

MARCOS OLIVEIRA ATHAYDE

DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E SAIS
NA PROPAGAÇÃO "IN VITRO" DO 'CRAVO' E 'TRIFOLIATA'.

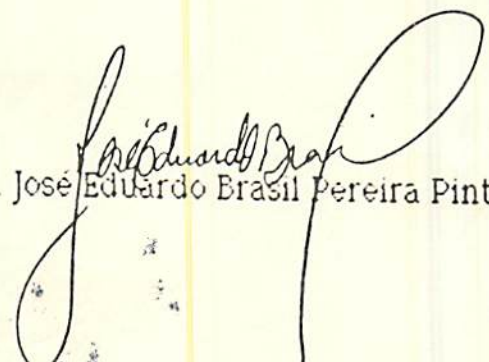
Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fito-tecnia, e sub-área de cultura de tecidos. Grau de "Magister Scientiae".

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS
LAVRAS - MINAS GERAIS

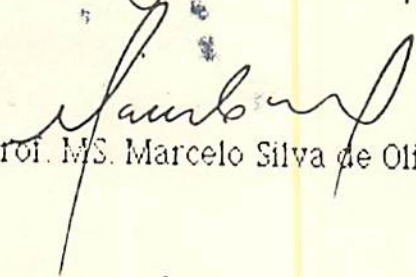
199

DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E SAIS
NA PROPAGAÇÃO "IN VITRO" DO 'CRAVO'
E 'TRIFOLIATA'

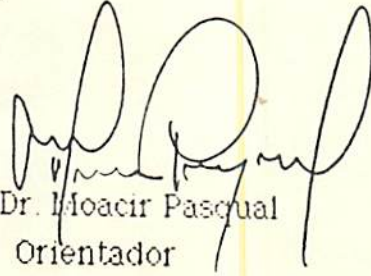
Aprovada Em 27 de Julho de 1992.



Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto



Prof. MS. Marcelo Silva de Oliveira



Prof. Dr. Moacir Pasqual
Orientador

DEDICO

À minha esposa Leillane

À minha filha Larissa

Aos meus pais e sogros

Aos meus irmãos e cunhados (as)

Aos meus irmãos em Cristo Jesus,
da 1ª Igreja Batista de Lavras.

AGRADECIMENTOS

A Deus, o meu salvador

À Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuária/EMCAPA, pela valorização de seu profissional ao longo destes anos.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, pela ajuda financeira.

À Escola Superior de Agricultura de Lavras/ESAL, pela oportunidade de aperfeiçoamento.

Aos Professores:

Moacir Pasqual, pela orientação, compreensão e sincera amizade

Marcelo Silva de Oliveira, pelas sugestões e amizade

José Eduardo Brasil P. Pinto, pelas sugestões e amizade

José Donizeti Alves, pelas sugestões e amizade.

Luiz Edson Motta de Oliveira, Pelos conhecimentos transmitidos através das disciplinas ministradas e pela amizade

Aos laboratoristas, pela presteza e amizade :

Vantuil Antônio Rodrigues

Evaldo de Souza Arantes

A Luiz Carlos de Miranda pela ajuda na organização das referências bibliográficas.

Aos amigos, pelo apoio nas diversas situações.

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

BIOGRAFIA

MARCOS OLIVEIRA ATHAYDE, filho de Arnulpho Alves Athayde e Nezir Oliveira Athayde, nasceu em Rio Novo do Sul, Estado do Espírito Santo, a 03 de novembro de 1962.

Concluiu o Curso Superior na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, no ano de 1985. Ingressando na EMCAPA neste mesmo ano. Casou-se com Leiliane Schedegger Athayde, com quem teve a maravilhosa Larissa.

Em fevereiro de 1990, iniciou o Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, a nível de Mestrado, na Escola Superior de Agricultura de Lavras.

SUMARIO

PAGINA	
1	INTRODUÇÃO..... 1
2	REFERENCIAL TEORICO..... 3
2.1	Cultura "in vitro" de citros..... 3
2.2	Meio de cultura..... 5
2.2.1	Sais minerais..... 5
2.2.2	Vitaminas..... 7
2.2.3	Extratos naturais complexos..... 8
2.2.4	Mio-inositol e aminoácidos..... 10
2.2.5	Reguladores de crescimento..... 11
2.2.6	Potencial osmótico..... 12
2.2.7	Carboidratos..... 13
2.3	Fotossíntese "in vitro"..... 14
2.4	Influência do fator genético..... 15

3	MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1	Obtenção do material vegetal.....	17
3.2	Meio de cultura.....	18
3.3	Experimentos conduzidos "in vitro".....	19
3.4	Delineamento experimental.....	20
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1	Influência de diferentes combinações de sacarose e sais do meio "MS" na multiplicação de brotos em segmentos nodais do porta-enxerto 'Trifoliata'.....	22
4.2	Influência de diferentes combinações de sacarose e sais do meio "MS" na multiplicação de brotos em segmentos nodais do porta-enxerto 'Cravo'.....	28
5	CONCLUSÕES.....	35
6	RESUMO.....	36
7	SUMMARY.....	37
8	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	38
9	APENDICE.....	50

LISTA DE QUADROS

QUADRO	PAGINA
01 Resumo da análise de variância para número médio de brotações do porta-enxerto 'Trifoliata' nas diferentes concentrações de sacarose e sais do meio "MS". ESAL, Lavras-MG, 1992.....	23
02 Número médio de brotações observado em função das doses de sacarose na ausência de sais para o porta-enxerto 'Trifoliata'. ESAL, Lavras-MG, 1992.....	24
03 Resumo da análise de variância para número médio de brotações do porta-enxerto 'Cravo' nas diferentes concentrações de sacarose e sais do meio "MS". ESAL, Lavras-MG, 1992.....	28

- 04 Número médio de brotações observado em função das doses de sacarose na ausência de sais para o porta-enxerto 'Cravo'. ESAL, Lavras-MG, 1992..... 29
- 05 Teores de sais que maximizam o número médio estimado de brotações para o porta-enxerto 'Cravo' na presença das diferentes doses de sacarose. ESAL, Lavras-MG, 1992..... 31
- 06 Doses de sacarose que minimizam o número médio estimado de brotações para o porta-enxerto 'Cravo' na presença de diferentes teores de sais. ESAL, Lavras - MG, 1992..... 32

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PAGINA
01	Número médio estimado de brotações em função dos teores de sais na ausência de sacarose para o porta-enxerto 'Trifoliata'. ESAL, Lavras-MG, 1992.	26
02	Número médio estimado de brotações em função dos teores de sais na presença de 15 g de sacarose para o porta-enxerto 'Trifoliata'. ESAL, Lavras-MG, 1992.	27
03	Número médio estimado de brotações em função dos teores de sais na ausência de sacarose para o porta-enxerto 'Cravo'. ESAL, Lavras-MG, 1992.	30

1. INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira tem se destacado nos últimos anos, no âmbito da atividade agrícola, gerando milhões de dólares para o país. Sabe-se que esta atividade é dependente do uso de porta-enxertos e que o 'Cravo' ocupa 95 % da área implantada com citros, mas deve-se ressaltar que o 'Trifoliata' é grandemente utilizado na região Sul do País, principalmente pela sua característica de resistência a baixas temperaturas. Comercialmente estes porta-enxertos são propagados através de sementes, as quais podem apresentar elevada taxa poliembriônica, produzindo várias plântulas nucelares, sendo que algumas cultivares podem apresentar até 40 % de plântulas zigóticas, as quais são descartadas para manutenção da uniformidade clonal. Outro aspecto relevante quanto às espécies cítricas, é a obtenção de cultivares de porta-enxertos via melhoramento genético, as quais requerem vários anos para produzir quantidades suficientes de sementes, especialmente aquelas que apresentam poucas sementes por fruto. Neste contexto a cultura de tecidos destaca-se como uma técnica de grande importância, devido em curto espaço de tempo produzir grande número de plantas geneticamente uniformes.

Baseado nestes fatos, objetivou-se adequar um meio de cultivo através da combinação de diferentes concentrações dos sais do meio "MS" e sacarose, para dar suporte a multiplicação "in vitro" dos porta-enxertos *Citrus limonia* OSBECK cv. Cravo e 'Trifoliata' (*Poncirus trifoliata* (L.) RAF.) além de novos genótipos porventura surgidos destes, via melhoramento genético.

