desenhados para a análise transcricional dos genes; com suas respectivas siglas, seqüências dos iniciadores e tamanho do <i>amplicon</i> (pb).	83
Tabela 6.	Valores de eficiência e R ² dos genes envolvidos na indução e no florescimento de citros, obtidos através de curva de eficiência por RT-qPCR.....	84

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Características fisiológicas envolvidas no florescimento em citros	21
2.2 Porta-enxerto utilizados na citricultura	24
2.3. Genes envolvidos na regulação do florescimento	25
2.4 Genes envolvidos no florescimento de citros	29
3. OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.2 Objetivos Específicos	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Caracterização fenotípica do florescimento de plantas de laranjeiras adultas ‘x11’	33
4.1.1 Material vegetal e condições experimentais	33
4.1.2 Classificação e porcentagem dos ramos novos em diferentes épocas de poda	35
4.1.3 Caracterização fenotípica dos ramos novos com estruturas reprodutivas mistas uniflorais em diferentes épocas de poda	36
4.1.4 Determinação da viabilidade e germinação <i>in vitro</i> de grãos de pólen	37
4.2 Caracterização morfo-anatômica do desenvolvimento das brotações de laranjeiras ‘x11’ e ‘Valência’	40
4.3 Caracterização molecular dos genes envolvidos na indução e no florescimento de plantas adultas e juvenis de laranjeiras ‘x11’ e ‘Valência’	43
4.3.1 Material vegetal e condições experimentais	43
4.3.2 Busca das seqüências e desenho dos iniciadores específicos dos genes associados ao florescimento em citros	45
4.3.3 Extração de RNA total	46
4.3.3.1 Quantificação e análise da integridade do RNA total	47
4.3.3.2 Tratamento com DNase	47
4.3.3.3 Síntese de cDNA	48
4.3.3.4 Confirmação da eficiência da síntese de cDNA	48
4.3.3.5 Análise da identidade dos iniciadores com cDNA e genômico	49
4.3.4 Análise da expressão gênica por RT-PCR quantitativo	49
5. RESULTADOS	51

5.1 Caracterização fenotípica do florescimento de plantas de laranjeiras adultas ‘x11’	51
5.1.1 Avaliação da temperatura durante o período de pré-florescimento.....	51
5.1.2 Caracterização morfológica dos ramos novos da laranjeira ‘x11’	55
5.1.3 Classificação e porcentagem dos ramos novos de laranjeira ‘x11’ em diferentes épocas de poda.....	59
5.1.4 Caracterização fenotípica dos ramos novos com estruturas reprodutivas mistas uniflorais de laranjeira ‘x11’ em diferentes épocas de poda	63
5.1.4.1 Número de dias necessários até a plena floração.....	63
5.1.4.2 Comprimento dos ramos novos e número de folhas/ramo	65
5.1.4.3 Determinação da viabilidade e germinação <i>in vitro</i> de grãos de pólen.....	67
5.2 Caracterização morfo-anatômica do desenvolvimento das brotações de laranjeiras ‘x11’ e ‘Valência’	69
5.2.1 Caracterização morfo-anatômica do desenvolvimento das brotações da laranjeira ‘x11’	70
5.2.2 Caracterização morfo-anatômica do desenvolvimento das brotações da laranjeira ‘Valência’	75
5.3 Caracterização molecular dos genes envolvidos na indução e no florescimento de plantas adultas e juvenis de laranjeira ‘x11’ em relação a ‘Valência’	79
5.3.1 Seleção do material vegetal e condições ambientais	79
5.3.2 Extração, quantificação e análise de RNA	81
5.3.3 Construção e determinação da eficiência dos iniciadores	82
5.3.4 Análise e quantificação dos transcritos dos genes envolvidos na indução e no florescimento de plantas adultas e juvenis de laranjeiras ‘x11’ e ‘Valência’	84
5.3.4.1 Expressão dos genes integradores <i>FLOWERING LOCUS T (FT)</i> , <i>SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 (SOC1)</i> e <i>LEAFY (LFY)</i>	84
5.3.4.2 Expressão dos genes repressores <i>FLOWERING LOCUS C (FLC)</i> , <i>SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)</i> e <i>SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)</i>	89
5.3.4.3 Expressão dos genes de identidade do meristema floral <i>APETALA1 (API)</i> , <i>WUSCHEL (WUS)</i> e <i>BARELY ANY MERISTEM (BAM)</i>	93
6. CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS	96
ANEXOS	107

1. INTRODUÇÃO

A grande adaptabilidade dos citros às condições climáticas diversas permite sua exploração em praticamente todo o território nacional. Isso confere ao Brasil o primeiro lugar na produção mundial de citros, com uma área total superior a 840 mil hectares, produção de 19,0 milhões de toneladas e rentabilidade de US\$ 11,3 milhões, o que representa um forte impacto na economia do país (IBGE, 2011).

O Estado de São Paulo se destaca como o maior produtor brasileiro de laranjas, com 80,4% da produção total deste fruto no país. De acordo com estimativas da safra de 2010, o Estado de São Paulo colheu 353 milhões de caixas de 40,8 kg, o que resulta em remuneração média para o produtor 40% acima da do ano anterior (AGRIANUAL, 2011).

Os citros têm como centro de origem as zonas tropicais úmidas do Sudeste da Ásia, sendo a laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) a mais cultivada no Brasil, para consumo *in natura* ou processada, na forma de suco, produção de óleo e ácido cítrico, além do bagaço utilizado como fonte de energia na indústria ou para a produção de polpa peletizada, para consumo animal.

A produção de frutos é o resultado final de uma complexa cadeia de eventos que ocorrem durante o desenvolvimento da planta, sendo a floração a etapa mais crítica na determinação da produtividade, que por sua vez, é condicionada pelo estado fisiológico da planta e pelas variações ambientais (GOLDSCHMIDT; KOCH, 1996).

A maioria das espécies do gênero *Citrus* apresenta características complexas quanto a sua constituição genética, embriologia, fisiologia de desenvolvimento e biologia reprodutiva. Estas características estão relacionadas ao fato dos citros serem plantas perenes e de ciclo vegetativo longo (período juvenil ou juvenilidade), o que torna o melhoramento genético para essa espécie um processo longo e trabalhoso. Isto promove, além da incapacidade de florescimento e frutificação, uma morfologia angular do caule, altas taxas de crescimento, abundância de espinhos que variam em tamanho e crescimento foliar abundante e vigoroso (GROSSER; GMITTER JUNIOR, 1990). Por isso, as plantas jovens de citros quase sempre precisam de mais uma década para envelhecer e alcançar produções satisfatórias, sendo só então, aptas às avaliações das suas características agrônômicas e de produtividade (SOOST; CAMERON, 1975).

Essas e outras características biológicas das laranjas podem ser solucionadas com a realização de programas de melhoramento de citros por cruzamentos controlados, bastando

para isto, à utilização de parentais que apresentem ciclo juvenil curto. Os quais podem possibilitar a redução de cada ciclo de recombinação/seleção, o que resultará em economia de tempo e de custo para a manutenção de plantas em estufas ou no campo. Além disto, as plantas de citros com ciclo juvenil curto têm excelente potencial para serem utilizados em estudos de genômica funcional, principalmente de genes relacionados ao florescimento e a frutificação (TAN et al., 2009).

No BAG-Citros do Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC encontra-se um acesso de laranjeira chamada de ‘x11’ (Figura 1), um mutante espontâneo de laranja doce que tem como característica principal o fato de apresentar período juvenil curto, apresentando *seedlings* (plantas obtidas pela germinação de sementes) ou plantas obtidas por meio de enxertia de borbulhas adultas com florescimento a partir de um ou dois anos de cultivo. Além disto, este mutante apresenta outras características de interesse, tais como: a) capacidade de florescer várias vezes no mesmo ano, bastando para isto realizar podas; b) formação de uma flor na porção terminal de ramos em desenvolvimento; c) plantas com porte mais baixo e ramos curtos e d) frutos com seis sementes em média, geralmente poliembriônicas e com média de três embriões/semente.

Figura 1 - Plantas juvenis das laranjeiras ‘x11’ (à esquerda) e ‘Valência’ (à direita - controle). As plantas apresentam-se com um ano de idade e foram obtidas através de sementes.

Este conjunto de características possibilita prever que este mutante, por se tratar de uma laranja doce e apresentar florescimento precoce, pode se constituir num excelente material para estudos de genômica funcional das características relacionadas com o florescimento e a frutificação.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Características fisiológicas envolvidas no florescimento em citros

O ponto de partida do ano agrícola em citros é a floração, a qual direciona os produtores para a realização de diversos procedimentos no manejo do pomar, principalmente os relacionados à nutrição, tendo a flor como referência.

O florescimento de citros envolve os períodos de indução, diferenciação e antese (NORDELO; TORRE, 1991). O início e a extensão do florescimento, os tipos de flores produzidas, sua distribuição na planta, a porcentagem de frutos fixados e a produtividade são resultantes de interações complexas entre os níveis hormonais e de carboidratos acumulados na planta, os quais são afetados pelas condições ambientais, principalmente temperatura e disponibilidade de água. Além destes fatores, a idade e estágio de desenvolvimento das plantas devem ser considerados, uma vez que as fases juvenil e adulta em citros são bastante distinguíveis, sendo que a passagem para a fase adulta pode demorar vários anos (TALON; GMITTER, 2008).

A indução floral está associada à fase de pré-florescimento ou repouso, na qual ocorre uma redução do crescimento vegetativo, favorecendo o acúmulo de reservas, que serão direcionadas ao desenvolvimento de estruturas reprodutivas durante o florescimento. Em regiões subtropicais as plantas de citros precisam de baixas temperaturas para induzir um período de repouso ou pré-florescimento, enquanto em condições tropicais o repouso vegetativo ocorre devido ao estresse hídrico (SPIEGEL-ROY; GOLDSCHMIDT, 1996).

Este repouso irá promover a transição da fase vegetativa para a formação de inflorescências, após a interação de fatores externos e internos das gemas (SOUTHWICK; DAVENPORT, 1986; DAVIES; ALBRIGO, 1994). A transição da etapa vegetativa para a reprodutiva pode ocorrer de duas maneiras: i) as gemas permanecem indeterminadas (reprodutivas/vegetativas) até imediatamente antes da brotação ou ii) entram em repouso no final do outono já determinadas (reprodutivas/vegetativas). A primeira possibilidade baseia-se no fato de que não se observam os primórdios florais nas gemas quando elas se encontram em repouso (GOLDSCHMIDT; MONSELISE, 1970; DAVENPORT, 1990).

O crescimento dos ramos ocorre em fluxos dependendo da temperatura e disponibilidade hídrica. Nas condições subtropicais existem três principais fluxos de brotação, nas épocas da primavera, outono e verão. Segundo Guardiola (1997) o fluxo de primavera é o

mais importante em termos de florescimento e produção de frutos devido à presença de ramos reprodutivos e vegetativos. Já os fluxos de verão e outono são formados geralmente ramos vegetativos, os quais são responsáveis pelo crescimento vegetativo da planta.

Portanto, no fluxo de primavera o surgimento dos botões florais é consequência da indução ocorrida durante o inverno, quando são registradas baixas temperaturas (entre 13 a 15 °C dia e 10 a 13 °C à noite) associadas a um período de seca, os quais irão favorecer uma série de modificações nas gemas, tornando as induzidas a formarem flores (MOSS, 1969; DAVENPORT, 1990; SPIEGEL-ROY; GOLDSCHMIDT, 1996). Embora a temperatura máxima limite para induzir a floração ainda não esteja bem definida, Davenport (1990) acredita que a mesma seja em torno de 19 °C e que temperaturas superiores a 22 °C sejam ineficientes. Considerando como fator de indução de florescimento a baixa temperatura, dada pelo número de horas de frio (NHF) abaixo de 13 °C, Ribeiro, Machado e Brunini (2006) estabeleceram limites para os valores de NHF favoráveis a indução do florescimento para as principais regiões produtoras do Estado de São Paulo, assim ocorre indução fraca por baixa temperatura quando o número de horas de frio varia de 30-100 h, moderada entre 101-299 h e forte quando os valores são superiores a 300 h.

As temperaturas baixas exercem uma função dupla, a de quebrar a dormência das gemas floríferas, uma vez que as mesmas possuem dormência mais profunda que as gemas vegetativas, e a de induzir outras gemas ao florescimento (GARCÍA-LUIS et al., 1992).

O período de diferenciação floral se constitui de mudanças bioquímicas e morfológicas, através da divisão e diferenciação celular, alongamento e desenvolvimento dos primórdios florais (DAVENPORT, 1990). O início deste período é dependente da temperatura ocorrida durante o inverno, sendo sua duração também influenciada pela temperatura, havendo uma relação direta entre a intensidade do frio e o tempo para ocorrer à antese. Para condições subtropicais, baixas temperaturas durante o período de inverno resultam em um florescimento tardio, com a formação de mais inflorescências sem a presença de folhas, enquanto temperaturas mais altas tendem a diminuir o período de iniciação floral e antese (SPIEGEL-ROY; GOLDSCHMIDT, 1996).

Em citros, a diferenciação floral inicia-se nos primeiros estádios de desenvolvimento das brotações das gemas na primavera, assim os meristemas vegetativos e reprodutivos só serão diferenciados após o início das brotações (DAVENPORT, 1990). Nesta fase, o meristema apical passa de um formato cônico ou de domo, próprio de um meristema vegetativo, para um formato achatado, característico de um meristema reprodutivo (SCHNEIDER, 1968). Porém, os ramos podem ser diferenciados pelas características

morfológicas, sendo os vegetativos formados por folhas e entrenós maiores e mais numerosos que os ramos reprodutivos, além da presença de espinhos (SCHNEIDER, 1968), enquanto que os reprodutivos são mais curtos, com folhas menores e apresentam diferentes tipos de inflorescências (MOSS, 1969). Em lima ácida ‘Tahiti’ (*Citrus latifolia* Tan.) as evidências indicam que a indução sobrevém imediatamente antes da diferenciação floral, pois somente as gemas que iniciaram o desenvolvimento durante as condições indutivas de déficit hídrico ou de baixas temperaturas produziram flores (SOUTHWICK; DAVENPORT, 1986).

A antese (abertura das flores) ocorre após os processos de indução e diferenciação terem sido completados, com o restabelecimento das condições moderadas de temperatura e umidade de solo favoráveis existentes na primavera. As flores de citros são arrançadas de forma simples ou em grupos, chamadas de inflorescências cimosas, sendo a gema apical a primeira a abrir, seguida pelas gemas basais do ramo, provavelmente em razão da dominância apical (DAVENPORT, 1990). O tamanho das flores geralmente decresce na época de abertura, sendo a apical a maior e a subapical, a menor (LORD; ECKARD, 1985), sendo esta a que apresenta a mais alta porcentagem de fixação de frutos no ramo (DAVIES; ALBRIGO, 1994).

O número total de flores nos citros pode atingir de 100 a 200 mil (DAVIES; ALBRIGO, 1994), mas somente 0,1 a 3% destas irão resultar em frutos maduros, evidenciando-se a proporção inversa entre o número de flores e a fixação de frutos (ERICKSON, 1968). Portanto, a floração é a fase crítica na determinação da produtividade, sendo por sua vez, condicionada pelo estado fisiológico da planta, assim como pelas condições ambientais (RIBEIRO; MACHADO; BRUNINI, 2006).

Há evidências que a intensidade de floração é dependente do conteúdo de carboidratos, tanto da parte aérea (folhas e ramos) como das raízes, porém ainda não está claro se os carboidratos desempenham papel regulador específico na floração ou se são apenas necessários para suprir a demanda energética mínima desses compostos para que ocorra a floração (SPIEGEL-ROY; GOLDSCHMIDT, 1996).

O desenvolvimento das flores de citros dura aproximadamente de três a cinco semanas (GOLDSCHMIDT; HUBERMAN, 1974), e o custo energético total de uma única flor de citros é alto e, por isto, a demanda total diária necessária durante o florescimento pode exceder a produção de fotoassimilados. Como consequência, ocorre abscisão de grande parte das flores e frutos (BUSTAN; GOLDSCHMIDT, 1998), cuja ocorrência dá-se em camadas específicas de células, as quais se tornam morfológica e bioquimicamente diferenciadas durante o desenvolvimento do órgão (TAIZ; ZEIGER, 2006). Altas temperaturas podem

contribuir para o aumento desta abscisão, uma vez que aceleram o desenvolvimento das flores e encurtam a duração do florescimento. Para esta situação, será requerida da planta uma grande quantidade de fotoassimilados em um curto período de tempo, para um grande número de flores (SPIEGEL-ROY; GOLDSCHMIDT, 1996).

2.2 Porta-enxertos utilizados na citricultura

A produtividade dos citros depende também da capacidade das plantas se aclimatarem às variações ambientais e aos estresses por meio de mecanismos que conferem tolerância. A capacidade das plantas frente às condições ambientais adversas, como estresses de origem abiótica e biótica, é influenciada pelos porta-enxertos (POMPEU JUNIOR, 2005).

Os citros são cultivados preferencialmente sobre porta-enxertos, que podem modificar o vigor e a produtividade das plantas (POMPEU JUNIOR, 1991), induzir variações no crescimento da copa (CASTLE et al., 1989), na precocidade, qualidade e produção dos frutos (ALBRIGO, 1977), na absorção de nutrientes minerais (CHAPLIN; WESTWOOD; ROBERTS, 1972) e também conferir tolerância à salinidade, à seca, ao frio, às doenças e pragas (MEDINA; MACHADO, 1998).

O porta-enxerto limoeiro ‘Cravo’ (*C. limonia* Osbeck) é o mais utilizado no Brasil representando cerca de 85% do total de plantas no país (POMPEU JUNIOR, 2005), devido às suas características tais como: rápido crescimento, precocidade e alta produção, bom desempenho em solos arenosos e argilosos, compatibilidade com a maioria das variedades de copa e principalmente maior tolerância à seca. Esta última característica está relacionada com a profundidade efetiva de seu sistema radicular e condutividade hidráulica das raízes (GIRARDI et al., 2010).

O citrumeleiro ‘Swingle’ (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) é o segundo porta-enxerto mais utilizado, com grande destaque devido à produção de frutos de melhor qualidade, tolerância ao frio e resistência à gomose e a nematóides (SCHÄFER; BASTIANEL; DORNELLS, 2001). O citrumeleiro ‘Swingle’ confere maior tolerância ao frio, com a copa apresentando maior atividade fotossintética quando a planta é submetida a baixas temperaturas noturnas (MACHADO et al., 2010), porém é menos resistente a seca e sensível a alcalinidade (GIRARDI; MORÃO FILHO; ALVES, 2010). Apesar disso, plantas enxertadas em citrumelo ‘Swingle’ parecem responder bem após o período moderado de seca, emitindo fortes floradas com bom pegamento dos frutos (POMPEU JUNIOR, 2005).

Quanto ao vigor, as plantas de laranjas doces enxertadas sobre limoeiro ‘Cravo’ aos cinco anos de idade apresentaram volume de copa duas vezes maior que as enxertadas sobre ‘Swingle’ (QUAGGIO et al., 2004). Este menor crescimento de plantas sobre ‘Swingle’ também foi relatado por Pompeu Junior (2005), que ressaltaram ser esta uma característica genética herdada do *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. o qual é um dos seus genitores e é também regulada pela ocorrência de déficit hídrico.

2.3. Genes envolvidos na regulação do florescimento

O florescimento é considerado como um dos eventos cruciais no desenvolvimento das plantas, pois garante o sucesso reprodutivo e a perpetuação da espécie. A identificação e caracterização de muitos genes associados ao processo de floração têm sido intensamente investigadas em plantas herbáceas, particularmente em mutantes de *Arabidopsis thaliana* (YANOFSKY et al. 1990; PENÃ et al., 2001; PARCY; BOMBLIES; WEIGEL, 2002). Estudos genéticos e fisiológicos em espécies-modelo relatam à existência de mais de 80 genes envolvidos nas múltiplas rotas que controlam o florescimento (SIMPSON; DEAN, 2002), o que vem possibilitando consideráveis descobertas de suas ações sobre o desenvolvimento meristemático e a formação dos órgãos florais.

Com isto, a indução floral passou a ser compreendida como um processo regulado por uma rede complexa de genes que atuam de forma integrada em resposta aos estímulos internos e externos. Os fatores externos que influenciam esse processo estão definidos em três vias: o fotoperíodo, vernalização e temperatura (AMASINO, RICHARD, 2010). Estes fatores externos atuam de forma integrada com os fatores internos (ou endógenos): a via autônoma, a qual independe de sinais ambientais, a via de resposta à concentração endógena de giberelina, além da idade e fase de desenvolvimento da planta (WELLMER; RIECHMANN, 2010).

Além das respostas aos sinais externos, as plantas também são sensíveis às condições adversas, tais como deficiência de água e de nutrientes, por isto, diferentes estratégias podem ser empregadas pelas plantas para sobreviverem a essas adversidades. Em plantas perenes, uma destas estratégias é o florescimento precoce (PUTTERILL; LAURIE; MACKNIGHT, 2004). A maioria dos recentes progressos no estudo da indução do florescimento foi realizada em espécies anuais, particularmente *Arabidopsis*, enquanto que em espécies perenes têm sido

menos estudadas devido à ocorrência de florescimento em múltiplos anos (TAN; SWAIN, 2006).

Os diversos estímulos ambientais são percebidos na planta por um conjunto de proteínas, principalmente fotorreceptores e fatores de transcrição. Apesar de muitos estudos fisiológicos, genéticos e bioquímicos estarem sendo desenvolvidos, ainda permanece difícil definir um mecanismo universal para a transição floral. O modelo mais aceito sugere, na planta de *Arabidopsis*, uma regulação dos estímulos ambientais e endógenos que atuam isoladamente ou em sobreposição, para promover a indução de florescimentos (Figura 2) (BOSS et al., 2004).

Todas as vias individuais de indução convergem para um ponto de integração que controla o tempo da floração (Figura 2). Existem pelo menos três genes conhecidos como integradores da floração: *FLOWERING LOCUS T (FT)*, *LEAFY (LFY)* e *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)*. Estes genes integradores da floração podem ativar outra classe de genes, conhecidos como genes de identidade do meristema floral, tais como o *APETALA1 (API)*, *FRUITFUL (FUL)*, *CAULIFLOWER (CAL)*, *LFY* e *SEPALLATA4 (SEP4)*. Cujas atividades promovem a transição dos meristemas vegetativos em meristemas reprodutivos, pela regulação da expressão de uma terceira classe de genes que são os genes de identidade de órgãos florais. Estes genes controlam diretamente a identidade floral, os quais promovem o desenvolvimento sequencial dos primórdios dos órgãos da flor dentro de cada verticilo da flor (TAN; SWAIN, 2006).

