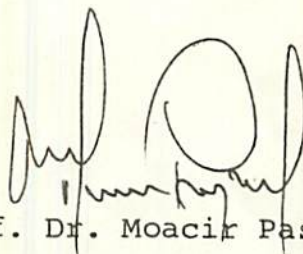




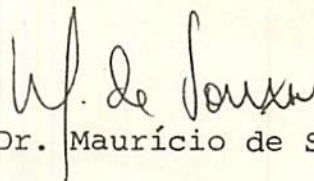


TAXA DE POLIEMBRIONIA E IDENTIFICAÇÃO DO EMBRIÃO SEXUAL "IN VITRO"  
DOS PORTA-ENXERTOS Citrus limonia OSBECK cv CRAVO E  
Poncirus trifoliata (L.) RAF.

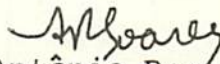
APROVADA: 04 de julho de 1990



Prof. Dr. Moacir Pasqual



Prof. Dr. Maurício de Souza



Prof. Dr. Antônio Resende Soares

Aos meus pais,

José Ramos de Siqueira e

Anísia Faria de Siqueira,

MEU RECONHECIMENTO.

Às minhas irmãs, irmão, cunhados,  
tios e sobrinhos,

OFEREÇO.

Às minhas filhas Priscila, Patrícia e  
Paula,

DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

Às seguintes instituições, pelo apoio, oportunidade e facilidades na elaboração da dissertação:

- SUDAP - Superintendência da Agricultura e Produção (SAGRI-SE)
- Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão (FAEPE)
- CAF Florestal Ltda.

Ao professor Moacir Pasqual, pela dedicação, orientação segura, incentivo, sugestões, amizade e companheirismo.

Ao apoio, incentivo, colaboração e amizade:

- Natalino de Jesus Cabral Corrêa
- Alaide Azevedo
- Eliana Patrícia Gorgulho
- Daniel Gomide Dessimoni Pinto
- Enilson Abrahão
- Joaquim José Silva do Carmo

- Luiz Mário Santos da Silva
- José Trindade
- José Unaldo da Silva Barbosa
- Prof. Maurício de Souza
- Prof. Antônio Resende Soares
- Prof. José Tarcísio Lima
- Prof. Magno Antônio Patto Ramalho
- Prof. César Augusto Brasil Pereira Pinto
- Prof. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
- Dr. Walter Suiter Filho
- Samuel Pereira de Carvalho
- Francisco Ronaldo Sarmanho de Souza
- Ângela de Fátima B. Abreu
- Vantuil Antônio Rodrigues
- Evaldo de Souza Arantes
- Hélia Maria Victor
- Antônio Máximo de Carvalho
- Inácio de Barros
- Milton Lázaro Arantes
- Sérgio Alves de Carvalho
- Marco Antônio Alves da Costa
- José Maria dos Santos
- Conceição Aparecida do Nascimento
- Paulo Lopes Cançado

Especialmente à minha querida esposa Eneida, minhas filhas Priscila, Patrícia e Paula, pela compreensão, dedicação e carinho, durante o transcorrer do curso.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## BIOGRAFIA DO AUTOR

JOSÉ DARLAN RAMOS, filho de José Ramos de Siqueira e Anísia Faria de Siqueira, nasceu em Sapucaí-Mirim, Minas Gerais a 04 de março de 1951.

Em 15 de dezembro de 1977, graduou-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal de Viçosa.

Em fevereiro de 1978 foi contratado pela Taomina Agro Florestal Ltda., em Camanducaia-MG, onde exerceu atividades com bovinocultura, suinocultura, reflorestamento, culturas anuais e fiscalização de sementes certificadas, até janeiro de 1981.

Nesse mesmo ano trabalhou com Planejamento Agrícola permanecendo nesta atividade até março de 1983.

De abril de 1983 a maio de 1984 desenvolveu suas atividades profissionais junto à Visor Empreendimentos Agro-Industriais, com sede em Recife-PE, para implantação de projeto com côco na cidade de Januária-Bahia.

Em junho de 1984 foi admitido pela Coordenadoria de Pesquisa Agropecuária-COPEA, vinculada à SUDAP, para exercer ati-



vidade de pesquisas na área de Fitotecnia com a Cultura do Mara -  
cujazeiro.

Em janeiro de 1987, iniciou o curso de Mestrado em  
Genética e Melhoramento de Plantas, na Escola Superior de Agriculu  
tura de Lavras - ESAL, Estado de Minas Gerais.

Atualmente exerce atividades de pesquisa na área de  
melhoramento com a cultura do eucalipto na CAF Florestal Ltda.,  
na cidade de Bom Despacho, Estado de Minas Gerais.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Melhoramento de citros .....	3
2.1.1. Poliembrionia .....	5
2.2. Cultura de tecidos .....	8
2.2.1. Cultura de embriões .....	9
2.2.1.1. Embriogênese somática .....	10
2.2.1.2. Embriogênese sexual .....	13
2.2.1.3. Identificação do híbrido .....	13
2.2.2. Micropropagação .....	14
2.2.3. Calos .....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	18
3.1. Determinação da taxa de poliembrionia do 'limão cravo', <u>Citrus limonia</u> Osbeck cv cravo e do 'trifoliata' <u>Poncirus trifoliata</u> (L.) Raf. ....	19
3.2. Determinação da taxa de poliembrionia dos frutos provenientes da hibridação artificial de <u>Poncirus trifoliata</u> (L.) Raf. x <u>Citrus limonia</u> Osbeck cv Cravo .....	20

	x
3.2.1. Hibridação e obtenção das sementes .....	20
3.2.2. Assepsia das sementes e identificação dos em briões híbridos .....	21
3.3. Efeito da destegumentação das sementes na expressão poliembriônica de porta-enxertos de citros em casa- de-vegetação e câmara-de-germinação .....	22
3.4. Taxa de poliembrionia do limão cravo, em relação à hibridação com trifoliata, autopolinização e polini- zação natural .....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	25
4.1. Poliembrionia do 'limão cravo' <u>Citrus limonia</u> Os - beck cv cravo, do 'limão trifoliata' <u>Poncirus tri-</u> <u>foliata</u> (L.). Raf. e do híbrido 'cravo x trifolia - ta' .....	25
4.2. Efeito da destegumentação das sementes na expressão poliembriônica de porta-enxertos de citros em casa- de-vegetação .....	36
4.3. Efeito da destegumentação das sementes na expressão poliembriônica de porta-enxertos de citros em câma- ra-de-germinação .....	40
4.4. Comparação da taxa de poliembrionia através da poli- nização artificial, autopolinização e polinização natural .....	42
5. DISCUSSÃO GERAL .....	48
6. CONCLUSÕES .....	52
7. RESUMO .....	54

8. SUMMARY ..... 56

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 58

## LISTA DE QUADROS

QUADROS		PÁGINA
1	Correlação de Pearson entre diâmetro de <u>fru</u> <u>tos</u> , número total de sementes, número de <u>se</u> <u>mentes</u> usadas, viabilidade das sementes e taxa de poliembrionia em 'limão cravo'.ESAL Lavras-MG, 1988 .....	26
2	Médias, desvio-padrão e coeficiente de va - riação dos parâmetros obtidos em 'limão <u>cr</u> <u>avo</u> '. ESAL, Lavras-MG, 1990. ....	28
3	Correlação de Pearson entre diâmetro de <u>fru</u> <u>tos</u> , número total de sementes, número de <u>se</u> <u>mentes</u> usadas, viabilidade das sementes e taxa de poliembrionia em 'limão trifoliata' ESAL, Lavras-MG, janeiro de 1988 .....	30
4	Médias, desvio-padrão e coeficientes de va - riação dos parâmetros obtidos em 'limão <u>tri</u> <u>foliata</u> '. ESAL, Lavras-MG, 1988 .....	32

## QUADROS

## PÁGINA

5	Correlação de Pearson entre diâmetro de frutos, número total de sementes, número de sementes usadas, número total de embriões, taxa de poliembrionia e viabilidade das sementes no híbrido de 'limão cravo' e 'trifoliata'. ESAL, Lavras-MG, 1989 .....	34
6	Médias, desvio-padrão e coeficientes de variação dos parâmetros obtidos em 'limão cravo' x 'trifoliata'. ESAL, Lavras-MG, 1989..	36
7	Quadrados médios para os diversos parâmetros analisados dos porta-enxertos 'limão cravo' e 'trifoliata', com e sem tegumento em casa-de-vegetação. ESAL, Lavras-MG, 1990.	37
8	Médias dos tratamentos para os porta-enxertos 'limão trifoliata' e 'limão cravo', com e sem tegumento. ESAL, Lavras-MG, 1989 ....	38
9	Valores observados para os parâmetros analisados nos porta-enxertos 'limão cravo' e 'trifoliata' com e sem tegumento em casa-de-vegetação. ESAL, Lavras-MG, 1989 .....	40
10	Quadrados médios dos diversos parâmetros analisados de 'limão cravo' em câmara-de-germinação. ESAL, Lavras-MG, 1990 .....	41

## QUADROS

## PÁGINA

11	Valores observados para os parâmetros analisados nos porta-enxertos 'limão cravo' e 'trifoliata' com e sem tegumento em câmara-de-germinação. ESAL, Lavras-MG, 1989 .....	42
12	Análise de variância para três tipos de polinização em quatro épocas diferentes de colheita dos frutos de 'limão cravo'. ESAL, Lavras-MG, 1990.....	43
13	Resumo de médias do número total de sementes, número de sementes usadas, viabilidade das sementes, taxa de poliembrionia e diâmetro dos frutos, para 'limão cravo', 'limão trifoliata' e o híbrido 'cravo e trifoliata'. ESAL, Lavras-MG, 1990 .....	49

## LISTA DE FIGURAS

FIGURAS		PÁGINA
1	Análise de regressão entre viabilidade das sementes e diâmetro dos frutos de 'limão cravo'. ESAL, Lavras-MG, 1988 .....	27
2	Análise de regressão entre viabilidade das sementes e diâmetro dos frutos 'limão trifoliata'. ESAL, Lavras-MG, 1988 .....	31
3	Número médio de embriões por semente (taxa de poliembrionia) em diferentes idades de frutos de <u>Citrus limonia</u> Osbeck cv cravo. ESAL, Lavras-MG, 1990 .....	44
4	Número total de sementes em frutos de diferentes idades em porta-enxertos 'limão cravo' e 'trifoliata'. ESAL, Lavras-MG, 1990 .	45
5	Número de sementes usadas em diferentes idades dos frutos de <u>Citrus limonia</u> Osbeck cv cravo. ESAL, Lavras-MG, 1990 .....	46



## FIGURAS

## PÁGINA

- 6 Viabilidade dos frutos em diferentes épocas de colheita dos porta-enxertos 'limão cra - vo' e 'trifoliata'. ESAL, Lavras-MG, 1990 .

47

## 1. INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira ocupa atualmente lugar de destaque no mercado internacional, pois o Brasil é o maior produtor e exportador mundial de sucos congelados. Ao longo dos últimos vinte anos, o crescimento da produção de laranja esteve aliado à expansão dos pomares.

As condições edafo-climáticas são favoráveis a um desenvolvimento razoável da citricultura, no entanto, a baixa produtividade dos laranjais brasileiros aliada à qualidade dos frutos pode afetar, no futuro, a competitividade do suco nacional no mercado externo. Atualmente os produtores se preocupam única e exclusivamente com a quantidade de frutos produzidos em detrimento da qualidade e produtividade, o que poderá repercutir negativamente num futuro bem próximo.

\* É necessário se pensar, além do aumento da área plantada, no melhoramento genético das variedades-copas e objetivando principalmente um aumento na produtividade. Nesse campo encontra-se uma série de limitações, dentre elas a ocorrência da poliembrionia. Esse fenômeno que é observado na maioria das espécies cí

tricas, dificulta o desenvolvimento do embrião zigótico, constituindo-se numa barreira para formação de híbridos. Além disso, quando há o desenvolvimento do embrião sexual, torna-se muito difícil a sua identificação e a cultura de tecidos pode ser uma ferramenta complementar para o aumento das respostas a esses entres. Nessa área, a cultura de tecidos tem dado substancial contribuição no resgate de embriões que por vários motivos não completam a sua maturação fisiológica.

O presente trabalho teve por objetivo apoiar as investigações, principalmente na identificação do embrião sexual "in vitro" e na determinação da taxa de poliembrionia de porta-enxertos de citros, através do uso das técnicas de cultura de tecidos e hibridações controladas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Melhoramento de citros

Os trabalhos de melhoramento com espécies cítricas tiveram início na França por A. Bernard em 1894, com a obtenção de alguns híbridos (citranges) com maior resistência ao frio. Contudo, referências antigas são escassas, principalmente as relacionadas com hibridações interespecíficas, que são importantes para os trabalhos de melhoramento.

A primeira publicação sobre hibridação interespecífica no melhoramento de citros, aparentemente autêntica, apareceu em 1717, quando Thomas Fair Child relatou um cruzamento entre o limão cravo "poeta" e o cravo "comum", ALLARD (1960).

No período de 1908 a 1942, as pesquisas nessa área se restringiram à Flórida e Califórnia nos Estados Unidos. Depois disso houve maior interesse pela cultura, sendo as pesquisas mais difundidas.

No Brasil, os trabalhos de melhoramento tiveram início por volta de 1935, na Estação Experimental do Instituto Agro-

nômico de Campinas, em Limeira, com testes comparativos entre diferentes porta-enxertos e produção de plantas nucelares, MOREIRA (1980). Dessa época em diante, os trabalhos foram conduzidos principalmente, através do uso de clones nucelares, sendo que estes quando usados com critério fornecem uma base sólida para uma citricultura vigorosa, sadia e lucrativa, MOREIRA (1962).