2. REFERENCIAL TEORICO

2.1. Cultura "in vitro" de citros

A propagação comercial das espécies cítricas, ocorre através de porta-enxertos oriundos de sementes, os quais são enxertados com a variedade copa desejada. Através de trabalhos de melhoramento genético, tem-se procurado obter genótipos resistentes às doenças, nematóides e possíveis estresses ambientais, como frio, salinidade e secas, além de apresentar grande longevidade, alta produção e boa qualidade dos frutos nos enxertos (MOORE, 1986). Entretanto, quando se obtém uma nova cultivar de porta-enxerto, é necessário grande número de plantas em curto espaço de tempo objetivando sua rápida disseminação nas áreas citrícolas, logo, uma das técnicas de cultura de tecidos, como a micropropagação através de segmentos nodais possibilitaria um grande número de plantas e uniformidade genética.

Em citros os primeiros trabalhos de cultivo "in vitro" iniciaram na década de 1950 (KORDAN, 1959 e RANGA SWAMY, 1961). Entretanto a partir do aparecimento dos meios de cultura "MS" (MURASHIGE & SKOOG, 1962) E "MT" (MURASHIGE & TUCKER, 1969), é que houve grande avanço nas técnicas "in vitro" para tais espécies (ALTMAN & GOREN, 1971; NAVARRO et alii, 1975 e CHATUVERDI & SHARMA, 1985).

Várias aplicações da cultura de tecidos em citros podem ser citadas: isolamento, cultura de protoplastos, hibridação somática (GROSSER & CHANDLER, 1986; LING et alii, 1990 e BUTTON & BOTHA, 1975), cultivo de anteras (CHATUVERDI & SHARMA, 1985); cultura de embriões (STARRANTINO & RUSSO, 1980 e WILMS et alii, 1983); embriogênese somática em tecidos nucelares (KOCHBA et alii, 1972; PASQUAL, 1985; NAVARRO et alii, 1985; BUTTON et alii, 1974; SPIEGEL-ROY & SAAD, 1986; MATSUMOTO & YAMAGUCHI, 1983; KOCHBA et alii, 1974; WAKANA & UEMOTO, 1987 e ESEN & SOOST, 1977), cultura de óvulos (STARRANTINO & RUSSO, 1980; KOCHBA & SPIEGEL-ROY, 1977; KOCHBA et alii, 1972, 1982 e MOORE, 1985), indução de mutação por irradiação de tecidos (PASQUAL, 1985), seleção "in vitro" contra fatores adversos (KOCHBA et alii, 1982), cultura de segmentos de frutos (SCHROEDER, 1962 e EINSET, 1978), propagação de plantas livres de vírus através da microenxertia (NAVARRO & JUAREZ, 1977; NAVARRO et alii, 1975; EDRISS & BURGER, 1984; HUANG et alii, 1988 e MURASHIGE et alii, 1972), propagação clonal através da cultura de gemas axilares, extremidades de ramos, meristemas de raízes e segmentos internodais (GRINBLAT, 1972; CHATUVERDI & MITRA, 1974; ALTMAN & GOREN, 1971, 1974; GILAD et alii, 1977, 1979; KITTO & YOUNG, 1981; SAUTON et alii, 1982; BARLASS & SKENE 1982; PASQUAL, 1985; BURGER & HACKETT, 1986; PINTO et alii, 1988 a, 1988 b;

MOORE, 1986; GROSSER & CHANDLER, 1986; BUTTON & RIJKENBERG, 1977 e GOREN et alii, 1979), estudo de fatores que controlam a diferenciação e desenvolvimento de gemas florais (ALTMAN & GOREN, 1977).

2.2. Meio de cultura

As exigências nutricionais para o estabelecimento e crescimento de um tecido "in vitro" podem variar com o genótipo, onde explantes de diferentes partes podem requerer meios distintos.

As diversas aplicações da cultura de tecidos com citros utilizam como meio básico o "MS" (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e também o "MT" (MURASHIGE & TUCKER, 1969), a partir dos quais ocorrem modificações conforme o objetivo.

2.2.1. Sais minerais

A maioria dos meios de cultura incluem em sua composição macro e micronutrientes essenciais ao crescimento da planta. Sendo o "MS", o meio mais completo, apresentando maior concentração de nitrogênio (60 mg). A maioria dos meios de cultura, apresentam o nitrato como única fonte de

nitrogênio, enquanto no "MS" encontram-se as formas de nitrato e amônio (BUTTON & KOCHBA, 1977). Para as espécies cítricas cultivadas "in vitro" os sais do "MS", tem proporcionado desenvolvimentos satisfatórios (PASQUAL & ANDO, 1989 a, 1989 b, 1989 c; ALTMAN & GOREN, 1974; BUTTON et alii, 1974; GRINBLAT, 1972 e PINTO et alii, 1988 a, 1988 b). Entretanto, conforme a finalidade, reduzidas concentrações de sais do meio "MS" apresenta a melhor resposta (KITTO & YOUNG, 1981; CHATUVERDI & MITRA, 1974, e CHATUVERDI & SHARMA, 1985).

Alguns papéis dos macro e micronutrientes, são apresentados por TAIZ & ZEIGER (1991).

Macronutrientes

- Nitrogênio - Constituinte de aminoácidos, amidas, proteínas, ácidos nucleicos, nucleotídeos e coenzimas, etc.
- Fósforo - Componente de açúcar-fosfato, ácidos nucleicos, nucleotídeos, coenzimas, fosfolipídeos, ácido fítico.
- Potássio - Cofator de 40 ou mais enzimas, movimento estomático.
- Enxofre - Componente de cisteína, cistina, metionina e conseqüentemente proteínas.
- Cálcio - Constituinte da lamela média de paredes celulares, cofator de enzimas envolvidas na hidrólise de ATP e fosfolipídios.

Magnésio - Constituinte da molécula de clorofila, requerido por algumas enzimas envolvidas com transferência de fosfato.

Micronutrientes

- Ferro - Constituinte dos citocromos, envolvido na fotossíntese e respiração.
- Manganês - Requerido para atividade de algumas enzimas e evolução do O₂ fotossintético.
- Boro - Indiretamente envolvido no transporte de carboidrato.
- Cobre - Cofator de algumas enzimas de oxi-redução da fotossíntese e respiração.
- Zinco - Cofator de algumas enzimas.
- Molibdênio- Constituinte da redutase do nitrato.
- Cloro - Requerido para as reações fotossintéticas envolvidas com a evolução do O₂

2.2.2. Vitaminas

Níveis ótimos de algumas vitaminas, para proliferação de tecidos de *Citrus* foram estabelecidos por MURASHIGE & TUCKER (1969). Muitos trabalhos tem mostrado que as vitaminas piridoxina-HCl, ácido nicotínico

e tiamina-HCl são as mais utilizadas em variadas concentrações nos meios para cultivo "in vitro" de citros (GILADI et alii, 1977; KOCHBA & SPIEGEL-ROY, 1977; BEN-HAYYIM & KOCHBA, 1982; LING et alii, 1990 e CHATUVERDI & MITRA, 1974).

De acordo com o objetivo, gênero e espécie, as concentrações das vitaminas são alteradas. Em micropropagação do porta-enxerto 'Trifoliata' (*Poncirus trifoliata* (L.) RAF.) PASQUAL & ANDO (1989a) e PINTO et alii (1988b) utilizaram em mg/l : tiamina HCl-0,2 , piridoxina - HCl-1,0 e ácido nicotínico-1,0.

Para algumas espécies cítricas, há necessidade de aumentar a concentração das vitaminas e, às vezes, outras vitaminas são acrescentadas à mistura padrão. É o caso da propagação clonal de *C. grandis* e *C. sinensis* por CHATUVERDI & MITRA (1974) que utilizaram tiamina-HCl-5,0 , piridoxina-HCl-1,25 , ácido nicotínico-1,25 , ácido fólico-0,1 , riboflavina-0,1 , biotina-0,1 e ácido ascórbico-5,0. Entretanto, para outras, necessário se faz diminuir as concentrações, como fizeram HUANG et alii (1988), visando a obtenção de plantas microenxertadas com a espécie *C. grandis* sobre o híbrido Citrange Troyer, com as concentrações de tiamina-HCl-1,0 , Piridoxina-HCl-0,5 e ácido nicotínico-0,5 mg/l.

2.2.3. Extratos naturais complexos

São preparações obtidas de produtos naturais, de composição variável, que servem para enriquecer o meio de cultivo. Atualmente, existe uma

forte tendência de utilizar meios de composição definida, pois as misturas complexas podem ter uma composição variável de uma fonte para outra, dificultando a reprodução dos resultados.

Testando o efeito do suco de laranja sobre várias espécies de *Citrus*, estabeleceu-se a concentração de 10 % como a mais adequada para o desenvolvimento dos explantes, (EINSET, 1978).