Segundo BOSS et al. (2004) as múltiplas vias que controlam o tempo da floração, podem ser divididas em duas rotas, as que ‘promovem’ e as que ‘possibilitam’ a indução floral (Figura 2). Nas diferentes vias que ‘promovem’ a transição floral inclui uma variedade de sinais ambientais (fotoperíodo, intensidade luminosa e temperatura ambiente) e endógenos (biossíntese de hormônios e estágio de desenvolvimento da planta), os quais irão ativar a expressão de genes integradores da floração. Em contraste a estas vias, estão aquelas que regulam os genes repressores, cuja função é contrária a atividade dos genes integradores da floração. Assim, a rota que ‘possibilita’ a transição atua na regulação da habilidade do meristema a responder aos distintos sinais como: vernalização, estágio de desenvolvimento e via autônoma de maneiras diferentes, estas atividades podem aumentar ou diminuir a eficácia dos repressores, e conseqüentemente, inibir ou promover o florescimento.

Um dos fatores mais importantes da rota que ‘promove’ o florescimento é o fotoperíodo (Figura 2). Os seus efeitos regulatórios na indução floral são conhecidos há muito tempo, tendo sido caracterizados em espécies que requerem fotoperíodo longo para a sua

indução floral (caso da *Arabidopsis*), em espécies de dias neutros (espécies com indução de floração independente do fotoperíodo) e nas espécies induzidas por dias curtos, (caso do arroz) (THOMAS; VINCE-PRUE, 1997).

O florescimento em *Arabidopsis* pelo fotoperíodo longo é promovido pelo gene *CONSTANS* (*CO*), que codifica um fator de transcrição que se acumula nas folhas em dias longos como resultado da expressão rítmica do mRNA e a estabilização da proteína *CO* na luz (WELLMER; RIECHMANN, 2010). A proteína *CO* ativa a expressão do florígeno *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) na folha e este se desloca por meio do floema para atuar no meristema apical do caule (AN et al., 2004). A indução de *FT* por *CO* é impedida pela ação de vários repressores florais, dentre eles, o *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*).

Figura 2 - Vias que regulam a transição floral em *Arabidopsis* (BOSS et al., 2004). As setas indicam ativação e as linhas com uma bola terminal indicam repressão. Um sinal de mais (+) indica aumento da regulação e um sinal de menos (-) indica uma diminuição da regulação em citros (ZHANG et al., 2011).

Na rota que ‘possibilita’ a transição floral (Figura 2), a vernalização é um dos sinais mais importantes, a qual promove o florescimento em resposta à exposição a períodos

prolongados de frio. Uma ampla gama de plantas necessita de um período de exposição em baixas temperaturas (vernalização) para promover a indução floral, tais como a mangueira (NUNEZ-ELISEA; DAVENPORT, 1994), laranjeira (MOSS, 1976) e macieira (McARTNEY et al., 2001). O regulador central do florescimento induzido por vernalização em *Arabidopsis* é o gene *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, um regulador negativo do florescimento que inibe a transcrição dos genes integradores do florescimento: *FLOWERING LOCUS (FT)* e *SUPPRESSOR OF OVER-EXPRESSION OF CONSTANT 1 (SOC1)*. Com a retirada dos repressores florais, a expressão do *FT* e *SOC1* é induzida e estes irão promover a transição do meristema vegetativo em floral pela ativação dos genes de identidade de meristema floral (SEARLE et al., 2006).

Segundo Koornneef et al. (1998) o crescimento vegetativo em *Arabidopsis* é mantido pela repressão da função dos genes do florescimento. *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)* é um importante repressor, que interage com *FLC* para reprimir diretamente a expressão de *SOC1* (LI et al., 2008) e com isto regular o tempo de florescimento pela manutenção do crescimento vegetativo. Além disso, outro importante repressor o *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* atrasa o florescimento e regula o desenvolvimento da planta através da manutenção do estágio indeterminado do meristema de inflorescência inibindo a formação das flores (SHANNON; MEEKS-WAGNER, 1991).

Seguindo a transição para o desenvolvimento reprodutivo em *Arabidopsis*, meristemas apicais são reprogramados para produzirem inflorescências e outros seguem com o desenvolvimento vegetativo (LAUX et al. 1996). Assim ao se iniciar a floração, interações entre os genes específicos do florescimento e genes requeridos para a manutenção do meristema, dentre eles o *WUSCHEL*, garantem que as flores de *Arabidopsis* irão se desenvolver mantendo sua integridade estrutural e funcional nos quatro verticilos (LAUX et al. 1996).

Em 1991, Coen e Meyerowitz propuseram o modelo ABC para descrever a determinação da identidade de órgãos florais com base em análises fenotípicas e genéticas de mutantes homeóticos de *Antirrhinum* e *Arabidopsis*. O modelo define que a atividade de três classes de genes homeóticos, chamados A, B e C determina a formação dos órgãos florais. A formação de uma flor é sequencial, ou seja, começando com as sépalas, pétalas, estames e carpelo, sendo que cada órgão se desenvolve em círculos concêntricos (verticilos) ao redor dos flancos do meristema. Assim sendo, a atividade dos genes A promove a formação das sépalas, enquanto que a formação de pétalas exige a atividade combinada dos genes A e B. Para o desenvolvimento dos estames é necessária a atividade combinada dos genes B e C,

enquanto que a formação de carpelos é dependente exclusivamente da atividade de gene C. Todos os genes ABC são membros de uma família de fatores de transcrição denominados de MADS-box, exceto o gene *APETALA2*(*AP2*) (TAN; SWAIN, 2006).

Em *Arabidopsis* os genes que especificam a identidade dos órgãos florais são bem caracterizados: *APETALA1*(*AP1*) (MANDEL et al., 1992) e o *APETALA2* (*AP2*) (JOFUKU et al., 1994) pertencem à classe A; *APETALA3* (*AP3*) (JACK; BROCKMAN; MEYEROWITZ, 1992) e *PISTILLATA* (*PI*) pertencem à classe B e o *AGAMOUS* (*AG*) pertence à classe C (YANOFISKY et al., 1990).

Estudos recentes indicam à participação de outros fatores na especificação da identidade dos órgãos florais, em conjunto com os genes ABC. Entre tais fatores estão os genes *SEPALLATA* (*SEP*) (PELAZ et al., 2000). Como a maioria dos genes ABC, os genes *SEP* também são MADS-box, e quatro genes *SEP* são funcionalmente redundantes (*SEP1*, *SEP2*, *SEP3* e *SEP4*) em *Arabidopsis*, porém juntos são essenciais para a especificação da identidade dos órgãos florais (PELAZ et al., 2000, DITTA et al., 2004). A importância dos genes *SEP* em promover o desenvolvimento das sépalas, pétalas, estames e carpelos levou à incorporação destes, na classe de genes E do modelo ABC (JACK, 2004).

O clássico modelo ABC foi então expandido para o modelo “ABCD” e “ABCDE”, com a incorporação de dois genes chamados de D e E (PELAZ et al., 2000). O último modelo, que agora é amplamente aceito, acrescentou a classe de genes D, responsável pela formação dos óvulos (FAVARO et al., 2003).

2.4 Genes envolvidos no florescimento de citros

O conhecimento sobre a floração em espécies perenes, incluindo o citros, tem avançado bastante devido ao fato de que, pelo menos de maneira geral, os mesmos genes identificados em plantas modelos parecem estar envolvidos na indução e desenvolvimento floral e no desenvolvimento dos frutos.

Em citros, ortólogos para os genes relacionados à floração têm sido isolados e caracterizados com sucesso, incluindo o *LEAFY* (*LFY*) e *APETALA1* (*AP1*) (PILLITTERI; LOVATT; WALLING, 2004b), *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) (NISHIKAWA, et al., 2007, 2009, ENDO, et al., 2005), *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*), *BARELY ANY MERITED* (*BAM*); (ZHANG et al., 2009a,b); *TERMINAL FLOWER1* (*TFL1*) (PILLITTERI; LOVATT;

WALLING, 2004a), *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)* (LI et al., 2010); *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 (SOC1)* e *WUSCHEL (WUS)* (TAN; SWAIN, 2007).

Os primeiros genes estudados em citros foram *LFY* e *API* por PEÑA et al. (2001), os quais transformaram plantas juvenis de citranges (*C.sinensis* x *P.trifoliata*) com os genes *LFY* e *API* obtendo uma redução drástica do período vegetativo das plantas para dois anos. Segundo Pillitteri, Lovatt e Walling (2004b) plantas transgênicas de *Arabidopsis* expressando constitutivamente os genes *LFY* ou *API* de citros apresentaram fenótipos semelhantes àqueles descritos para superexpressão desses genes em *Arabidopsis*. Como as plantas apresentaram florescimento bastante precoce, concluiu-se que os genes *LFY* e *API* também regulam a transição da fase juvenil para a fase adulta em citros, desempenhando funções semelhantes aos ortólogos para estes genes em *Arabidopsis*.

A indução floral por baixas temperaturas é uma exigência para o florescimento de algumas espécies de plantas. Em *Arabidopsis*, a vernalização promove o florescimento pela repressão da transcrição do gene *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, o principal gene MADS-box que atua como repressor floral, permitindo a expressão do gene *FT* e *SOC1*, o qual promove a transição para o desenvolvimento reprodutivo. Em citros, o ortólogo do gene *FLC* (*PtFLC*) foi isolado de um mutante de florescimento precoce de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., revelando um perfil de expressão de contrário ao observado em *Arabidopsis*, com uma alta expressão durante o inverno, seguido de uma diminuição na primavera e verão, isto sugere que funcionalmente o gene *FLC* difere entre plantas perenes e anuais. Adicionalmente, cinco formas alternativas de *splicing* do gene *FLC* foram isoladas em tecidos juvenis e adultos do mutante, indicando um mecanismo complexo de regulação da expressão desse gene durante a transição e desenvolvimento floral em citros (ZHANG et al., 2009a).

Além do *FLC*, em citros têm sido caracterizadas mudanças nos níveis de transcritos do ortólogo *FLOWERING LOCUS T* em resposta as temperaturas indutivas do florescimento. O aumento da expressão do gene *FT* em tangerina ‘Satsuma’ (*C. unshiu* Marc.) foi observado em plantas adultas durante o período de indução floral em resposta à exposição a uma temperatura de 15° C. No entanto, em plantas juvenis, os níveis de expressão de *FT* não foram alterados pelo tratamento com baixa temperatura (NISHIKAWA, et al., 2007, 2009). Além disso, a expressão constitutiva de *FT* de citros em *P. trifoliata* foi capaz de reduzir significativamente o tempo de florescimento das plantas transgênicas, evidenciando o papel do gene *FT* como importante regulador da indução floral em citros. (ENDO et al., 2005).

O gene *SOC1*, por sua vez, foi isolado e caracterizado por Tan; Swain (2007), juntamente aos genes *AP3* e *WUSCHEL (WUS)*. Em *Arabidopsis*, *SOC1* é um importante

integrador dos sinais do florescimento iniciados pelas múltiplas vias. A complementação gênica em mutantes *soc1* de *Arabidopsis* com o ortólogos de citros resultou na indução de florescimento precoce, sendo capaz de restaurar o fenótipo selvagem destes mutantes. Enquanto que a complementação do mutante *wus* de *Arabidopsis* sugere que o ortólogo em citros (*CsWUS*) possui um papel importante em garantir a integridade da identidade e da estrutura dos meristemas florais. Essas observações indicam que o gene *SOC1* e *WUS* apresentam em citros funções equivalentes às observadas em *Arabidopsis* (TAN; SWAIN, 2007).

A identificação e caracterização de numerosos genes que interrompem a fase vegetativa ou que alteram a identidade do meristema têm sido investigadas principalmente em *Arabidopsis*. Dentre esses genes que regulam o tempo do florescimento, o *TERMINAL FLOWER1 (TFL1)* foi isolado de laranja doce ‘Washington navel’ por Pillitteri, Lovatt e Walling (2004a). Estes autores determinaram que as plantas transgênicas de *Arabidopsis* expressando o gene *CsTFL1* apresentaram um fenótipo de florescimento tardio semelhante à superexpressão de *TFL1* em *Arabidopsis*, adicionalmente, encontraram uma correlação positiva entre a juvenilidade em citros e o acúmulo dos transcritos de *TFL1*.

SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP), é outro importante gene que mantém o crescimento vegetativo pela repressão da função dos genes do florescimento. Em citros, *SVP* foi isolado de um mutante de florescimento precoce de *P.trifoliata* por Li et al. (2010), revelando um alto número de transcritos em tecidos dormentes e meristemas vegetativos antes da transição floral e baixos níveis em brotações florais durante a transição floral. Assim, o padrão de expressão do *SVP* em citros, durante a determinação do meristema apical, sugere que este gene regula o tempo de florescimento mantendo o desenvolvimento vegetativo e também controla a identidade do meristema floral pela manutenção do desenvolvimento reprodutivo, sendo assim funcionalmente conservado de *Arabidopsis* (LI et al., 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar as características fenotípicas e morfo-anatômicas envolvidas no florescimento em diversas épocas do ano de plantas adultas da laranjeira 'x11'. Além de verificar a expressão de alguns genes envolvidos no florescimento de plantas adultas e juvenis de laranjeira 'x11' em comparação com as plantas de laranjeira 'Valência'.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar e caracterizar os parâmetros envolvidos no fenótipo do florescimento em plantas adultas de laranjeira 'x11' quando submetidas a quatro épocas de poda;
- b) Verificar o período em que ocorrem os processos de indução e diferenciação floral, por meio de análises morfo-anatômicas das brotações provenientes de ramos novos das plantas adultas da laranjeira 'x11', em comparação com as plantas de laranjeira 'Valência'.
- c) Determinar o perfil de transcritos dos genes envolvidos na indução e no florescimento em citros (*FT*, *SOC1*, *LFY*, *TFL1*, *FLC*, *SVP*, *API*, *BAM* e *WUS*), em plantas adultas e juvenis da laranjeira 'x11' em comparação com plantas de laranjeira 'Valência'.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização fenotípica do florescimento de plantas de laranjeiras adultas ‘x11’

4.1.1 Material vegetal e condições experimentais

Foram utilizadas dezesseis plantas adultas de laranjeira ‘x11’, sendo nove enxertadas em limoeiro ‘Cravo’ (*C. limonia* Osbeck) e sete, enxertadas em citrumeleiro ‘Swingle’ (*C. paradisi* Macf. *x* *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.), além de duas plantas de laranjeira ‘Valência’ enxertadas em limoeiro ‘Cravo’ (plantas controle). Todas as plantas tinham aproximadamente três anos de idade e foram conduzidas em vasos de 20 L de volume, contendo uma mistura de substrato comercial e solo, com fertirrigação em sistema automático, mantidas em estufas sob condições ambientais no Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC.

Foram realizadas podas não severas dos ramos (cerca de 1 cm de comprimento), resultantes do último surto de crescimento (aproximadamente com um ano de idade ou menos) em todos os ramos de cada planta, de forma a induzir novas brotações e o florescimento na laranjeira ‘x11’ (Figura 3).

Figura 3 - Ramos com ápices caulinares podados e gemas nas axilas das folhas 20 dias após a poda, as quais posteriormente se desenvolveram nos ramos laterais.

As épocas de podas adotadas foram de outono e de primavera, com realização nas respectivas datas 02 de maio e 02 de novembro do ano de 2011. No ano seguinte, as podas foram realizadas no verão e no inverno, nos dias 01 de fevereiro e 02 de agosto, a escolha das datas em anos alternados foi baseada em observações prévias de que as plantas precisavam de período de repouso para manter o crescimento vegetativo.

Uma vez que a baixa temperatura é um estímulo importante na indução floral em citros, foi realizado o monitoramento diário da temperatura pelo equipamento HOBO U12 External Data Logger (Onset Ltda) instalado dentro da casa de vegetação. Com os dados obtidos, foram calculadas as temperaturas média, mínima e máxima mensal e o número de horas diárias de temperaturas inferiores a 13 °C no ano de 2011 e 2012, durante o período de pré-florescimento, ou seja, desde 62 dias antecedentes a cada dia de poda até o dia do surgimento dos primórdios florais.

Parâmetros avaliados

Semanalmente após cada poda, as variáveis relacionadas ao crescimento e desenvolvimento das brotações das gemas axilares da laranjeira adulta 'x11', desde o início das brotações até o florescimento completo foram avaliadas de acordo com o citado a seguir:

4.1.2 Classificação e porcentagem dos ramos novos em diferentes épocas de poda

Foi determinado o número total e a porcentagem de ramos novos com gemas reprodutivas e vegetativas, no total de ramos emitidos nas plantas adultas de 'x11'. Os ramos novos foram classificados de forma semelhante ao citado por Guardiola (1997):

- i. Ramo vegetativo (presença só de folhas);
- ii. Ramo reprodutivo unifloral (com flores terminais e sem folhas)
- iii. Ramo reprodutivo misto unifloral (com flores terminais e várias folhas)
- iv. Ramo reprodutivo multifloral (flores terminais e flores laterais desenvolvidas sem folhas);
- v. Ramo reprodutivo misto multifloral (flores terminais e flores laterais desenvolvidas com várias folhas);

Além dessa classificação, também foi incluído o ramo reprodutivo misto unifloral abortado (com flores terminais não desenvolvidas e com folhas).

4.1.2.1 Delineamento experimental

Neste trabalho, a variável resposta do experimento refere-se à classificação dos ramos em quatro categorias mutuamente exclusivas (ramos com flor unifloral, ramos com flor multifloral, ramos sem flor e ramos com flor abortada), representando uma variável resposta multicategórica.

Nesse contexto, a análise estatística dos resultados do experimento foi realizada por meio dos modelos lineares generalizados, que são apropriados para verificar a pertinência do efeito de época (primavera, verão, outono e inverno) bem como o efeito de porta-enxerto

sobre a classificação dos ramos novos. O modelo utilizado descreve todos os logitos de pares das categorias de resposta, ou seja:

$$\text{Logitos} = \log \frac{(\pi_{ijk})}{(\pi_{ij4})} = \beta_{0k} + \beta_{ik} \text{ porta enxerto} + \beta_{jk} \text{ época}_j$$

em que: $i = 1; 2$ porta-enxertos, $j = 1; 2; 3; 4$ épocas e $k = 1; 2; 3$.

A categoria ramo com flor abortada foi tomada como referência para efeito de estimação das proporções de cada uma das categorias (estimativas das probabilidades).

Os procedimentos metodológicos adotados incluíram o ajuste do modelo dado pela equação acima e de modelos encaixados, ou seja, modelos com menos parâmetros (sem o efeito de época e/ou sem o efeito de porta-enxerto). Uma vez constatado o efeito do fator época, uma análise estratificada foi feita em cada ocasião, possibilitando estudar simultaneamente o efeito de época e de porta-enxerto sobre as proporções de cada categoria de resposta. O nível de significância dos testes adotados foi $\alpha = 0; 05$. A análise foi feita com o auxílio do *software* R, versão 2.14.

4.1.3 Caracterização fenotípica dos ramos novos com estruturas reprodutivas mistas uniflorais em diferentes épocas de poda

Após a identificação dos tipos de estruturas emitidas pelos ramos novos, foi realizada a caracterização de 30 ramos reprodutivos mistos uniflorais, o motivo para tal fato é que, após cada poda, as plantas produziram em média entre 30 e 100 ramos novos. Então, nas plantas adultas de ‘x11’ em cada época de poda e de cada porta-enxerto, foram avaliados os seguintes parâmetros:

a-) número de folhas emitidas em cada ramo antes do botão floral terminal: foram contadas as folhas novas nas axilas de cada ramo novo com uma flor terminal, após o desenvolvimento completo da flor terminal;

b-) comprimento do ramo até o botão floral terminal: foi mensurado com régua milimetrada, após o desenvolvimento completo da flor terminal;

c-) número de dias desde a poda até a abertura da primeira flor terminal: foram contabilizados o período de desenvolvimento da brotação desde a poda até o surgimento da primeira inflorescência (com botão floral menor que 1 cm);

d-) número de dias para o florescimento de 100% das flores de cada planta: foram contabilizados os dias desde o surgimento da primeira inflorescência até o florescimento total das flores.

Após as avaliações, todas as plantas foram mantidas em repouso até a próxima época de poda, os frutos desenvolvidos foram retirados manualmente, pois sua presença afeta os próximos períodos de florescimento, devido ao efeito aditivo da competição por fotoassimilados e o efeito inibitório dos frutos no florescimento (GARCÍA-LUIZ et al., 1992; GOLDSCHMIDT; KOCH, 1996).

4.1.3.1 Delineamento experimental

Com relação ao comprimento médio dos ramos e número médio de folhas, observou-se que estes dados têm característica de variável aleatória contínua com tendência para à distribuição normal. Adicionalmente, considerando que foram realizadas análises nas mesmas plantas nas quatro épocas do estudo (primavera, verão, outono e inverno) foi feita uma análise de dados baseada na metodologia para medidas repetidas proposta por Zeger e Liang (1986), pela qual foi possível verificar uma distribuição normal para as variáveis respostas e uma estrutura de correlação para as observações nas mesmas plantas. Essa análise é uma generalização da Análise da Variância de delineamentos experimentais, exceto pelo fato de se considerar observações repetidas (correlação) e da estatística do teste ser a Qui-Quadrado.

4.1.4 Determinação da viabilidade e germinação *in vitro* de grãos de pólen

Foram utilizadas três plantas adultas da laranjeira ‘x11’ enxertadas em cada porta-enxerto, limoeiro ‘Cravo’ e citrumeleiro ‘Swingle’. As anteras foram coletadas de flores terminais na primavera e no outono de 2011 e no inverno de 2012, no momento inicial da antese, quando era visível a recente abertura das pétalas e as anteras possuíam coloração bem

amareladas (Figura 4), a fim de se garantir que pólen analisado se encontrasse no estágio maduro.

Figura 4 - Flor em estágio de antese (abertura recente das pétalas).

Foram selecionadas três flores de cada planta, das quais se coletou metade das anteras para a análise da viabilidade e a outra metade para a determinação das porcentagens de germinação.