Atualmente há necessidade de intensificar esforços no sentido de se obter maior variabilidade, principalmente, com porta-enxertos, pois o mais difundido, o Citrus limonia Osbeck cv Cravo representa 95% dos pomares, acarretando assim uma grande vulnerabilidade genética, PASSOS (1980).

As espécies cítricas pertencem aos gêneros Citrus, Fortunella e Poncirus que apresentam uma grande variabilidade, CAMERON & SOOST (1976), e facilidade de hibridações naturais, CHAPOT (1975); MOREIRA (1980). Talvez sejam estas as causas de não se intensificarem os trabalhos de melhoramento. Apesar dos cítricos apresentarem essa facilidade, quando são feitos trabalhos de hibridações artificiais visando a obtenção do híbrido, este não se desenvolve satisfatoriamente, além de apresentar vários problemas como poliembrionia, MOREIRA et alii (1947); FROST & SOOST (1968); RANGAN et alii (1969); HEARN (1977), longo período de juvenilidade, LEOPOLD & KRIEDEMANN (1975) e a não expressão do vigor híbrido, MOREIRA (1980) entre outros.

A biotecnologia é uma técnica com grandes potencialidades de estratégias para estudos de fisiologia, morfologia, citologia e melhoramento genético, FERNANDES (1987), principalmente na resolução dos problemas anteriormente citados.

### 2.1.1. Poliembrionia

Um fenômeno muito comum em muitas espécies cítricas é a poliembrionia, que é caracterizada pela presença de dois ou mais embriões na mesma semente, MOREIRA et alii (1947); GURGEL & SOUBIHE SOBRINHO (1951); GURGEL (1952), SOUBIHE SOBRINHO & GURGEL (1953); RANGAN et alii (1969); CHAPOT (1975); HEARN (1977); SOARES, FILHO (1982).

Segundo MOREIRA et alii (1947), a poliembrionia foi citada pela primeira vez por Strassburger em 1978. As sementes de citros apresentam um embrião sexual, sendo os demais de natureza agâmica, provenientes das células do nucelo, GURGEL (1952). O desenvolvimento desses embriões ocorre concomitantemente com o embrião sexual, na extremidade micropilar do nucelo, projetando-se para dentro do saco embrionário, MAHESHWARI & RANGA SWAMY (1958).

Raramente ocorre a formação de mais de um embrião sexuado, quando ocorre é devido ao desenvolvimento de dois sacos embrionários ou pela clivagem do zigoto, MOREIRA et alii (1947); SOUBIHE SOBRINHO (1953). Em algumas variedades de citros pode-se encontrar de 1 a 40 embriões por nucelo, OHTA & FURUSATO (1957).

O número de embriões contidos numa semente é influenciado pela cultivar, estado nutritivo do fruto, fatores ambientais e cultivar polinizadora, FROST & SOOST (1968); OGATA (1981); ABRAMOF et alii (1978).

O tamanho e o número de embriões por sementes são muito

to variáveis, porém apenas três ou quatro chegam a germinar, SALI BE (1970). Geralmente é através do tecido do endosperma que há germinação e crescimento dos embriões, WAKANA & UEMOTO (1988).

A existência de um outro tipo de poliembrionia foi citada por BACCHI (1943), em que a fecundação é feita por dois gametófitos no mesmo óvulo, originando dois híbridos diferentes. Esse autor afirma também que podem ocorrer três casos na formação de mais que um embrião na semente: \*a) divisão da oosfera após a fecundação, em duas ou mais; \*b) fecundação de qualquer um dos sete núcleos além da oosfera no saco embrionário; \*c) desenvolvimento de embriões a partir de mais de um saco embrionário no óvulo.

Existem controvérsias sobre a "necessidade de polinização e fecundação para o desenvolvimento dos embriões nucelares. Para MAHESHWARI & RANGA SWAMY (1958); FROST & SOOST (1968), a polinização e fecundação são pré-requisitos para a embriogênese nucelar, apesar de ter sido registrada a formação de sementes em C. sinensis Osbeck e C. pardisi Macf. e, de embrióides "in vitro", BUTTON & BORNAM (1971); KOCHBA et alii (1972), sem polinização. Alguns híbridos interespecíficos requerem para o desenvolvimento de embriões assexuais a ocorrência da polinização, FROST & SOOST (1968), no entanto não é muito clara a necessidade de fecundação, ESEN (1977). A fecundação segundo SPIEGEL-ROY & ROCHBA (1980), ocorre três dias a quatro semanas após a polinização e logo a seguir inicia-se a divisão do zigoto, juntamente com o desenvolvimento dos embrióides, BACCHI (1943)!

As plântulas nucelares provenientes de uma mesma semente, teoricamente teriam a mesma constituição genética. FROST &

SOOST (1968), no entanto têm-se verificado variabilidade entre esses seedlings, IGLESIAS et alii (1974).

• Tem-se observado que o caráter poliembriônico é controlado por genes recessivos e ligados a uma série de genes múltiplos, MAHESHWARI & RANGA SWAMY (1958), que regulam a síntese de um inibidor da embriogênese, ESAN (1973), em células nucelares de variedades monoembriônicas. Em contraste, diversos trabalhos resultados de cruzamentos entre cultivares mono e poliembriônicas, mostram que a poliembriõnia é dominante, PARLEVLIET & CAMERON (1959); CAMERON & FROST (1968); SOOST & CAMERON (1975); CAMERON & SOOST (1969).

• Cruzando pais monoembriônicos, PARLEVLIET & CAMERON (1959) constataram que a progênie era quase que totalmente monoembriônica. Cruzamentos entre mono e poliembriônicos produziram ambos os tipos, em proporções próximas de 1:1. Resultados do cruzamento entre "Ponkan" C. reticulata com quatro diferentes pais monoembriônicos apresentaram maiores percentagens de indivíduos poliembriônicos superiores ao esperado. Comparando resultados os autores concluíram que essa característica é controlada por um gene principal, dominante, denominado P, responsável pela manifestação da poliembriõnia. Tipos monoembriônicos possuem o genótipo PP e para a "Ponkan", PARLEVLIET & CAMERON (1959) sugerem mais de um gene principal ou a presença de genes modificadores, afetando a característica.

Tangerinas e trifoliata são altamente poliembriônicos. O limão cravo, entretanto, possui baixa e constante percentagem de poliembriõnia, PRATES & POMPEU JUNIOR (1981). Segundo HAN-



NA & BASHAW (1987), poliembrionia ou apomixia é mais uma oportunidade para desenvolvimento e uso de genótipos superiores na propagação de plantas produtoras de sementes, e além disso permite perpetuar híbridos mantendo suas características genéticas.

Em Citrus há uma variabilidade, CAMERON & SOOST(1976), devido ao alto grau de heterozigose ocasionado pela facilidade de mutações espontâneas e a presença da poliembrionia, tendo esta um importante papel na diferenciação evolucionária, CAMERON & FROST (1968).

Apesar de linhagens nucelares serem de constituição genética idêntica, BUTTON & BORNMAN (1971), elas possuem maior longevidade, são livres de vírus, mais vigorosas e produzem mais do que as plantas que lhe deram origem. No entanto, com novas técnicas da microenxertia e termoterapia "in vitro", o uso de nucelos como fonte de material livre de vírus passou para segundo plano, MURASHIGE et alii (1972).

## 2.2. Cultura de tecidos

Devido aos inúmeros problemas apresentados pelo gênero Citrus, como esterilidade gamética, longo período juvenil, incompatibilidade e a poliembrionia, a biotecnologia apresenta alternativas viáveis que, quando utilizadas racionalmente, podem ser uma ferramenta valiosa, principalmente em trabalhos de melhoramento.

⇒ Os primeiros trabalhos de melhoramento com cultura de tecidos em citros foram feitos por SCHROEDER & SPECTOR (1957), KORDAN (1959); RANGA SWAMY (1961), na década de 50, sendo intensificados posteriormente após desenvolvimento de meios propícios para a propagação "in vitro", MURASHIGE & SKOOG (1962); MURASHIGE & TUCKER (1969).

Atualmente, a cultura de tecidos de citros já se encontra totalmente difundida, com trabalhos que vão desde a micropropagação até a obtenção de mutantes resistentes às condições estressantes através da irradiação gama em protoplastos.

### 2.2.1. Cultura de embriões

A cultura de embriões teve início com o trabalho de HANNING (1904), através de embriões de óvulos e sementes em plantas superiores e posterior cultura "in vitro", obtendo seedlings de embriões maduros de dois gêneros de crucíferas, Raphans e Cochlearia.

Essa técnica permite estudos mais aprofundados na área de fisiologia e melhoramento, entre outros; para esta última deve-se enfatizar o resgate de embriões híbridos imaturos oriundos de cruzamentos incompatíveis, PASQUAL & PINTO (1988). Uma das práticas mais comuns aplicadas a técnica de cultura de embriões é a obtenção de plântulas híbridas em cruzamentos interespecíficos, onde ocorrem barreiras sexuais na formação da semente, ANDREOLI

(1985).

O meio utilizado para a cultura de embriões é o MURASHIGE & SKOOG, com algumas variações de hormônios, dependendo do genótipo e estágio do embrião, sendo que a taxa de germinação diminui quanto mais jovem for o embrião, BRUCK & WALKER (1985).

#### 2.2.1.1. Embriogênese somática

Embriogênese somática, embriogenia somática, embriogênese assexual ou embriogenia adventícia são expressões que significam o processo pelo qual células somáticas haplóides ou diplóides produzem estruturas semelhantes a células embrióides, SANTOS (1987).

Considerando que há desenvolvimento natural de embriões a partir das células do nucelo, este é o tecido mais usado para indução de embrióides, além de outros em menor escala.

Nucelo é o corpo do óvulo que contém o saco embrionário, ele é o principal alimento para o embrião durante o seu desenvolvimento, POPINIGIS (1985).

Os primeiros trabalhos, utilizando o nucelo como explante para a indução de embrióides, foram feitos por RANGA SWAMY (1958, 1959, 1961).

A adição de cinetina e 2,4-D inibiu a embriogênese em nucelo de citros da cultivar de laranja valência, PASQUAL et alii

(1987) e melhor estímulo ao enraizamento dos embriões foi proporcionado por ANA (1,0 mg/l) e ácido giberélico (GA3) 1,0 e 5,0 mg/l.

RANGA SWAMY (1961) não obteve sucesso cultivando embriões nucelares "in vitro", em diferentes estágios de desenvolvimento, com o uso do meio "White". No entanto, ao adicionar 400ppm de caseína hidrolisada a esse meio, o mesmo autor verificou que o novo meio favoreceu o crescimento e desenvolvimento de embriões em forma globular, inclusive a germinação.

Embriões de sementes imaturas de "Satsuma" (C. unshui Marc.) polinizada com Poncirus trifoliata (L.) Raf., mostraram desenvolvimento satisfatório se isolados aos 90 a 120 dias após a polinização em meio "MS" acrescido de suco de pepino a 20%, HORIU CHI et alii (1976).

O meio "MT", MURASHIGE & TUCKER (1969), adicionado de 5% de sacarose, 1% de ágar, extrato de malte e leite de côco, KOCH BA et alii (1972), induziu o desenvolvimento dos embriões, sendo que os nucelares se desenvolveram primeiro que o zigôto. Utilizando um meio "MS" suplementado com 40 mg/l de extrato de malte, BUTTON & BORNMAN (1971), concluíram que para haver diferenciações em plântulas, é necessário a transferência desses embrióides para um meio "MS" contendo 1 mg/l de ácido giberélico.

Com o objetivo de promover a embriogênese em nucelos foi usado, por RANGA SWAMY (1959) o extrato de malte, mostrando que este não foi efetivo em alguns casos.

O uso de cinetina e 2,4-D inibiu a embriogênese em nu

celo de citros da cultivar de laranja Valência e melhor estímulo ao enraizamento dos embriões foi proporcionado por ANA (1 mg/l) e ácido giberélico (GA3) 1,0 e 5,0 mg/l, PASQUAL et alii (1987).

A adição de auxinas e citocininas inibe a embriogênese em nucelos e o desenvolvimento de embrióides, PASQUAL (1985). Cultura de nucelos "in vitro" induz embrióides em cultivares monoembriônicos de muitas espécies de citros, DEIDDA (1973), e a formação de embrióides ocorre três a seis semanas de cultura na extremidade micropilar do nucelo, ESAN (1973).

Nucelos extraídos de frutos cítricos em desenvolvimento e cultivados "in vitro", permitem a regeneração de plantas inteiras, BUTTON & KOCHBA (1977). A partir de nucelo pode-se obter calos, embrióides ou ambos simultaneamente, RANGA SWAMY (1958); PASQUAL et alii (1984). Os embrióides normalmente se originam na extremidade micropilar do nucelo, projetando-se para dentro do saco embrionário, juntamente com o embrião sexual, MAHESWARI & RANGA SWAMY (1958).

Embriões somáticos de citros desenvolvem-se diretamente a partir do nucelo, BAKRY (1986), tendo sido encontrados de 12 a 40 embrióides, OHTA & FURUSATO (1957). A quantidade de embrióides encontrados é muito variável com o estado nutritivo do fruto, fatores ambientais e até pela cultivar polinizadora, FROST & SOOST (1968).

PASQUAL et alii (1988), obtiveram "in vitro", sem adição de reguladores de crescimento, até 12 embrióides.

### 2.2.1.2. Embriogênese sexual

Poucos são os trabalhos que utilizam o embrião sexual "in vitro", pois este se desenvolve ao mesmo tempo que os nucelos. Assim sendo, há necessidade de identificação do embrião gamético através do uso de processos enzimáticos ou por utilização de marcadores genéticos.