O crescimento de calos de 'Satsuma' (*C. unshiu* MARC.) foi incrementado sobre o meio básico de "MT" (MURASHIGE & TUCKER, 1969) acrescido de 185 μ M de adenina, 2,8 μ M de GA₃ e 400 mg/l de extrato de malte (LING et alii, 1990). STARRANTINO & RUSSO (1980) obtiveram embriões, pseudobulbilhos e calo embriogênico a partir de óvulos não desenvolvidos da laranja 'Navel' (*C. sinensis* OSBECK) e limão (*C. limon* (L.) BURM.), cultivados sobre o meio "MS" (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com 500 mg/l de extrato de malte. Em *C. madurensis* segmentos internodais não apresentaram formação de calos, nem gemas, quando na presença isolada de extrato de malte (GRINBLAT, 1972). Entretanto, plantas foram obtidas de embriões somáticos de cultura de nucelo (*C. reticulata*) sobre o meio "MS" suplementado com 500 mg/l extrato de malte (NAVARRO et alii, 1985).

A água do coco tem sido utilizada para um grande número de espécies "in vitro". Em *Citrus* estimula embriogênese e regeneração de plantas a partir de calos, na concentração de 10 % como suplemento do meio "MT" (BUTTON & BOTHA, 1975).

2.2.4. Mio-inositol e aminoácidos

O mio-inositol nos meios de cultura, tem sido utilizado na concentração de 100 mg/l. Na cultura "in vitro" de citros, o mio-inositol tem integrado os meios, para as diversas finalidades, uma vez que os mais utilizados são o "MS" e "MT"

MOORE (1982) relata que o inositol é incorporado às moléculas de fosfolipídios que compoem a estrutura da membrana plasmática. Além disso, pode formar com a auxina um composto conjugado inativo como regulador de crescimento, verificado por CHISNELL & BÂNDURSKI (1982) em tecidos vegetativos de milho. Outra implicação deste hexitol está relacionado com a síntese de componentes da parede celular (ASAMIZU & NISHI, 1979).

Os aminoácidos normalmente são representados pela glicina na concentração de 2,0 mg/l em cultura "in vitro" de citros (DURAN-VILA et alii, 1989 e GRINBLAT, 1972). Algumas substâncias complexas quando adicionadas do meio, podem suprir a necessidade de aminoácidos, como exemplo tem-se o extrato de malte e caseína hidrolisada.

2.2.5. Reguladores de crescimento

Os reguladores de crescimento representados pela auxina e citocinina são considerados os compostos orgânicos de maior efeito morfogênico

em cultura de tecidos de plantas, pois a calogênese e rizogênese são controladas pelo balanço entre estes reguladores, podendo ser generalizado entre as espécies vegetais (MURASHIGE, 1974). Entretanto, a produção de brotos / explante de três porta-enxertos de *Citrus* testados por MOORE (1986) sobre o meio "MT", foi maior quando utilizou 22 μ M de BA na ausência de auxina. Resultado semelhante foi obtido por BARLASS & SKENE (1982) no cultivo de citros, onde 10 μ M de BA na ausência de auxina promoveu o maior número de brotos, enquanto 10 μ M de NAA resultou no enraizamento dos explantes.

GRINBLAT (1972), comenta que as citocininas são eficientes na formação de ramos, tanto por via direta como por via indireta. Enquanto na presença de ácido abscísico (ABA) e etileno, GOREN et alii (1979) e ALTMAN & GOREN (1977) conseguiram formação de calos em cultura de gemas de *C. sinensis* OSBECK e concluíram que o efeito do ABA sobre a formação de calos é mediado pelo etileno.

A combinação hormonal de AIA (ácido- α -indolacético), GA₃ (ácido giberélico-3) e BAP (Benzilaminopurina) no meio "MT" suportaram o crescimento de explantes de frutos de *Citrus*, por um período superior a um ano (GULSEN et alii, 1981). Entretanto, ALTMAN & GOREN (1974) estudando o comportamento do ciclo de crescimento e dormência em gemas de *Citrus* "in vitro" e bem como seu controle hormonal, verificaram que gemas coletadas no verão, apresentavam retardamento na brotação, quando na presença de AIA e GA₃, sendo que este último acentuava este comportamento, além de proporcionar o alongamento do broto.

2.2.6. Potencial osmótico

O potencial osmótico do meio de cultivo é a soma dos potenciais impostos pelo ágar, minerais e açúcar, embora o açúcar seja reconhecidamente o mais influente. Isto é sustentado pelo fato da sacarose, durante a autoclavagem, ser hidrolizada em frutose e glicose, compostos osmoticamente ativos (SINGHA et alii, 1987).

Verificou-se que a osmolaridade do meio representa um papel de indução do enverdecimento e formação de brotos, "*per se*", ou através de mudanças na disponibilidade de hormônios e/ou outros fatores de crescimento das células (BARG & UMIEL, 1977).

DO & CORMIER (1991), estudando o efeito do potencial osmótico na acumulação de antocianina em suspensão de células de uva (*Vitis vinifera* L.), concluíram que à medida que aumentavam a concentração de sacarose implicava no aumento do potencial osmótico do meio. WANG & JANICK (1986) fizeram a mesma observação quando determinaram os fatores que afetam a acumulação de cera em embriões de jojoba. E ainda a concentração de sacarose determinou o tamanho de célula de *Phytolacca americana*, ou seja, com o aumento da concentração de sacarose ocorreu diminuição no tamanho da célula. Isto sugere que a redução no tamanho da célula foi devido ao efeito osmótico da sacarose (SAKUTA et alii, 1987). Complementando, LI & EATON (1984), afirmam que o requerimento do nível de osmolaridade no meio está relacionado com o nível interno (protoplasma) dos tecidos expostos ao mesmo. Isto foi constatado por KOCHBA & BUTTON (1974) quando trabalharam com

embriogênese de *C. sinensis*, onde na presença de 5% de sacarose houve desenvolvimento dos embriões, enquanto na ausência isto não ocorreu, demonstrando o efeito osmótico da sacarose. Entretanto, apenas 1/3 da sacarose no meio é usada para osmorregulação (BROWN et alii, 1979).

2.2.7. Carboidratos

Os carboidratos fornecem energia metabólica e esqueletos carbônicos para a biossíntese dos compostos orgânicos necessários para o crescimento das células, além de atuar como um componente osmótico do meio de cultura.

MURASHIGE (1974) afirma que vários carboidratos tem sido usados, mas não tem mostrado superioridade sobre a sacarose, que suporta as mais altas taxas de crescimento na maioria das espécies.

Muitos estudos vem sendo desenvolvidos sobre a entrada e o metabolismo de sacarose "in vitro". Alguns autores relatam que a sacarose é hidrolisada em glicose e frutose gradualmente no meio, pela ação da enzima invertase localizada na parede celular (KOZAI et alii, 1991; UEDA et alii, 1974; STOMMEL & SIMON, 1989 e BENDER et alii, 1987).

A atividade biológica de qualquer substância não somente varia com a dosagem, mas depende grandemente do meio no qual é colocada (MURASHIGE & SKOOG, 1962). Portanto, a concentração de sacarose é um fator

importante para obter crescimento satisfatório, dependendo do meio e do explante. A concentração mais utilizada de sacarose é 3% (p/v).

Variadas concentrações são utilizadas com espécies cítricas para diversas finalidades, assim como 5% de sacarose (KOCHBA & BUTTON, 1974); BELOUALY, 1991; BUTTON, 1978 e GAVISH et alii, 1991). Todavia, concentração superior a 5%, apresentou melhor resultado para o processo de microenzertia em *Citrus* segundo NAVARRO et alii (1975). Enquanto a concentração de 3% proporcionaram satisfatório desenvolvimento à cultura de gemas axilares (PASQUAL & ANDO, 1989a e 1989b).

2.3. Fotossíntese "in vitro"

As plantas "in vitro" apresentam pouca ou nenhuma capacidade fotossintética, para prover um positivo balanço de carbono e energia metabólica, logo, requerem açúcar exógeno para seu crescimento (KOZAI et alii, 1990). Isto é devido à baixa concentração de CO₂ no interior dos frascos e a baixa intensidade luminosa, além da presença do próprio açúcar no meio (LEE et alii, 1985). Mas BUTTON (1978) trabalhou com efeitos de carboidratos sobre o crescimento e organização de calos ovular de *Citrus* observando a formação de amido em calos verdes, o que considerou como resultado do processo fotossintético "in vitro".

KOZAI et alii (1990), LANGFORD & WAINWRIGHT, (1987) e CAPELLADES et alii (1991) estudando a taxa de fotossíntese em cultura "in vitro" de Rosa, verificaram que quando a concentração de sacarose estava em

torno de 5%, ocorria diminuição da taxa fotossintética e quando reduzia para 1% esta aumentava, mostrando que a sacarose no meio de cultura é um fator limitante para o processo fotossintético daquela Rutacea. CAPELLADES et alii (1991), também verificaram que o ponto de compensação de luz dos explantes crescidos sobre o meio com 5% de sacarose, apresentavam elevados valores enquanto que concentrações menores, proporcionaram valores menores, demonstrando uma maior otimização da intensidade luminosa pelos explantes na menor concentração de sacarose.