Com o auxílio de uma pinça, metade das anteras de cada flor foi acondicionada num tubo eppendorf contendo uma solução fixadora (álcool absoluto: ácido acético (3:1)), em seguida foram mantidas a temperatura de 4 °C por 24 horas até o momento de preparo das lâminas. Para cada tubo eppendorf (contendo anteras de apenas uma flor) foram preparadas duas lâminas com os grãos de pólen, que foram corados com solução de carmim acético a 2%, totalizando seis lâminas por planta (3 flores x 2 repetições) e visualizadas com o auxílio de microscópio de luz. Em cada lâmina foram avaliados no mínimo 300 grãos de pólen, os quais foram classificados em viáveis (corados em vermelho intenso) e não viáveis (não corados). Em seguida, foram calculados os percentuais de grãos de pólen viáveis para cada amostra de cada planta.

Para a determinação das porcentagens de germinação *in vitro* foi utilizada a outra metade das anteras das flores selecionadas. As anteras foram imediatamente retiradas das flores e colocadas para a germinação *in vitro* em placas de Petri de plástico (6,0 x 1,5 mm), contendo meio de cultura para a germinação, composto de 800 mg. L⁻¹ de nitrato de cálcio, 200 mg L⁻¹ de ácido bórico, 10% de sacarose e 2,2 g L⁻¹ de phytigel e pH do meio de cultura ajustado para 6,5 antes da adição do phytigel (PIO et al., 2007).

Cerca de cinco anteras, provenientes de três flores diferentes foram distribuídas em três placas de Petri (três repetição) contendo o meio de cultura para a germinação. Em seguida as placas foram mantidas em câmara escura a temperatura de 28 °C por 24 a 48 horas. Após

esse período, o número de grãos de pólen germinados e não germinados foram contabilizados em quatro campos de visão, contendo um mínimo de 25 grãos de pólen cada, por placa de Petri, totalizando a avaliação de no mínimo 100 unidades de grãos de pólen por placa de Petri.

4.1.4.1 Delineamento experimental

Considerando as variáveis respostas referentes às condições de ‘pólen germinado’ ou ‘pólen não germinado’ e ‘pólen viável’ ou ‘pólen não viável’, foram utilizados para a análise os modelos de regressão logística (AGRESTI, 2002), uma vez que estas variáveis são dicotômicas, sendo caracterizadas pela distribuição binomial.

O modelo de regressão logística para cada uma das duas variáveis respostas foi dado por:

$$\eta = \ln \frac{(\pi_{ijk})}{(1 - \pi_{ij})} = \beta_{0k} + \beta_i \text{ porta enxerto}_i + \beta_j \text{ época}_j \quad (\text{eq.1})$$

em que: $i = 1; 2$ porta-enxertos, $j = 1; 2; 3$ épocas.

Por meio do modelo 1, pode-se estimar as probabilidades do sucesso, ou seja, $P[Y = 1 | \eta]$, em que “1” representa a ocorrência de ‘pólen germinado’ ou ‘pólen viável’, de acordo com a variável a ser modelada. Tem-se, então que:

$$\hat{\pi}_{ij} = \frac{\exp(\hat{\eta})}{1 + \exp(\hat{\eta})} = \frac{\exp(\hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_i \text{ porta enxerto}_i + \hat{\beta}_j \text{ época}_j)}{1 + \exp(\hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_i \text{ porta enxerto}_i + \hat{\beta}_j \text{ época}_j)} \quad (\text{eq.2})$$

em que: $i = 1; 2$ porta-enxertos, $j = 1; 2; 3$ (primavera, outono e inverno) épocas.

Os procedimentos metodológicos adotados incluíram o ajuste do modelo dado pela equação 1 (eq.1) e de modelos encaixados (eq.2), ou seja, modelos com os mesmos parâmetros (sem o efeito de época e/ou sem o efeito de porta-enxerto). Para considerar a estrutura de dependência entre as observações, uma vez que as amostras são retiradas das mesmas plantas nas ocasiões foi considerada no processo de ajuste dos modelos uma estrutura

de correlação, segundo a metodologia de modelos logísticos para dados correlacionados, proposta por Zeger e Liang (1986). A estrutura de correlação, nesse caso, não é de interesse prático, mas é relevante no processo, pois visa corrigir os erros-padrão dos coeficientes dos modelos. O nível de significância dos testes adotados foi $\alpha = 0,05$. A análise foi feita com o auxílio do *software* R, versão 2.15.

4.2 Caracterização morfo-anatômica do desenvolvimento das brotações de laranjeiras ‘x11’ e ‘Valência’

Na tentativa de se verificar o momento em que ocorrem os processos de indução e diferenciação floral nas laranjeiras ‘x11’ e ‘Valência’ na época de outono, considerada não indutiva ao florescimento nas laranjeiras, foram realizadas observações morfo-anatômicas de brotações em diferentes estádios, provenientes de gemas axilares.

Para isto, foram utilizadas três plantas adultas das laranjeiras ‘x11’ e ‘Valência’, enxertadas em limoeiro ‘Cravo’, com três anos de idade e mantidas em casa de vegetação. No dia 05 de abril de 2012 todas as plantas tiveram os ápices caulinares podados ($\cong$ 1 cm de comprimento) para induzir novas brotações (poda de outono). No período compreendido entre os dias 20 e 31 de abril foram coletadas brotações das gemas axilares em expansão de três tamanhos diferentes, oriundas das duas laranjeiras e entre os dias 01 e 10 de maio coletou-se brotações com botões florais visíveis da laranjeira ‘x11’ e brotações vegetativas da ‘Valência’.

Em cada coleta foram selecionados quatro ramos, contendo folhas e da parte mais superior da planta, dos quais foram retiradas duas gemas. Com o auxílio do paquímetro digital (Mitutoyo, modelo CD-6) foi mensurado o comprimento das brotações, provenientes das gemas axilares, com medições do ponto A ao B (Figura 5).

Assim, os estádios fenológicos considerados para as análises morfo-anatômicas das brotações, das gemas axilares proveniente das plantas ‘x11’ e ‘Valência’ foram os seguintes: estágio 1- brotação com 3 mm de comprimento; estágio 2- brotação com 5 mm; estágio 3- brotação com 7 mm e estágio 4- brotação com 13 mm.

Figura 5 - Determinação do comprimento da brotação da gema axilar realizada por meio da medição da distância do ponto (A), intersecção da base da brotação com o ramo e o ponto (B), intersecção do maior primórdio foliar visível.

Metade das amostras selecionadas foi utilizada na visualização do desenvolvimento do meristema apical na lupa (Olympus MX11). Para facilitar a observação externa dos meristemas, primeiramente os primórdios foliares foram removidos com o auxílio de uma pinça.

A outra metade das amostras foi conduzida e preparada no Laboratório de Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas (CENA/USP). Primeiramente as amostras foram imersas em solução de Karnovsky modificada composta por glutaraldeído (2%), paraformaldeído (2%) e cloreto de cálcio (5 mM) em tampão cacodilato sódio (0,05 M, pH 7,2), sob vácuo (60 mmHg) por 20 minutos e posteriormente mantidas em refrigeração (4 °C) durante 48 horas. As amostras foram processadas para infiltração em historesina (Leica) conforme o protocolo detalhado na Tabela 1.

Tabela 1 - Protocolo para infiltração em historesina (RODRIGUEZ; WETZSTEIN, 1998)

PRODUTO/PROCEDIMENTO	TEMPO MÍNIMO *
- 3 períodos em propanol PA 100%	1 hora por período
- 3 períodos em butanol PA 100%	1 hora por período
- 3 períodos em butanol PA 100%	1 hora por período
- 1 período em solução contendo 1/3 de historesina e 2/3 de butanol PA 100%	1 semana
- 1 período em solução contendo 1/2 de historesina e 1/2 de butanol PA 100%	1 semana
- 1 período em solução contendo 1/3 de historesina e 2/3 de butanol PA 100%	1 semana
- 1 período em solução contendo historesina pura	1 mês

*Todas as amostras foram submetidas a (60 mmHg) por 15 minutos e mantidas sob refrigeração (4 °C).

Após a fase de infiltração, todas as amostras foram submetidas às seguintes etapas:

- a) Emblocagem em historesina (Leica, Heiderberg) conforme instruções do fabricante, com polimerização à temperatura ambiente, por 48 horas;
- b) Realização dos cortes seriados longitudinais (5 µm) em micrótomo rotativo (Leica, RM2155). Deposição dos cortes em lâminas histológicas contendo água filtrada para esticar os cortes. Secagem sobre chapa aquecida a 40 °C;
- c) Coloração dos cortes por 2 minutos em fucsina (5% p/v) aquecida, em seguida, em azul de toluidina (0,1% p/v) por 3 minutos, secagem das lâminas à temperatura ambiente;
- d) Montagem dos cortes histológicos em entellan® coberto com lamínula para tornar as lâminas permanentes;
- e) Análise em microscópio de luz digital (Olympus câmera modelo DP71), e obtenção das micrografias digitais em câmera digital acoplada ao microscópio.

As características morfológicas das brotações em diferentes estádios de desenvolvimento, e os respectivos desenvolvimentos anatômicos do meristema apical da laranjeira 'x11' foram comparadas entre si, e com as amostras de 'Valência'.

Adicionalmente, foi realizada a análise fenotípica das laranjeiras ‘x11’ e da ‘Valência’, conforme descrito no item 4.1.2, para se determinar a existência de atributos que possam auxiliar na identificação e distinção dos ramos vegetativos e florais.

Para verificar se ocorre influência da temperatura diária, e de que maneira esta pode afetar os processos envolvidos no florescimento durante a época de coleta das brotações, foi realizado o monitoramento diário da temperatura pelo equipamento HOBO U12 External Data Logger (Onset Ltda) instalado dentro da casa de vegetação. Com os dados obtidos, foram calculadas as temperaturas mínimas, médias e máximas e o número de horas de frio ($< 13^{\circ}\text{C}$) entre os meses de abril a junho, que correspondente ao período entre o último surto de florescimento e a iniciação floral.

4.3 Caracterização molecular dos genes envolvidos na indução e no florescimento de plantas adultas e juvenis de laranjeiras ‘x11’ e ‘Valência’

4.3.1 Material vegetal e condições experimentais

Este ensaio teve como finalidade estudar os níveis de transcritos dos genes envolvidos na indução e no florescimento de plantas adultas e juvenis de ‘x11’ em relação ao controle ‘Valência’.

Para isto, no dia 10 de julho de 2012 foram realizadas podas em todos os ápices caulinares ($\cong 1$ cm de comprimento) de três plantas adultas com três anos de idade (as mesmas utilizadas no ensaio 4.2) e três plantas juvenis com dois anos de idade, todas enxertadas em limoeiro ‘Cravo’ e mantidas em casa de vegetação.

Na Figura 6 estão detalhadas somente as brotações em três estádios de desenvolvimento selecionadas de plantas adultas (A-C) e de juvenis (D-F) da laranjeira ‘x11’. E estas mesmas brotações com os mesmos comprimentos e as mesmas características, também foram coletadas de plantas adultas e juvenis da laranjeira ‘Valência’.

Assim, no mesmo dia da realização da poda, as gemas axilares dormentes foram coletadas de plantas adultas e juvenis (Figura 6A e 6D) das laranjeiras ‘x11’ e ‘Valência’, e entre os dias 03 e 08 de agosto foram coletadas brotações com 7 mm de comprimento, contendo primórdios foliares de plantas adultas e juvenis das duas laranjeiras (Figura 6B e

6E). Entre os dias 17 e 23 de agosto coletou-se brotações com 13 mm de comprimento com botões florais terminais visíveis de plantas adultas (Figura 6C) e brotações vegetativas de plantas juvenis (Figura 6F).

Figura 6 - Amostras das brotações adultas (A-C) e juvenis (D-F) em três estádios de desenvolvimento, provenientes de gemas axilares da laranjeira 'x11'. A e D-) Estádio 1, gema dormente ≤ 1 mm de comprimento (E1); B e E-) Estádio 2, brotação com 7 mm (E2); C e F-) Estádio 3, brotação com 13 mm (E3). Barras = 500 μ m.

As amostras das brotações em cada estágio de desenvolvimento foram coletadas de três plantas adultas e juvenis. Para isto, foram selecionados cinco ramos da parte mais superior das plantas e contendo folhas, dos quais foram retiradas cerca de três brotações do topo à base do ramo. Desta forma, em cada estágio de desenvolvimento foram coletadas três amostras, uma de cada planta, totalizando três repetições biológicas de cada laranjeira. Cada amostra utilizada nas análises de expressão foi composta por 15 brotações (provenientes de 3 brotações x 5 ramos).

Como não existe nenhum estudo em citros caracterizando e padronizando os diferentes estágios de desenvolvimento das gemas florais para a análise da expressão dos genes envolvidos nos florescimento, como descrito para *Arabidopsis* por Smyth; Bowman e Meyerowitz (1990), os tamanhos das brotações coletadas foram definidos de acordo com os resultados dos estudos morfo-anatômicos do meristema apical detalhados no item 4.2. Para isto, os comprimentos das brotações foram medidos da intersecção da gema com a axila da folha até o início dos primórdios foliares (Figura 5), com o auxílio do paquímetro digital (Mitutoyo, modelo CD-6), conforme os procedimentos detalhados no item 4.2.

Todas as coletas foram realizadas entre 8:00 e 11:00 horas da manhã para minimizar possíveis flutuações na expressão gênica ao longo do dia que poderiam comprometer as análises (LI et al, 2010). As amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido

e estocadas a -80°C para posterior extração de RNA total e síntese de cDNA, realizadas no Laboratório de Melhoramento de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), Piracicaba, SP.

Para verificar a influência da temperatura e de que maneira esta pode afetar a expressão dos genes envolvidos no florescimento em citros, foi realizado o monitoramento diário da temperatura pelo equipamento HOBO U12 External Data Logger (Onset Ltda) instalado dentro da casa de vegetação. Com os dados obtidos, foram calculadas as temperaturas mínimas, médias e máximas e o número de horas de frio (< 13 °C) entre os meses de junho a agosto, que correspondem ao período entre a data do último surto de florescimento e a iniciação floral.

4.3.2 Busca das seqüências e desenho dos iniciadores específicos dos genes associados ao florescimento em citros

As seqüências expressas (ESTs) dos principais genes envolvidos na indução e no florescimento de citros utilizadas no desenho dos iniciadores foram obtidas do banco de dados do *GeneBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Na Tabela 2, encontraram-se os genes integradores das vias de indução (*FT*, *SOC1* e *LFY*), os genes repressores (*FLC*, *SVP* e *TFL1*) e os genes de identidade do meristema floral (*API*, *BAM* e *WUS*) associados com o florescimento em citros, com os seus respectivos número de acesso do *GeneBank*, trabalho de referência e nomenclatura utilizada nos trabalhos.

Os iniciadores (*primers*) para o gene *LFY* foram idênticos ao citado por Zhang et al. (2011). Os demais iniciadores de cada gene foram desenhados em regiões conservadas das seqüências previamente identificadas, utilizando-se o programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), com os seguintes critérios: tamanho do fragmento a ser amplificado variando de 100 a 300 pb; tamanho do *primer* entre 18 e 22 pb (ótimo a 20 pb); temperatura de anelamento entre 59 e 61 °C (ótimo a 60 °C); conteúdo GC% entre 40 e 60% (ótimo a 50%); fator de auto-complementariedade máxima inicial de 3,0; fator de autocomplementariedade máxima na região 3' de 0.

Tabela 2 - Genes selecionados envolvidos na indução e no florescimento de citros, número de acesso do *GeneBank*, trabalho de referência e nomenclatura utilizada.

<i>Gene</i>	<i>Acesso</i>	<i>Referência</i>	<i>Nomenclatura</i>
<i>FT</i>	AB301935	NISHIKAWA et al.(2007)	<i>CiFT3(Citrus unshiu)</i>
<i>SOCI</i>	EU032532	TAN; SWAIN (2007)	<i>CsSL2 (Citrus sinensis)</i>
<i>LFY</i>	AY338976	PILLITTERI et al. (2004b)	<i>CsLFY (Citrus sinensi)s</i>
<i>FLC</i>	EU497680	ZHANG et al. (2009a)	<i>PtFLC (Poncirus trifoliata)</i>
<i>SVP</i>	FJ373211	LI et al. (2010)	<i>PtSVP (Poncirus trifoliata)</i>
<i>TFLI</i>	AY344244	PILLITTERI et al. (2004a)	<i>CsTFLI (Citrus sinensis)</i>
<i>API</i>	AY338974	PILLITTERI et al. (2004b)	<i>CsAPI (Citrus sinensis)</i>
<i>BAM</i>	FJ851422.1	ZHANG et al. (2009b)	<i>PtBAM (Poncirus trifoliata)</i>
<i>WUS</i>	EU032533.1	TAN; SWAIN (2007)	<i>CsWUS (Citrus sinensis)</i>

Dentre os pares de iniciadores obtidos para cada o gene de interesse, foram selecionados aqueles com as melhores características indicadas pelo programa NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer>), em relação à estabilidade e eventual ocorrência de pareamento indesejável; como a formação de alças (*hairpins*), dímeros do mesmo iniciador (*primer dimers*) e entre o par de iniciadores (*cross dimers*).

Os nove iniciadores específicos (alvos) sintetizados, foram ressuspendidos na concentração estoque de 100 uM em TE (10 mM Tris HCL pH 8.0; 1 mM EDTA pH 8.0) e armazenados a -20°C.

4.3.3 Extração de RNA total

Para o procedimento de extração do RNA, bem como para as etapas que se seguiram, foram tomados os devidos cuidados à manutenção da integridade do mesmo. Para tanto, todos os materiais utilizados na maceração das amostras, foram previamente tratados com dietilpirocarbonato (DEPC) a 0,01% e submetidos à esterilização em autoclave por 40 min a 120 °C e 1 atm de pressão.

O RNA total de cada amostra, foi extraído individualmente usando o kit ZR Plant RNA MiniPrep do fabricante Zymo Research.

Seguindo-se as especificações do protocolo, a extração de RNA iniciou-se com 100 mg de tecido para cada amostra, o qual foi macerado em nitrogênio líquido no próprio tubo de eppendorf e as demais etapas foram realizadas de acordo com as instruções do kit. Na última etapa de extração foram adicionados 25 uL de água ultrapura (Milli-Q) estéril tratada com DEPC a 0,01% autoclavada para a ressuspensão do RNA seguido pelo armazenamento a -80 °C.

4.3.3.1 Quantificação e análise da integridade do RNA total

Para conferir a integridade do RNA, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel 1,2% agarose com tampão SB (10 mM NaOH pH 8,5; ajustado com ácido bórico) (BRODY; KERN, 2004) a 4 V cm^{-1} , aplicando-se uma alíquota de 2 uL do RNA total de cada amostra.

Para a determinação da concentração e pureza do RNA total extraído, uma alíquota de 1 µL foi retirada para leitura da densidade óptica no espectrofotômetro Smarspech 4000 (BioRad®, Hercules, CA, EUA) em 260 nm e razão de 260/280 nm, respectivamente. Considerou-se um RNA de alta qualidade, quando a relação $A_{260/280}$ foi maior que 1.8, o que indicava amostra de RNA livre de contaminação por proteínas e fenóis.

4.3.3.2 Tratamento com DNase

Para digerir ácido desoxirribonucleico contaminante (DNA), 2 µg do RNA total foi tratado com a enzima DNase I (Fermentas Life Sciences). Utilizou-se 2 uL de 1U DNase I, 2 uL de 10x *Reaction Buffer* com MgCl_2 (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 25 mM MgCl_2 ; 1mM CaCl), 1,0 uL de 40 U RibolockTM (Fermentas), água ultrapura estéril tratada com 0,01% DEPC para um volume final de 10 mL. A reação foi incubada no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) a 37 °C por 40 min. Para que ocorresse a inativação da enzima, adicionou-se 2 mL de 25 mM EDTA, incubando a 65 °C por 10 min, sendo colocado no gelo imediatamente.

4.4.3.3 Síntese de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando-se 2 µg do RNA tratado com DNase, seguindo as especificações do kit RevertAidTM H Minus Reverse Transcriptase (Fermentas). Foi acrescentando ao RNA tratado, 1 mL de 50 µM oligonucleotídeo poli-dT (18 pb), 1 µL de dNTPs e água ultrapura estéril tratada com 0,01% DEPC para um volume final de 15 µL, incubado por 5 min à 65 °C e resfriado a 4 °C por 1 min. Para a transcrição reversa, adicionou-se 4 µL de 5 X Reaction Buffer (250 mM Tris-HCl pH 8.4; 250 mM KCl; 20 mM MgCl₂) e 1 µL de 200 U da enzima RevertAidTM H Minus Reverse Transcriptase (Fermentas) para um volume final de 20 µL . A reação de transcrição reversa foi realizada no termociclador GeneAmp PCR System 9700 e o programa utilizado foi de 60 °C por 30 min e 85 °C por 5 min. Após sintetizados, os cDNAs foram armazenados a -20 °C.

4.3.3.4 Confirmação da eficiência da síntese de cDNA

Realizou-se uma reação de amplificação no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) visando a confirmação da eficiência da síntese dos cDNAs recém sintetizados. A reação de PCR seguiu-se com os seguintes parâmetros: 1 µL de cDNA na diluição 1:10 (v/v), 0,5 µL de 10 mM de dNTPs, 2 µL de 5 µM de cada iniciador do gene de referência Rpl45 (Ribossomal Protein L45), 1,5 µL de 25 mM de MgCl₂, 1 U da enzima *Taq* polimerase, 2,5 µL de 10x *Taq buffer* com (NH₄)₂SO₄ (750 mM Tris-HCl, pH 8.8; 200 mM (NH₄)₂SO₄) – (Fermentas) e água ultrapura (Mili-Q) estéril, totalizando 25 µL. O programa de amplificação foi realizado com a etapa de uma desnaturação inicial de 95°C por 5 min; seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 40 s; e finalizando com a etapa de extensão final de 72 °C por 5min.

Os produtos amplificados foram visualizados em gel 1,5% agarose, tampão SB e eletroforese a 4 V cm⁻¹. Para certificação do tamanho do fragmento utilizou-se marcador de peso molecular GeneRule 100 pb DNA *Ladder* (Fermentas).

4.3.3.5 Análise da identidade dos iniciadores com cDNA e genômico

Com o objetivo de certificar a identidade de amplificação dos iniciadores dos genes da via de indução e florescimento de citros (Tabela 2) a serem utilizados nas análises de RT-qPCR, foi conduzida uma reação de amplificação no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). O volume total da PCR foi de 25 uL; adicionando-se 1 uL cDNA 1:10 (v:v) [*pool* de todas as amostras de cDNA da laranjeira 'x11']; 100 ng DNA genômico (da laranjeira 'x11') e água ultrapura estéril (utilizada como controle negativo). O programa de amplificação foi semelhante ao descrito no item 4.3.3.4.