Óvulos fertilizados, contendo embriões parcial ou totalmente desenvolvidos foram primeiramente cultivados por MAHESHWARI & RANGA SWAMY, citados por KOCHBA & SPIEGEL-ROY (1977). O Poncirus trifoliata (L.) Raf., possuidor do gene marcador folha trilobada, quando usado como progenitor masculino na polinização de uma espécie de limão, produziu 46% de plantas zigóticas, CAMERON & SOOST (1969). Entretanto a mesma espécie de limão quando autopolinizada produziu quase que 100% de plântulas nucelares.

### 2.2.1.3. Identificação do híbrido

⇒ O principal entrave na identificação do híbrido resultante dos cruzamentos entre espécies do gênero Citrus, é a ocorrência da poliembrionia, onde o embrião zigótico é inibido pelos embriões nucelares, sendo esta a causa principal do insucesso nos trabalhos de melhoramento convencional dessas espécies.

Métodos bioquímicos, como análise de flavonóides, têm

sido usados para distinção de plântulas híbridas de nucelares, TATUM (1977); ESEN (1977).

O uso de técnicas isoenzimáticas para identificar o embrião sexual é muito mais eficiente do que através da morfologia foliar, LIMA (1977).

Outro tipo de identificação pode ser feita, como por exemplo, o uso de hidro-carbonos de cadeia longa e isoenzimas peroxidases e esterases, SPIEGEL-ROY et alii (1977).

A identificação deve ser feita no estágio inicial de desenvolvimento da plântula, o que facilita o transporte para outros ambientes, a fim de se fazer a aclimatação do híbrido e o uso de marcadores genéticos tem facilitado o trabalho de identificação.

Várias tentativas foram feitas para distinguir plântulas nucelares das sexuais de citros, através da análise infravermelho de óleos essenciais nas folhas, PIERINGER & EDWARDS (1965), ou morfologia das folhas das progênes, TEICH & SPIEGEL-ROY(1972).

### 2.2.2. Micropropagação

O meio utilizado na micropropagação é basicamente o "MS", suplementado com hormônios, sendo que suas dosagens podem ser modificadas de acordo com o genótipo e objetivos do trabalho.

BARLASS & SKENE (1982), utilizando nós e entre-nós com

menos de 1 cm, retirados de ramos jovens e adultos de diversos ge-  
nótipos, colocados em meio "MS" sólido, suplementado com BAP a  
2,0 mg/l e ápices caulinares em meio "MS" integral ou metade da  
concentração, adicionado de BAP a 0,5 e 2,0 mg/l, mantidos à luz  
por 15 horas a 27°C e 9 horas de escuro à 20°C, observaram que os  
entre-nós de plântulas jovens produziram ramos prontamente, en-  
quanto que nos adultos não houve crescimento.

A multiplicação de gemas, através de segmentos de li-  
mão cravo, segundo PINTO et alii (1987), é estimulado com BAP  
(1,0 mg/l) e baixas concentrações de ANA (0,0 e 0,1 mg/l). Os au-  
tores chamam a atenção de que segmentos de árvores adultas no cam-  
po, apresentam índices de contaminação dificilmente controlados.

CAMPBELL et alii (1987) obtiveram em meio contendo  
ANA e BAP, boa brotação na micropropagação de segmentos nodais. A  
multiplicação de ramos axilares sobre segmentos nodais jovens foi  
influenciada pelo tipo e concentração da citocinina empregada, o  
BAP na concentração de 0,75 mg/l, promoveu melhor multiplicação,  
OTONI (1988). O número e comprimento médios e o vigor dos ramos a-  
xilares foram influenciados pelo tamanho do segmento nodal, sendo  
que o de 0,5 cm proporcionou melhor multiplicação de ramos. O ANA  
na presença de 0,75 mg/l de BAP, favoreceu o desenvolvimento de  
ramos axilares até a concentração de 0,25 mg/l.

Trabalho feito por PINTO et alii (1987) micropropagan-  
do limão cravo, evidenciou maior número de brotos com 4,4 uM de  
BAP + 0,54 uM de ANA e PASQUAL & ANDO (1989) com Poncirus trifo-  
liata (L.) Raf., utilizando a dosagem de 1,0 mg/l de ANA e BAP na



mesma dosagem obtiveram resultados semelhantes.

### 2.2.3. Calos

Vários são os explantes utilizados para a obtenção de calos e estes com inúmeros objetivos em cultura de tecidos, são aproveitados desde a indução de embrióides até a variações soma-clonais. Muitos trabalhos citam a formação de calos a partir da cultura de nucelos e óvulos, além de embrióides diferenciados diretamente, MAHESWARI & RANGA SWAMY (1958); SABARWAL (1963); BUTTON & BORNMAN (1971); MITRA & CHATUVERDI (1972); KOCHBA & BUTTON (1974); DEIDDA (1973).

Além de óvulos e nucelos, vários outros segmentos do fruto têm sido utilizados para indução e crescimento de calos, NITSCH (1965); EINSET (1978).

Estudos feitos por KORDAN (1963), através da formação de calos provenientes de frutos jovens, permitem observar fenômenos morfológicos, citológicos e fisiológicos.

KATO (1980), trabalhando com vesículas de frutos maduros obteve a formação de calos em C. *hossaku*, Hort. ex Tanaka. STARRANTINO & RUSSO (1980), extraíndo óvulos não desenvolvidos de algumas cultivares de citros e posteriormente cultivando-os "in vitro", obtiveram calos friáveis e embriogênicos.

MITRA & CHATUVERDI (1972), obtiveram embrióides a par

tir de calos oriundos da parede do ovário não polinizado de duas espécies poliembriônicas e de pedaços de óvulo não fertilizado de C. aurantifolia.

Inúmeros são os trabalhos que expressam o uso de calos para a obtenção de variação somaclonal em citros. As alterações mais comuns se referem ao número de cromossomos acarretando aneuploidia e poliploidia, sendo que nas espécies cítricas, o número básico normal de cromossomos é igual a nove, CAMERON & FROST (1968); CAMERON & SOOST (1976); SPIEGEL-ROY & VARDI (1984); SELI-TO-BOAVENTURA (1989).

Algumas alterações têm sido observadas tanto em embriões oriundos diretamente do nucelo como através da formação de calos ou pseudobutilhos por DEIDDA (1973); JUAREZ et alii (1976); STARRANTINO et alii (1978). No entanto, apesar dessas variações ocorrerem embriões anormais, esses embriões dão origem a plantas normais, PASQUAL (1985).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos aqui apresentados foram conduzidos no pomar, casa-de-vegetação, câmara de germinação e laboratório de Biotecnologia da Escola Superior de Agricultura de Lavras. A cidade de Lavras está situada na região do Estado de Minas Gerais, a  $21^{\circ}14'06''$  de latitude sul e  $45^{\circ}00'00''$  de longitude oeste, com altitude de 910 metros, precipitação média anual de 1483 mm e temperatura média anual de  $19,3^{\circ}\text{C}$ , VILELA & RAMALHO (1979). O clima predominante de acordo com BRASIL (1969) e CASTRO NETO (1982) é do tipo Cwb.

Os ensaios foram feitos e conduzidos de acordo com disponibilidade de material genético e levando-se em conta a deficiência de pesquisa nessa área. As plantas matrizes utilizadas foram os porta-enxertos Poncirus trifoliata L. Raf., 'limão trifoliata' e Citrus limonia Osbeck cv Cravo, 'limão cravo', o primeiro como progenitor masculino e o segundo como feminino.

Seis experimentos foram conduzidos envolvendo esses dois porta-enxertos com a finalidade de determinar as taxas médias de poliembrionia do 'limão cravo', Citrus limonia Osbeck

cv Cravo x Poncirus trifoliata (L.) Raf., e o efeito da destegumentação das sementes na expressão poliembriônica de porta-enxertos de citros em casa-de-vegetação e em câmara de germinação.

3.1. Determinação da taxa de poliembrionia do 'limão Cravo' , Citrus limonia Osbeck cv Cravo e do trifoliata Poncirus trifoliata (L.) Raf.

Foram colhidos 57 frutos do 'limão cravo' e 41 do 'trifoliata' de uma só vez e de uma única planta matriz, previamente identificada. Essa planta foi utilizada por apresentar melhores condições fitossanitárias em comparação com as outras existentes no pomar da ESAL.

Os frutos colhidos foram medidos com o auxílio de um paquímetro, registrando-se o seu diâmetro. Em seguida os frutos foram abertos com cuidado e avaliados os seguintes parâmetros: número total de sementes/fruto; número de sementes usadas por fruto, onde as sementes que apresentavam um completo desenvolvimento, com embriões compactados, impedindo a individualização, eram descartadas; viabilidade das sementes, definido pelo número total de sementes, e, finalmente, a taxa de poliembrionia, expressa pelo número total de embriões excisados no fruto dividido pelo número total de sementes.

As sementes viáveis foram abertas com ajuda de uma pinça e bisturi e, sob estereomicroscópio, com aumento de quaren-

ta vezes, seus embriões foram excisados e contados.

3.2. Determinação da taxa de poliembrionia dos frutos provenientes da hibridação artificial de Poncirus trifoliata(L.) Raf. x Citrus limonia Osbeck cv Cravo

3.2.1. Hibridação e obtenção das sementes

Este trabalho foi conduzido no período de setembro de 1988 a janeiro de 1989 no pomar e no laboratório de Biotecnologia da Escola Superior de Agricultura de Lavras.

As hibridações foram feitas na época de início de floração do progenitor masculino, 'limão trifoliata' e do progenitor feminino, o 'limão cravo'. As flores do 'trifoliata' foram colhidas na fase de balão e, em placas de Petri contendo papel filtro foram armazenadas até a ântese. Após aproximadamente 2 dias houve a liberação dos grãos de pólen, os quais aptos para a germinação do tubo polínico, foram levados para se efetuar as hibridações das flores do progenitor feminino que também estavam no estágio de balão. Selecionou-se uma flor em cada ramo, que foi emasculada, polinizada, protegida com um saquinho de papel e identificada com uma etiqueta de papelão. As flores restantes do ramo foram eliminadas.

Os frutos foram colhidos quando apresentavam um diâmetro favorável que facilitasse a contagem dos embriões individual-

mente. Essa fase, para o 'limão cravo', está em torno de 27,0 a 34,0 cm de diâmetro, ou a partir de 10 semanas após a hibridação. Em seguida os mesmos foram transportados para o laboratório, medindo seu diâmetro com paquímetro.

### 3.2.2. Assepsia das sementes e identificação dos embriões híbridos

As sementes sofreram uma assepsia com hipoclorito de sódio a 3%, durante vinte minutos. Após esse período as mesmas foram lavadas três vezes na câmara de fluxo laminar, após o que foram cortadas longitudinalmente e seus embriões excisados e contados individualmente.

Os embriões provenientes de uma mesma semente foram contados e inoculados num mesmo tubo de ensaio contendo 10 ml do meio "MS" de cultura, identificados e levados para sala de crescimento com 27°C e intensidade luminosa de mais ou menos 3.000 lux durante 16 horas diárias.

Os embriões híbridos foram identificados pela presença de folha trilobada, característica dominante do Poncirus trifoliata, utilizado como progenitor masculino.



3.3. Efeito da destegumentação das sementes na expressão poliembriônica de porta-enxertos de citros em casa-de-vegetação e câmara de germinação

Para avaliar o efeito da destegumentação das sementes foram conduzidos dois ensaios, um em casa-de-vegetação, com temperatura em torno de 28°C e umidade relativa de 80%, no pomar da Escola Superior de Agricultura de Lavras, durante o período de 22 de junho a 26 de julho de 1989 e outro em câmara de germinação, temperatura de 28°C e 90% U.R.

Os porta-enxertos utilizados foram o Poncirus trifoliata (L.) Raf. 'limão trifoliata' e o Citrus limonia Osbeck 'limão cravo'. As sementes foram retiradas de frutos maduros e em seguida foram destegumentadas, evitando a danificação das mesmas. Posteriormente essas sementes foram tratadas com hipoclorito de sódio a 3%, durante vinte minutos, diminuindo assim os riscos de contaminação. Essas sementes foram deixadas para secar em temperatura ambiente, durante 6 horas.

O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado com 6 repetições e os tratamentos obedeceram um esquema fatorial 2 x 2 constando de 2 genótipos, limão cravo e trifoliata, ambos com e sem tegumento.

No ensaio em casa-de-vegetação foram semeadas 20 sementes/parcela a 2 gm de profundidade em caixas plásticas de 28 x 38 cm, contendo como substrato, uma camada de 8 cm de areia lavada.





Para o ensaio em câmara de germinação foram utilizadas 25 sementes/parcela e como substrato usou-se o papel toalha.

Após 35 dias de germinação foram avaliados o número de sementes germinadas, número total de embriões, frequência de um e dois embriões.

#### 3.4. Taxa de poliembrionia do limão cravo, em relação à hibridação com trifoliata, autopolinização e polinização natural

A polinização artificial foi feita seguindo a mesma metodologia descrita no item 3.2.

Para a polinização natural foram selecionadas e identificadas flores na fase de balão, uma em cada ramo escolhido, deixando-se ocorrer a livre polinização.

A autopolinização foi obtida através da proteção de flores no estágio de balão, com saquinho de papel, para evitar a entrada de inseto ou pólen estranho.