EDELMAN & HANSON (1971), mostraram que cloroplastos de células de calos de cenoura crescidas em meio com sacarose, apresentavam-se morfológicamente diferentes daqueles crescidos em meio de sacarose, ou seja, no primeiro os cloroplastos tinham poucos tilacóides (poder redutor), explicando a baixa eficiência fotossintética.

2.4. Influência do fator genético

As espécies cítricas são alógamas, altamente heterozigotas, e os cultivares tem se mantido inalterados por várias gerações, pois são propagadas vegetativamente. Estas espécies são também caracterizadas por um período juvenil prolongado. A juvenilidade torna-se ainda mais prolongada quando elas são propagadas a partir de sementes (BUTTON & KOCHBA, 1977).

Em cultura de tecidos de citros tem-se verificado o ajustamento do meio de cultivo para as diversas finalidades, em função da influência genotípica (MOORE, 1986).

A indução da embriogênese em óvulos não desenvolvidos de cultivares poliembriônicas e monoembriônicas de *Citrus*, foi relacionada aos efeitos do genótipo e de aditivos de crescimento. Foram verificadas diferenças quanto à resposta embriogênica, devido ao genótipo, sendo que embriões foram produzidos em cultivares poliembriônicas, mas não nas cultivares monoembriônicas (MOORE, 1985).

Em propagação "in vitro" de porta-enxertos de citros, cultivados sobre o meio "MT", suplementado com 22 μM de BA, verificou-se grandes diferenças quanto ao número de brotos/explante entre os porta-enxertos (MOORE, 1986).

PASQUAL & ANDO (1989 a e 1989 b) trabalhando com micropropagação de 'Trifoliata', determinaram NAA-1,0 + BAP-1,0 em mg/l como a melhor combinação para a multiplicação de gemas axilares, enquanto para a laranja 'Valência' a melhor combinação foi NAA-0,2 + BAP-0,2 mg/l. Para o porta-enxerto 'Cravo' a combinação que proporcionou maior taxa de multiplicação em cultura de segmentos nodais, foi BAP-4,4 μM + NAA-0,5 μM que não diferiu de BAP-4,4 μM na ausência de NAA (PINTO et alii, 1988a).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado em Lavras-MG., no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Escola Superior de Agricultura de Lavras.

3.1. Obtenção do material vegetal

Foram utilizadas plântulas já estabelecidas "in vitro" dos porta-enxertos *Citrus limonia* OSBECK cv. cravo e 'Trifoliata' (*Poncirus trifoliata* (L.) RAF), das quais retirou-se segmentos nodais com tamanhos em torno de 1,5 cm.

3.2. Meio de cultura

O meio de cultura básico foi o "MS" (MURASHIGE & SKOOG, 1962), adicionado dos seguintes reguladores de crescimento em mg/l: BAP - 0,1, AIA - 0,1 e Cinetina - 1,0

As soluções-estoque de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas e aminoácidos, constituintes de meio de cultura básico, foram preparadas e armazenadas a 5 °C. O pH dos meios de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$, antes da adição do ágar, utilizando-se NaOH ou HCl 0,1 N.

Os meios de cultura foram solidificados com 7,0 g/l de ágar distribuindo-se 10 ml do meio por tubo de ensaio (25 x 150 mm), vedados com tampa de polipropileno. Enquanto, a esterelização destes meios foi realizada por autoclavagem, à temperatura de 120 °C e pressão de 1,05 Kg/cm², durante 20 minutos. posteriormente à autoclavagem a solidificação ocorreu com inclinação de 45 °C dos porta-tubos e a inoculação de explantes foi realizada em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar. O ambiente das culturas foi mantido na temperatura de 25 °C, com fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 3000 Lux.

3.3. Experimento conduzido "in vitro"

Experimento A:

Influência de seis doses de sacarose combinadas com cinco concentrações do componente sais do "MS", sobre a formação de brotações em segmentos nodais do porta-enxerto, 'Cravo'. Este experimento foi constituído com trinta tratamentos e quatro repetições, onde cada repetição constitui-se com três tubos de ensaio.

Os tratamentos originaram-se das combinações das doses de sacarose (0; 15; 30; 45; 60 e 75 g/l) com as concentrações do componente sais do meio "MS" (0; 25; 50; 75 e 100 %).

Ressalta-se que o componente sais refere-se aos macro e micronutrientes e a percentagem máxima de 100 % corresponde às concentrações originais do meio "MS".

Experimento B:

Influência de seis doses de sacarose combinadas com cinco concentrações do componente sais do "MS", sobre a formação de brotações em segmentos nodais do porta-enxerto 'Trifoliata'. Este experimento foi constituído de trinta tratamentos e quatro repetições, onde cada repetição constitui-se com três tubos de ensaio.

Os tratamentos originaram-se das combinações das doses de sacarose (0; 15; 30; 45; 60 e 75 g/l) com as concentrações do componente sais do meio "MS" (0; 25; 50; 75 e 100 %).

3.4. Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Os resultados foram interpretados estatisticamente por meio de análise de variância e de regressão.

Os experimentos seguiram o esquema fatorial (6 x 5), com quatro repetições, sendo o primeiro fator relativo às doses de sacarose e o segundo às concentrações do componente sais do meio "MS".


Após quarenta dias à inoculação dos explantes, estes foram avaliados quantitativamente, quanto ao número de brotações. Realizou-se também uma avaliação qualitativa, através da descrição dos explantes, quanto ao fator fenotípico (coloração).

Os dados foram transformados, utilizando-se a expressão

$$\sqrt{Z + 0,5}$$

onde Z representa o número de brotos total em três tubos de ensaio. A variável transformada recebe a notação Y, isto é, $Y = \sqrt{Z + 0,5}$.

A análise de regressão foi realizada fixando o fator sacarose e variando todos os teores do fator sais representado por X na presença daquele e vice-versa. No entanto, para identificar a melhor combinação de sais e sacarose entre os desdobramentos realizados, baseou-se no máximo número de brotos estimados através dos modelos estatísticos ajustados e o maior coeficiente de determinação destes modelos (Apêndice).



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudando os dados analisados para ambos os experimentos, optou-se por interpretar o efeito dos teores de sais na presença de cada dose de sacarose, por considerar que o fator essencialidade dos elementos minerais, foi determinante para a emissão de brotos pelos porta-enxertos 'Cravo' e 'Trifoliata', "in vitro". Todavia, determinadas informações foram obtidas interpretando os dados relativos a doses de sacarose na presença dos diferentes teores de sais.

4.1. Influência de diferentes combinações de sacarose e sais do meio "MS" na multiplicação de brotos em segmentos nodais do porta-enxerto 'Trifoliata'.

Verifica-se no Quadro 01 efeitos significativos para sacarose, sais e para a interação de sacarose e sais quanto ao número médio de brotações.

QUADRO 01-Resumo da análise de variância para número médio de brotações do porta-enxerto 'Trifoliata' nas diferentes concentrações de sacarose e sais do meio "MS". ESAL, Lavras-MG, 1992.

CAUSAS DE VARIÇÃO	G.L.	QUADRADO MÉDIO
Sacarose	05	12,64831 **
Sais	04	24,92034 **
Sac. X Sais	20	1,08111 **
Resíduo	90	0,36061
TOTAL	119	
CV(%)		23,88
Média geral		2,52

** Significativo ao nível de 1%, pelo teste F.

O número de brotações na presença das diferentes doses de sacarose e na ausência de sais, não apresentam efeitos significativos (Quadro 02). Isto pode ser entendido pela essencialidade dos elementos minerais, para o desenvolvimento dos explantes, pois os mesmos são participantes de componentes como clorofila, fosfolípidos, aminoácidos e consequentemente de proteínas (enzimas), além de participarem como cofatores de muitas reações enzimáticas durante o metabolismo celular (TAIZ & ZEIGER, 1991).

QUADRO 02 - Número médio de brotações observado em função das doses de sacarose na ausência de sais para o porta-enxerto 'Trifoliata'. ESAL, Lavras-MG, 1992.