4.3.4 Análise da expressão gênica por RT-PCR quantitativo

As análises de amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) foram conduzidas empregando-se o SYBR Green® (Molecular Beacons) no sistema de RotorGene-4000 (Corbett Research). As reações de amplificação foram realizadas num volume final de 10 uL, contendo 1 uL do cDNA diluído 1:10 (v/v); 0,3 uL de 5 uM de cada iniciadores gene-específicos; 5 ul de Maxima Syber Green/ROX qPCR Master Mix (2x); e água ultrapura (Milli-Q) estéril para um volume final de 10 ul. O perfil da reação foi estabelecido com duas etapas constantes de: 50 °C por 2 min e 95 °C for 10 min; seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 30s, com detecção do sinal de fluorescência ao final de cada etapa de extensão.

Neste ensaio foram incluídas amostras em triplicatas (10^{-1}) e controle negativo (água ultrapura estéril, sem DNA molde) (repetição técnica). A eficiência de amplificação de cada par de iniciadores foi determinada pela curva de eficiência com três diluições seriais do pool de cDNA das amostras das brotações das plantas adultas e juvenis da laranjeira 'x11', utilizados nas diluições 1:100; 1:1000 ou 1:10; 1:20 e 1: 40 (v/v).

Dentre os genes candidatos para uso como referência neste experimento, os genes *Translation Initiation Factor (IF4)*, *Translation Initiation Factor 5A (IF5A)* e *Ribossomal Protein L45 (Rpl45)* se destacaram em análises prévias, por apresentarem menor variação quantitativa na expressão de diversas amostras de tecido/orgãos de laranjeiras, analisados no Laboratório de Melhoramento Vegetal/CENA (dados não publicados) e, por isto foram usados como genes-referência no presente estudo.

Então, a expressão gênica foi avaliada das amostras das brotações em três estágios de desenvolvimento ('E1', 'E2' e 'E3') coletadas de plantas adultas (A) e juvenis (J) das plantas de laranjeiras 'Valência' e 'x11', para cada um dos nove pares de genes alvos e 3 pares de genes referência. Todos os materiais foram coletados de três plantas individuais (repetição biológica).

A análise da curva de eficiência de amplificação do pool de cDNA das amostras serviu como referencial para se estabelecer o *threshold*, ou seja, o limite de detecção estabelecido em 10% da fluorescência. O coeficiente R^2 resultante foi considerado ideal com valores acima de 0,98; o valor de M (inclinação da reta) entre -3 e -4 foi considerado aceitável, sendo seu ótimo em torno de 3,6. A eficiência ideal deve ter valor igual a 1, o que corresponde a uma eficiência de amplificação = 2 (dobrando a cada ciclo), ou seja, 100%, no entanto, foi considerado satisfatório valores entre 80 e 100%. A análise de dímeros de iniciadores foi verificada pela análise da curva de *melting* e em eletroforese dos produtos em gel de 1,5% de agarose

A aquisição dos dados em tempo real foi efetuada com o programa *RotorGene Real-Time Analysis* 6.0 (Corbett Research, Austrália), o qual fornece os valores de ciclo limite de leitura (Ct, ou cycle threshold), eficiência da PCR (E) e coeficiente R^2 .

Para a normalização de cada uma das amostras analisadas, calculou-se a variação quantitativa de expressão dos genes de indução e do florescimento de forma relativa aos genes de referências com o auxílio do programa *Relative Expression Software Tool* (REST-2009), disponível em <http://www.gene-quantification.com/rest.html> (PFAFFL, 2001; PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002; VANDESOMPELE et al., 2002) disponível em <http://www.gene-quantification.com/rest.html>. A utilização deste programa permitiu quantificar relativamente o nível de transcritos dos genes alvos em relação aos genes de referência.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização fenotípica do florescimento de plantas de laranjeiras adultas ‘x11’

As observações prévias do florescimento de ‘x11’ e de ‘Valência’ nas quatro épocas do ano (outono, primavera, verão e inverno) demonstraram que apenas a laranjeira ‘x11’ foi capaz de florescer em várias épocas do ano, enquanto a laranjeira ‘Valência’ somente floresceu na primavera.

5.1.1 Avaliação da temperatura durante o período de pré-florescimento

Na Figura 7, observa-se o comportamento da variação mensal das temperaturas máxima, média e mínima na estufa onde foram realizados os experimentos, durante o período de avaliação nos anos de 2011 e 2012.

Verificou-se, nesta figura, uma dinâmica semelhante quanto à ocorrência de baixas temperaturas nos meses de maio a julho (época coincidente com a indução da florada em laranjeiras) durante os dois anos de avaliação. Porém em 2011, durante os meses de inverno foram registradas as menores temperaturas médias (20 °C), mínimas (< 10 °C) e máximas (< 40 °C) em relação ao ano de 2012. Uma vez que os citros paralisam o crescimento da parte aérea em temperaturas inferiores a 13 °C (MOSS, 1969; DAVENPORT, 1990), pode-se inferir que em 2011 as plantas ficaram mais tempo com o crescimento paralisado. Em relação às temperaturas máximas nota-se que estas foram superiores a 36 °C, este fato compromete a fotossíntese devido ao fechamento estomático o qual diminui o fluxo de CO₂ nos sítios de fixação (MEDINA et al., 1999), provocando o aumento na taxa respiratória a qual afeta o crescimento da planta por danos fisiológicos (ORTOLANI; PEDRO JUNIOR; ALFONSI., 1991).

Figura 7 - Valores mensais das temperaturas médias máxima (T.max), média (T.med) e mínima (T.min) verificadas durante o ano de 2011 e 2012. As siglas em vermelho indicam os meses em que foram realizadas podas dos ápices dos ramos. O: poda de outono; P: poda de primavera; V: poda de verão; I: poda de inverno.

Segundo Spiegel-Roy e Goldschmidt (1996), o pré-florescimento é considerado o período em que ocorre a indução floral, que pode ser promovida por estresse hídrico em regiões tropicais ou por baixas temperaturas em regiões subtropicais.

Em citros, estima-se que os primeiros estímulos para a indução floral iniciam de 60 a 120 dias antes da florada (LIMA, 1989). Baseado nesta estimativa e na duração do período de indução na época de poda do verão ter sido em torno de 62 dias, este valor foi tomado como referência para as demais épocas de poda, como sendo o tempo mínimo antes da poda necessário para que ocorra a indução floral. Assim o período de pré-florescimento das plantas de 'x11' foi dividido em dois intervalos: 62 dias antes da poda (A) e entre a poda e a brotação (P-B). Enquanto o período entre o início da brotação e o início do florescimento (B-IF) foi determinado como sendo o período correspondente ao início da diferenciação floral. Com isto, foi possível observar as temperaturas, no período de pré-florescimento e diferenciação floral e, se estas foram suficientes para induzir e iniciar o florescimento nas épocas em que foram realizadas as podas.

Os somatórios térmicos e a variação das temperaturas que ocorreram durante o período de pré-florescimento e no início da diferenciação em cada época de poda estão detalhados na Tabela 3. O número de horas de frio (NHF) abaixo de 13 °C no pré-florescimento totalizou 47 e 98 h, respectivamente, nas épocas de podas de outono e primavera, o que determina que estes dois períodos tiveram uma fraca indução por baixas temperaturas (RIBEIRO; MACHADO; BRUNINI, 2006; VALIENTE; ALBRIGO, 2004).

Durante a época de poda de verão não houve nenhuma indução por baixas temperaturas, apesar de ter sido observado florescimento da laranjeira 'x11' mesmo neste período, enquanto que na poda de inverno foi considerada como forte para a indução do florescimento, totalizando 371 h abaixo de 13 °C (Tabela 3).

Pela análise dos períodos de pré-florescimento, os maiores somatórios do número de horas de frio foram registrados na época de poda da primavera e de inverno (Tabela 3). Estes dois períodos estão relacionados com as temperaturas mínimas e médias consideradas como eficientes para promover a floração dos citros segundo MOSS (1969), que descreve que as temperaturas do ar promotoras da floração oscilam de 13 a 15 °C durante o dia e 10 a 13 °C durante a noite.

Porém, na poda de outono foi observado que no período de diferenciação floral, relacionado com o início das brotações e a formação das primeiras flores (B-IF), foram registradas temperaturas menores em relação ao período de pré-florescimento (Tabela 3). Este fato difere das podas de primavera e de inverno, nas quais as menores temperaturas foram registradas antes da poda (A) e as maiores temperaturas ocorreram entre a poda e o início da formação das flores (P-B acrescido de B-IF). No entanto, na poda de verão foram registradas somente altas temperaturas no período de pré-florescimento e de diferenciação floral, sendo estas maiores em relação às demais épocas de poda.

Segundo Cassin et al. (1969) a liberação do estresse por temperaturas mais altas desencadeia o desenvolvimento das estruturas reprodutivas, portanto para as plantas da laranjeira 'x11' submetidas a poda de outono, a ausência de altas temperaturas no período entre a poda e o início da formação das flores (P-B acrescido de B-IF) não foi um fator limitante para o desenvolvimento das estruturas florais.

Tabela 3 - Resumo do número de horas de frio abaixo de 13°C (NHF) e variação das temperaturas médias: mínima (mín), média (méd) e máxima (máx), durante o período de pré-florescimento e diferenciação floral de laranjeira 'x11', além da duração dos períodos nas diferentes épocas de poda.

	Período	NHF	Temperatura (°C)			Duração do período	
			mín	méd	máx	dias	datas
Poda outono	A	0	15	26	48	62	01/03-01/05
	P-B	47	9	22	43	18	02/05-20/05
	B-IF	182	7	19	36	22	21/05-12/06
Poda primavera	A	78	6	23	42	62	01/09-01/11
	P-B	20	10	25	43	14	02/11-15/11
	B-IF	13	12	27	45	15	16/11-30/11
Poda verão	A	0	14	26	44	62	10/12-09/02
	P-B	0	18	28	50	24	10/02-04/03
	B-IF	0	18	29	49	6	05/03-07/03
Poda inverno	A	302	7	21	44	62	01/06-01/08
	P-B	69	9	23	46	27	02/08-28-08
	B-IF	27	10	24	46	21	29/08-18/09

*A: antes da poda; P-B: poda à brotação; B-IF: brotação ao início do florescimento

A temperatura também exerce influência na duração do período de brotação, assim altas temperaturas (25 a 30 °C) durante o período de pré-florescimento tendem a diminuir o tempo da iniciação floral e florescimento, enquanto que as temperaturas mais baixas (13 a 19 °C) resultam em florescimento tardio (SPIEGEL-ROY; GOLDSCHMIDT, 1996).

De acordo com os dados de temperatura observados no presente estudo pode se concluir que na época de primavera e verão as plantas de 'x11' apresentaram um florescimento precoce devido a curta duração (15 e 6 dias) do período compreendido entre a brotação e o início do florescimento (B-IF). Este fato está relacionado com o menor número de horas de frio registrado nestas épocas e também a uma elevação da temperatura durante o período de brotação, a qual é capaz de promover uma antecipação da diferenciação e desenvolvimento das gemas já induzidas (Tabela 3). Já as plantas de 'x11' podadas nas épocas de outono e inverno apresentaram um atraso no início do florescimento (22 e 21 dias), devido ao maior número de horas de frio e ao menor aumento da temperatura durante o período de brotação (B-IF), em relação às demais épocas (Tabela 3). Portanto, com base nos

valores de temperatura registrados sugere-se que o estresse hídrico não foi necessário para a floração da laranjeira ‘x11’, tendo em vista que todas as plantas usadas no experimento foram irrigadas diariamente.

5.1.2 Caracterização morfológica dos ramos novos da laranjeira ‘x11’

De acordo com a classificação de Guardiola (1997) na laranjeira ‘x11’ predominam ramos com estruturas reprodutivas mistas, ou seja, ramos novos com flores e preferencialmente com folhas, este fato é importante já que as inflorescências que apresentam folhas possuem maior capacidade de retenção de frutos (AGUSTÍ et al., 1992) provavelmente porque possuem maior disponibilidade de carboidratos, maior força de dreno e melhor conexão vascular com o fruto, em decorrência da maior produção de hormônios pelas folhas (DAVIES; ALBRIGO, 1994). É importante ressaltar que a presença constante de folhas permite a atividade fotossintética durante todos os dias do ano, sendo possível a manutenção do suprimento de (açúcares) para o crescimento das plantas (SPIEGEL-ROY; GOLDSCHMIDT, 1996).

De maneira geral, nas quatro épocas de poda foram observadas a formação das mesmas estruturas reprodutivas e vegetativas, porém em porcentagem diferentes. Assim verificou-se que os ramos novos produziram principalmente brotações reprodutivas mistas uniflorais (flor terminal), multiflorais (flor lateral) e abortadas, além de brotações vegetativas (sem flor), todas com a presença de folhas (denominadas de estruturas mistas).

Na Figura 8 podem ser visualizadas as principais características das estruturas reprodutivas unifloral e multifloral. Percebe-se que na Figura 8A-C, denominada de unifloral, à presença de um botão floral terminal e único na região apical do ramo e com folhas expandidas nas axilas do ramo (A) e a presença de ramos novos com uma flor terminal aberta (B-C).

Já na Figura 8D-I, pode se observar a estrutura reprodutiva mista multifloral que é formada pela presença de um ramo com um botão floral terminal de maior tamanho e botões laterais únicos, fechados e de menor tamanho distribuídos nas axilas das folhas do ramo (Figura 8D). Notou-se, que os ramos possuem folhas e flores terminais as quais primeiramente se abrem enquanto os botões laterais permanecem fechados (Figura 8E), os

ramos novos também apresentaram comprimentos diferentes e com botões terminais e laterais fechados (Figura 8F).

Na Figura 8G-I percebe-se que os ramos novos não emitiram folhas, sendo classificadas em estruturas multiflorais (com flores terminais e laterais, porém sem folhas). Na Figura 8G notou-se a formação de pequenos ramos novos sem folhas, contendo flor terminal aberta e laterais fechadas formando várias estruturas florais pequenas e compactas. Também se observou várias flores laterais abertas unidas formando um cacho, este tipo de arranjo assemelha-se a um ‘buque’ de flores (Figura 8H). E notou-se à presença de ramos com várias flores bem unidas, porém mais espaçadas que aquelas presentes no ramo anterior (Figura 8I).

Com base nestas figuras também foi possível observar que os ramos com estruturas reprodutivas mistas uniflorais, produzem uma flor terminal, folhas e pequenos espinhos nas axilas das folhas, ao invés de flores. Já nas estruturas mistas multiflorais ocorreu primeiramente à abertura de uma flor terminal seguida pela iniciação simultânea de todas as flores laterais, já que as gemas nas posições basais do ramo somente desenvolvem flores e resposta a altos níveis de indução (VALIENTE; ALBRIGO, 2004). Esta dinâmica é evidentemente, um efeito da dominância apical comum em inflorescências cimosas, nas quais um meristema se torna irreversivelmente comprometido com a floração, dependendo de sua posição na inflorescência (LORD; ECKARD, 1987).

Também foi possível observar que as flores laterais estão arrançadas de três maneiras: distribuídas nas axilas das folhas ao longo do ramo, compactadas e em cachos, apresentando ramos com folhas ou sem folhas, dependendo do arranjo da estrutura. Os ramos com estruturas reprodutivas com flores terminais e laterais distribuídas no ramo (Figura 8A-F) estão associados à produção de alta porcentagem de frutos, em comparação com os ramos contendo estruturas reprodutivas multiflorais do tipo compactadas e em cachos, mas sem folhas (Figura 8G-I) (SAUER, 1951).

A proporção de cada tipo de inflorescência varia em função da intensidade de brotação e a variedade (DAVENPORT, 1990). Por exemplo, as brotações reprodutivas da tangerineira ‘Poncã’ estão relacionadas a altas quantidades de flores uniflorais preferencialmente com folhas (LELIS; SIQUEIRA; SANTOS, 2008). Outras espécies de tangerinas, como a ‘Satsuma’ (*Citrus unshiu* Marc.), apresentam padrão de florescimento semelhante, que, entretanto, diferem de outras espécies de citros como as laranjas doces, as quais apresentam uma grande proporção de flores multiflorais sem folhas (GUARDIOLA, 1997).

Figura 8 - Detalhe da estrutura reprodutiva mista unifloral (A-C) e multifloral (D-I). **A-** Ramo com botão floral terminal fechado; **B e C-** Ramo com flor terminal aberta; **D-** Ramo com botão floral terminal e botões laterais fechados; **E e F-** Ramos com flor terminal aberta e botões laterais fechados isolados; **G-** Ramos de menores tamanhos e com botões florais compactos; **H-** Ramos com flores abertas em cachos; **I-** Ramos com flores laterais abertas em cacho.

Na Figura 9 estão detalhados os ramos reprodutivos uniflorais abortados e também os ramos vegetativos. Pode se observar que alguns ramos novos apresentaram um botão floral terminal único contendo uma zona de abscisão, localizada na parte inferior do mesmo, que provoca o desprendimento dessas estruturas do ramo principal (Figura 9A-B). Também notou-se a presença de ramos novos com um botão floral com características senescentes, devido as marcas de abscisão de coloração marrom escura, na região apical (Figuras 9C-D). A abscisão de partes de plantas é, por definição, um processo fisiológico ativo devido à ruptura das paredes celulares (TAIZ; ZEIGER, 2006). Sugere-se que a abscisão em citros ocorre devido à formação de flores defeituosas, pois em torno de 83% das flores abortadas possuem anormalidades visíveis (ERICKSON; BRANNAMAN, 1960), bem como a abscisão pode ser estimulado por estresse, devido à deficiência de micronutrientes, como o zinco (KASKA, 1989), competição por fotoassimilados e condições ambientais adversas.

O desenvolvimento dos ramos vegetativos (presença só de folhas) foi marcado pelo aparecimento de um pequeno meristema na região apical, folhas e espinhos na posição lateral de cada ramo (Figura 9E-F). Segundo Guardiola (1997) essas estruturas são responsáveis pelo aumento da área foliar e pelo crescimento da copa, e ocorrem intensamente no período compreendido entre o verão e o outono.

Figura 9 - Detalhe da estrutura reprodutiva mista unifloral abortada (A-D) e vegetativa (E-F). **A e B-** Ramos com botão floral terminal ligeiramente desprendido; **C e D-** Ramo com a presença de botão floral terminal e meristema apical com coloração escura; **E e F-** Ramo com estrutura vegetativa.

5.1.3 Classificação e porcentagem dos ramos novos de laranjeira ‘x11’ em diferentes épocas de poda

A figura 10 mostra a classificação dos ramos novos de acordo com os diferentes tipos de estruturas formadas (reprodutivas e vegetativas), provenientes das gemas axilares de plantas de laranjeira adulta ‘x11’, enxertadas em dois porta-enxertos limoeiro ‘Cravo’ e citrumeleiro ‘Swingle’, quando submetidas a podas em quatro épocas de poda (primavera,

verão, outono e inverno). Os resultados das análises estatísticas desses dados encontram-se no Anexo A.

Verificou-se que há efeito da época de poda na classificação dos ramos novos ($p < 0,001$), ou seja, é altamente significativa a diferença entre os tipos de estruturas formadas nestes ramos quando submetidos as podas em diferentes épocas do ano, embora as estimativas das proporções para algumas destas estruturas pouco se deferiram. Os modelos ajustados mostraram que o efeito de porta-enxerto também foi significativo para cada uma das épocas de poda ($p < 0,001$), exceto para primavera ($p=0,0338$) (Anexo A).

Dessa forma, observou-se que as plantas de 'x11' quando podadas na época de primavera e outono, formaram uma maior proporção de ramos novos com flores uniflorais, com a presença de folhas. Embora não tenham sido verificadas diferenças significativas entre os porta-enxertos para a época de primavera, a estimativa de ramos com flores terminais foi maior em plantas enxertadas em 'Cravo' (79%) em relação às plantas em que o 'Swingle' foi o porta-enxerto (73%) (Figura 10). Já nas plantas submetidas à poda de outono, pôde-se verificar diferenças significativas entre os porta-enxertos 'Cravo' e 'Swingle', os quais apresentaram respectivamente 67% e 62% dos ramos novos com flores terminais. Estas estruturas também foram formadas nos ramos novos provenientes da poda de verão (6%) e inverno (24%), principalmente nas plantas de 'x11' sobre o porta-enxerto 'Swingle', porém em menores proporções quando comparadas com as demais épocas (Figura 10).

Os ramos novos reprodutivos multiflorais (terminais e laterais com ou sem folhas) formaram-se principalmente em plantas podadas na época de inverno. Verificou-se a formação de 84% e 70% dos ramos novos com flores multiflorais, nos porta-enxertos 'Cravo' e 'Swingle' respectivamente. Nas demais épocas de poda o número de ramos novos formados com este tipo de estrutura reprodutiva não foi expressivo, atingindo porcentagem em torno de 2% dos ramos podados na primavera e no verão (Figura 10).

Com relação à presença de ramos com flores abortadas, observou-se que houve uma maior proporção quando as plantas de 'x11' foram submetidas à poda de verão, sendo esta estimativa maior, em torno de 95% dos ramos novos de plantas enxertadas em 'Cravo'. Enquanto que as plantas de 'x11' enxertadas em 'Swingle' apresentaram um número maior de ramos com essa estrutura em torno de 16% na época de primavera e 11% na época de outono, já na época de inverno a presença de flor abortada foi de 1% dos ramos novos em ambos os porta-enxertos (Figura 10).

Na época de outono, as plantas de 'x11' enxertadas sobre 'Cravo' apresentaram uma maior proporção de ramos novos com brotações vegetativas (29%),

diferindo significativamente das plantas em ‘Swingle’ (27%) e também das demais épocas do ano. Nas plantas com o porta-enxerto ‘Swingle’ verificou-se uma maior proporção de ramos novos vegetativos nas podas de inverno (4%) e de primavera (9%) em relação ao porta enxerto ‘Cravo’ (Figura 10).

Figura 10 - Porcentagem dos ramos novos com estruturas reprodutivas mistas (unifloral, multifloral e abortada) e estruturas vegetativas (sem flor) oriundas das brotações das gemas laterais de laranjeira ‘x11’ enxertadas em limoeiro ‘Cravo’ e citrumeleiro ‘Swingle’, quando submetidas a quatro épocas de poda (primavera, verão, outono e inverno).