Os frutos dos três diferentes tipos de polinização foram colhidos em quatro épocas distintas (aos 80, 90, 100 e 110 dias após a polinização), perfazendo um total de 12 tratamentos dispostos em delineamento inteiramente casualizado com esquema fatorial e número diferente de repetições. Registrou-se o diâmetro do fruto (DF), viabilidade da semente (V) e as sementes foram ex-

traídas e contadas, anotando-se o número total de sementes (NTS) e o número de sementes usadas (NSU). As sementes provenientes das polinizações controladas foram desinfestadas através de uma imersão em hipoclorito de sódio a 3% por 20 minutos. Posteriormente foram lavadas em água destilada autoclavada por 3 vezes consecutivas, em câmara de fluxo laminar. Com auxílio de pinça e bisturi os embriões foram excisados e contados.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

- 4.1. Poliembrionia do 'limão Cravo' Citrus limonia Osbeck cv Cravo, do 'limão trifoliata' Poncirus trifoliata (L.) Raf. e do híbrido 'cravo x trifoliata'

A análise do Quadro 1 mostra que as variáveis estudadas não estão correlacionadas com o diâmetro dos frutos, exceção feita à viabilidade das sementes, que posteriormente foi submetida à análise de regressão.

A Figura 1 torna evidente que a viabilidade das sementes está ligada à idade do fruto. À medida que o fruto se desenvolve, a viabilidade aumenta, até se estabilizar.

A análise de regressão indicou que o modelo  $Y = -0,7 + x^{0,766}$  foi o que melhor se enquadrou. A maior concentração de notas altas se situa entre as faixas de 30,0 a 34,0 milímetros de diâmetro dos frutos, constituindo-se na faixa ideal de viabilidade das sementes para visualização e posterior contagem dos embriões.

QUADRO 1 - Correlação de Pearson entre diâmetro de frutos, número total de sementes, número de sementes usadas, viabilidade das sementes e taxa de poliembrionia em 'limão cravo'. ESAL, Lavras-MG, 1988.

Variáveis	Nº de obser- vações	Correlação	T	Signifi- cância
Diâmetro x número total de sementes	57	-0,1434	-1,0748 NS	0,1436
Diâmetro x número sementes usadas	57	-0,1910	-1,4434 NS	0,0773
Diâmetro x viabi- lidades sementes	57	0,6994	7,2575 S	0,0000
Diâmetro x taxa de poliembrionia	46	-0,1995	-1,3507 NS	0,0918

S = significativo

NS = não significativo.

Observa-se no Quadro 2 que o C.V. registra uma grande variação dentro de cada parâmetro analisado, porém mais acentuada para a viabilidade das sementes. Isso é explicado porque a viabilidade depende do número de embriões visualizados nas sementes dentro de um fruto; conseqüentemente, em faixas extremas onde não é possível se contar os embriões, a nota vai decaindo, chegando a zero. Essas faixas extremas se caracterizam por duas particularidades: no início quando o fruto é ainda pequeno, os embriões não

## MODELO POTENCIAL

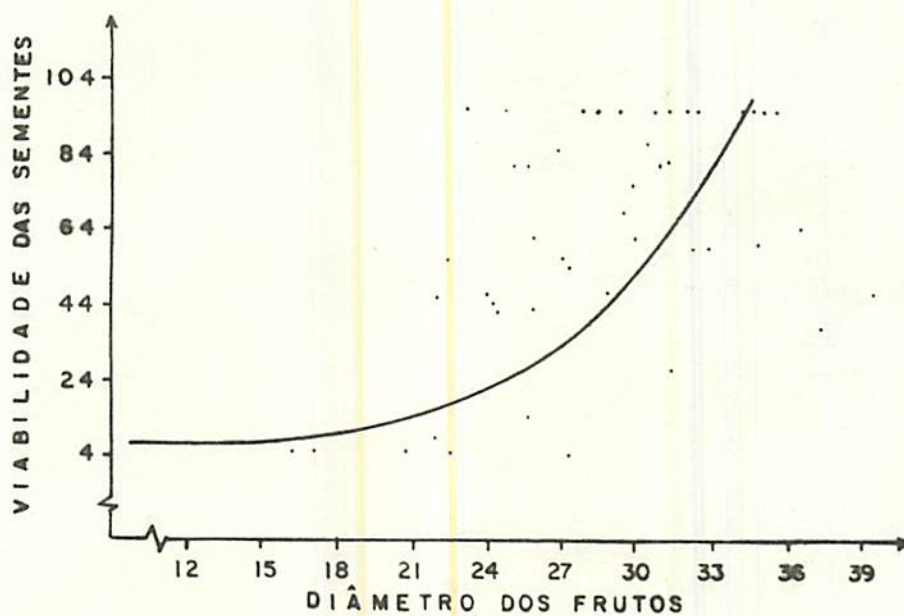


FIGURA 1 - Análise de regressão entre viabilidade das sementes e diâmetro dos frutos de 'limão cravo'. ESAL, Lavras-MG, 1988.

se desenvolveram o suficiente para que seja possível a visualização no estereomicroscópio de quarenta vezes, ou então quando os embriões já se desenvolveram de tal maneira que os mesmos se fun-

QUADRO 2 - Médias, desvio-padrão e coeficiente de variação dos parâmetros obtidos em 'limão cravo', ESAL, Lavras-MG, 1990.

Variável	Média	Desvio padrão	CV (%)
Número total sementes/fruto	12,77	4,74	37,11
Número sementes usadas/fruto	12,13	4,80	39,62
Viabilidade sementes (nota)	6,08	37,74	62,05
Taxa de poliembrionia (número embriões/fruto)	1,41	0,51	36,49
Diâmetro dos frutos (mm)	27,14	4,99	18,38

dem em uma massa dentro da semente, dificultando a individualização e contagem dos mesmos.

Foi apresentado também um alto C.V. pela variável número total de sementes, o que era esperado, pois existe uma grande variabilidade entre os frutos de um mesmo genótipo, encontrando-se até 30 sementes num fruto, para uma média de 12,77 sementes/fruto.

O parâmetro número de sementes usadas é muito semelhante ao anterior, apresentando as mesmas características; isso se explica pela difícil decisão de separar a olho nu, as sementes aptas para leitura dos embriões.

A taxa de poliembrionia, ou seja, o número médio de

embriões por fruto, evidenciou um alto C.V. entre os frutos avaliados, corroborando afirmações de FROST & SOOST (1968); OGATA (1981) & ABRAMOF et alii (1978) no entanto os dados apresentados de 1,41 embriões por fruto identificam uma baixa taxa de poliembriõnia, de acordo com POMPEU JÚNIOR (1981). Por outro lado, como foram identificados 17 embriões, esses dados são semelhantes aos de OHTA & FURUSATO (1957), que afirmaram que se pode encontrar até 40 embriões em uma mesma semente.

O Quadro 3 mostra resultados semelhantes aos obtidos para 'limão cravo', isto é, somente a viabilidade das sementes se correlacionou com o diâmetro dos frutos, neste caso, de forma negativa.

A taxa de poliembriõnia foi calculada considerando todos os frutos, porém quando não era possível efetuar contagem dos embriões, consequentemente a viabilidade foi zero. A poliembriõnia está, então, diretamente relacionada com a viabilidade dos frutos. No início de crescimento do fruto, como os embriões não são visíveis com a lupa de aumento de quarenta vezes, tem-se uma baixa viabilidade a qual atinge valor ideal, a partir daí começa a decair. Como a análise de correlação para a variável viabilidade das sementes apresentou-se significativa, fez-se uma análise de regressão, encontrando-se um  $R^2 = 0,55$ , e a seguinte equação de modelo exponencial para expressar o comportamento:  $Y = 0,457 - 0,749^X$ .

Observa-se na Figura 2, onde se expressa a curva ajustada com as respectivas notas, que as maiores estão na faixa de 27,0 a 35 mm de diâmetro dos frutos.

QUADRO 3 - Correlação de Pearson entre diâmetro de frutos, número total de sementes, número de sementes usadas, viabilidade das sementes e taxa de poliembrionia em 'limão trifoliata'. ESAL, Lavras-MG, janeiro de 1988.

Nº de variáveis	Observações	Correlação	T	Significância
Diâmetro x número total sementes	41	-0,1535	-0,9698 NS	-0,1691
Diâmetro x número sementes usadas	41	-0,1854	-0,1783 NS	-0,1229
Diâmetro x viabilidades sementes	41	-0,7131	-6,3521 S	0,0000
Diâmetro x taxa de poliembrionia	12	-0,1996	-0,6440 NS	0,2670

S = significativo

NS = não significativo.

Observa-se pelo Quadro 4, uma grande variação dos dados, e entre esses a viabilidade com C.V. mais alto, indicando que há uma grande diferença entre as sementes de um mesmo fruto.

Analisando a média dessa variável (26,75), conclui-se que a maioria dos frutos analisados apresentavam diâmetros superiores à faixa ideal de viabilidade (27,0 e 35,0 mm). Esta afirmativa foi confirmada pelo diâmetro médio dos frutos analisados, que foi de 39,43 mm. De um modo geral todos os parâmetros analisados apresentaram altos índices de variação (C.V.), demonstrando que



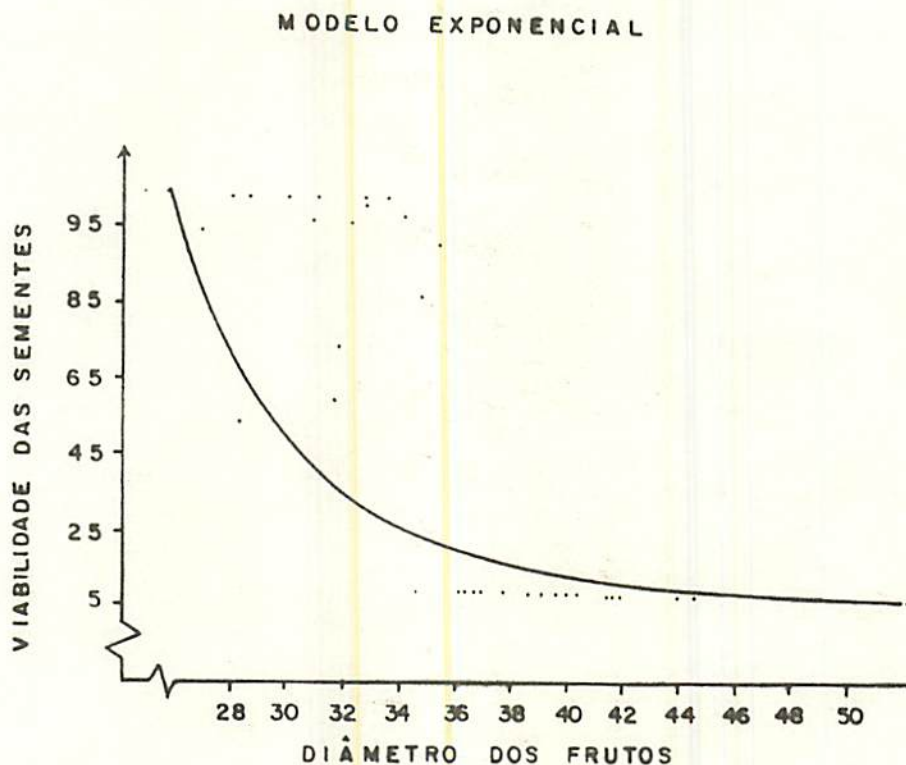


FIGURA 2 - Análise de regressão entre viabilidade das sementes e diâmetro dos frutos 'limaão trifoliata'. ESAL, Lavras - MG, 1988.

existe uma grande variabilidade dentro de um mesmo genótipo, o que está de acordo com CAMERON & SOOST (1976). O número total de sementes por fruto mostrou uma média de 28,93, no entanto, foram encontradas até 42 sementes num mesmo fruto.

O valor da taxa de poliembrionia foi considerado alto,

QUADRO 4 - Médias, desvio-padrão e coeficientes de variação dos parâmetros obtidos em 'limão trifoliata'. ESAL, Lavras -MG, 1988.

Variável	Média	Desvio padrão	CV (%)
Número total sementes/fruto	28,93	18,68	64,57
Número sementes usadas/fruto	26,61	18,27	68,66
Viabilidade das sementes(nota)	26,75	47,71	159,67
Diâmetro dos frutos (mm)	39,43	6,90	17,50
Taxa de poliembrionia (número embriões/fruto)	2,90	0,96	33,10

corroborando resultados de PRATES & POMPEU JUNIOR (1981), entre tanto, encontrou-se uma semente do porta-enxerto 'limão trifoliata' com 12 embriões, com tamanhos e formas diferentes, estando de acordo com os resultados de OHTA & FURUSATO (1957), que encontraram de 1 a 40 embriões numa mesma semente.

A identificação do híbrido em tubo de ensaio foi realizada após o surgimento da primeira folha trilobada em uma das plântulas de um mesmo tubo, o que aconteceu com o surgimento da quarta ou quinta folha verdadeira. Esse resultado está de acordo com TEICH & SPIEGEL-ROY (1972), afirmando que além da análise infra-vermelha de óleos essenciais nas folhas (PIERINGER & EDWARDS, 1965), o uso de marcadores genéticos é uma tentativa promissora.

A técnica usada nesse trabalho facilita a identificação e transporte das plântulas para outros ambientes, apesar de sua eficiência ser questionada, pois segundo LIMA (1977), o uso de isoenzimas seria mais seguro e mais eficiente. Entretanto, o uso de marcadores genéticos é o meio mais rápido, econômico e mais acessível economicamente em nossas condições. Apesar de cada semente, em geral, apresentar somente um embrião sexual, foi observada no presente trabalho uma baixa percentagem de desenvolvimento do mesmo, em torno de 40%. Segundo GURGEL (1952), as sementes cítricas apresentam somente um embrião sexual e o restante de natureza agâmica, proveniente das células do nucelo. No entanto, alguns embriões não se desenvolvem e dentre esses pode estar o sexual, confirmado pelos resultados de SALIBE (1969), que concluiu que apenas três a quatro embriões chegam a germinar.