SACAROSE (g/l)	BROTOS/EXPLANTE
0	0,33
15	0,40
30	0,06
45	0,00
60	0,00
75	0,00

Na ausência de sacarose e presença de sais, após 40 dias, 'Trifoliata' apresentou maior taxa de brotação na faixa de 50 a 75 % de sais, enquanto abaixo e acima desta faixa, a taxa diminuiu, caracterizando uma típica curva de toxicidade por minerais (Figura 1). Observa-se também que o máximo de 4,42 brotos/explante, foi obtido na presença de 68% de sais. Este comportamento apresentado pelos explantes, provavelmente deve-se à essencialidade dos elementos minerais, assim como pela realização de fotossíntese "in vitro", gerando esqueletos carbônicos e fonte de energia, uma vez que não havia açúcar exógeno no meio. CAPELLADES et alii (1991), trabalhando com cultura "in vitro" de Rosa, em condições de elevada

concentração de CO₂ e intensidade luminosa verificaram que diminuindo a concentração de sacarose no meio de cultivo, os explantes apresentavam aumento da taxa fotossintética. Este comportamento poderia ter ocorrido com o 'Trifoliata' nas condições em que desenvolveu-se o experimento.

Na análise dos dados, observou-se que na presença de 15 g de sacarose, o teor de 100 ‰ de sais proporcionou um máximo de 9,70 brotos/explante (Figura 2), caracterizando-se como a melhor combinação.

A presença de sacarose reverteu o efeito tóxico causado provavelmente pelos micronutrientes, uma vez que na ausência de sacarose o teor de 100 ‰ de sais apresentou-se tóxico aos explantes.

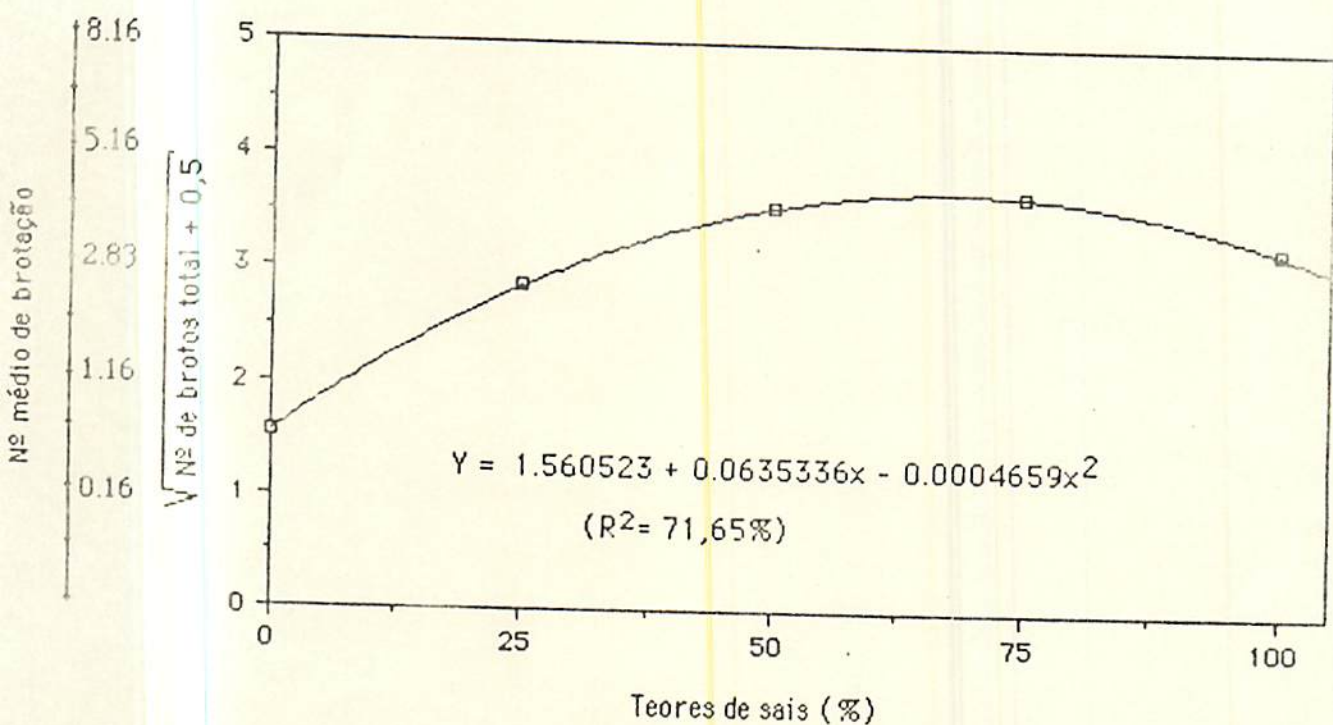


FIGURA 1 - Número médio estimado de brotações em função dos teores de sais na ausência de sacarose para o porta-enxerto *Trifoliata*. ESAL, Lavras-MG; 1992.

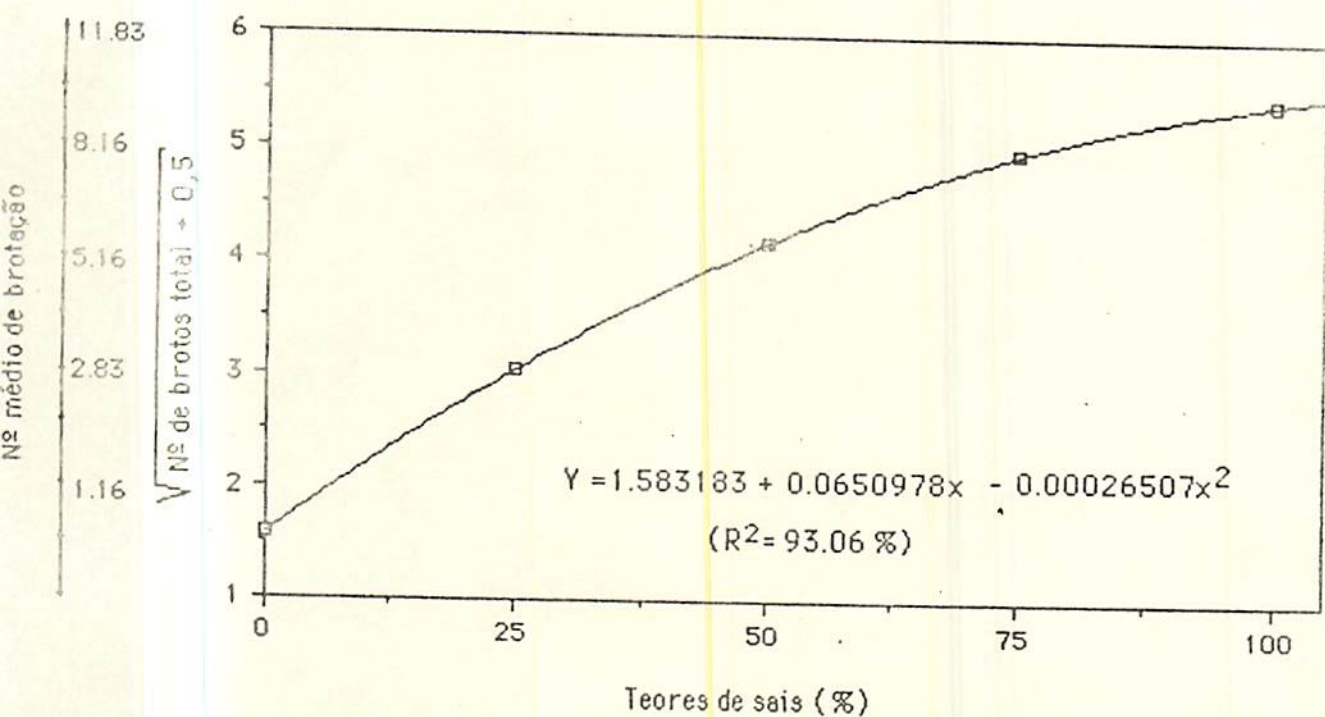


FIGURA 2 - Número médio estimado de brotações em função dos teores de sais na presença de 15g de sacarose para o porta enxerto 'Trifoliata'. ESAL, Lavras-MG, 1992.

4.2. Influência de diferentes combinações de sacarose e sais do meio "MS" na multiplicação de brotos em segmentos nodais do porta-enxerto 'Cravo'.

No Quadro 03 verifica-se os efeitos significativos para sacarose, sais e a interação de sacarose com sais, quanto ao número médio de brotações.

QUADRO 03 - Resumo da análise de variância para número médio de brotações do porta-enxerto 'Cravo' nas diferentes concentrações de sacarose e sais do meio "MS". ESAL, Lavras-MG, 1992.

CAUSAS DE VARIACÃO	G.L.	QUADRADO MÉDIO
Sacarose	05	1,50837 **
Sais	04	25,81898**
Sac. X Sais	20	1,65516**
Resíduo	90	0,37669
TOTAL	119	
CV(%)		28,23
MÉDIA GERAL		2,17

** Significativo ao nível de 1%, pelo teste F.

A brotação não ocorreu na ausência de sais, (Quadro 04), devido à essencialidade dos elementos minerais no metabolismo celular.