A duração e a intensidade das baixas temperaturas também podem influenciar no tipo de inflorescência formada (MOSS, 1969). Assim, é possível que a intensidade e distribuição do florescimento estejam relacionadas geralmente à intensidade e duração do estresse ocasionado pelas baixas temperaturas, quando a planta encontra-se em dormência (RIBEIRO; MACHADO; BRUNINI, 2006; SPIEGEL-ROY; GOLDSCHMIDT, 1996).

Com base nestes resultados, sugere-se que a intensidade e a formação das estruturas reprodutivas e vegetativas estejam relacionadas com o efeito da duração da indução ocorrida nas diferentes épocas de poda (Tabela 3). Assim, as plantas de ‘x11’ submetidas às podas de

primavera e outono emitiram um número maior de estruturas reprodutivas mistas uniflorais (flores terminais com folhas), pois o tempo de exposição a baixas temperaturas (98 h e 47 h) promoveu um efeito indutivo fraco com duração em torno de 76 e 80 dias, respectivamente. Por outro lado, na época de poda de inverno o maior acúmulo de baixas temperaturas (371 h) promoveu um efeito indutivo forte com duração em torno de 89 dias, o que favoreceu a formação mais intensa de ramos reprodutivos com estruturas multiflorais (flores laterais e terminais com e sem folhas).

Segundo Moss (1976) as plantas de laranja ‘Washington navel’ produziram uma porcentagem maior de ramos vegetativos e estruturas reprodutivas mistas (com folhas e flores) quando submetidas a um regime de indução de 24 °C dia/ 19 °C noite durante oito semanas, enquanto as plantas submetidas a 18 °C dia/ 13 °C noite, produziram predominantemente ramos com estruturas reprodutivas sem folhas. Portanto esses resultados indicam que há uma relação entre intensidade de floração e baixas temperaturas.

De modo inverso, as plantas de ‘x11’ podadas na época de verão, não submetidas às condições indutoras de florescimento, emitiram predominantemente estruturas reprodutivas abortadas em resposta as altas temperaturas registradas. Por outro lado, quanto maior foi o acúmulo de horas de permanência das plantas de ‘x11’ em baixas temperaturas, menor foi a emissão de estruturas vegetativas.

Geralmente, brotações de verão e outono são menos intensas e produzem exclusivamente ramos vegetativos (GUARDIOLA, 1997). No entanto, as plantas de ‘x11’ apresentaram fenótipo diferenciado, com brotações de verão formando ramos com estruturas reprodutivas abortadas enquanto que as brotações de outono, embora em menor intensidade que nas demais épocas, foram predominantemente de ramos reprodutivos com estruturas mistas uniflorais (65 a 70%) e ramos vegetativos (25 a 30%).

Em suma, foi possível observar que as podas realizadas nos ápices dos ramos velhos de laranjeira ‘x11’, em diferentes épocas do ano, promoveram a brotação de gemas dormentes, tanto em condições de altas quanto de baixas temperaturas. Sendo a maior intensidade de ramos reprodutivos com flores abortadas produzidos em altas temperaturas, enquanto que as estruturas reprodutivas uniflorais e multiflorais foram produzidas em condições de temperaturas amenas ou baixas.

Além das condições ambientais, outros fatores como variedade e porta-enxerto estão envolvidos nos processos de indução floral, de duração do período e da intensidade de formação das estruturas reprodutivas ou vegetativas, sendo que o porta-enxerto exerce

influência direta sobre a copa na adaptação as diferentes condições edafoclimáticas e na produção e qualidade de frutos (STUCHI et al., 2004).

Assim, ao se comparar os porta-enxertos utilizados, percebeu-se que as plantas de ‘x11’ enxertadas em limoeiro ‘Cravo’ apresentaram uma intensidade maior de ramos reprodutivos, principalmente com estruturas mistas uniflorais na época de poda de primavera e verão e de estruturas multiflorais na época de poda de inverno, em comparação as plantas enxertadas em citrumeleiro ‘Swingle’.

Os porta-enxertos possibilitam obter plantas cítricas com alteração de vigor, sendo considerado um dos fatores mais importante para a indução do florescimento e frutificação (ZIMMERMAN, 1972). Segundo Jaleel e Zekri (2002), plantas de ‘Valência de Olinda’ enxertadas sobre limoeiro ‘Cravo’ são mais vigorosas, mais precoces e produtivas que as sobre citrumeleiro ‘Swingle’.

Portanto, pode-se afirmar que as principais diferenças de intensidade e de formação das estruturas reprodutivas e vegetativas entre os porta-enxertos, estejam relacionadas com as características varietais dos porta-enxertos e também com as condições ambientais como, baixas temperaturas ocorridas nas épocas de poda, as quais afetaram diretamente o comportamento das plantas quando enxertadas em diferentes porta-enxertos.

5.1.4 Caracterização fenotípica dos ramos novos com estruturas reprodutivas mistas uniflorais de laranjeira ‘x11’ em diferentes épocas de poda

5.1.4.1 Número de dias necessários até a plena floração

Para se verificar a influência do porta-enxerto e da época de poda na antecipação ou no atraso da floração, foram registrados a partir do início do florescimento o número de dias necessários para que os ramos reprodutivos com estruturas do tipo uniflorais atingissem 100% das flores abertas, em três épocas de poda (primavera, outono e inverno), nas quais foram observadas flores terminais e também na época de verão, na qual foram avaliados os ramos reprodutivos abortados. Na Figura 11 pode se observar que em relação ao número de dias

necessários para atingir 100% das flores abertas, as plantas ‘x11’ enxertadas em ‘Cravo’ apresentaram florescimento precoce em relação ao ‘Swingle’, nas quatro épocas de avaliação.

Considerando as épocas de poda, o número de dias para o florescimento pleno dos ramos reprodutivos com flores terminais foi menor na época de poda da primavera em plantas de ‘x11’ em ‘Cravo’ (nove dias) e ‘Swingle’ (14 dias) em relação às demais épocas de poda. Sendo que na época de poda de verão os ramos com inflorescências do tipo abortadas se desenvolveram em cinco dias em plantas enxertadas em ‘Cravo’ e seis dias em plantas em ‘Swingle’ (Figura 11).

Na época de poda da primavera observou-se pelo número de dias do surgimento do primeiro botão floral até a abertura de 100% das flores, ambos os porta-enxertos apresentaram florescimento precoce, este padrão pode ter ocorrido como consequência do menor número de horas de frio (98 h). Enquanto que na época de poda de inverno o florescimento foi mais tardio em ambos os porta-enxertos, devido ao maior acúmulo de horas de baixas temperaturas (371 h).

Figura 11 Número de dias necessários para a ocorrência de 100% do florescimento em ramos novos de plantas de ‘x11’ enxertadas sobre limoeiro ‘Cravo’ e citrumeleiro ‘Swingle’, quando submetidas a quatro épocas de poda. Valores indicam as médias dos dias para o florescimento de nove plantas enxertadas em ‘Cravo’ e sete plantas em ‘Swingle’. Barras indicam o desvio padrão.

De acordo com Spiegel-Roy e Goldschmidt (1996) existe uma relação direta entre a intensidade do frio e o tempo para ocorrer à antese. Esses autores relatam que baixas temperaturas durante o período de inverno atrasam o início da brotação e consequentemente

resultaram em um florescimento tardio, enquanto temperaturas mais altas tendem a diminuir o período de iniciação floral e antese.

Portanto, a temperatura ambiente não somente afeta diretamente a indução e a diferenciação, mas também afeta a data e a intensidade do florescimento (CASSIN et al., 1969; GUARCÍA-LUIS et al., 1992).

5.1.4.2 Comprimento dos ramos novos e número de folhas/ramo

Na figura 12 encontram-se detalhadas as médias estimadas para o comprimento dos ramos (cm) e o número de folhas presentes nos ramos novos com brotações reprodutivas do tipo uniflorais, das plantas de ‘x11’ enxertadas sobre dois porta-enxertos ‘Cravo’ e ‘Swingle’, em três épocas de poda, as quais apresentaram estas estruturas. Os resultados das análises estatísticas desses dados encontram-se no Anexo B e C

Pôde-se observar que os fatores a época de poda e o porta-enxerto apresentaram diferenças significância (Anexo B e C), ou seja, estes dois fatores possuem influência no crescimento médio dos ramos e na quantidade de folhas presentes nos ramos novos com estruturas reprodutivas.

Considerando a variação sazonal do crescimento dos ramos (Figura 12), as plantas de ‘x11’ submetidas à poda de primavera apresentaram ramos significativamente maiores em relação às demais épocas de poda, sendo essa dinâmica também observada no número médio de folhas por ramo. Nas plantas de ‘x11’ enxertadas sobre ‘Cravo’, os maiores valores de crescimento dos ramos e a maior quantidade de folhas/ramo foram observados na poda de primavera (24 cm e 12 folhas/ramo) e de verão (23 cm e 11 folhas/ramo) e os menores valores ocorreram na época de poda de outono (22 cm e 11 folhas/ramo) e de inverno (19 cm e 10 folhas/ramo).

Embora Erickson e Brannaman (1960) reportaram a ocorrência de abscisão foliar em laranjeiras durante a primavera e o outono, as plantas ‘x11’ não apresentaram queda de folhas que levasse à redução do número foliar por ramo.

Figura 12 - Determinação dos valores médios dos comprimentos dos ramos e do número de folhas por ramo, de plantas de 'x11' sobre limoeiro 'Cravo' e citrumeleiro 'Swingle', quando submetidas a quatro épocas de poda. Os valores médios de 30 ramos de nove plantas de 'x11' enxertadas em 'Cravo' e de sete plantas em 'Swingle'. Barras indicam o desvio padrão.

De maneira geral, as plantas cresceram mais vigorosamente na época de poda de primavera e verão, apresentando maior comprimento de ramos e com mais folhas por ramo, em consequência do menor número de horas abaixo de 13 °C registradas nesses períodos (Figura 12). Segundo Khairi e Hall (1976) plantas condicionadas a temperaturas mais elevadas apresentaram um maior crescimento da parte aérea, assim como maior acúmulo de fitomassa foliar em citros, devido ao aumento progressivo da atividade metabólica. Enquanto que os menores crescimentos dos ramos e a menor quantidade de folhas (Figura 12) foram decorrentes das baixas temperaturas (≤ 13 °C), ocorridas nas épocas de poda de outono e inverno, evidenciando o papel regulatório da temperatura do ar em relação ao crescimento (REUTHER, 1973).

O uso de diferentes porta-enxertos também afetou o crescimento dos ramos reprodutivos das plantas 'x11' nas quatro épocas de poda. Assim, para as plantas em 'Swingle' verificou-se que estas apresentaram ramos reprodutivos com os menores comprimentos e com menores quantidades de folhas/ramo, quando comparado com as plantas enxertadas em 'Cravo', independente das épocas em que foram realizadas as podas.

Esses resultados são semelhantes ao observado por Quaggio et al. (2004), os quais verificaram que as plantas em citrumeleiro Swingle possuem menor volume de fitomassa e menor crescimento quando comparadas com as do porta-enxerto limoeiro Cravo. Este fato, também pode ter origem genética, pois o menor crescimento é uma característica do porta-

enxerto *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. e alguns de seus híbridos, caso do citrumeleiro ‘Swingle’ (POMPEU JUNIOR, 2005).

5.1.4.3 Determinação da viabilidade e germinação *in vitro* de grãos de pólen de laranjeira ‘x11’

Na Figura 13 estão detalhadas as porcentagem de grãos de polens viáveis e de germinação *in vitro* de grãos de pólen, provenientes das anteras das flores terminais das plantas de ‘x11’ enxertadas sobre ‘Cravo’ e ‘Swingle’ e em três épocas de poda, em que se observou a produção dessas estruturas reprodutivas. Os resultados das análises estatísticas desses dados encontram-se em Anexo D, E e F

Foram observados que há efeito da época de poda e do porta-enxerto nas taxas de germinação *in vitro* e viabilidade dos grãos de pólen ($p < 0,001$), ou seja, as probabilidades estimadas apresentados no Anexo D e F diferiram estatisticamente entre os porta-enxertos ‘Cravo’ e ‘Swingle’ e entre as épocas de poda. Segundo Cavalcante; Schifino-Wittmann e Dornelles (2000) há uma correlação positiva e significativa (0,80) entre a viabilidade avaliada pelo método de coloração com o corante carmim propiônico e a germinação *in vitro* do pólen, porém os resultados obtidos em plantas de ‘x11’ não foi observada nenhuma correlação significativa entre a taxa de viabilidade e germinação dos pólenes.

De maneira geral, notou-se na Figura 13 que as maiores probabilidades de germinação e viabilidade dos grãos de pólen estão associadas às plantas de ‘x11’ enxertadas sobre ‘Cravo’, em todas as épocas de poda (Anexo F).

Na estimativa da viabilidade dos grãos de pólen, considerável presença de grãos viáveis foi observada na época de poda de inverno, com valores de 92% e 90% de polens viáveis em plantas ‘x11’ enxertadas em ‘Cravo’ e ‘Swingle’. Já para as análises de capacidade de germinação *in vitro* dos grãos, as maiores porcentagens de germinação foi de 55% em plantas enxertadas em ‘Cravo’ e a menor de 53% em ‘Swingle’. Enquanto que a porcentagem mínima de viabilidade e germinação foi observada em plantas ‘x11’ submetidas à poda de primavera, com valores em torno de 60% de viabilidade e de 30% de germinação (Figura 13). Este resultado, na época de poda da primavera indicou uma maior presença de grãos anormais e não germinados, o que está associado a irregularidades no processo meiótico e ao baixo índice meiótico (CHEN et al., 2004).

Assim, sugere-se que a variação da viabilidade e da germinação dos grãos pólen pode ter sido influenciada por fatores genéticos associados aos distintos porta-enxertos utilizados, e que estes responderam de forma diferenciada aos fatores ambientais submetidos durante cada época de poda.

A taxa de viabilidade do pólen encontrada em plantas de 'x11', independente da época de poda e do porta-enxerto utilizado, foi semelhante aos resultados obtidos por Domingues; Tulmann Neto e Teófilo Sobrinho (2000) os quais encontraram valores entre 28,1% e 57,3%, na avaliação de diversos clones de laranjeira 'Pêra', ou seja a variabilidade é maior quando se compara distintas variedades de citros. Da mesma forma, a taxa de germinação do pólen em plantas de 'x11' foi semelhante às observações de Kobayashi et al. (1995), os quais avaliaram a capacidade de germinação *in vitro* dos grãos de pólen em quatro híbridos e encontraram valores entre 9,9% e 27% de germinação dos grãos, sendo um indicativo que a viabilidade dos grãos de pólen é reduzida nestes híbridos.

Em plantas de 'x11' independente da época de poda realizada, a maior porcentagem de viabilidade de pólen foi obtida através do método de coloração com carmim propiônico em comparação a germinação *in vitro*, este resultado concorda com o que foi sugerido por Moreira e Gurgel (1941), de que as análises pelo método colorimétrico podem superestimar a viabilidade destes.

Figura 13 - Determinação da porcentagem de grãos de pólen viável utilizando o carmim acético (2%) como corante (esquerda) e a porcentagem de grãos de pólen germinado *in vitro* (direita) da laranjeira 'x11' sobre dois porta-enxertos, em três épocas de poda.

A cor das anteras serve como indicativo inicial da variabilidade do pólen. Nas plantas de 'x11' a maioria das flores apresentaram anteras de cor amarela (Figura 14A), as quais possuem grãos de pólen viáveis. Cores distintas em anteras foram descritas por Brugnara et al. (2008) em híbridos de tangerina 'Montenegrina' com laranjeira 'Caipira',

sendo que anteras maduras de cor amarela e brilhantes produziram grãos de pólen férteis, enquanto que anteras brancas ou creme-pálidas não produziram grãos viáveis.

O teste de viabilidade com a coloração dos grãos de pólen com carmim acético (2%) está detalhado na Figura 14B, no caso de polens viáveis percebe-se uma coloração vermelha e grãos de pólen de tamanho normal, enquanto que grãos de pólen inviáveis são menores e sem coloração. (Figura 14B).

Figura 14 - (A) Flor da laranjeira 'x11' com antera de coloração normal; (B) Determinação da viabilidade de grãos de pólen pelo método do carmim acético (2%). I-grão de pólen inviável; V-grão de pólen viável.

As análises da viabilidade e a capacidade de germinação *in vitro* dos grãos de pólen, são essenciais na determinação da fertilidade masculina, já que em citros, a presença de grãos de pólen viáveis é necessária para a fertilização e formação das sementes (KOLTUNOW et al, 1995). Portanto, as plantas de 'x11' podem ser utilizadas nos programas de melhoramento por cruzamentos, principalmente quando submetidas à poda de inverno.

5.2 Caracterização morfo-anatômica do desenvolvimento das brotações de laranjeiras 'x11' e 'Valência'

O estudo morfo-anatômico foi realizado visando caracterizar a início dos processos de indução e diferenciação floral em gemas axilares da 'x11' e da 'Valência', comparando-os entre si e com os padrões de desenvolvimento observados em *Citrus sinensis* 'Washington Navel Orange' por Lord e Eckard (1985, 1987).

Essa caracterização foi necessária para compreender os processos envolvidos no florescimento da laranjeira 'x11', e desta forma, relacionar as mudanças dos estádios de

desenvolvimento floral com os padrões de expressão dos genes responsáveis pelo controle da formação dos órgãos florais. Como não existem estudos quanto à determinação dos estágios de desenvolvimento floral em citros, os critérios utilizados para *Arabidopsis thaliana* foram adaptados para citros por meio da visualização externa do desenvolvimento das brotações das gemas axilares.

5.2.1 Caracterização morfo-anatômica do desenvolvimento das brotações da laranja 'x11'

As gemas axilares com brotações nos estádios 1, 2 e 3 (Figuras 15A-C) foram caracterizadas pela presença de vários primórdios foliares, verdes-claros, de formato fino e alongado, os quais cobrem e dobram-se sob a região terminal da ramificação, protegendo o meristema apical. Ainda, nos estádios 2 e 3 notou-se que as brotações apresentaram um crescimento maior, com o alongamento e engrossamento do ramo jovem, o qual posteriormente formará o ramo lateral (Figuras 15B e 15C).

Em seguida, ao se remover a maioria dos primórdios foliares do ápice caulinar, foi possível observar os detalhes do diâmetro e da superfície dos meristemas apicais, circundados por pequenos primórdios foliares (Figura 15-G). No estádio 1 (Figura 15E) o meristema apical foi caracterizado por possuir um diâmetro reduzido e pela ausência de indícios que determinam o seu destino, em vegetativo ou floral. Nos estádios 2 e 3 notou-se um meristema apical de diâmetro maior, com a formação de saliências na sua superfície, o que provavelmente indica o início da formação dos primórdios de sépalas (Figuras 15F-G).

O estádio 4 (Figura 15H) foi marcado por um crescimento mais acentuado do ramo jovem, pela presença de primórdios foliares bem distanciados da região terminal do ápice, tornando visível o meristema apical, no qual se encontra um botão floral bem diferenciado ($\leq 0,5$ mm) e de coloração verde (Figura 15H).

Uma das dificuldades de se estudar a floração em citros é a impossibilidade de separar, morfológicamente, as estruturas vegetativas das reprodutivas, antes da brotação (DAVENPORT, 1990). Por esse motivo, as observações da morfologia externa e o acompanhamento do desenvolvimento anatômico foram realizados nos primeiros sinais da mudança da gema dormente para o início das brotações.

Figura 15 - Análise morfológica do desenvolvimento das brotações, provenientes de gemas axilares da laranja 'x11' adulta. **A e E-** Estádio 1, brotação com 3 mm de comprimento e detalhe do meristema apical; **B e F-** Estádio 2, brotação com 5 mm e detalhe do meristema floral; **C e G-** estágio 3, brotação com 7 mm e detalhe do meristema floral; **D e H-** Estádio 4, brotação com 13 cm e detalhe do meristema floral. Notar a presença de um botão floral visível. **Ma-** meristema apical (floral ou vegetativo); **Mf-** meristema apical floral; **Pf-** primórdio foliar; **Ps-** primórdio de sépala; **Rj-** ramo jovem. **Barras:** 500 μ m (Figuras A, B, C, D, E, H) e 250 μ m (Figuras F e G).

No estágio 1 e 2 do desenvolvimento das brotações da laranja 'x11' foram observados os primeiros sinais de formação dos primórdios florais, com o aparecimento de duas saliências na posição lateral do meristema apical, que indicam a formação dos primórdios de sépalas (Figura 16A-B). Em seguida, no estágio 3 iniciou-se o desenvolvimento dos primórdios de pétalas (Figura 16C) e no estágio 4 (Figura 16D) encontram-se diferenciados os estames e carpelos, ambos originados de células da zona central do meristema apical. Além disso, neste estágio notou-se que os primórdios de sépalas se sobrepõem protegendo os demais órgãos florais, enquanto que os primórdios de pétalas apresentaram um arranjo entremeado e se encontraram sobrepostos ao ápice.

O meristema floral apresentou um formato cônico nos estádios iniciais do desenvolvimento das gemas (Figuras 16A-C) e ao longo da iniciação dos órgãos florais o ápice adquiriu um diâmetro maior, devido ao aumento tanto em comprimento quanto em altura. Durante a formação dos carpelos, ocorreu a diminuição do diâmetro do ápice, o qual se

tornou totalmente diferenciado. Segundo LYNDON (1998) o aumento no tamanho do meristema durante desenvolvimento floral começa com o aumento na frequência de divisões celulares na região central do meristema.

Figura 16 - Análise anatômica do desenvolvimento do meristema apical das brotações, provenientes de gemas axilares da laranjeira 'x11' adulta. **A-**) Estádio 1, brotação com 3 mm de comprimento. Notar os primórdios de sépalas; **B-**) Estádio 2, brotação com 5 mm. Notar os primórdios de sépalas; **C-**) estágio 3, brotação com 7 mm. Notar a presença dos primórdios de pétalas; **D-**) Estádio 4, brotação com 13 mm e com botão floral visível. Notar a presença dos órgãos florais. **Mf**- meristema apical floral; **Pc**- primórdio de carpelos; **Pe**- primórdio de estames; **Pf**- primórdio foliar; **Pp**- primórdios de pétala; **Ps**- primórdio de sépala.

As principais mudanças anatômicas observadas durante o desenvolvimento do meristema reprodutivo na 'x11', foram correspondentes as descrições realizadas nos meristemas florais da laranja 'Pêra Rio' (PEREIRA; PINTO; DAVIDE, 2003) e 'Washington navel' (LORD; ECKARD, 1985, 1897).