Existem controvérsias quanto a necessidade ou não de fecundação para germinação dos embriões; para MAHESWARI & RANGASWAMY (1958); FROST & SOOST (1968); BUTTON & BORNMAN (1972), a polinização e fecundação são pré-requisitos para a embriogênese nuclear, apesar de se desenvolver, "in vitro", embriões provavelmente na ausência de polinização pelo não surgimento da folha trilobada, corroborando afirmações de BUTTON & BORNMAN (1971); KOCHBA et alii (1972).

Foi observada também uma variabilidade entre plântulas nucleares de uma mesma semente, o que é corroborado por IGLIASIAS et alii (1974), porém, teoricamente, deveriam ter a mesma constituição genética, FROST & SOOST (1968).

Os resultados das análises de correlação entre as va-

riáveis estudadas dos frutos oriundos da hibridação artificial entre Poncirus trifoliata (L.) Raf. x Citrus limonia (L.) Osbeck cv cravo estão apresentadas no Quadro 5. Observa-se que não existe diferença significativa para nenhum dos parâmetros estudados. No entanto, a maior correlação apresentada foi da variável taxa de poliembrionia em relação ao diâmetro dos frutos.

QUADRO 5 - Correlação de Pearson entre diâmetro de frutos, número total de sementes, número de sementes usadas, número total de embriões, taxa de poliembrionia e viabilidade das sementes no híbrido de 'limão cravo' e 'trifoliata'. ESAL, Lavras-MG, 1989.

Nº de variáveis	Observações	Correlação	T	Significância
Diâmetro x número total sementes	15	-0,0936	-0,3391 NS	0,3700
Diâmetro x número sementes usadas	15	0,0745	0,2694 NS	0,3959
Diâmetro x número total de embriões	15	0,3571	1,3785 NS	0,0957
Diâmetro x taxa de poliembrionia	15	0,5596	2,4343 NS	0,150
Diâmetro x viabilidade de sementes	15	0,1572	0,5740 NS	0,2879

NS = não significativo.

Com base nos resultados conclui-se que a hibridação controlada altera os resultados até aqui obtidos entre os progenitores 'limão cravo' e 'limão trifoliata'. Na hibridação controlada, não houve uma correlação significativa para todos os parâmetros analisados.

Pela análise dos dados do Quadro 6, observa-se que o número de sementes contidas num fruto diminui, com relação aos progenitores citados nos dois experimentos anteriores. Houve também uma grande variação entre os frutos dentro da mesma planta, da dos esses de acordo com CAMERON & SOOST (1976). O baixo número de sementes apresentado pode ser explicado pela alteração dos mecanismos fisiológicos de desenvolvimento dos frutos pela hibridação controlada.

A variável número de sementes usadas, consequentemente, apresenta as mesmas características. A variável número total de embriões contidos no fruto foi incrementada, com relação aos progenitores, apresentando consequentemente uma média taxa de poliembrionia (2,37), esse resultado pode ser explicado pela maior quantidade de grãos de pólen colocados de uma só vez no estigma da planta mãe, quando foi feita a polinização controlada. Observa se também um alto valor expresso da viabilidade das sementes, isso devido à época de colheita que foi feita dentro da faixa ideal para realização da mesma, intencionalmente para facilitar a conta gem dos embriões.

QUADRO 6 - Médias, desvio-padrão e coeficientes de variação dos parâmetros obtidos em 'limão cravo' x 'trifoliata'.  
ESAL, Lavras-MG, 1989.

Variáveis	Média	Desvio padrão	CV (%)
Número total de sementes	10,20	4,39	43,09
Número sementes usadas	8,40	3,85	45,84
Número total embriões	21,33	13,46	63,08
Viabilidade das sementes	8,21	22,89	27,90
Taxa de poliembrionia	2,39	0,88	36,59
Diâmetro dos frutos	30,77	3,04	9,87

#### 4.2. Efeito da destegumentação das sementes na expressão poliembriônica de porta-enxertos de citros em casa-de-vegetação

Verifica-se pelo Quadro 7, que tanto o genótipo como a destegumentação da semente influenciaram ( $p \leq 0,01$ ) o número de sementes germinadas e o número de embriões. Por outro lado, tanto a frequência de um como de dois embriões sofreram o efeito da destegumentação da semente ( $p \leq 0,01$ ) e que a destegumentação exerce uma influência diferenciada entre os genótipos para estes parâmetros.

QUADRO 7 - Quadros médios para os diversos parâmetros analisados dos porta-enxertos 'limão cravo' e 'trifoliata', com e sem tegumento em casa-de-vegetação. ESAL, Lavras -MG, 1990.

Fontes de	GL	Sementes	Total de	Frequência	Frequência
variação		germinadas	embriões	um embrião	2 embriões
Genótipo	1	18,375**	63,375**	0,667	0,416
Tegumento	1	805,042**	1190,042**	560,667**	3,172**
G x T	1	7,042	7,042	37,500**	1,139**
Resíduo	20	3,525	5,625	4,183	1,076
CV (%)	-	17,53	19,29	22,11	28,35

\*\* = Significativo ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

O Quadro 8 evidencia que as sementes quando desprovidas do tegumento apresentam uma percentagem de germinação muito superior, independente do genótipo. A observação de que os tegumentos que envolvem a semente dificultam a sua germinação tem sido feita por inúmeros outros autores, considerando inclusive o tegumento como um dos fatores condicionantes da dormência de algumas sementes e, em casos extremos impedindo totalmente a germinação.

O número total de embriões apresenta um comportamento muito similar às sementes germinadas, registrando valores superiores

QUADRO 8 - Médias dos tratamentos para os porta-enxertos 'limão trifoliata' e 'limão cravo', com e sem tegumento. ESAL, Lavras-MG, 1989.

Parâmetros	Cravo		Trifoliata	
	com	sem	com	sem
	tegumento	tegumento	tegumento	tegumento
Sementes germinadas	6,33 B	16,83 A	3,50 B	16,17 A
Total de embriões	6,33 C	21,50 A	4,17 C	17,17 B
Freq. de um embrião	5,83 B	13,00 A	3,00 B	15,17 A
Freq. de dois embriões	0,71 B	1,87 A	0,88 B	1,17 B

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

res para sementes destegumentadas e identificando inclusive diferenças estatísticas entre genótipos (Quadro 8). Esse fato comprova a ineficiência da determinação da taxa de poliembrionia pelo método convencional, através do qual as sementes eram simplesmente colocadas para germinar, e aceitava-se que o número de plantas obtidas correspondia ao número de embriões em uma semente, conforme citação de OGATA (1981), SALIBE (1969).

Ainda no Quadro 8 pode-se notar que a frequência de um embrião é maior para ambos os genótipos quando os tegumentos são removidos. Observa-se também que, apesar de as diferenças não serem significativas, o limão 'trifoliata' apresenta valor maior



que o 'cravo' quando as sementes são destegumentadas, ao passo que este valor é menor em sementes com tegumentos. Esta é a razão da significância estatística na interação genótipo x tegumento para a frequência de um embrião e, deve estar relacionado a uma maior rigidez dos tegumentos de 'trifoliata', dificultando mais a germinação de suas sementes, onde o índice verificado foi inferior para o limão 'cravo' com sementes tegumentadas. A destegumentação na frequência de dois embriões só se revelou significativa para o 'limão cravo' e, este por sua vez, diferiu significativamente do 'trifoliata'.

Pelo Quadro 9, verifica-se que o porta-enxerto 'limão cravo' apresenta maiores valores, principalmente quando se retira os tegumentos das sementes. A destegumentação tem efeito direto na germinação, número total de embriões e conseqüentemente na taxa de poliembrionia.

Os dados sobre a percentagem de sementes com 3 ou 4 embriões evidenciam que são poucas as sementes que atingem esses valores, corroborando afirmações de SALIBE (1969).

Comparando os valores dos porta-enxertos, com respeito à taxa de poliembrionia, evidencia-se uma maior taxa para o 'limão cravo', contrariando os dados obtidos quando se faz a contagem direta dos embriões na semente, sendo esta a taxa real de poliembrionia. De acordo com os dados pode-se concluir que a discrepância havida pode ser devida à maior sobrevivência dos embriões dentro das sementes do porta-enxerto 'limão cravo'.

QUADRO 9 - Valores observados para os parâmetros analisados nos porta-enxertos 'limão cravo' e 'trifoliata' com e sem tegumento em casa-de-vegetação. ESAL, Lavras-MG, 1989.

Tratamento	% de Germ.	% de sementes				Poliem- brionia (%)	Taxa poliem- brionia
		1E	2E*	3E	4E		
Cravo S/T	84,17	77,23	18,81	2,97	0,97	22,77	1,28
Cravo C/T	31,67	100,00	-	-	-	0	1,00
Trifoliata S/T	17,50	85,71	9,52	4,77	-	14,29	1,19
Trifoliata C/T	80,83	93,81	6,19	-	-	6,19	1,06

\* Embriões.

#### 4.3. Efeito da destegumentação das sementes na expressão poliembriônica de porta-enxertos de citros em câmara-de-germinação

Observa-se no Quadro 10 que, exceto para frequência de um embrião, os demais parâmetros foram influenciados apenas pelo genótipo. O não efeito da destegumentação da semente, no caso, pode ser explicado pelo ambiente uniforme durante o período.

Ainda o Quadro 10, observa-se um baixo coeficiente de variação para a maioria dos parâmetros analisados, com exceção da frequência de dois embriões; esses dados confirmam a citação anterior de que há uma alta uniformidade do ambiente onde o trabalho

QUADRO 10 - Quadrados médios dos diversos parâmetros analisados de 'limão cravo' em câmara-de-germinação. ESAL, Lavras-MG, 1990.

Fontes de variação	GL	Semen. germ.	Total de embriões	Freq. embriões	Freq. embriões	Taxa Poliembr.
Genótipo	1	70,04**	260,04**	1,50	42,67**	0,068*
Tegumento	1	0,377	0,37	2,67	0,67	0,01
G x T	1	0,376	2,04	1,50	0,16	0,025
Resíduo	20	3,24	9,66	4,12	4,11	0,00897
C.V. (%)	-	8,04	11,78	10,68	57,27	8,12

\*\* = Significativa a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

\* = Significativa a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

foi desenvolvido.

Uma análise do Quadro 11, evidencia que o 'limão cravo' apresenta maior frequência de dois embriões, maior taxa de poliembrionia, maior percentagem de germinação.

Esses resultados, semelhantes ao experimento anterior contrariam os resultados obtidos por PRATES & POMPEU JUNIOR (1981). Presume-se que houve diferença entre os dados devido à maior sobrevivência dos embriões e conseqüentemente maior germinação do porta-enxerto 'limão cravo'.

QUADRO 11 - Valores observados para os parâmetros analisados nos porta-enxertos 'limão cravo' e 'trifoliata' com e sem tegumento em câmara-de-germinação. ESAL, Lavras - MG, 1989.

Tratamento	% de germinação	% de sementes			Poliembrionia (%)	Taxa poliembrionia
		1E*	2E	3E		
Cravo S/T	96,67	79,31	19,31	1,38	20,68	1,22
Cravo C/T	97,97	80,00	18,62	1,38	20,00	1,23
Trifoliata S/T	83,11	88,62	10,57	0,81	11,38	1,15
Trifoliata C/T	84,00	92,06	7,94	-	7,94	1,08
Totais	89,93	85,07	14,55	0,93	15,49	1,18

\* Embriões.

#### 4.4. Comparação da taxa de poliembrionia através da polinização artificial, autopolinização e polinização natural

O Quadro 12 mostra que o tipo de polinização influencia a taxa de poliembrionia ( $p \leq 0,05$ ), o número total de sementes ( $p \leq 0,05$ ) e o número de sementes usadas ( $p \leq 0,01$ ). Considerando-se a idade dos frutos, a mesma sugere que o estágio de desenvolvimento do fruto afeta a taxa de poliembrionia ( $p \leq 0,05$ ), o número total de sementes e a viabilidade das sementes. Por ou -

QUADRO 12 - Análise de variância para três tipos de polinização em quatro épocas diferentes de colheita dos frutos de 'li mão cravo'. ESAL, Lavras-MG, 1990.

Fontes de variação	GL	Taxa de poliembrionia	Número total sementes	Número sementes u-sadas	Diâmetro do fruto	Viabilidade
Polinizações	2	1,57*	206,76*	94,17**	2,45	1,71
Idades	3	1,25*	75,32*	34,07	8,76	37,16*
Pol. x Idades	6	0,13	64,98*	7,37	9,39	1,15
Resíduo	48	0,33	26,73	16,40	14,75	4,60
C.V. (%)	-	29,62	53,30	46,39	12,08	29,95

\* = Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

\*\* = Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

tro lado, o tipo de polinização influencia diferentemente o número total de sementes, em relação à idade do fruto.

Quando se compara os três tipos de polinização verifica-se que os diferentes tratamentos aplicados alteram a taxa de poliembrionia, concordando com PARLEVLLET & CAMERON (1959).