QUADRO 04 - Número médio de brotações observado em função das doses de sacarose na ausência de sais para o porta-enxerto 'Cravo'. ESAL, Lavras-MG, 1992.

SACAROSE (g/l)	BROTOS/EXPLANTE
0	0,00
15	0,00
30	0,00
45	0,00
60	0,00
75	0,00

Na Figura 3 o contrário poderá ser observado, onde brotações ocorreram na ausência de sacarose, provavelmente devido à essencialidade dos minerais e a capacidade de fotossíntese dos explantes. Sendo que na presença de 57 % de sais, ocorreu o máximo de 1,93 brotos/explante. Para o 'Cravo', assim como ocorreu com o 'Trifoliata', verifica-se na Figura 3 a caracterização de toxidez por minerais, onde os teores entre 50 e 75 % de sais apresentaram o maior número de brotos/explante e os teores abaixo e acima destes, proporcionaram brotações em menor número.

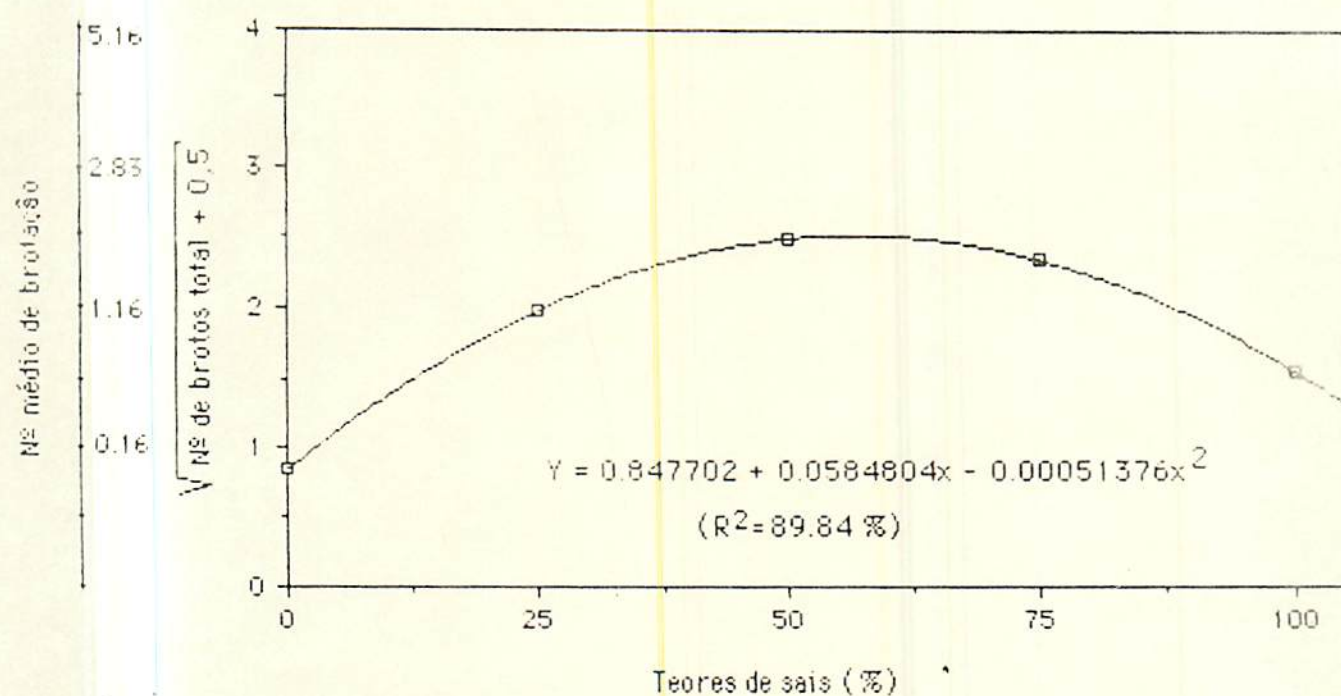


FIGURA 3 - Número médio estimado de brotações em função dos teores de sais na ausência de sacarose para o porta-enxerto 'Cravo'. ESAL, Lavras-MG, 1992.

A partir de 30 g de sacarose, não houve aumento significativo no número de brotos, evidenciando que esta é uma dose economicamente adequada, que deve ser utilizada na presença de 100 % de sais (Quadro 05). Isto sugere que a sacarose reverte o efeito tóxico causado pelos minerais, quando na ausência de sacarose. No entanto, teores acima de 100 % de sais, tem seus efeitos desconhecidos, podendo proporcionar resultados positivos ou negativos quanto ao número de brotos/explante.

QUADRO 05 - Teores de sais que maximizam o número médio estimado de brotações para o porta-enxerto 'Cravo' na presença das diferentes doses de sacarose. ESAL, Lavras-MG, 1992.

DOSES DE SACAROSE (g/l)	TEORES OTIMOS DE SAIS (%)	MAXIMA BROTAÇÃO/EXPLANTE
0	57	1,93
15	80	3,10
30	100	5,10
45	100	4,40
60	100	5,20
75	100	4,37

QUADRO 06-Doses de sacarose que maximizam o número médio estimado de brotações para o porta-enxerto 'Cravo' na presença de diferentes teores de sais. ESAL, Lavras-MG, 1992.

TEORES DE SAIS (%)	DOSES OTIMAS DE SACAROSE (g/l)	MAXIMA BROTAÇÃO/EXPLANTE
0	-	0,01
25	0	1,95
50	0	2,15
75	43	4,88
100	55	4,63

Baseando-se nos dados anteriores, destacamos o efeito osmótico da sacarose no meio de cultivo, onde observa-se que a redução de sacarose de 43 g/l na presença de 75% de sais (Quadro 06) para 30 g/l (Quadro 05), é necessário aumentar 25% de sais no meio, para manter o equilíbrio osmótico. Isto pode ser sustentado por BROWN et alii (1979), onde relatam que 1/3 da sacarose é utilizado para osmorregulação.

Quando da análise qualitativa dos porta-enxertos quanto ao fator fenotípico, observou-se que o 'Cravo' demonstrava-se menos vigoroso que o 'Trifoliata', sendo que o primeiro apresentava-se com uma coloração verde-

pálida tendendo à clorose generalizada, independente dos tratamentos, enquanto o 'Trifoliata' apresentava-se com a tonalidade verde que, tornava-se menos intensa, à medida que se aumentava a dose de sacarose no meio. Este comportamento pode ter sido devido à entrada da sacarose no tecido dos explantes, via difusão passiva, causando desequilíbrio na atividade metabólica das células, caracterizado pelo amarelecimento dos explantes. (TAIZ & ZEIGER, 1991).

LANGFORD & WAINWRIGHT (1987), trabalhando com efeito de sacarose sobre a capacidade fotossintética de explantes de Rosa, concluíram que o teor de clorofila e a taxa fotossintética aumentavam quando a concentração de sacarose era diminuída de 5% para 1%.

Comparando-se as Figuras 1 e 3, verifica-se que o 'Trifoliata' apresenta uma brotação superior ao 'Cravo', isto sugere influência do fator genotípico, concordando com MOORE (1986) que obteve respostas diferentes para três porta-enxertos de citros quanto ao número de brotos. Portanto, o 'Trifoliata' poderia estar apresentando maior capacidade fotossintética "in vitro", ou seja, através do processo de fotossíntese seria possível produzir açúcar necessário para atender sua demanda metabólica, naquela situação. Isto poderia ser sustentado pela baixa exigência do 'Trifoliata' quanto à quantidade ótima de açúcar exógeno (15 g), enquanto o 'Cravo' precisou de 30 g para sua necessidade metabólica. E ainda, LI & EATON (1984) afirmam que esta diferença ocorre devido ao nível de osmolaridade do meio de cultivo estar relacionado com o nível interno dos tecidos expostos ao mesmo.

Considerando ainda o comportamento do 'Cravo' e do 'Trifoliata' na ausência de sacarose, observa-se que ambos apresentaram maior número médio de brotações na faixa de 50% a 75% de sais, esta situação pode ser postulada baseando-se na termodinâmica, onde, a energia livre da água é inversamente proporcional à concentração de solutos, logo, na ausência de sacarose esta energia é maior, proporcionando aos explantes uma absorção mais acentuada de micronutrientes do "MS", acarretando com isto toxidez aos explantes, como verificado na presença de 100% dos sais. Enquanto que a diminuição da brotação abaixo de 50% dos sais, deve-se provavelmente à deficiência de macro e micronutrientes no meio.