Embora a laranjeira ‘x11’ seja um mutante que possui a capacidade de florescimento em várias épocas do ano, notou-se que este fenótipo não afetou as etapas de diferenciação dos órgãos, pois as sépalas, pétalas, estames e carpelos são produzidos sequencialmente e crescem em verticilos concêntricos. Por isso, a ‘x11’ assemelha-se as demais laranjeiras quanto à disposição dos órgãos florais em verticilos, diferindo somente no tempo de indução e duração da diferenciação floral.

Na Figura 17, verifica a variação semanal da temperatura entre abril a junho de 2012, o período que corresponde à indução foi estabelecido entre o dia 01/04 (um mês antes da poda) até o dia 20/05 (quando foi observado o início do desenvolvimento das brotações). Neste período notou-se que as temperaturas variaram em torno de 9 a 18 °C para as mínimas, de 21 a 28 °C para as médias e de 37 a 49 °C para as máximas e o número de horas de frio ($T_{\text{mín}} < 13\text{ °C}$) totalizou cerca de 180 horas, valor que classifica o período como “moderado” de indução por baixas temperaturas (RIBEIRO; MACHADO; BRUNINI, 2006; VALIENTE; ALBRIGO, 2004), que ditam a soma do número de horas de frio (NHF) abaixo de 13 °C como uma escala de definição da condição ambiental favorável ao florescimento.

A laranjeira ‘x11’ apresentou 80% dos ramos novos com estruturas reprodutivas mistas uniflorais (flores terminais com folhas), enquanto que a ‘Valência’ produziu somente estruturas vegetativas.

Com base nestes resultados, supõe-se que um mínimo de horas de frio abaixo de 13 °C aliado a uma poda não severa dos ramos pode ser considerado um processo indutivo eficiente em plantas adultas de ‘x11’. Já que este procedimento foi capaz de quebrar a dominância apical e promover o desenvolvimento e o florescimento das gemas axilares somente na ‘x11’, num período em que as condições ambientais, principalmente as baixas temperaturas, não foram suficientes para a indução do florescimento na laranjeira ‘Valência’.

Figura 17 - Temperaturas máxima, média e mínima semanal verificada entre abril e junho de 2012, pelo monitoramento realizado pelo equipamento HOBO na casa de vegetação. As setas indicam as semanas nas quais foram feitas a poda e as coletas das brotações nos quatro estádios de desenvolvimento: estágio 1, com 3 mm (E1), estágio 2, com 5 mm (E2), estágio 3, com 7 mm (E3) e estágio 4, com 13 mm de comprimento (E4).

Através dos cortes anatômicos realizados na ‘x11’, foi possível caracterizar somente as principais modificações morfológicas que ocorreram durante o desenvolvimento floral. Não foi possível identificar com precisão o momento em que ocorreu a indução e em que momento os estímulos foram suficientes para promover a transição floral, em que a gema vegetativa passa à reprodutiva.

Então, com base nas características fenotípicas da ‘x11’ foi possível determinar de forma precisa somente os eventos cronológicos transcorridos do início do desenvolvimento das brotações até a formação completa das estruturas reprodutivas. Para isto, a poda foi considerada como sendo um marco dos processos de iniciação floral, a partir do qual o desenvolvimento das brotações iniciou-se entre 10 a 15 dias e a diferenciação dos órgãos florais entre 15 a 25 dias e a antese (100% dos botões abertos) após 40 dias da poda.

5.2.2 Caracterização morfo-anatômica do desenvolvimento das brotações da laranjeira ‘Valência’

Nas Figuras 18A-D, analisando-se a morfologia externa das brotações de ‘Valência’ não foi possível nas amostras coletadas nos três estádios iniciais do desenvolvimento das brotações (3, 5 e 7 mm) diferenças morfológicas em relação aos meristemas apicais da laranjeira ‘x11’. Assim não foi possível determinar nestes estádios de desenvolvimento, em ambas as laranjeiras, se os meristemas formarão ramos vegetativos ou reprodutivos (Figuras 18A-C). Em todas as brotações coletadas da ‘Valência’ notou-se que primórdios foliares mais espaçados da região central da ramificação (Figuras 18A-D), bem como os ramos jovens apareceram mais definidos e alongados nos estádios 3 e 4 (Figuras 18C-D) do que nos estádios anteriores.

Ao se remover os primórdios foliares dos ápices caulinares foi possível visualizar em detalhe que a superfície superior do meristema apical é bem lisa e sem protuberâncias, recobertas por primórdios florais (Figuras 18E-H), mesmo no estágio 4. Além disso, os meristemas apicais apresentaram diâmetro bem reduzido, de coloração amarela e de formato semelhante nas brotações dos quatro estádios avaliados e sem indícios de diferenciação floral. Este é um indício de que os meristemas apicais de laranjeira ‘Valência’ formariam somente estruturas vegetativas.

Figura 18 - Análise morfológica do desenvolvimento das brotações, provenientes de gemas axilares da laranjeira 'Valência'. **A e E-**) Estádio 1, brotação com 3 mm de comprimento e detalhe do meristema apical vegetativo; **B e F-**) Estádio 2, brotação com 5 mm e detalhe do meristema apical vegetativo; **C e G-**) Estádio 3, brotação com 7 mm e detalhe do meristema apical vegetativo; **D e H-**) Estádio 4, brotação com 13 cm e detalhe do meristema apical vegetativo. **Mv-** meristema apical vegetativo; **Pf-** primórdio foliar; **Rj-** ramo jovem. **Barras:** 500 μ m (Figuras A, B, C, D, E, H) e 250 μ m (Figuras F e G).

As observações dos cortes histológicos longitudinais da laranjeira 'Valência', realizados no estágio 1 (Figura 19A) mostraram um meristema apical de formato estreito e achatado, notou-se um expressivo aumento na proliferação celular nas regiões laterais do ápice o que evidencia o início da formação dos primórdios foliares. Nos estádios 2, 3 e 4 (Figuras 19B-D) os meristemas apicais adquiriram um formato levemente arredondado e longitudinalmente menor, com uma contínua formação dos primórdios foliares nas laterais do ápice.

Segundo LYNDON (1998) o meristema apical vegetativo não produz somente folhas, mas também nós, os quais as folhas ficam presas, com internódios abaixo das folhas e espinhos. No entanto, estas estruturas são mais difíceis de serem distinguidas dos tecidos meristemáticos adjacentes, particularmente nos estádios iniciais de desenvolvimento do ápice caular. Os tecidos internos das folhas são derivados principalmente de camadas da túnica,

enquanto os tecidos do nó e dos internódios são derivados do ambos das células do corpo e da túnica (FAHN, 1990).

Figura 19 - Análise anatômica do desenvolvimento do meristema apical das brotações, provenientes de gemas axilares da ‘Valência’. **A-)** Estádio 1, brotação com 3 mm de comprimento. **B-)** Estádio 2, brotação com 5 mm. **C-)** Estádio 3, brotação com 7 mm; **D-)** Estádio 4, brotação com 13 cm. **Mv**- meristema apical vegetativo; **Pf**- primórdio foliar;

Ao analisar as características fenotípicas de ‘Valência’ observou-se que 100% dos ramos novos eram vegetativos, isto indica que nesta laranjeira as gemas axilares de outono, não foram induzidas ao florescimento, nem por baixas temperaturas e nem por poda. Portanto, está prática não pode ser recomendada como um processo indutivo suficientemente capaz de promover o florescimento em plantas adultas de ‘Valência’ no período de outono.

Com base nos eventos cronológicos verificou-se que o desenvolvimento vegetativo na ‘Valência’ foi mais lento que o desenvolvimento floral na ‘x11’. Já que o tempo transcorrido para a formação dos ramos vegetativos iniciou-se de 20 a 25 dias após a poda

com as primeiras brotações visíveis e os ramos atingiram o seu crescimento máximo entre 30 a 40 dias da poda.

Além disso, os meristemas tornaram-se vegetativos na ‘Valência’, pois se originaram de ramos com internódios longos, folhas largas e com espinhos. Esse fato reforça a descrição de Lord e Eckard (1985), na qual ramos com ápices produzindo folhas apicais também produzirão espinhos axilares, e consequentemente gemas vegetativas.

Uma vez que, as gemas florais na ‘x11’ só podem ser distinguidas das gemas vegetativas na ‘Valência’ através das modificações anatômicas após a brotação das gemas, uma análise comparativa mais detalhada demonstra que a ‘x11’ possui um ápice com formato cônico pronunciado e diâmetro maior (Figura 16) que o ápice vegetativo da ‘Valência’. Além disso, na ‘Valência’ o ápice mantém a forma e o diâmetro relativamente constante durante o desenvolvimento das brotações (Figura 19).

Segundo Pidkowich, Klenz, e Haughn (1999) o meristema vegetativo é indeterminado e cresce indefinidamente, enquanto o meristema floral é determinado e termina quando todos os órgãos florais estão formados. Assim, fica claro que o desenvolvimento floral requer a coordenação de um conjunto complexo de eventos. Vários estudos moleculares e genéticos têm identificado vários genes que regulam o destino das células nos meristemas florais e de que maneira a determinação do meristema floral é regulada em relação à indeterminação do meristema vegetativo (LIU; THONG; YU, 2009; WIGGE et al., 2005).

Portanto, a formação de meristemas vegetativos ou florais é considerada um processo crítico para desenvolvimento da planta de citros, marcado por mudanças a nível molecular, fisiológico, hormonal e morfológico do ápice caulinar, o qual é influenciado por diversos sinais endógenos e ambientais.

5.3 Caracterização molecular dos genes envolvidos na indução e no florescimento de plantas adultas e juvenis de laranjeira ‘x11’ em relação a ‘Valência’

5.3.1 Seleção do material vegetal e condições ambientais

Com base no experimento prévio de caracterização morfo-anatômica dos meristemas apicais adultos (Item 5.2) da laranjeira ‘x11’ e do controle ‘Valência’, foram selecionadas brotações em três diferentes estádios de desenvolvimento, as quais devido às modificações anatômicas observadas foram consideradas determinantes na formação dos meristemas florais.

Por isso, para plantas adultas de laranjeira ‘x11’ e de ‘Valência’ foram coletadas no estágio 1, gemas dormentes (≤ 1 mm) mencionadas dessa forma pela ausência de crescimento visível antes da poda. Para o estágio 2 foram selecionadas as brotações com 7 mm, as quais pelas análises anatômicas indicaram a formação dos primórdios de pétalas e no estágio 3 foram selecionadas as brotações com 13 mm com botão floral visível completo (Figura 16). Para as plantas juvenis de ‘x11’ e de ‘Valência’ foram coletadas as brotações nos mesmos comprimentos dos materiais adultos, porém estas brotações apresentaram somente estruturas vegetativas (Figura 19).

Durante a transição da fase vegetativa para a reprodutiva em plantas adultas de citros, a indução do florescimento ocorre quando as temperaturas decrescem no outono e no inverno, quando as taxas de crescimento diminuem ou cessam, possibilitando a transição das gemas vegetativas em reprodutivas. Enquanto a diferenciação ocorre quando as temperaturas aumentam na primavera.

Na Figura 20, pode se observar o comportamento da variação semanal das temperaturas entre junho a agosto. Do período de indução do florescimento (01.06) até o início do crescimento das brotações (dia 20.06) as temperaturas variaram entre 7 a 11 °C, para as mínimas, 17 a 24 °C para as médias e 33 a 45 °C para as máximas. O número de horas de frio ($T_{\text{mín}} < 13$ °C) ocorridos no mesmo período totalizou 278 horas, valor que o classifica como ‘moderado’ para a indução do florescimento em citros (RIBEIRO; MACHADO; BRUNINI, 2006; VALIENTE; ALBRIGO, 2004), que ditam a soma do número de horas de

frio (NHF) abaixo de 13 °C como uma escala de definição da condição ambiental favorável a indução do florescimento.

Avaliando as temperaturas mínimas e o número de horas de frio, evidenciou-se que a diminuição verificada nos meses de junho e julho foi adequada para o processo de indução floral, e um aumento das temperaturas médias a partir de agosto, foi relacionado com o período de iniciação floral.

Figura 20 - Temperatura máxima, média e mínima semanal verificada entre junho e agosto de 2012 de acordo com o monitoramento realizado pelo equipamento HOBO na casa de vegetação. As setas indicam às semanas, as quais foram feitas as coletas das brotações nos três estágios de desenvolvimento: estágio 1, gema dormente (E1) e poda, estágio 2, brotação com 7 mm (E2) e estágio 3, brotação com 13 mm (E3).

O florescimento de 100% das plantas ocorreu no mês de agosto, com diferenças entre as laranjeiras para o número de brotações emitidas conforme os dados da Tabela 4. De maneira geral, predominaram as brotações reprodutivas mistas multiflorais (flores terminais e laterais) nas duas cultivares, sendo que na 'x11' a porcentagem de brotações mistas uniflorais (flores terminais) foi maior que na 'Valência'. As plantas juvenis de ambas as laranjeiras apresentaram somente brotações vegetativas.

Tabela 4 - Avaliação do número total de brotações (NB), vegetativas (BV), reprodutivas (BR), mistas uniflorais (MU), mistas multiflorais (MM) e mista uniflora abortada (MA), emitidas durante o florescimento das laranjeiras adultas de 'x11' e da 'Valência' (controle)

Laranjeira	NB	BV	BR	MU (%)*	MM (%)*	MA (%)*
'Valência'	128	5	123	3,6	94,0	2,4
'x11'	132	4	128	20,4	79,6	0

(*) número brotações mistas/número total de brotações reprodutivas

5.3.2 Extração, quantificação e análise de RNA

Após a seleção das brotações que, foi realizada a extração do RNA total das amostras de meristema dos três estádios de desenvolvimento, provenientes de três plantas adultas e juvenis das laranjeiras Valência e 'x11', em triplicata biológica. Em seguida, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro e analisadas por eletroforese em gel de agarose (Figura 21), depois de confirmada a integridade do RNA total, as amostras foram submetidas à síntese de cDNA.

Figura 21 - RNA total das brotações das laranjeiras 'Valência' (controle 'C') e 'x11', obtido pelo Kit de extração. (1° repetição biológica). Amostras das brotações em três estádios de desenvolvimento, do material adulto (A) e juvenil (j): C.A-1 (1), C.A-2 (2), C.A-3 (3), x11.A-1 (4), x11.A-2 (5), x11.A-3 (6), C.j-1 (7), C.j-2 (8), C.j-3 (9), x11.j-1 (10), x11.j-2 (11), x11.j-3 (12).

Para validar a eficiência da síntese, as amostras de cDNA foram diluídas a 1:10 (v/v) e utilizadas como fita molde em reações de PCR utilizando-se o *primer* do gene *Rpl45* (gene de referência). Os produtos da amplificação foram separados e visualizados por eletroforese em gel de agarose, demonstrando que os cDNAs estavam sintetizados (Figura 22).

Figura 22 - Amplificação das amostras das brotações das laranjeiras ‘Valência’ (‘C’) e ‘x11’ com o iniciador de referência Rpl45 (1^o repetição biológica). (M) marcador de peso molecular 100 pb. Amostras das brotações em três estádios de desenvolvimento do material adulto (A) e juvenil (j): C.A-1 (1), C.A-2 (2), C.A-3 (3), x11.A-1 (4), x11.A-2 (5), x11.A-3 (6), C.j-1 (7), C.j-2 (8), C.j-3 (9), x11.j-1 (10), x11.j-2 (11), x11.j-3 (12) e branco (b).

5.3.3 Construção e determinação da eficiência dos iniciadores

Foram desenhados iniciadores específicos de nove genes envolvidos na indução e no florescimento de *Citrus sinensis* [L.] Osbeck, (Tabela 5), a partir das sequências gênicas transcritas.

Em seguida, para confirmar a identidade dos produtos de amplificação (*amplicom*) e avaliar a existência de íntrons nas sequências amplificadas dos genes envolvidos no florescimento, foi realizada uma amplificação com os nove iniciadores específicos empregando o cDNA e o DNA genômico da laranjeira ‘x11’, para confirmar o tamanho das sequências amplificadas. Os nove genes testados amplificaram as sequências de cDNA e de DNA genômico, sendo também observado que os genes *FT*, *TFL1* e *SPV* não apresentaram íntrons, pois não houve diferenças nos tamanhos dos *amplicons* de DNA e de cDNA, enquanto que para os demais genes, o tamanho do *amplicom* na sequência genômica foi maior que nos cDNAs, o que indica a presença de um íntrons na sequência genômica.

Tabela 5 - Descrição dos iniciadores específicos (alvos) de citros desenhados para a análise transcricional dos genes; com suas respectivas siglas, seqüências dos iniciadores e tamanho do *amplicon* (pb).

Gene	Sequência (5'-3')	Amplicon (pb)	Íntron
<i>API</i>	F: TCTACTTCCACAGCCACCTC R: AGTTCATCCAGCAAAGCATC	141	
<i>BAM</i>	F: CATTTTCTCCTCCTCCTCCA R: AAACAATAAGGCAGCACCA	114	
<i>LFY</i>	F: GGTCCAGAACATCGCCAAG R: TGAAAGCCCTCCTCAGTGC	186	
<i>FLC</i>	F: CTCATTGGGCATCTTTGGTG R: GCCGCTGCTGTTGTATCATTA	151	
<i>FT</i>	F: CGGCAACTTGGAAGGCAG R: CGGAGGTCCCAGATTGTAAA	94	não
<i>SOCI</i>	F: TTCAATGAGCAGATGGGGC R: CTTCTTTCCGTTGGGTCG	118	
<i>SVP</i>	F: TGCCGAAAAAAGCCATCTG R: CCAATCCAACCTTCAAGAGACC	104	não
<i>TFLI</i>	F: AGAATGTTAGAACCTCTCGCTG R: TGAAACAACGTGGACGGAAA	142	não
<i>WUS</i>	F: GGGGTTTCTGCTACACTTCCT R: CCGCCAACAACACTGCTAC	147	

A curva de eficiência para cada iniciador específico dos nove genes foi realizada utilizando-se um pool do cDNA das brotações em desenvolvimento da laranjeira 'x11' e de 'Valência' em diluições seriadas de 1:10, 1:100 e 1:1000 (v/v). Para os genes *FT*, *TFLI* foram realizadas diluições nas concentrações 1:10, 1:20 e 1:40 (v/v).

Todos os nove iniciadores testados foram considerados como funcionais, com valores de eficiência de amplificação variando de 0,80 (gene *SVP*) a 1,0 (*FT* e *TFLI*) e valores de correlação R^2 acima de 0,98 (Tabela 6).

Tabela 6 - Valores de eficiência e R² dos genes envolvidos na indução e no florescimento de citros, obtidos através de curva de eficiência por RT-qPCR

Gene	Eficiência	R ²
<i>API</i>	0,81	0,98
<i>BAM</i>	0,89	0,90
<i>LFY</i>	0,98	0,98
<i>FLC</i>	0,91	0,99
<i>FT</i>	1,0	0,98
<i>SOC1</i>	0,81	0,99
<i>SVP</i>	0,80	0,98
<i>TFL1</i>	1,0	0,98
<i>WUS</i>	0,90	0,98

5.3.4 Análise e quantificação dos transcritos dos genes envolvidos na indução e no florescimento de plantas adultas e juvenis de laranjeira ‘x11’ em relação à ‘Valência’

5.3.4.1 Expressão dos genes integradores *FLOWERING LOCUS T (FT)*, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 (SOC1)* e *LEAFY (LFY)*

Para entender os mecanismos moleculares envolvidos na indução e diferenciação floral da laranjeira ‘x11’ em relação à laranjeira ‘Valência’, os níveis de expressão dos nove genes selecionados foram examinados em brotações em três estádios de desenvolvimento provenientes de gemas axilares das plantas adultas e juvenis. As mudanças nos níveis dos transcritos destes genes estão detalhadas nas Figuras 23, 24 e 25.

Com relação ao gene *FLOWERING LOCUS T (FT)*, principal integrador de diferentes vias que promovem o florescimento, avaliou-se no presente estudo a expressão do gene *CiFT3*, descrito por Nishikawa et al. (2007). Em brotações adultas de ‘x11’ o número de transcritos foi maior no estágio 1 em relação à laranjeira ‘x11’, com uma expressiva diminuição nos estádios seguintes (2 e 3). Fazendo uma análise mais detalhada dos estádios de desenvolvimento, o número elevado de transcritos encontrados no estágio 1, indica que o *FT* está relacionado com o processo de indução, pois em seguida promoveu a brotação das gemas dormentes. E a diminuição acentuada no estágio 2 e 3 coincidem, respectivamente,

com os processos de diferenciação floral, devido à formação dos primórdios de órgãos florais (pétalas) e desenvolvimento completo do botão floral (Figura 23).

Apesar de ambas as laranjeiras terem apresentado florescimento neste ensaio, os resultados observados em relação à maior expressão do gene *FT* em plantas adultas de ‘x11’ no estágio 1, indicam que este gene pode estar relacionado com as características diferenciais que esta planta apresenta, tais como: florescimento precoce das plantas juvenis e o florescimento em várias épocas do ano, independente de estímulos ambientais. No entanto, para a confirmação desta hipótese, novos experimentos deverão ser realizados, com avaliações do florescimento e da expressão em outras épocas.

No caso das plantas juvenis, como ambas as variedades não floresceram no ensaio, o número de transcritos do gene *FT* foi semelhante no estágio 1 das plantas. Um ensaio adicional que poderia fornecer resultados esclarecedores seria uma análise da expressão deste gene em plantas juvenis de ‘x11’ que já floresceram em comparação com plantas juvenis de ‘Valência’ e de ‘x11’ que não floresceram.

Na tangerina ‘Satsuma’ (*Citrus unshiu* Marc) foi demonstrado que dois homólogos do gene *FT*, *CiFT1* e *CiFT2*, os quais são expressos em altos níveis em frutos jovens e não participam na transição do florescimento. Somente o terceiro homólogo de *FT*, *CiFT3*, expresso em baixos níveis nas folhas e ramos, e não expresso em órgãos florais, parece atuar como um papel chave na indução do florescimento (NISHIKAWA et al., 2007). Um padrão de expressão contrário ao observado em citros, foi encontrado em dois homólogos de *FT* de maçã, *MdFT1* e *MdFT2*, os quais foram expressos respectivamente em gemas apicais de ramos em frutificação e em órgãos reprodutivos de plantas adultas, promovendo o florescimento precoce nesta espécie (KOTODA et al., 2010).