A Figura 3 mostra que a polinização artificial apresenta maior taxa de poliembrionia em quase todas as fases de desenvolvimento do fruto analisado, corroborando as citações de PARLEVLLET & CAMERON (1959); FURUSATO (1961); CAMERON & FROST (1968);

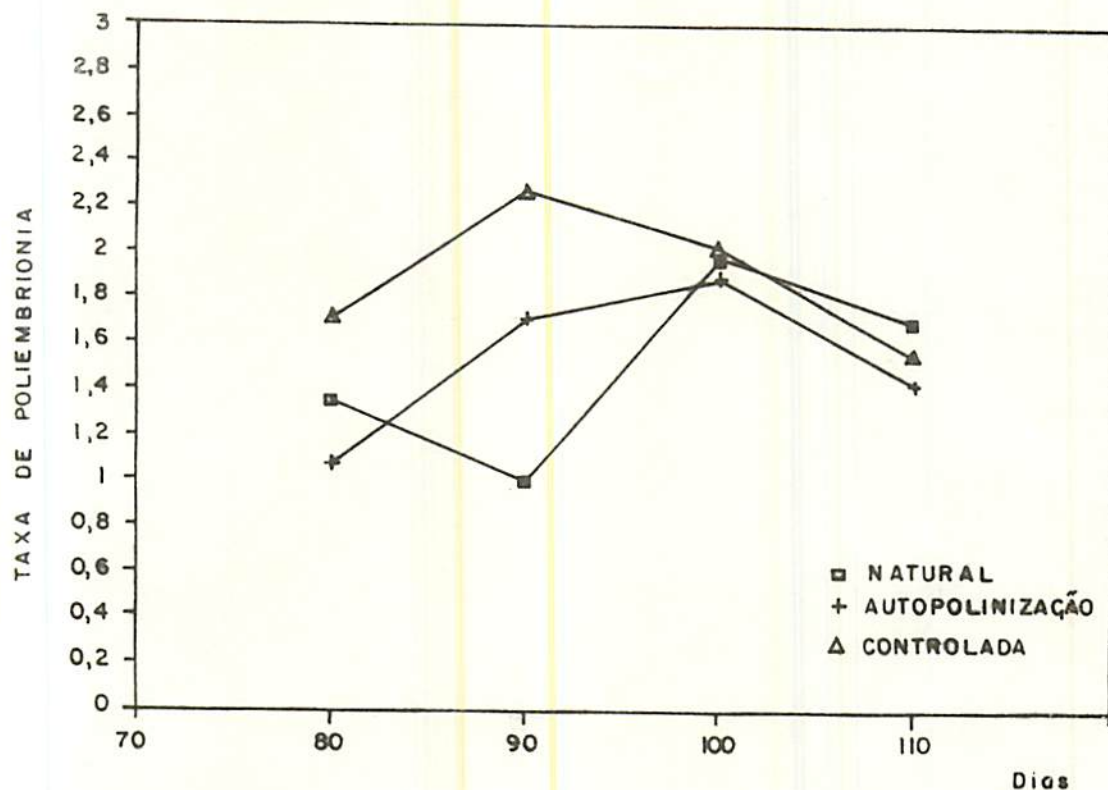


FIGURA 3 - Número médio de embriões por semente (taxa de poliembriõnia) em diferentes idades de frutos de Citrus limonia Osbeck cv cravo. ESAL, Lavras-MG, 1990.

FURUSATO et alii (1968); SOOST & CAMERON (1975); CAMERON & SOOST (1979). No entanto, considerando a idade de 110 dias, observa-se que a taxa de poliembriõnia caiu para todos os tratamentos, isso está diretamente relacionado com a viabilidade dos frutos, pois, nessa fase os embriões não estão visíveis individualmente. Essa afirmação está de acordo com a Figura 6, que apresenta um ponto de



Figura 2 - Gráfico de linhas que mostra o comportamento das variáveis A, B e C ao longo dos dias. O eixo horizontal representa o tempo em dias (10, 20, 30, 40) e o eixo vertical representa o valor das variáveis (0,1 a 1,0). A linha A (CONTROLAGA) apresenta um pico em torno do dia 20. A linha B (FUNDAMENTAL) apresenta um pico em torno do dia 30. A linha C (FUNDAMENTAL) apresenta um pico em torno do dia 40.

Fonte: Dados do autor, 2023.

mínima para todos os tratamentos nessa idade. À medida que o fruto cresce os embriões se fundem dentro das sementes, o que dificulta a contagem individual dos embriões.

Analisando a Figura 4, observa-se que o número total de sementes foi maior em autopolinizações, dentro da maior parte do período, do que nas hibridações controladas e naturais. Esse aumento no número total de sementes (NTS) em autofecundação pode ser devido a não interferência externa, ou compatibilidade dentro da mesma cultivar. Aos 110 dias de idade o comportamento foi diferente, talvez devido ao menor número de frutos analisados.

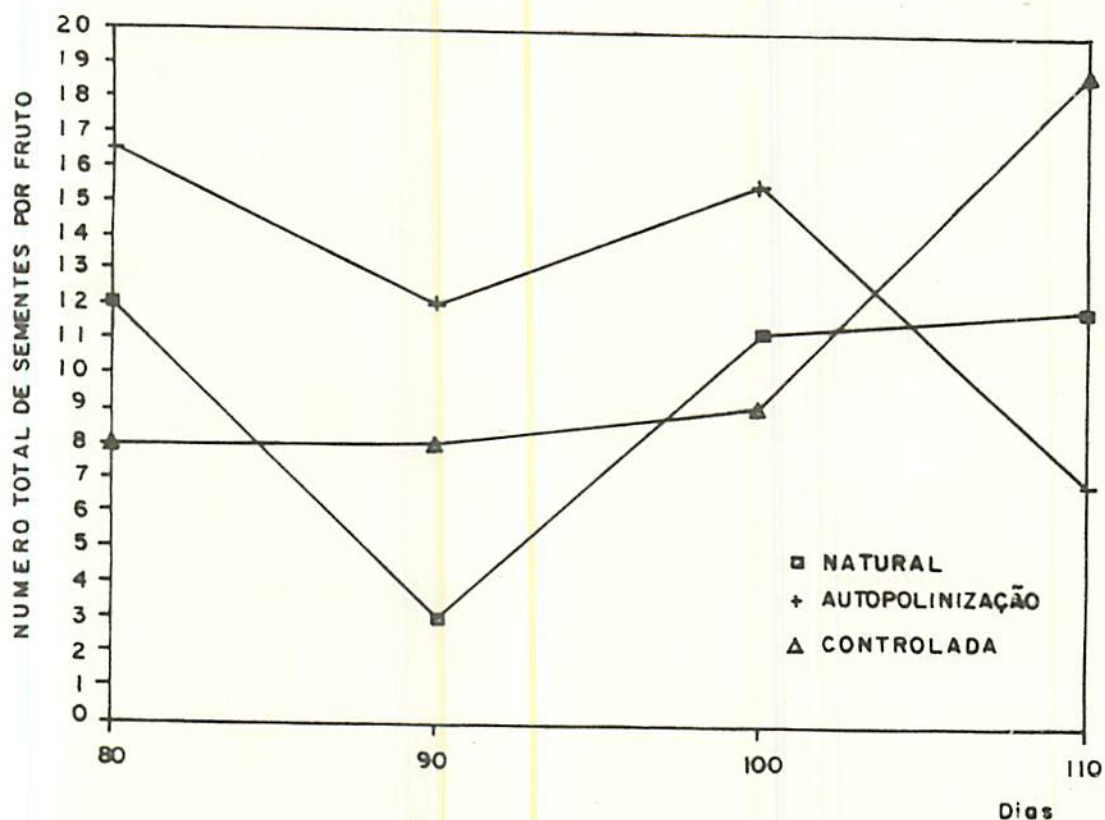


FIGURA 4 - Número total de sementes em frutos de diferentes idades em porta-enxertos 'limão cravo' e 'trifoliata'.

ESAL, Lavras-MG, 1990.



A Figura 5 mostra o número de sementes usadas (NSU), apresenta o mesmo comportamento do número total de sementes (Figura 4).

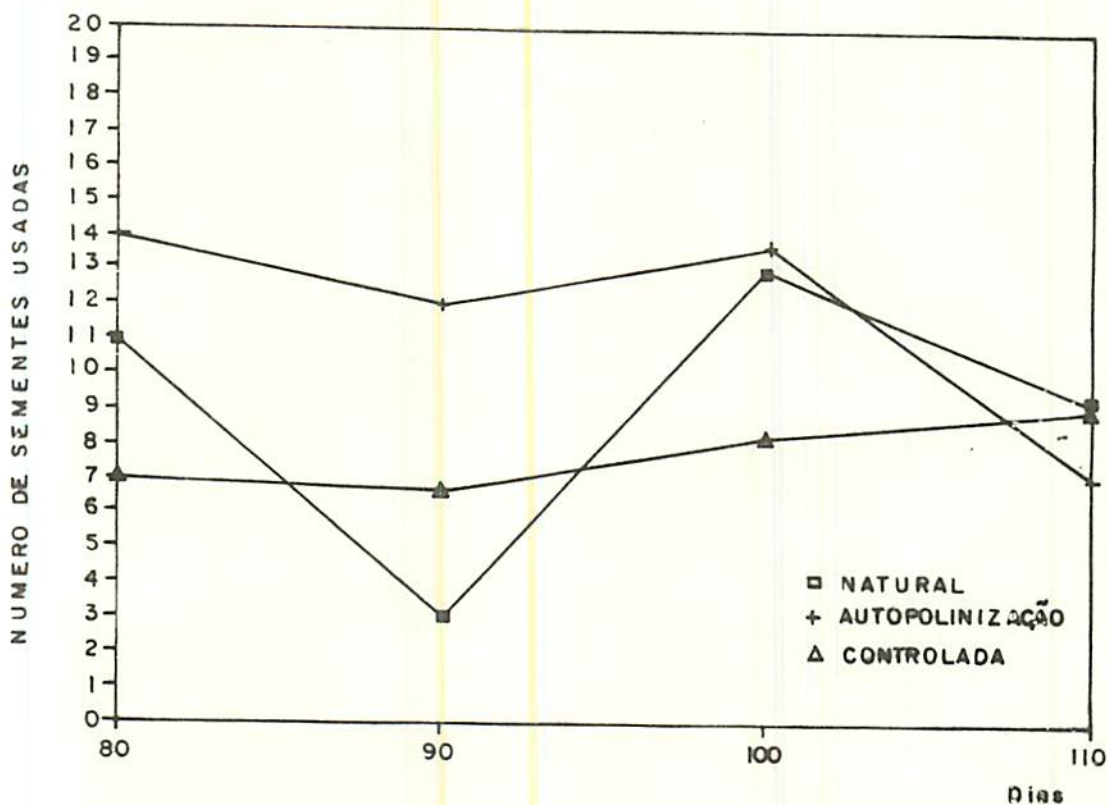


FIGURA 5 - Número de sementes usadas em diferentes idades dos frutos de *Citrus limonia* Osbeck cv cravo. ESAL, Lavras-MG, 1990.

A viabilidade dos frutos mostrou respostas diferentes ( $p \leq 0,01$ ) em relação à idade dos frutos. Essa viabilidade é alterada à medida que os frutos se desenvolvem, pois quanto maior for

a idade do fruto, menor é a viabilidade (Figura 6).

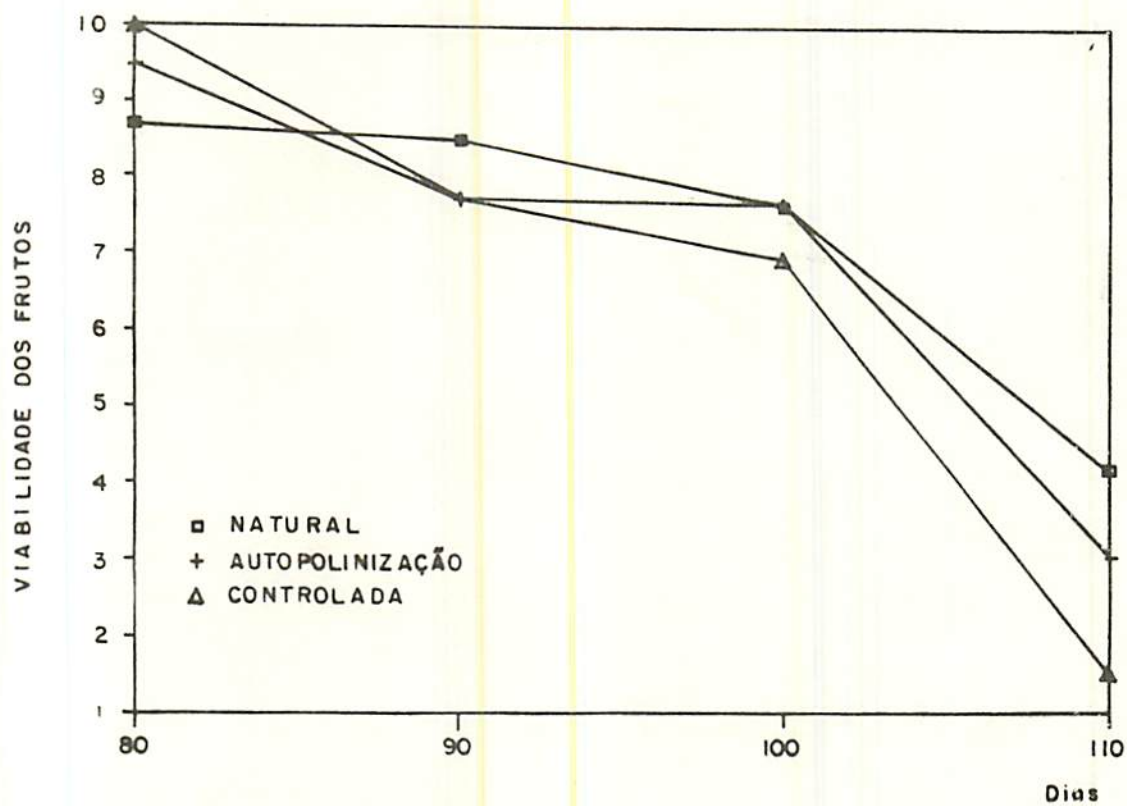


FIGURA 6 - Viabilidade dos frutos em diferentes épocas de colheita dos porta-enxertos 'limão cravo' e 'trifoliata'. ESAL, Lavras-MG, 1990.