5. CONCLUSÕES

Nas condições onde realizaram os experimentos, conclui-se que:

- Na ausência de sacarose ambos os porta-enxertos emitem brotações, sendo que os dados mostram um maior número de brotos para o 'Trifoliata' em relação ao 'Cravo'.
- Na ausência de sais ambos os porta-enxertos não emitem brotações significativamente diferentes de zero.
- As melhores combinações foram:
 - 'Trifoliata' - 15 g de sacarose com 100% de sais
 - 'Cravo' - 30 g de sacarose com 100% de sais.

6. RESUMO

Objetivando estudar a taxa de brotação de segmentos nodais dos porta-enxertos 'Trifoliata' e 'Cravo', foram realizados experimentos, com os dois genótipos, testando doses de sacarose e concentrações dos sais do meio "MS". Utilizou-se segmentos nodais provenientes de plântulas que se encontravam estabelecidas "in vitro". Os experimentos obedeceram ao delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 6 x 5 com quatro repetições, sendo seis doses de sacarose (0, 15, 30, 45, 60 e 75 g/l) e cinco níveis de sais do meio básico "MS" (0, 25, 50, 75 e 100%). Os resultados foram interpretados estatisticamente por meio de análises de variância e de regressão. Observou-se uma diferença no número de brotações, sendo que a melhor combinação para o 'Trifoliata' ocorreu com 15 g. de sacarose e 100% de sais do "MS" e para o 'Cravo' foi 30 g de sacarose e 100% de sais. Nota-se que na ausência de sacarose ambos os porta-enxertos emitiram brotações, sendo que o 'Trifoliata' apresentou maior número de brotos em relação ao 'Cravo' e na ausência de sais a emissão de brotação não foi significativamente diferente de zero.

7. SUMMARY

DIFFERENT CONCENTRATION OF SUCROSE AND SALTS ON THE "IN VITRO" PROPAGATION OF 'CRAVO' AND 'TRIFOLIATA'

The main objective of this work is the determination of the sprouting rate of nodal segments on rootstocks of 'Trifoliata' and 'Cravo'. The experiments involved two genotypes subject to different concentrations and dosages of sucrose and salts in "MS" prepared medium. The experiment was set up as random blocks in a 6 x 5 factorial scheme with four replications, being six sucrose levels (0, 15, 30, 45, 60 and 75 g/l) and five salt concentrations (0, 25, 50, 75 and 100%). The results were interpreted through statistical regression and analyses of variance. The highest number of sprouts produced by the 'trifoliata' was obtained when the salt level and sucrose concentration were set up at 100% and 15 g/l, respectively. For 'Cravo' this level were, respectively, 30 g/l and 100%. It could be observed that when no sucrose was present, both rootstocks produced buds bring the number of sprouts on the 'Trifoliata', larger than on 'Cravo'. When no salt was present, the number of sprouts was significantly not different from zero.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ALTMAN, A. & GOREN, R. Growth and dormancy cycles in *Citrus* bud cultures and their hormonal control. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 30 : 240-5, 1974.
2. _____ & _____ Horticultural and Physiological aspects of *Citrus* bud culture. *Acta Horticulturae*, The Hague, 78 : 51-60, 1977.
3. _____ & _____ Promotion of callus formation by abscisic acid in *Citrus* bud cultures. *Plant Physiology*, Washington, 47 (2) : 844-6, 1971.
4. ASAMIZU, T. & NISHI, A. Biosynthesis of cell-wall polysaccharides in cultured carrot cells. *Planta*, Berlin, 146 : 49-54, 1979.

5. BARG, R. & UMIEL, N. Effects of sugar concentrations on growth greening and shoot formation in callus cultures from four genetic lines of tobacco. *Zeitschrift Pflanzenphysiologie*, Bet Dagan, 81 : 161-6, 1977.
6. BARLASS, M. & SKENE, K. G. M. In vitro plantlet formation from *Citrus* species and hybrids. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, 17 : 333-41, 1982.
7. BELOUALY, N. Plant regeneration from callus culture of three *Citrus* rootstocks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, 24 : 29-34, 1991.
8. BENDER, L.; PAULER, B. & NEUMANN, K.-H. On carbohydrate metabolism of cultured carrot root explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, 8 : 135-46, 1987.
9. BEN-HAYYIM, G. & KOCHBA, J. GROWTH Characteristics and stability of tolerance of Citrus Callus Cells subjected to Noel stress. *Plant Science Letters*, Urbana, 27 : 87-94, 1982.
10. BROWN, D. C. W.; LEUNG, D. W. M. & THORPE, T. A. Osmotic requirement for shoot formation in tobacco callus. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 46 : 36-41, 1979.
11. BURGER, D. W. & HACKETT, W. P. Gradients of adventitious bud formation on excised epicotyl and root sections of *Citrus*. *Plant Science*, Berkeley, 43 : 229-232, 1986.

12. BUTTON, J. The effects of some carbohydrates on the growth and organization of *Citrus* ovular callus. *Zeitschrift Pflanzenphysiologie*, Bet Dagan, 88 : 61-68, 1978.
13. ——— & BOTHA, C. E. J. Enzymic maceration of *Citrus* callus and regeneration of plants from single cells. *Journal of Experimental Botany*, London, 26 (94) : 723-9, 1975.
14. ——— & KOCHBA, J. Tissue culture in the *Citrus* industry. In : REINERT, J. & BAJAJ, Y. P. S. eds. *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture*. New York, 1977, p. 72-92.
15. ——— ; ——— & BORNMAN, C. H. Fine structure of and embryoid development from embryogenic ovular callus of "Shamouti" orange (*Citrus sinensis* OSB.). *Journal of Experimental Botany*, London, 25 (85) : 446-57, 1974.
16. ——— & RIJKENBERG, F. H. J. The effect of subculture interval on organogenesis in callus cultures of *Citrus sinensis*. *Acta Horticulturae*, The Hague, 78 : 225 - 35, 1977.
17. CAPELLADES, M.; LEMEURE, R. & DEBERG, P. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in Rosa cultured "in vitro". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, 25 : 21-6, 1991.
18. CHATUVERDI, H. C. & MITRA, G. C. Clonal propagation of *Citrus* from Somatic Callus Cultures. *Hortscience*, Virginia, 9(2) : 118-20, 1974.

- 19 _____ & SHARMA, A. K. Androgenesis in *Citrus aurantifolia* (CHRISTM)
Swingle *Planta*, Berlin, 165 (1) : 142 - 4, 1985.
- 20 CHISNELL, J. R. & BANDURSKI, R. S. Isolation and characterization of indol -
3 - yl - Acetyl - myo - inositol from vegetative tissue of *Zea mays*.
Supplemento Plant Physiology, Washington, 69 (4) : 55, abst. 306, Apr.
1982
- 21 DO, C. B. & CORMIER, F. Accumulation of peonidin-3-glucoside enhanced by
osmotic stress in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension. *Plant Cell,
Tissue and Organ Culture*, The Hague, 24 : 49-51, 1991.
- 22 DURAN-VILA, N., ORTEGA, V. & NAVARRO, L. Morphogenesis and tissue
cultures of three *Citrus* species. *Plant Cell, Tissue and Organ
Culture*, The Hague, 16 : 123-33, 1989.
- 23 EDELMAN, J. & HANSON, A. D. Sucrose suppression of chlorophyll synthesis
in carrot callus cultures. *Planta*, Berlin, 98 : 150-6, 1971.
- 24 EDRISS, M. H. & BURGER, D. W. Micro-grafting shoot-tip culture of *Citrus* on
three trifoliolate rootstocks, *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, 23 :
255-9, 1984
- 25 EINSET, J. W. *Citrus* tissue culture : Stimulation of fruit explant cultures
with orange juice. *Plant Physiology*, Washington, 62 : 885-8, 1978.
- 26 ESEN, A. & SOOST, R. K. Adventive embryogenesis in *Citrus* and its relation
to pollination and fertilization. *American Journal Botany*, Columbus,
64 (6) : 607-14, 1977.

- 27 GAVISH, H. , VARDI, A. & FLUHR, R. Extra cellular proteins and early embryo development in *Citrus* nucelar cell cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, 82 : 606-16, 1991.
- 28 GILADI, I. ; ALTMAN, A. & GOREN, R. A method for aseptic culture of bud explants from *Citrus* trees. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, 10 : 357-62, 1979.
29. _____; ALTMAN, A. & GOREN, R. Differential effects of sucrose, Abscisic Acid and benzyladenine on shoot Growth and Collus Formating 42 in the abscission Zone of excised citrus bud. **Plant Physiology**, Washington, 59: 1161 - 4, 1977.
30. GOREN, R. , ALTMAN, A. & GILADI, I. Role of ethylene in abscisic acid-induced callus formation in *Citrus* bud cultures. **Plant Physiology**, Washington, 63(2) : 280-2, 1979.
- 31 GRINBLAT, U. Differentiation of *Citrus* stem "in vitro". **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, 97 (5) : 599-603, 1972.
32. GROSSER, J. W. & CHANDLER, J. L. "In vitro" multiplication of Swingle Citrumelo Rootstock with Coumarin, **Hortscience**, Virginia, 21 (3) : 518-20, 1986.
33. GULSEN, Y. ; ALTMAN, A. & GOREN, R. Growth and development of *Citrus* pistils and fruit explants "in vitro". **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, 53 : 295-300, 1981.