Em citros, assume-se que *FT* também é um sinal móvel do florescimento, e que o aumento na expressão durante a indução floral pode ser regulado por fatores ambientais como baixa temperatura e déficit hídrico, e não sendo regulado pelo fotoperíodo, como ocorre em *Arabidopsis*, já que o florescimento em citros não é considerado dependente do fotoperíodo (CHICA, ABRIGO, 2011; NISHIKAWA et al., 2009).

Os resultados observados no presente estudo indicam que o padrão de acúmulo de transcritos do gene *FT* em plantas adultas de ‘x11’ pode ser regulado pelas várias vias de indução, principalmente pelas baixas temperaturas que ocorreram durante a indução floral (entre junho e julho) (Figura 23).

Outro importante gene integrador das múltiplas vias promotoras do florescimento no meristema apical, o gene *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 (SOC1)*,

apresentou em plantas adultas de 'x11' uma transcrição moderada nos três estádios de desenvolvimento das brotações, em relação às plantas da laranjeira do controle. As maiores diferenças entre 'x11' e 'Valência' foram encontradas no estágio 1, o que coincide com a indução floral, e no estágio 3, quando o botão floral está totalmente diferenciado nos órgãos florais. Enquanto que, nas plantas juvenis de 'x11', este gene foi reprimido em todos os estádios de desenvolvimento em relação aos respectivos controles juvenis (Figura 23). Diante destes resultados, pode se considerar que o gene *SOCI* possivelmente não esteja relacionado com as características diferenciais de florescimento observadas na laranjeira adulta de 'x11'.

De acordo com Chica e Albrigo (2011), baixas temperaturas induzem a um maior acúmulo de transcritos de *CsSOCI* em *C. sinensis* durante a indução floral. Segundo Tan; Swain (2007) transcritos do gene *SOCI* foram encontrados nos quatro verticilos florais em botões florais fechados e abertos de 'Bellamy Navel' (*Citrus sinensis* L.), embora ainda não seja claro o papel de *SOCI* nos estádios mais avançados do desenvolvimento dos órgãos florais de citros. No mutante precoce de *P.trifoliata* que apresenta fenótipo semelhante a laranjeira 'x11', a expressão de *SOCI* está correlacionada com a indução floral, desenvolvimento das inflorescências e florescimento precoce (ZHANG et al., 2011).

A dinâmica de expressão observada nas plantas adultas de 'x11' indicou que, além de controlar o tempo de florescimento por diferentes estímulos, o gene *SOCI* também pode ser requerido para a expressão da identidade da função dos órgãos florais.

Quando *SOCI* é induzido no ápice caulinar junto com *AGL24*, diretamente ativam *LFY*, um gene considerado como integrador das múltiplas vias do florescimento e da identidade do meristema floral (PARCY, 2005).

Na Figura 23, observou-se que nas gemas dormentes (estádio 1) de plantas adultas de 'x11', os transcritos do gene *LFY* estavam presentes em menores níveis que as gemas do controle. Nos estádios seguintes, este gene atingiu níveis de transcritos bem mais elevados, entre 2 e 2,5 vezes maior que o controle, respectivamente quando os primórdios florais começaram a se desenvolver (estádio 2) e na presença do botão floral (estádio 3). Níveis semelhantes dos transcritos do gene *LFY* foram encontrados no estágio 1 entre as plantas juvenis de 'x11' e 'Valência', enquanto que nos estádios 2 e 3 foram observados níveis relativamente baixos nas plantas juvenis de 'x11' em relação as plantas juvenis de 'Valência'.

Os resultados observados em plantas adultas estão consistentes com os estudos de Pillitteri, Lovatt e Walling (2004b) em laranjeira 'Washington navel', no qual a expressão de *LFY* foi restrita aos botões florais e ramos completos com flores precoces, e não foi detectado em tecidos vegetativos como sementes, raízes e folhas.

Dada a importância de *LEAFY* (*LFY*) em especificar a identidade do meristema floral, sabe-se que a regulação espacial e temporal da atividade *LFY* é um fator importante que determina quando (o tempo de floração) e onde (inflorescência arquitetura) as flores serão formadas. Dessa forma, nas inflorescências cimosas ou simpodiais, a identidade floral é especificada primeiramente nos meristemas apicais florais, enquanto os meristemas laterais simpodiais são transitoriamente reprimidos, e em seguida eventualmente também adquirem identidade floral (MOYROUND et al., 2010). Este tipo de inflorescência é comum em citros e também em tabaco, tomate e petúnia, cujos ortólogos de *LFY* são expressos em padrões diferentes ao das inflorescências racemosas de *Arabidopsis*, que expressam *LFY* na fase vegetativa, especificamente nos primórdios foliares, de maneira constante até que os transcritos atinjam um limite e a floração seja desencadeada através da ativação direta do gene *APETALA1* (BENLLOCH et al., 2007; PARCY, 2005).

Figura 23 - Expressão relativa dos genes integradores do florescimento em plantas adultas (coluna esquerda) e juvenis (coluna direita) da laranjeira 'x11' em relação ao controle 'Valência'. Eixo X: estágio de desenvolvimento das brotações (E1-gema dormente; E2-brotação com 7 mm; E3-brotação com 13 mm de comprimento). Eixo Y: expressão relativa, indicando o número de vezes que foi expresso ao longo do desenvolvimento das brotações.

5.3.4.2 Expressão dos genes repressores *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)* e *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)*

O gene *FLC* desempenha uma papel importante na repressão do florescimento, sendo regulado por duas vias a autônoma e a da vernalização. Com a retirada desse repressor floral, a expressão do *FT* e *SOC1* é induzida e estes irão promover a transição do meristema vegetativo em floral pela ativação dos genes de identidade de meristema floral (HELLIWELL et al., 2006; SEARLE et al., 2006).

O nível de expressão do gene *FLOWERING LOCUS C (FLC)* nas plantas adultas de ‘x11’ foi maior que o das plantas de ‘Valência’ em cada estágio de desenvolvimento. Porém foi observado um baixo acúmulo de transcritos, atingindo no estágio 1 valores em torno de 1,5 vezes maior que o controle, e este acúmulo diminui em função do avanço do desenvolvimento das brotações (estádio 2 e 3). Já as plantas juvenis de ‘x11’ apresentaram um maior nível de expressão no estágio 1 em relação ao controle, e uma expressão semelhante nas duas variedades nos estádios posteriores (Figura 24).

Zhang et al., (2009a) encontraram no mutante *P.trifoliata* um nível de transcritos de *PtFLC* maior em plantas juvenis que em adultas durante o inverno, enquanto que expressão espacial do mutante por hibridização *in situ* revela que este gene é predominantemente expresso em meristemas vegetativos e reprodutivos.

Ao se analisar a influência da vernalização na expressão de *FLC* nas plantas adultas de ‘x11’ e no controle, percebeu-se que no período de inverno, antes e depois da poda (de junho a julho) as temperaturas variaram em torno de 13 °C, sugerido por Medina et al., (1999) como suficiente para estimular o florescimento. Portanto, a baixa temperatura pode estar envolvida na eliminação da dormência (estádio 1) e indução do florescimento devido à alta expressão de *FLC*. Especula-se que o gene *FLC* pode estar envolvido na regulação da dormência em citros (ZHANG et al., 2009a) e este padrão é similar ao observado em *Populus trichocarpa* (ROHDE; BHALERAO, 2007).

O ligeiro aumento da temperatura ($\cong 23$ °C) coincidiu com a formação das estruturas e do botão floral (estádios 2 e 3), embora não tenha sido suficiente para reprimir a expressão deste gene, como o observado por Zhang et al., (2009a) em que um aumento de 2 °C na temperatura, após a exposição ao frio, foi capaz de promover a repressão do *FLC* e o florescimento no mutante *P.trifoliata* precoce.

Este padrão de expressão de *FLC* nos citros também é observado em outras perenes, como *Populus trichocarpa* (ROHDE; BHALERAO, 2007), nas quais a vernalização promove à expressão, e em temperaturas altas ocorre a repressão, porém esta dinâmica é contrária a observada em *Arabidopsis*, na qual baixas temperaturas diminuem a sua expressão (MICHAELS; AMASINO, 1999).

Portanto, maiores esclarecimentos sobre as flutuações da expressão do gene *FLC* e seus mecanismos regulatórios em plantas perenes são necessários, já que a maioria dos estudos se baseia em dados obtidos de plantas modelos anuais. Assim, a repetição deste ensaio numa época do ano distinta da que ocorre a indução do florescimento pelo frio poderá ser útil para elucidar o comportamento da expressão dos demais genes envolvidos no florescimento em laranjeiras ‘x11’ e ‘Valência’.

Outro importante repressor floral é o *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)*, que interage com *FLC* para reprimir a expressão de *FT* e *SOC1* (LI et al., 2008). Nas plantas adultas de ‘x11’, o gene *SVP* foi ligeiramente mais expresso em gemas dormentes (estádio 1), mas não apresentou alteração expressiva no número de transcritos nas brotações com primórdios florais (estádio 2) e foi ligeiramente reprimido no estágio 3 (brotação com botão floral completo) (Figura 24). Nas plantas juvenis de ‘x11’ os níveis de transcritos foram menores que os respectivos controles, em todos os estádios de desenvolvimento das brotações (Figura 26).

Segundo Li et al. (2010) o padrão de expressão do *PtSVP* no mutante precoce de *P.trifoliata* variou com a estação do ano, com o crescimento das brotações e com a poda. Este gene foi expresso abundantemente em gemas dormentes e durante a diferenciação das estruturas florais e baixos níveis foram encontrados durante a transição floral. Consistentes com os dados de expressão, os dados de hibridização *in situ* indicaram que o gene *PtSVP* foi mais expresso em células diferenciadas (primórdios florais ou brotações vegetativas) que em células indiferenciadas (meristema apical), sugerindo que a função deste gene durante a determinação do meristema apical não é a de reprimir a iniciação floral, mas sim, a de manter o desenvolvimento dos meristemas (LI et al., 2010).

Com isto, percebe-se que a baixa expressão do gene *SVP* na laranjeira ‘x11’ no estágio apropriado, garante o desenvolvimento de flores normais pela interação com o gene *API*, o qual promove o desenvolvimento dos órgãos florais pela supressão da expressão de *SVP* após a transição floral. Por isso, os repressores florais são importantes reguladores do florescimento, pois impedem a ativação prematura das vias que regulam o florescimento garantindo o tempo correto da reprodução (LI et al., 2008).

O gene *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* é outro importante repressor do florescimento, que controla tanto o momento do florescimento, quanto a identidade do meristema (SHANNON; MEEKS-WAGNER, 1991), pela repressão das atividades de *LFY* e *API* no ápice dos ramos. Nas plantas adultas de ‘x11’, o número relativo de transcritos do gene *TFL1* foi maior no estágio 1 (gema dormente) em relação ao controle. Com o avanço do desenvolvimento das partes florais, houve uma expressiva diminuição da expressão relativa nos estádios 2 e 3, resultando na sua repressão em relação aos respectivos controles (Figura 24). Já as plantas juvenis de ‘x11’ apresentaram nos três estádios de desenvolvimento das brotações um baixo número de transcritos quando comparado com os respectivos controles juvenis.

Nishikawa et al. (2007) não relataram variações na expressão deste gene durante a indução e desenvolvimento botão de flor, nem em *P.trifoliata* e nem em tangerina ‘Satsuma’ (*C. unshiu* March.), indicando que este gene está relacionado com processos de juvenilidade. Outras plantas perenes, como macieira (*Malus domestica*) e *Populus trichocarpa*, exibem este padrão de expressão em plantas juvenis, para prevenir o florescimento antes do tempo apropriado (KOTODA et al, 2001; MOHAMED et al., 2010). Em tomate, o ortólogo de *TFL1*, *SELF-PRUNING (SP)* previne a ativação do desenvolvimento floral em ramos vegetativos simpodiais e, portanto influencia na mudança da fase vegetativa para a reprodutiva (PNUELI et al., 1998).

No estudo conduzido por Zhang et al. (2009b), estes autores relatam que o gene *TFL1* pode estar envolvido em outros aspectos do desenvolvimento floral, ainda pouco examinados em citros, pois a hibridização *in situ* detectou um acúmulo de transcritos em todos os órgãos florais, semelhante ao que ocorre no homólogo de *TFL1* de macieira (KOTODA et al., 2001).

Figura 24 - Expressão relativa dos genes repressores do florescimento em plantas adultas (coluna esquerda) e juvenis (coluna direita) da laranjeira 'x11' em relação ao controle 'Valência'. Eixo X: estágio de desenvolvimento das brotações (E1-gema dormente; E2-brotação com 7 mm; E3-brotação com 13 mm de comprimento). Eixo Y: expressão relativa, indicando o número de vezes que foi expresso ao longo do desenvolvimento das brotações.

5.3.4.3 Expressão dos genes de identidade do meristema floral *APETALA1* (*API*), *WUSCHEL* (*WUS*) e *BARELY ANY MERISTEM* (*BAM*)

Depois de determinar a identidade do meristema floral, o gene *LFY* assume o segundo papel na ativação direta da expressão de *APETALA1* (*API*), o qual também é regulado por outras vias, para a especificação da identidade dos órgãos na flor (WILLIAM et.al., 2004; MOYROUD et al., 2010). Assim, *LFY* regula a transição do desenvolvimento da flor, pelo menos em parte, induzindo a expressão *API* em regiões do meristema apical, que darão origem a primórdios florais.

Durante o desenvolvimento das brotações percebeu-se um acúmulo maior no número de transcritos nas plantas adultas de ‘x11’ em relação as plantas adultas de ‘Valencia’ (Figura 25). Os transcritos de *API* se acumularam de maneira não expressiva nos estádios 1 e 2 das plantas adultas de ‘x11’, atingindo cerca de 1,5 vezes mais transcritos que o controle no estágio 3, quando o botão floral estava completo. Nas plantas juvenis de ‘x11’ foi observado uma ligeira repressão deste gene em relação ao controle juvenil (Figura 25).

No trabalho de Zhang et al. (2011) o acúmulo de transcritos de *API* na fase de formação dos primórdios florais e do botão floral foi cerca de 5 vezes maior no mutante de *Poncirus trifoliata* que apresenta florescimento precoce, em relação ao controle. Em laranja doce, Pillitteri; Lovatt, e Walling (2004b) relataram que *CsAPI* foi mais abundante em plantas adultas que nas juvenis, sendo que observado um aumento no número de transcritos de *CsAPI* no final do período de indução floral, o que sugere o envolvimento deste gene no desenvolvimento floral de citros.

Segundo Nishikawa et al. (2007) nenhuma correlação aparente foi observada entre o padrão de acúmulo dos transcritos *CsAPI* em tangerina ‘Satsuma’ e a indução floral por baixas temperaturas. Peña et al. (2001) transformaram plantas de *Citrus* para expressarem constitutivamente os genes *LFY* e *API* de *Arabidopsis*. Ambos os transgênicos induziram a produção de flores e frutos férteis nas plantas transformadas já no seu primeiro ano de desenvolvimento, resultando numa grande diminuição do tempo para o início do florescimento.

A organização e funcionamento do meristema floral são governados por uma rede de genes que se interagem, incluindo o *WUSCHEL* (*WUS*). Uma análise detalhada da Figura 25 indica que os níveis de transcritos de plantas adultas foram semelhantes para ambas as laranjeiras nos estádios 1 e 2, enquanto que no estágio 3 ocorreu um aumento expressivo no

número relativo de transcritos de *WUS* em plantas adultas de 'x11'. Já as plantas juvenis de 'x11' ocorreu uma repressão deste gene em todos os estádios de desenvolvimento em relação ao controle (Figura 25).

A expressão de *WUS* nos estágios posteriores do desenvolvimento do botão de citros pode estar relacionada com o papel de *WUS* em outros aspectos da morfogênese floral, como o desenvolvimento de estames (DEYHLE et al., 2007) e contribui na sinalização do desenvolvimento do óvulo (GROSS-HARD; LENHARD; LAUX., 2002). Os resultados obtidos por Tan e Swain (2007) indicam que *CsWUS* desempenha um papel central na promoção e manutenção da identidade e integridade estrutural das gemas e da flor, como é o caso de *WUS* em *Arabidopsis*.

O gene *BARELY ANY MERISTEM (BAM)* é requerido em muitos aspectos do desenvolvimento em *Arabidopsis*, incluindo a estrutura, morfologia foliar e dos órgãos florais, tempo de florescimento, padrão vascular e desenvolvimento de gametas femininos e masculinos (DeYOUNG et al., 2006; CAREY et al., 2006).

Nas plantas adultas de 'x11' o gene *BAM* foi reprimido no estágio 1, em seguida teve um aumento expressivo no número de transcritos no estágio 2 e uma repressão no estágio 3, em relação ao controle. Enquanto nas plantas juvenis de 'x11', os níveis de transcritos foram mais altos no estágio 1, decresceram no estágio 2 e em seguida aumentaram ligeiramente no estágio 3 em relação aos respectivos controles (Figura 25).

A análise da expressão espacial realizada por Zhang et al., (2009b) na fase de crescimento vegetativo do mutante juvenil e adulto de *P. trifoliata* indicou que o *BAM* foi expresso nos primórdios foliares e no meristema apical. Na fase de determinação floral este gene foi altamente expresso em meristemas florais e em células periféricas, enquanto que na fase de formação das inflorescências, foi detectado em pétalas e anteras. Adicionalmente, a expressão do gene *BAM* foi consistente com a transição da fase vegetativa para a reprodutiva no mutante precoce de *P. trifoliata*, pelas análises de RT-PCR, sugerindo que este gene tem um papel similar ao desenvolvimento do florescimento em *Arabidopsis*.

Figura 25 - Expressão relativa dos genes identidade do meristema em plantas adultas (coluna esquerda) e juvenis (coluna direita) da laranjeira 'x11' em relação ao controle 'Valência'. Eixo X: estágio de desenvolvimento das brotações (E1-gema dormente; E2-brotação com 7 mm; E3-brotação com 13 mm de comprimento). Eixo Y: expressão relativa, indicando o número de vezes que foi expresso ao longo do desenvolvimento das brotações.

6. CONCLUSÕES

1. Com base na caracterização fenotípica do florescimento das plantas adultas de ‘x11’ pode se concluir que:
 - i. Todos os parâmetros fenotípicos foram afetados pela época de poda e pelo porta-enxerto utilizado;
 - ii. O florescimento ocorreu em várias épocas do ano, porém com variações na intensidade de formação das estruturas reprodutivas e vegetativas;
 - iii. Ramos com flores terminais foram obtidos em maior proporção na poda de primavera e outono, ramos multiflorais no inverno, ramos vegetativos no outono e ramos com flores abortadas no verão;
 - iv. O número de dias até a formação de botões florais, o comprimento dos ramos, o número de folhas e a viabilidade e germinação *in vitro* de grãos de pólen tiveram poucas alterações entre as épocas de poda e os porta-enxertos;
2. Pelas análises morfo-anatômicas não foi possível precisar o momento em que ocorreram os processos de indução, mas foi possível observar que a diferenciação de botão floral em laranjeira ‘x11’ ocorreu quando as brotações apresentavam um comprimento mínimo de 13 mm.
3. As plantas adultas de ‘x11’ em comparação com as plantas de ‘Valência’, no período de indução floral (estádio 1), apresentaram maior número de transcritos dos genes *FT* e *TFL1* e menor número de transcritos dos genes *LFY* e *BAM*. Na diferenciação floral (estádio 2) os genes *FT*, *LFY* e *BAM* apresentaram elevada expressão enquanto o gene *TFL1* apresentou um nível reduzido de transcritos. E em botões florais (estádio 3) foram encontrados altos níveis de expressão do gene *LFY* e baixos níveis de expressão dos genes *TFL1*, *SVP* e *BAM*.
4. As plantas juvenis de ‘x11’ não apresentaram grandes alterações de expressão nos nove genes em relação às plantas juvenis de ‘Valência’, em nenhum dos três estádios. A exceção foi para o gene *BAM*, que apresentou maiores expressões nos estádios 1 e 3, mas no estágio 2, foi reprimido em relação a ‘Valência’.

REFERÊNCIAS

- AGRESTI, A. **Categorical Data Analysis**. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons, 2002.
- AGRIANUAL. Anuário da Agricultura Brasileira. 17. ed. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2011. 520 p.
- AGUSTÍ, M. V. et al. The use of 2,4-DP to improve fruit size in citrus. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, Acireale, Italy, v. 1, p. 423-427, 1992.
- ALBRIGO, L.G. Rootstocks affect 'Valencia' orange fruit quality and water balance. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 2., 1977Orlando, Florida. **Proceedings...** Orlando, FL: International Society of Citriculture, 1977. p. 62-65.
- AMASINO, R. Seasonal and developmental timing of flowering. **Plant Journal**, Oxford, v. 61, n. 6, p. 1001-13, 2010.
- AN, H. et al. *CONSTANS* acts in the phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of Arabidopsis. **Development**, Cambridge, v. 131, p. 3615–3626, 2004.
- BENLLOCH, R. et al. Floral initiation and inflorescence architecture: a comparative view. **Annals of Botany**, Oxford, v. 100, p. 659–676, 2007.
- BOSS, P. K. et al. Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 16, p.18-31, 2004.
- BRODY, J. R.; KERN, S. E. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, Natick, v. 36, p. 214-216, 2004.
- BRUGNARA, E. C. et al. Ploidia e fertilidade de pólen em progênies de citros. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 3, p. 599-602, 2008.
- BUSTAN, A.; GOLDSCHMIDT, E. E. Estimating the cost of flowering in a grapefruit tree. **Plant, Cell and Environment**, Nottingham, v. 21, n. 2, p. 217-224, 1998.
- CAREY, L. H. et al. The *BAM1/BAM2* receptor-like kinases are important regulators of Arabidopsis early anther development. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 18, p. 1667–1680, 2006.
- CASSIN, J. et al. The influence of climate upon the blooming of citrus in tropical areas. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1968, Riverside, California. **Proceedings...** Riverside, California: University of California, 1968. p. 315-324.
- CASTLE, W. S. et al. **Rootstock selection: The first step to success**. Gainesville: University of Florida, Institute of Food and Agricultural Science, 1989. 47 p.
- CAVALCANTE, H. C.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DORNELLES, A. L. C. Meiotic behavior end pollen fertility in an open-pollinated population of 'Lee' mandarin [*Citrus*

clementina x (*C. paradisix* x *C. tangerina*)]. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 86, p. 103-114, 2000.