## 5. DISCUSSÃO GERAL

Observa-se no Quadro 13 que o número de sementes contidas no fruto apresenta diferenças significativas entre os genótipos estudados, o qual é maior para o porta-enxerto 'limão trifoliata' e bem menor para o híbrido entre 'limão trifoliata' e 'limão cravo'. Conseqüentemente o número de sementes usadas segue o mesmo raciocínio, pois estes parâmetros estão diretamente relacionados.

A viabilidade foi também diferenciada entre os três tipos de frutos analisados, o que pode ser explicado pela maior facilidade de manuseio entre os mesmos. As sementes de 'limão cravo' apresentavam tegumentos mais finos, facilitando a excisão dos embriões, enquanto que no 'limão trifoliata' o tegumento é mais resistente e há um número maior de embriões contidos numa semente. Outro fator que pode ter influenciado esse número é a fase em que se encontravam os frutos, pois as fases ideais são diferentes para essas espécies, no caso presente as sementes de 'limão trifoliata' não se apresentaram dentro de uma faixa ótima para observação dos embriões individualizados no interior das sementes.

QUADRO 13 - Resumo de médias do número total de sementes, número de sementes usadas, viabilidade das sementes, taxa de poliembrionia e diâmetro dos frutos, para 'limão cravo', 'limão trifoliata' e o híbrido 'cravo e trifoliata'. ESAL, Lavras-MG, 1990.

Variáveis	'Cravo'		'Trifoliata'		'Cravo'x'Tri foliata'	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
Número total sementes	12,77	4,74	28,93	18,68	10,20	4,39
Número sementes usadas	12,13	4,80	26,61	18,27	8,40	3,85
Viabilidade	6,08	37,74	26,75	47,71	82,05	22,89
Taxa de poliembrionia	1,41	0,51	2,90	0,96	2,39	0,88
Diâmetro dos frutos	27,14	4,99	39,43	6,90	30,77	3,04

Considerando a taxa de poliembrionia, observa-se (Quadro 13) que também houve diferenças significativas (Quadro 12), como já era esperado, corroborando citações de FROST & SOOST(1968); OGATA (1981); ABRAMOF et alii (1978). A taxa de poliembrionia foi maior para o 'limão trifoliata', em segundo lugar para os frutos provenientes dos cruzamentos e por último para o 'limão cravo'. Verificou-se pois, que a poliembrionia está ligada diretamente com o genótipo das cultivares utilizadas como progenitores, sendo que essa característica, segundo PARLEVLIE & CAMERON (1959), é controlada por um gene principal denominado P.

O Citrus limonia Osbeck possui baixa taxa de poliembrionia, dados esses que estão de acordo com PRATES & POMPEU JUNIOR (1981).

Analisando o Quadro 13, como um todo, conclui-se que existe uma grande variabilidade entre e dentro dos parâmetros avaliados e que as diferenças são altamente significativas, afirmações já anteriormente constatadas por CAMERON & FROST (1976), CAMERON & FROST (1968).

Deve ser registrado que o número total de sementes depende somente da cultivar ou variedade utilizada, independentemente da hibridação controlada.

A poliembrionia no gênero Citrus, dificulta principalmente a identificação do embrião sexual; no presente trabalho foi utilizado o Poncirus trifoliata (L.) Raf. como progenitor masculino, possuidor da característica folha "trilobada", TEICH & SPIEGEL-ROY (1972), que permitiu o reconhecimento do híbrido. Foram obtidas oito plantas que estão se desenvolvendo no pomar da ESAL, à disposição para futuros trabalhos, principalmente na área de Genética e Melhoramento, constituindo-se num material altamente promissor por suas características genéticas favoráveis, já citadas anteriormente.

Respostas sobre a taxa real e taxa de expressão da poliembrionia foram obtidas nesse trabalho. Pelos resultados apresentados observa-se que a taxa real é bem maior, pois essa é feita pela contagem dos embriões contidos dentro da semente, enquanto que a segunda é feita somente após a emergência das plântulas,

sendo então prejudicada pelas condições adversas do meio ambiente e aglomeração dos embriões dentro da semente. Analisando-se o efeito da destegumentação sobre a expressão da poliembrionia concluiu-se que as variáveis utilizadas apresentaram maiores valores na câmara de germinação, como já era esperado, pois, o ambiente é mais favorável ao desenvolvimento e germinação dos embriões (Quadro 9 e 11).

Os dois ensaios com destegumentação das sementes (casa-de-vegetação e câmara de germinação) apresentaram resultados diferentes dos ensaios anteriores e dos apresentados por PRATES & POMPEU JUNIOR (1982), pois, a taxa de poliembrionia do Citrus limonia Osbeck foi maior do que o Poncirus trifoliata (L.) Raf. ; esse resultado conflitante pode ser devido à alta taxa de germinação apresentada pelo Citrus limonia Osbeck nos dois experimentos.

## 6. CONCLUSÕES

1. A taxa de poliembrionia é uma característica dominante e variável com as espécies cítricas Citrus limonia Osbeck cv cravo e Poncirus trifoliata (L.) Raf.
2. A taxa de poliembrionia para o 'limão trifoliata', é de 2,90 embriões/sementes, para 'limão cravo' de 1,41, e para os frutos provenientes do cruzamento ('cravo' e 'trifoliata') de 2,39 embriões/semente, e deve ser determinada pela contagem direta dos embriões nas sementes.
3. A viabilidade das sementes é afetada pela idade dos frutos.
4. O diâmetro ou a idade dos frutos não influencia a taxa de poliembrionia, o número total de sementes e o número de sementes usadas, porém aos 80-90 dias após a polinização, torna-se mais fácil a individualização dos embriões.
5. O tamanho ideal dos frutos para contagem dos embriões é de 27,0 a 34,0 mm de diâmetro para o 'limão trifoliata' e para as sementes resultantes do cruzamento de 28,0 a 33,0 mm para o 'limão cravo'.

6. O tipo de polinização afeta a taxa de poliembrionia, bem como o número total de sementes e o número de sementes usadas.
7. A destegumentação favorece a germinação das sementes e a emergência de um maior número de embriões/semente.
8. A destegumentação induz um aumento na taxa de poliembrionia.



## 7. RESUMO

O presente trabalho foi conduzido na Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), Minas Gerais, durante o período de outubro de 1987 a fevereiro de 1990. Objetivou-se a determinação da taxa de poliembrionia e identificação do embrião sexual "in vitro" dos porta-enxertos Poncirus trifoliata (L.) Raf. e Citrus limonia Osbeck cv cravo. Foram instalados seis experimentos onde se determinou a taxa de poliembrionia do 'cravo', do 'trifoliata' e das sementes provenientes da hibridação dos mesmos. Os parâmetros analisados foram número total de sementes, número de sementes usadas, viabilidade e diâmetro dos frutos, número de embriões por semente e número total de embriões. Os dados obtidos foram submetidos às análises de correlação e posterior regressão.

Determinou-se também a expressão da poliembrionia em sementes com e sem tegumentos em casa-de-vegetação e câmara de germinação, em DIC com esquema fatorial 2 x 2 com seis repetições, através da análise dos seguintes parâmetros: número de sementes germinadas, número total de embriões, frequência de um dois, três e quatro embriões. A taxa de poliembrionia foi determinada também

considerando-se hibridações controladas, auto-polinização e polinização aberta, com DIC em esquema fatorial 3 x 4 com número diferente de repetições.

Com base nos resultados obtidos concluiu-se que: a viabilidade está correlacionada com idade ou diâmetro dos frutos; a taxa de poliembrionia é dependente do genótipo e está diretamente relacionada com o tipo de hibridação utilizada e deve ser determinada pela contagem direta dos embriões na semente; a retirada do tegumento das sementes facilita a germinação e desenvolvimento dos embriões, conseqüentemente alterando a taxa de poliembrionia.

## 8. SUMMARY

POLIEMBRIONIC RATE AND IDENTIFICATION SEXUAL EMBRYO "IN VITRO" OF THE ROOSTOCKS Poncirus trifoliata (L.) RAF. AND Citrus limonia OS BECK CV CRAVO.

Author: José Darlan Ramos

Adviser: Moacir Pasqual

The present work was conducted in Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil, during the period October 1987 to February 1990.

The objective was to determine the poliembrionic rate and identify "in vitro" sexual embryo of the roostocks Poncirus trifoliata (L.) Raf. and Citrus limonia Osbeck cv cravo. The study made up of six experiments, determined the poliembrionic rate of the 'cravo', 'trifoliata' and seeds from their hybridization. Variables analyzed were: number of seeds by fruit, number of seeds by fruit sampled for examination, diameter of the fruit, and total number of embryos per fruit. The analyses examined correlation between variables and significantly correlated variables

were further analyzed by regression.

Poliembrionic expression in seeds, with or without seed coats was determined in a greenhouse and in a germination chamber, using a 2 x 2 factorial scheme with six replications. The variables were: number of germinating seeds; total number of embryos; frequency one, two, three and four embryos.

The poliembrionic rate was also determined by factorial analysis and compared for three types of pollination at four stages of fruit development.

Based on results obtained one can conclude that seed viability is correlated with age or diameter of the fruit; the rate of poliembrios depends on the genotype and is related to the type pollination and direct count of embryos in seed; the removal of the seed coat facilitates germination and embryo development and consequently changes the poliembrionic rate.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAMOF, L.; FUJIWARA, M. & COSTA, O.A. Embriologia em Citrus spp. Piracicaba, ESALQ, 1978. 54p.
2. ALLARD, R.W. Hibridação interespecífica no melhoramento de plantas. In: \_\_\_\_\_. Princípios do melhoramento genético das plantas. São Paulo, Edgard Blücher, 1960. p.349-55.
3. ANDREOLI, C. Cultura de embrião. In: SIMPÓSIO DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1, Brasília, 1985. Anais... Brasília, 1986. p.25-8.
4. BACCHI, O. Cytological observations in citrus: III. Megasporeogenesis, fertilization and polyembryony. Botanicae Gazette, Chicago, 105:221-5, 1943.
5. BAKRY, F.J. A embriogene somática e suas aplicações. In: SIMPÓSIO DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1, Brasília, 1985. Anais... Brasília, 1986. p.29.

6. BARLASS, M. & SKENE, K.G.M. In vitro plantlet formation from citrus specie and hybrids. Scientia Horticulturae. Netherlands, 17:333-41, 1982.
7. BRASIL; Ministério da Agricultura. Escritório de Meteorologia. Normas Climatológicas (Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e Guanabara). Rio de Janeiro, 1969. 99p.
8. BRUCK, D.K. & WALKER, D.B. Cell determination during embryogenesis in Citrus jambhiri II. Epidermal differentiation as a out-time event. American Journal of Botany. Columbus, 72(10):1602-9, Oct. 1985.
9. BUTTON, J. & BORNMAN, C.H. Development of nucellar plants from unpollinated and unfertilised ovules of the washington navel orange "in vitro". Journal South African Botany. Cleromont, 37(2):127-34, 1971.
10. \_\_\_\_\_ & KOCHBA, J. Tissue culture in the citrus industry. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. Berlin, Springer-Verlag, 1977. p.70-92.
11. CAMERON, J.W. & FROST, M.B. Genetics, breeding, and nucellar embryony. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D. & WEBBER, M.J. The Citrus Industry. Berkeley, University of California, 1968. v.2, cap.5, p.325-70.

12. CAMERON, J.W. & SOOST, R.K. Citrus. In: MOORE, J.N. & JANICK, J., eds. Advances in Fruit Breeding. West Lafayette, Purdue University Press, 1975. p.513-7.
13. \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Citrus. In: SIMMONDS, N.W., ed. Evo - lution of Crop Plants. New York, Longuran, 1976. p.261-5.
14. \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Citrus. In: Outlines of perenial crop breeding in the tropics. Wageningen, H. Velnman and Zonen, 1969. p.129-62.
15. CAMPBELL, C.S.; GREENE, C.W. & BERGRUIST, S.E. Apomixis and sexuality in three species of aurilanchier, shadbush (Rosa ceae, Meloideae). American Journal of Botany, Columbus, 74(3):321-8, Mar. 1987.
16. CASTRO NETO, P. Notas de aula prática do curso de agrometeorologia. Lavras, ESAL, 1982. 45p. (Apostila).
17. CHAPOT, H. The citrus plant. In: \_\_\_\_\_. Citrus, Switzerland, CIBA-GEIGY, 1975. p.6-13. (Technical Monograph, 4).
18. DEIDDA, di. Embrioni nucellari di clementine ottenuti "in vitro". Revista della Ortofloro-fruticultura Italiana, 57(4):291-6, 1973.

19. EINSET, J.W. Citrus tissue culture: stimulation of fruit explant cultures with orange juice. Plant Physiology, Washington, 62(6):885-8, Dec. 1978.
20. ESAN, E.B. A detailed study of adventive embryogenesis in the Rutaceae. Riverside, University of California, 1973. 233p. (Dissertacion).
21. ESEN, A. Separation of nucellar and zygotic citrus seedlings by use of polyphenol oxidase-catalyzed browning. Proc.Sut. Soc.Citriculture, 2:616-8, 1977.
22. \_\_\_\_\_ & SOOST, R.K. Adventive embryogenesis in Citrus and its relation to pollination and fertilization. American Journal Botany, Califórnia, 64(6):607-14, July 1977.
23. FERNANDES, M.I.B. de M. Perspectivas da biotecnologia para o melhoramento de plantas. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 22(9/10):881-96, set./out. 1987.
24. FROST, H.B. Genetics and breeding. In: WEBBER, H.J. & BATHCHELOR, L.D. The citrus Industry; History, Botany and Breeding. Berkeley, University of California Press, 1948. Cap.9, p.817-913.