CHAPLIN, M. H.; WESTWOOD, M. N.; ROBERTS, A. N. Effects rootstocks on leaf element content of 'Italian' prune (*Prunus domesticus* L.). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v. 97, p. 641-644, 1972.

CHEN, C. L. et al. Cytogenetic analysis of two interspecific Citrus allotetraploid somatic hybrids and their diploid fusion parents. **Plant Breeding**, Berlin, v. 123, p. 332-337, 2004.

CHICA, E. J.; ALBRIGO, L. G. Accumulation of flowering gene transcripts in *Citrus sinensis* during floral bud induction and initiation: Water deficit and cool temperatures effects. **Tree Physiology**, Victoria, v. 32, p. 1-25, 2011.

COEN, E. S.; MEYEROWITZ, E. M. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. **Nature**, London, v. 353, p. 31-37, 1991.

DAVENPORT, T. L. Citrus flowering. **Horticultural Reviews**, Westport, v. 12, p. 349-408, 1990.

DAVIES, F. S.; ALBRIGO, L. G. **Citrus**. Wallingford: Cab International, 1994. 254 p.

DEYHLE, F. et al. *WUSCHEL* regulates cell differentiation during another development. **Developmental Biology**, New York, v. 302, n. 1, p. 154-9, 2007.

DeYOUNG, B. J. et al. The *CLAVATA1*-related *BAM1*, *BAM2* and *BAM3* receptor kinase-like proteins are required for meristem function in Arabidopsis. **Plant Journal**, Oxford, v. 45, p. 1-16, 2006.

DITTA, G. et al. The *SEP4* gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity. **Current Biology**, London, v. 14, p. 1935-1940, 2004.

DOMINGUES, E.T.; TULMANN NETO A.; TEÓFILO SOBRINHO, J. Viabilidade de pólen em clones de laranja Pera e outras variedades assemelhadas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, p.85-89, 2000.

ENDO, T. et al. Ectopic expression of an *FT* homolog from citrus confers an early flowering phenotype on trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.). **Transgenic Research**, Heidelberg, v. 14, n. 5, p. 703-12, 2005.

ERICKSON, L. C; BRANNAMAN, B. L. Abscission of reproductive structures and leaves of orange trees. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v. 75, p. 222-229, 1960.

ERICKSON, L. C. The general physiology of citrus. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L. D.; WEBBER, H. J. (Ed.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California Press, 1968. v. 2, p. 86-126.

FAHN, A. **Plant anatomy**. 4. ed. New York: Pergamon, 1990. 588 p.

FAVARO, R. et al. *MADS-Box* Protein Complexes Control Carpel and Ovule Development in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 15, p. 2603-2611, 2003.

GARCÍA-LUIS, A. et al. Low temperature influence on flowering in *Citrus*. The separation of inductive and bud dormancy releasing effects. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 86, n. 4, p. 648-652, 1992.

GIRARDI, E. A.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; ALVES, A. S. R. Mudanças de laranjeira Valência sobre dois porta-enxertos e sob diferentes manejos de adubação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, p. 855-864, 2010.

GOLDSCHMIDT, E. E.; MONSELISE, S. P. Hormonal control of flowering in citrus and some other woody perennials. In: CARR, D. **Plant growth substances**. Berlin: Springer Verlag, 1970. p.758-766.

GOLDSCHMIDT, E. E.; HUBERMAN, M. The coordination of organ growth in developing citrus flowers: a possibility for sink type regulation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 25, n. 3, p. 534-541, 1974.

GOLDSCHMIDT, E. E.; KOCH, K. E. Citrus. In: ZAMSKI, E.; SCHAFFER, A. A. (Ed.). **Photoassimilate distribution in plants and crops: source-sink relationships**. New York: Marcel Dekker, 1996. p.797-798.

GROSS-HARD, R.; LENHARD, M.; LAUX, T. *WUSCHEL* signaling functions in interregional communication during *Arabidopsis* ovule development. **Genes & Development**, New York, v. 16, n. 1, p. 1129-1138, 2002.

GROSSER, J. W.; GMITTER JUNIOR, F. G. Protoplast fusion and citrus improvement. **Plant Breeding Reviews**, New York, v. 8, p. 339-374, 1990.

GUARDIOLA, J. L. **Overview of flower bud induction, flowering and fruit set**. In: FUTCH, S. H.; KENDER, W. J. (Ed.). **Citrus Flowering and Fruit**. Short Course. Lake Alfred, FL: Citrus Research and Education Center, 1997. P. 5–21.

HELLIWELL, C. A. et al. The *Arabidopsis* *FLC* protein interacts directly in vivo with *SOC1* and *FT* chromatin and is part of a high-molecular-weight protein complex. **Plant Journal**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 183-92, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção Agrícola Municipal**, Rio de Janeiro, v. 36, 2009. Disponível em: <www.ibge.gov.br/sisdra> Acesso: 19 fev. 2011.

JACK, T.; BROCKMAN, L. L.; MEYEROWITZ, E. M. The homeotic gene *APETALA3* of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. **Cell**, Cambridge, v. 68, p. 683-697, 1992.

JACK, T. Molecular and genetic mechanisms of floral control. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 16, p. S1–17, 2004.

JALEEL, A. A.; ZEKRI, M. Yield and fruit quality of 'Olinda Valencia' trees grown on nine rootstocks in Saudi Arabia. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Tallahassee, v. 115, p. 17-22, 2002.

JOFUKU, K. D.; DEN BOER, B. G. W.; VAN MONTAGU, M.; OKAMURO, J. K. Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 6, p. 1211-1225, 1994.

KASKA, N. Bud, flower and fruit drop in citrus and other fruit trees. In: OSBORNE, D. J.; JACKSON, M. B. (Ed.). **Cell separation in plants**. Physiology, biochemistry and molecular biology. Berlin: Springer Verlag, 1989. p. 309-321. (NATO ASI Series, 35).

KHAIRI, M. M. A.; HALL, A. E. Effects of air and soil temperatures on vegetative growth of citrus. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v. 101, p. 337-341, 1976.

KOBAYASHI, S. et al. Fruit characteristics and pollen fertility of citrus somatic hybrids. **Journal of Japanese Society of Horticultural Science**, Tokyo, v. 64, n. 2, p. 283-289, 1995.

KOLTUNOW, A. M. et al. Anther, ovule, seed and nucellar embryo development in *Citrus sinensis* cv. Valencia. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. 1567-1582, 1995.

KOORNNEEF, M. et al. Genetic control of flowering time in *Arabidopsis*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 49, p. 345-370, 1998.

KOTODA, N. et al. The function analysis of *MdMADS5* and *MdTFL*, apple homologues of *APETALA1* and *TERMINAL FLOWER1*, in transgenic *Arabidopsis*. **HortScience**, St. Joseph, v. 36, p. 441-445, 2001.

KOTODA, N. et al. Molecular characterization of *FLOWERING LOCUS T*-like genes of apple (*Malus domestica* Borkh.). **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 51, p. 561-575, 2010.

LAUX, T.; MAYER, K. F. X.; BERGER, J.; JURGENS, G. The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. **Development**, Cambridge, v. 122, p. 87-96, 1996.

LELIS, F. M. V.; SIQUEIRA, D. L.; SANTOS, D. Florescimento de tangerineiras 'Ponkan' (*Citrus reticulata* Blanco) submetidas a diferentes períodos de temperatura invernal. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 818-821, 2008.

LI, D. et al. A repressor complex governs the integration of flowering signals in *Arabidopsis*. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 15, n. 1, p. 110-20, 2008.

LI, Z.-M. et al. *PtSVP*, an *SVP* homolog from trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.), shows seasonal periodicity of meristem determination and affects flower development in transgenic *Arabidopsis* and tobacco plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 74, p. 129-142, 2010.

LIMA, J. E. O. Florescimento e frutificação em citrus. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 10, p. 243-253, 1989.

LIU, C.; THONG, Z.; YU, H. Coming into bloom: the specification of floral meristems. **Development**, Cambridge, v. 136, n. 20, p. 3379-3391, 2009.

LORD, E. M.; ECKARD, M. J. Shoot development in *Citrus sinensis* L. Osbeck ('Washington' Navel' orange). I. floral and inflorescence ontogeny. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 146, p. 320-326, 1985.

LORD, E. M.; ECKARD, K. J. Shoot development in *Citrus-Sinensis* L (Washington Navel Orange). 2. Alteration of developmental fate of flowering shoots after Ga₃ treatment. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 148, p. 17-22, 1987.

LYNDON, R. F. **The shoot apical meristem**: its growth and development. Cambridge: Cambridge, University Press, 1998. 277 p.

McARTNEY, S. J. et al. Seasonal variation in the onset and duration of flower development in 'Royal Gala' apple buds. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v. 76, p. 536-540, 2001.

MACHADO, D. F. S. P. et al. Efeito da baixa temperatura noturna e do porta-enxerto na variação diurna das trocas gasosas e na atividade fotoquímica de laranjeira "Valência". **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, p. 351-359, 2010.

MANDEL, M. A. et al. Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. **Nature**, London, v. 360, p. 273-277, 1992.

MEDINA, C. L.; MACHADO, E. C. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeira 'Valência' enxertada sobre limoeiro 'Cravo' e *Trifoliata* e submetida à deficiência hídrica. **Bragantia**, Campinas, v. 57, p. 15-22, 1998.

MEDINA, C. L.; MACHADO, E. C.; GOMES, M. M. A. Condutância estomática, transpiração e fotossíntese em laranjeira Valência sob deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, DF, v. 11, n. 1, p. 29-34, 1999.

MICHAELS, S. D.; AMASINO, R. M. *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 11, n. 5, p. 949-56, 1999.

MOHAMED, R.; WANG, C.T.; MA, C.; SHEVCHENKO, O.; DYE, S. J.; PUZEY, J. R.; ETHERINGTON, E.; SHENG, X.; MEILAN, R.; STRAUSS, S. H.; BRUNNER, A. M. *Populus* CEN/TFL1 regulates first onset of flowering, axillary meristem identity and dormancy release in *Populus*. **Plant Journal**, Oxford, v. 62, p. 674-688, 2010.

MOREIRA, S.; GURGEL, J. T. A. A fertilidade do pólen e sua correlação com o número de sementes, em espécies e formas do gênero citrus. **Bragantia**, Campinas, v. 1, n. 11-12, p. 669-711, 1941.

MOSS, G. I. Influence of temperature and photoperiod on flower induction and inflorescence development in sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v. 44, p. 311-320, 1969.

MOSS, G. I. Temperature effects on flower initiation in sweet Orange (*Citrus sinensis*). **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 27 p. 399-407, 1976.

MOYROUD, E. et al. *LEAFY* blossoms. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 15, n. 6, p. 346–352, 2010.

NISHIKAWA, F. et al. Increased *CiFT* abundance in the stem correlates with floral induction by low temperature in *Satsuma mandarin* (*Citrus unshiu* Marc.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, p. 3915–3927, 2007.

NISHIKAWA, F. et al. Differences in seasonal expression of flowering genes between deciduous trifoliolate orange and evergreen *Satsuma mandarin*. **Tree Physiology**, Victoria, v. 29, p. 921–926, 2009.

NORDELO, C.B.; TORRE de la, A.B. **Citricultura tropical**, Tomo I. Havana: Ministério de Educação Superior, 227p., 1991.

NUNEZ-ELISEA, R.; DAVENPORT, T. L. Flowering of mango trees in containers as influenced by seasonal temperature and water stress. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 58, p. 57-66, 1994.

ORTOLANI, A. A.; PEDRO JUNIOR, M. J.; ALFONSI, R. R. Agroclimatologia e o cultivo de citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A. A. (Ed.). **Citricultura brasileira**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. p. 153-195.

PARCY, F.; BOMBLIES, K.; WEIGEL, D. Interaction of *LEAFY*, *AGAMOUS* and *TERMINAL FLOWER1* in maintaining floral meristem identity in *Arabidopsis*. **Development**, Cambridge, v. 129, n. 10, p. 2519-2527, 2002.

PARCY, F. Flowering: a time for integration. **International Journal of Developmental Biology**, Vizcaya, Spain, v. 49, p. 585–593, 2005.

PELAZ, S.; DITTA, G. S.; BAUMANN, E.; WISMAN, E.; YANOFSKY, M. F. B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. **Nature**, London, v. 405, p. 200-203, 2000.

PENÃ, L. et al. Constitutive expression of *Arabidopsis LEAFY* or *APETALA1* genes in citrus reduces their generation time. **Nature Biotechnology**, New York, v. 19, p. 263–267, 2001.

PEREIRA, I. A. M.; PINTO, J. E. B.; DAVIDE, L. C. Época da indução e evocação em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Pêra Rio. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 5, p. 857-862, 2003.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative Expression Software Tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, n. 9, p. e36, 2002.

PIDKOWICH, M. S.; KLENZ, J. E.; HAUGHN, G. W. The making of a flower: control of floral meristem identity in *Arabidopsis*. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 7, p. 64–70, 1999.

PILLITTERI, L. J.; LOVATT, C. J.; WALLING, L. L. Isolation and characterization of a *TERMINAL FLOWER* homolog and its correlation with juvenility in citrus. **Plant Physiology**, Rockville, v. 135, p. 1-12, 2004a.

PILLITTERI, L. J.; LOVATT, C. J.; WALLING, L. L. Isolation and characterization of *LEAFY* and *APETALA1* homologues from *Citrus sinensis* L. Osbeck ‘Washington’. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v. 129, n. 6, p. 846-856, 2004b.

PIO, L. A. S. et al. Viabilidade do pólen de laranjas doces em diferentes condições de armazenamento. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 147-153, 2007.

PNUELI, L. et al. The *SELF-PRUNING* gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of *CEN* and *TFL1*. **Development**, Cambridge, v. 125, p. 1979–1989, 1998.

POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A. A. (Ed.). **Citricultura brasileira**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v. 1, p. 265-280.

POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**. Campinas: IAC; Fundag, 2005. cap. 4, p. 61-104.

PUTTERILL, J.; LAURIE, R.; MACKNIGHT, R. It's time to flower: the genetic control of flowering time. **BioEssays**, Cambridge, v. 26, p. 363–373, 2004.

QUAGGIO, J. A.; MATTOS JUNIOR, D.; CANTARELLA, A.; STUCHI, E. S.; SEMPIONATO, O. R. Sweet orange trees grafted on selected rootstocks fertilized with nitrogen, phosphorus and potassium. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, p. 1-6, 2004.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: A language and environment for statistical computing. Version 2.15.3. Vienna, Austria, 2013. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>.

REUTHER, W. Climate and citrus behavior. In: REUTHER, W. (Ed.) **The citrus industry**. Riverside Berkeley: University of California Press, 1973. p. 280-337.

RIBEIRO, R. V.; MACHADO, E. C.; BRUNINI, O. Ocorrência de condições ambientais para indução do florescimento em citros no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 247-253, 2006.

RODRIGUEZ, A. P. M.; WETZSTEIN, H. Y. A morphological and histological comparison of the initiation and development of pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryogenic cultures induced with naphthaleneacetic acid or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Protoplasma**, Leipzig, v. 204, p. 71-83, 1998.

ROHDE, A.; BHALERAO, R. P. Plant dormancy in the perennial context. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 12, p. 217-223, 2007.

SAUER, M. R. Growth of orange shoots. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 2, p. 105-117, 1951.

SCHÄFER, G.; BASTIANEL, M.; DORNELLS, A. L. C. Porta-enxertos utilizados na citricultura. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, p. 723-733, 2001.

SCHNEIDER, H. The anatomy of citrus. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L. D.; WEBBER, H. J. (Ed.). **The citrus industry**. Riverside: University of California, 1968. v. 2, p. 1-85.

SHANNON, S.; MEEKS-WAGNER, D. R. A mutation in the Arabidopsis *TFL1* gene affects inflorescence meristem development. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 3, p. 877-892, 1991.

SEARLE, I. et al. The transcription factor *FLC* confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in Arabidopsis. **Genes & Development**, New York, v. 20, n. 7, p. 898-912, 2006.

SIMPSON, G. G.; DEAN, C. Arabidopsis, the Rosetta stone of flowering time? **Science**, Washington, DC, v. 296, p. 285-289, 2002.

SMYTH, D.; BOWMAN, J.; MEYEROWITZ, E. M. Early flower development in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 2, n. 10, p. 755-767, 1990.

SOOST, R. K.; CAMERON, J. W. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J. N. (Ed.). **Advances in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1975. p. 507-540.

SOUTHWICK, S. M.; DAVENPORT, T. L. Characterization of water stress and low temperature effects on flower induction in citrus. **Plant Physiology**, Rockville, v. 81, n. 1, p. 26-29, 1986.

SPIEGEL-ROY, P.; GOLDSCHMIDT, E. E. **Biology of citrus**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996.

STUCHI, E. S. et al. Produtividade e qualidade dos frutos de laranjeira 'Pera' clone IAC em 16 porta-enxertos na região de Bebedouro-SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, p. 359-362, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 719 p.

TALON, M.; GMITTER JUNIOR, F. G. Citrus genomics. **International Journal of Plant Genomics**, New York, 2008. Doi: 10.1155/2008/528361

TAN, B. et al. Highly efficient transformation of the GFP and MAC12.2 genes into precocious trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* [L.] Raf), a potential model genotype for functional genomics studies in *Citrus*. **Tree Genetics & Genomes**, Dordrecht, v. 5, p. 529–537, 2009.

TAN, F. C.; SWAIN, S. M. Genetics of flower initiation and development in annual and perennial plants. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 128, n. 1, p. 8-17, 2006.

TAN, F. C.; SWAIN, S. M. Functional characterization of *AP3*, *SOCI* and *WUS* homologues from citrus (*Citrus sinensis*). **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 131, p. 481-495, 2007.

THOMAS, B.; VINCE-PRUE, D. **Photoperiodism in plants**. San Diego: Academic Press, 1997.

VALIENTE, J. I.; ALBRIGO, L. G. Flower bud induction of sweet orange trees [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]: effect of low temperatures, crop load and bud age. **Journal of American Society of Horticulture Science**, Geneva, v. 129, n. 2, p. 158-164, 2004.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, London, v. 3, n. 7, res.0034.1–res.0034.11, 2002.

WELLMER, F.; RIECHMANN, J. L. Gene networks controlling the initiation of flower development. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 26, n. 12, p. 519-27, 2010.

WIGGE, P. A. et al. Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. **Science**, Washington, DC, v. 309, p.1056-1059, 2005.

WILLIAM, D. A. et al. Genomic identification of direct target genes of *LEAFY*. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v. 101, p. 1775–1780, 2004.

YANOFSKY, M. F. et al. The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. **Nature**, London, v. 346, p. 35–39, 1990.

ZEGER, S. L.; LIANG, K. Y. Longitudinal data analysis for discrete and continuous outcomes. **Biometrics**, Washington, DC, v. 42, p. 121-130, 1986.

ZHANG, J.-Z. et al. *PtFLC* homolog from trifoliate orange (*Poncirus trifoliata*) is regulated by alternative splicing and experiences seasonal fluctuation in expression level. **Planta**, Berlin, v. 229, p. 847-859, 2009a.

ZHANG, J.-Z. et al. Identification of flowering-related genes between early flowering trifoliate orange mutant and wild-type trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) by suppression subtraction hybridization (SSH) and macroarray. **Gene**, Amsterdam, v. 430, p. 95–104, 2009b.

ZHANG, J.-Z. et al. Transcriptome profile analysis of flowering molecular processes of early flowering trifoliate orange mutant and the wild-type [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] by

massively parallel signature sequencing. **BMC Genomics**, London, v. 12, n. 1, p. 63, 2011.
doi: 10.1186/1471-2164-12-63.

ZIMMERMAN, R. H. Juvenility and flowering in woody plants: a review. **Hortscience**, St. Joseph, v. 7, p. 445-449, 1972.

ANEXOS

Anexo A - Resumo da análise estatística com as probabilidades estimadas para cada categoria de classificação dos ramos novos, considerando ao efeito da época de poda e o efeito de porta-enxerto

Porta-enxertos	Classificação dos ramos novos	Épocas de poda			
		Primavera	Verão	Outono	Inverno
		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>
Cravo <i>A</i>	flor unifloral	0,788043	0,000000	0,672000	0,117460
	flor multifloral	0,010870	0,016060	0,000001	0,847619
	sem flor	0,067934	0,000006	0,286666	0,027513
	flor abortada	0,133153	0,983934	0,041333	0,007408
Swingle <i>B</i>	flor unifloral	0,734939	0,072720	0,617602	0,270195
	flor multifloral	0,016064	0,000000	0,000001	0,686629
	sem flor	0,090361	0,000003	0,285280	0,032033
	flor abortada	0,158636	0,927277	0,097117	0,011143

*Grupos de probabilidades associadas a letras diferentes diferem estatisticamente.

Anexo B - Análise da Variância do modelo referente ao comprimento dos ramos

Fatores	Graus de liberdade	Qui-Quadrado	valor p
Porta-enxerto	1	6,004	0,01427
Época	3	68,37	< 0,001

Anexo C - Análise da Variância do modelo referente ao número médio das folhas

Fatores	Graus de liberdade	Qui-Quadrado	valor p
Porta-enxerto	1	10,1	0,0015
Época	3	62,7	< 0,001

Anexo D - Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão logística quanto à variável resposta "germinação"

Parâmetros	Estimativas	Erro-padrão	valor p
intercepto	-0,52770	0,04679	< 0,001
porta-enxerto("swingle")	-0,10916	0,03743	0,00354
época("outono")	-0,43579	0,09374	< 0,001
época("inverno")	0,78641	0,07216	< 0,001

*Categorias "Cravo" e " primavera" são tomadas como referência

Anexo E - Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão logística quanto à variável resposta "viabilidade"

Parâmetros	Estimativas	Erro-padrão	valor p
intercepto	1,53502	0,10027	< 0,001
porta-enxerto("swingle")	-0,20611	0,07722	0,0076
época("outono")	-0,80580	0,12388	< 0,001
época("inverno")	1,02660	0,09039	< 0,001

*Categorias "Cravo" e " primavera" são tomadas como referência

Anexo F - Probabilidades estimadas pelo modelo de regressão logística, considerando a época do ano e o efeito de porta-enxerto para cada uma das duas variáveis respostas analisadas

Porta-enxerto	Época	Probabilidade	
		de germinar	Probabilidade de ser viável
Cravo	primavera	0,3711	0,8227
	outono	0,2762	0,6746
	inverno	0,5643	0,9284
Swingle	primavera	0,3460	0,7907
	outono	0,2549	0,6279
	inverno	0,5373	0,9134