25. FROST, H.B. & SOOST, R.K. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In: BATCHELOR, L.D. & WEBBER, H.J. The Citrus Industry. Berkeley, University of California Press, 1968. v.2, cap.4, p.290-323.
26. GURGEL, J.T.A. Poliembrionia e embriogenia adventícia em Citrus, Mangifera e Eugenia. Dusenya, Curitiba, 3(6):443-50, nov. 1952.
27. \_\_\_\_\_ & SOUBIHE SOBRINHO, J. Análise de poliembrionia em Citrus, maxime em toranjas. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 8(155):727-46, 1951. (Separata, 155).
28. \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Poliembrionia em mirtáceas frutíferas. Bragantia, Campinas, 11(141/163). 1951. (Separata).
29. HANNA, W.W. & BASHAW, E.C. Apomixis: its identification and use in plant breeding. Crop Science, Madison, 27(6):1136-9, Nov./Dec. 1987.
30. HANNING, E. Zur physiologie pflanzlicher embryonen. I. Ueber die cultur von cruciferen-embryonen ausserhalb des embryo-sacks. Botanische Zeitung, Berlin, 62:45-80, 1904.

31. HEARN, C.J. Recongnition of zygotic seedlings in certain orange crosses by vegetative characters. Proceeding In - ternational Society of Citriculture, 2:611-4, 1977.
32. HORIUCHI, S.; YUDA, E. & NAKAGAWA, S. "In vitro" culture of young embryo in polyembrionic Citrus. Journal of Japanese Society for Horticultural Science, Tokyo, 45(3):253-60, 1976.
33. IGLESIAS, L.; LIMA, H. & SIMON, J.P. Isoenzyme identifica - tion of zygotic and nucellar seedlings in Citrus. The Journal of Heredity, Washington, 65(2):81-4, Mar./Apr. 1974.
34. JUAREZ, J.; NAVARRO, L. & GUARDIOLA. Obtention de plants nu- cellaires de divers cultivars de clementiniers an moyey de la culture de nucelle "in vitro". Fruits, Paris, 31(12): 751-62, Dec. 1976.
35. KATO, Y. Studies on juice visicles isolated from nature and inmature citrus fruit. Journal of the Japanese Society of Horticultural Science. Tokyo, 49(1):36-40, Ma . 1980.

36. KOCHBA, J. & BUTTON, J. The stimulation of embryogenesis and embryoid development in habituated ovular callus from the "shamouti" orange (Citrus sinensis) as affected by tissue age and sucrose concentration. Journal of Plant Physiology, Berlin, 73(2):415-21, 1974.
37. \_\_\_\_\_ & SPIEGEL-ROY, P. Cell and tissue culture for breeding and developmental studies of Citrus. HortScience, Virginia, 12(2):110-4, Apr. 1977.
38. \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_ & SAFRAN, H. Adventice plants from ovules and nucelli in Citrus. Planta, Berlin, 106:237-45, 1972.
39. KORDAN, H.A. Growth characteristics of citrus fruit tissue "in vitro". Nature, London, 198:867-9, 1963.
40. \_\_\_\_\_. Proliferation of excised juice vesicles of lemon "in vitro". Science, Washington, 129:779-80, 1959.
41. LEOPOLD, A.C. & KRIEDEMANN, P.E. Juvenility, maturity and senescence. In: \_\_\_\_\_. Plant growth and development. New York, McGraw Hill, 1975. cap.11, p.249-69.
42. LIMA, H. Estudio comparativo de la efectividad de los técnicas utilizadas para la diferenciación de posturas nucelares y cigóticos en cítricos. Proceedings International Society of Citriculture, 2:641-4, 1977.

43. MAHESHWARI, P. & RANGA SWAMY, N.S. Polyembryony and "in vitro" culture of Citrus and Mangifera. The Indian Journal of Horticulture, Bangalore, 15:275-86, 1958.
44. MITRA, G.C. & CHATUVERDI, H.C. Embryoids and complete plants from unpollinated ovaries and from ovules of "in vitro" grown emasculated flower buds of Citrus spp. Bulletin of the Torrey Botanical Club, New York, 99:184-9, 1972.
45. MOREIRA, C.S. Melhoramento de citros. In: RODRIGUEZ, O. & VIEGAS, F. Citricultura Brasileira, Campinas, Fundação Cargill. 1980. v.1, p.195-223.
46. MOREIRA, S. Clones nucelares: caminho para uma nova citricultura. Revista da Agricultura, Piracicaba, 37(1):73-82, mar. 1962.
47. \_\_\_\_\_; GURGEL, J.T.A. & ARRUDA, L.F. Poliembriõnia em Citrus. Bragantia, Campinas, 7(3):69-106, mar. 1947.
48. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, Kopenhagen, 15:473-97. 1962.

49. MURASHIGE, T. & TUCKER, D.L.M. Growth factor requirements of citrus tissue culture. In: CHAPMAN, H.D., Ed. Proc. First Int. Citrus Symp., Riverside, California, 3:1155-61, 1969.
50. \_\_\_\_\_; BITTERS, W.P.; RANGAN, T.S.; NAVAR, E.M.; TOISTACHER, C.N. & HOLLIDAY, B.P. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus free Citrus clones. HortScience, 7:118-9, 1972.
51. NITSCH, J.P. Culture in vitro de tissues de fruits. II. Orange. Bulletin Societe Botanique France, Paris, 112:19-22, 1965.
52. OGATA, T. Poliembrionia, efeitos do nitrato de potássio e da permanência de sementes no germinador, na separação dos embriões de citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 6, Recife, 1981. Anais... Recife, Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1981. v.2., p.693-701.
53. OHTA, Y. & FURUSATO. Embryoculture in Citrus. Rep. Kihara Inst. Biol. Res. Yokohama, 8:49-54, 1957.
54. OTONI, W.C. Estudos de propagação "in vitro" de Citrus sinensis (L.) Osb. cv Pêra, a partir da cultura de segmentos nodais juvenis. Viçosa, UFV, 1988. 108p. (Tese MS).

55. PARLEVLIT, J.E.; CAMERON, J.W. Evidence on the inheritance of nucellar embryony in Citrus. Proceeding of the American Society for Horticultural Science. Virgínia, 74: 252-60, 1959.
56. PASQUAL, M. Regeneração de plantas "in vitro" e radiosensibilidade de tecidos nucelares de citros. Piracicaba, ESALQ, 1985. 106p. (Tese de Doutorado).
57. \_\_\_\_\_ & ANDO, A. Micropropagação de 'trifoliata' através de cultura de gemas axilares "in vitro". Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 24(2):217-20, fev. 1989.
58. \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_ & CRÓCOMO, O.J. Desenvolvimento de embriões nucelares de Citrus sinensis Osb., cv. valência, "in vitro". In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9, Campinas, 1987. Anais... Campinas, Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1987. v.1., p.305-9.
59. \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Influência de reguladores de crescimento sobre a embriogênese "in vitro" de nucelos de Citrus sinensis cv. valência. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 23(3):255-9, mar. 1988.

60. PASQUAL, M.; ANDO, A. & CRÓCOMO, O.J. Desenvolvimento de embriões nucelares de Citrus sinensis Osb. cv.valência "in vitro". In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9, Campinas, 1987. Anais... Campinas, Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1987. 305-9.
61. \_\_\_\_\_; CRÓCOMO, O.J. & ANDO, A. Regeneração de plantas cítricas "in vitro" a partir de nucelos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 7, Florianópolis, 1984. Anais... Florianópolis, Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1984. v.1. p.407-7.
62. \_\_\_\_\_ & PINTO, J.E.B.P. Cultura de embriões. Notícias da Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas. Brasília, 9:2-12, ago. 1988.
63. PASSOS, O.S. Melhoramento de citros na Califórnia (EUA) e sugestões para a citricultura brasileira. Cruz das Almas, EMBRAPA-CNPMPF, 1980. 9p. (EMBRAPA-CNPMPF, Miscelânea, 2).
64. PIERINGER, A.P. & EDWARDS, G.J. Identification of nucellar and zygotic citrus seedlings by infrared spectroscopy. Proceeding of the American Society Horticultural Science. Virgínia, 84:226-34, 1965.

65. PINTO, J.E.B.P.; BARBOSA, M.H.P. & PASQUAL, M. Multiplicação "in vitro" do porta-enxerto trifoliata com gemas axilares provenientes de árvore adulta. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9, Campinas, 198. Anais... Campinas, Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1987. v.1., p.407-10.
66. \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Micropropagação "in vitro" do porta-enxerto 'Cravo' por cultura de segmentos nodais e internodais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9, Campinas, 1987. Anais... Campinas, Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1987. v.1., p.401-5.
67. POPINIGIS, F. Formação da semente. In: \_\_\_\_\_. Fisiologia da semente. Brasília, ABEAS, 1985. cap.6, p.1-17.
68. PRATES, H.S. & POMPEU JÚNIOR, J. Determinação preliminar de poliembrionia e número médio de embriões, em sementes de Citrus e afins, do banco ativo de germoplasma do Instituto Agrônômico de Campinas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 6, Recife, 1981. Anais... Recife, Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1981. v.2., p.563-8.
69. RANGAN, T.S.; MURASHIGE, T. & BITTERS, W.P. "In vitro" initiation of nucelar embryos in monoembryonic citrus. Hort-Science, Virginia, 3:226-7, 1968.



70. RANGAN, T.S.; MURASHIGE, T. & BITTERS, W.P. "In vitro" studies of zygotic and nucellar embryogenesis in *Citrus*. In: CHAPMAN, H.D., Proc. First Int. Citrus Symp., Riverside, 1:225-9, 1969.
71. RANGA SWAMY, N.S. Experimental studies on female reproductive structures of *Citrus microcarpa* Bunge. Phytomorphology, New Delhi, 11:109-27, July 1961.
72. \_\_\_\_\_. Culture of nucellar tissue of citrus "in vitro". Experientia, New York, 14(3):111-2, 1958.
73. \_\_\_\_\_. Morphogenetic response of *Citrus* ovules to growth and juvenants in culture. Nature, London, 183(14):735-6, Mar. 1959.
74. SABHARWAL, P.S. "In vitro" culture of ovules, nucelli and embryos of *Citrus aurantifolia* Swingle. In: MAHESWARI, P. Ed. Plant Embriology - a symposium. Nova Delhi, 1963. p.239-43.
75. SALIBE, A.A. & CEREDA, E. Poliembrionia em variedades de citros. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 22, Salvador, 1970. Anais... Salvador, Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 1970. p.208.

76. SANTOS, A.V.P. dos. Embriogênese somática "in vitro". Notícias da Associação Brasileira de Cultura de Tecido de Planta, Brasília, 5:2-4, abr. 1987.
77. SCHROEDER, C.A. & SPECTOR, C. Effect of gibberellic acid and indolacetic acid on growth of excised fruit tissue. Science, Washington, 126(3276):701-2, Oct. 1957.
78. SELITO-BOAVENTURA, Y.M. & PIO, R.M. Análise citogenética em três cultivares de laranja doce (Citrus sinensis (L.) Osbeck). Revista Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 12(1):117-26, mar. 1989.
79. SOARES FILHO, W.S. Genes principais em Citrus e gêneros a - fins. Piracicaba, ESALQ, 1982. 38p. *Ver Com J*
80. SOOST, P.K. & CAMERON, J.W. Citrus. In: JONICK, J. & MOORE, J.N. Advances in Fruit Breeding. West Lafayette, Indiana, Purdue University Press. 1975, p.507-40.
81. SOUBIHE SOBRINHO, J. & GURGEL, J.T.A. Poliembrionia e embrionia adventícia, em Citrus, Mangifera e Myrtaceae frutíferas. Dusenía, Curitiba, 4(5,6):421-8, nov. 1953.
82. SPIEGEL-ROY, P. & KOCHBA, J. Embryogenesis in citrus tissue cultures. In: FIECHTER, A. ed. Advances in Biochemical Engineering. Berlin, Springer-Verlang, 1980. p.27-48.

83. SPIEGEL-ROY, P. & KOCHBA, J. Application of tissue culture for plant improvement. In: BARZ, W.; REINHARD, E. & ZENK, M.H. eds. Plant tissue and it's bio-technological application, New York, Springer-Verlang, 1977. p.404-13.
84. \_\_\_\_\_ & VARDI, A. Citrus. In: AMMIRATO, P.V.; EVANS, D. A.; SHARP, W.R. & YAMADA, Y. Handbook of Plant Cell Culture. New York, MacMillan, 1984. v.3., Cap.13, p.355-82.
85. \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_ & SHANI, A. Peroxidase isozymes as a tool for early separation of nucellar and zygotic citrus seedlings. Proc.Int.Citriculture, 2:619-24, 1977.
86. STARRANTINO, A. & RUSSO, F. Seedlings from undeveloped ovules of ripe fruit of polyembrionic Citrus cultivars. Hort Science, Virginia, 15(3):296-7, June 1980.
87. \_\_\_\_\_; SPINA, P. & RUSSO, F. Embriogenesi unicellare e sviluppo di piantine "in vitro" dalle unicelle di alcune specie di agrumi. Giornale Botanico Italiano, Florence, 112:41-52, 1978.
88. TATUM, J.H. & BERRY, R.E. Separation of nucellar and zygotic citrus seedlings by their flavonoids and other non-volatile components. Proc.Int.Soc.Citriculture, 2:614-6, 1977.  
 T-634-353 PAS. reg. t. 25183 PASQUAL

9. TEICH, A.H. & SPIEGEL-ROY, P. Differentiation between nucellar and zygotic citrus seedlings by leaf shape. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, 42:314-5, 1972.
10. VILELA, . de A. & RAMALHO, M.A.P. Análise das temperaturas e precipitações pluviométricas de Lavras, Minas Gerais. Ciência e Prática, Lavras, 3(1):71-9, jan./jun. 1979.
11. WAKANA, A. & UEMOTO, S. Adventive embryogenesis in Citrus (Rutaceae). II. Postfertilization development. American Journal of Botany. Columbus, 75(7):1033-47, July 1988.