34. HUANG, L. C., CHEN, W. L. & CHIU, D. S. "In vitro" graft-enhanced nucellar plant development in the monoembryonic *Citrus grandis* L. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, 63(4): 705 - 9, 1988.
35. KITTO, S. L. & YOUNG, M. J. "In vitro" propagation of "Carrizo citrange". **Hortscience**, Virginia, 16(3): 305 - 6, 1981.
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. **Zeitschrift Pflanzenphysiologie**, Bet Dagan, 73 (2): 415 - 21, 1974.
37. _____ ; _____ ; SPIEGEL-ROY, P.; BORNMAN, C. H. & KOCHBA, M. Stimulation of rooting of *Citrus* embryoids by gibberellic acid and adenine sulphate. **Annual Botany**, New York 38: 795- 802, 1974.
38. _____ & SPIEGEL-ROY, P. Cell and tissue culture for breeding and developmental studies of *Citrus*. **Hortscience**, Virginia, 12(2) : 110-14, 1977.
39. _____ ; _____ ; NEUMANN, H. & SAAD, S. Effect of carbohydrates on somatic embryogenesis in subcultured nucellar callus of *Citrus* cultivars. **Zeitschrift Pflanzenphysiologie**, Bet Dagan, 105: 359-68, 1982.
40. _____ ; _____ & SAFRAN, H. Adventive plants from ovules and nucelli in *Citrus*. **Planta**, Berlin, 106(2) : 237 - 45, 1972.

41. KORDAN, H. A. Proliferation of excised juice vesicles of lemon "in vitro". *Science*, Washington, 129: 779-80, 1959.
42. KOZAI, T.; OKI, H. & FUJIWARA, K. Photosynthetic characteristics of *Cymbidium* plantlet "in vitro". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, 22:205-11, 1990.
43. _____, IWABUCHI, K.; WATANABE, K. & WATANABE, I. Photoautotrophic and photomixotrophic growth of strawberry plantlets "in vitro" and changes in nutrient composition of the medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, 25: 107-15, 1991.
44. LANGFORD, P. J. & WAINWRIGHT, H. Effects of sucrose concentration on the photosynthetic ability of Rose shoots "in vitro". *Annals of Botany*, New York, 60 : 633-40, 1987.
45. LEE, N.; WETZSTEIN, H. Y. & SOMMER, H. E. Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue - cultured plantlets and seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. Towards improved acclimatization and field survival. *Plant Physiology*, Washington, 78:637-41, 1985.
46. LI, J. R. & EATON, G. W. Growth and rooting of grape shoot apices "in vitro". *Hortscience*, Virginia, 19:64-6, 1984.
47. LING, J. T.; NITO, N.; IWAMASA, M. & KUNITAKE, H. Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic callus of 'Satsuma'. *Hortscience*, Virginia, 25(8) : 970-2, 1990.

48. MATSUMOTO, K. & YAMAGUCHI, H. Induction of adventitious buds and globular embryoids on seedlings of Trifoliate Orange (*P. trifoliata*). *Japanese Journal Breeding*, Tokyo, 33(2): 123-9, 1983.
49. MOORE, G. A. Factors affecting "in vitro" embryogenesis from undeveloped ovules of mature *Citrus* fruit. *Journal of American Society for Horticultural Science*, Alexandria, 110(1): 66-70, 1985.
50. ———. "In vitro" propagation of *Citrus* rootstocks. *Hortscience*, Virginia, 21(2): 300 - 1, 1986.
51. MOORE JUNIOR, T. S. Phospholipid biosynthesis. In: BRIGGS, W. R.; GREEN, P. B. & JONES, R. L. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, 33: 235-59, 1982.
52. MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. In: BRIGGS, W. R.; GREEN, P. B.; JONES, R. L. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, 25: 135 - 66, 1974.
53. ———; BITTERS, W.P.; RANGAN, T.S.; NAUER, E. M.; ROISTACHER, C.N.; & HOLLIDAY, P.B. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free *Citrus* clones. *Hortscience*, Virginia, 7(2): 118-21, 1972.
54. ——— & SKOOG, F. A revised medium for growth and bioassays tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 15 (3): 473-97, 1962.

55. _____ & TUCKER, D. P. H. Growth factor requirements of *Citrus* tissue culture. In: CHAPMAN, H. D. ed. *International Citrus Symposium*, I, Riverside, University of California, 1969. p. 1155 - 61.
56. NAVARRO, L., ORTIZ, J. M. & JUAREZ, J. Aberrant *Citrus* plants obtained by somatic embryogenesis of nucelli cultured "in vitro". *Hortscience*, Virginia, 20(2): 214- 5, 1985.
57. _____, ROISTACHER, C. N. & MURASHIGE, T. Improvement of shoot ap grafting "in vitro" for virus-free *Citrus*. *Journal of American Society for Horticultural Science*, Alexandria, 100(5) : 471-9, 1975.
58. _____ & JUAREZ, J. Tissue culture Techniques used in Spain to recover virus-free *Citrus* Plants. *Acta Horticulturae*, The Hague, 78 : 425 -35, 1977
59. PASQUAL, M. Regeneração de plantas "in vitro" e radiosensitividade de tecidos nucelares de Citros. ESALQ, Piracicaba, 1985. 107p. (Tese de Doutorado).
60. _____ & ANDO, A. Embriogênese nucelar em óvulos abortivos de laranja 'Pera' Cultivados "in vitro". *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 24(12): 1507-11, Dez. 1989 c.
61. _____ & _____. Micropropagação da laranja 'Valência' através da cultura de gemas axilares "in vitro". *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 24(6): 723-6 jun. 1989 b.

- 62 _____ & _____ Micropropagação de 'Trifoliata' através de cultura de gemas axilares "in vitro". *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 24(2) 217-20, Fev. 1989 a.
- 63 PINTO, J. E. B. P., BARBOSA, M. H. P. & PASQUAL, M. 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, 1988 a. V 1 p 401-6
- 64 _____, _____ & _____; Multiplicação "in vitro" do porta enxerto 'Trifoliata' com gemas axilares provenientes de árvore adulta. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9, Campinas, 1987. *Anais...* Campinas, Sociedade Brasileira de Fruticulturá, 1988 b. V.1. p. 407 - 10.
- 65 RANGA SWAMY, N. S. Experimental studies on female reproductive structures of *Citrus microcarpa* BUNGE. *Phytomorphology*, Delhi, 11(2). 109-27, 1961.
- 66 SAKUTA, M.; TAKAGI, T. & KOMAMINE, A. Effects of sucrose on betacyanin accumulation and growth in suspension cultures of *Phytolacca americana*. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 71:455-8, 1987.
- 67 SAUTON, A., MOURAS, A. & LUTZ, A. Plant regeneration from *Citrus* root meristems. *Journal of Horticultural Science*, Ashford, 57(2):227-31, 1982.
- 68 SCHROEDER, C.A. Totipotency of cells from fruit pericarp tissue "in vitro". *Science*, Washington, 138:595-6, 1962.

69. SINGHA, S., OBERLY, G. H. & TOWNSEND, E. C. Changes in nutrient composition and pH of the culture medium during "in vitro" shoot proliferation of crabapple and pear. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, The Hague, 11:209-20, 1987.
70. SPIEGEL-ROY, P. & SAAD, S. Effect of Carbohydrates and inhibitors of GA₃ Biosynthesis on Embryogenic potential of Salt tolerant and non-tolerant callus lines of orange (*Citrus sinensis* OSB.). *Plant Science*, Berkeley, 47:215-20, 1986.
71. STARRANTINO, A. & RUSSO, F. Seedlings from undeveloped ovules of Ripe fruits of polyembryonic *Citrus* cultivars. *Hortscience*, Virginia, 15(3):296-7, 1980.
72. STOMMEL, J. R. & SIMON, P. W. Influence of 2 deoxy-D-glucose upon growth and invertase activity of carrot (*Daucus carota* L.) cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, 16:89-102, 1989.
73. TAIZ, L. & ZEIGER, E. Mineral nutrition: In: _____. *Plant Physiology*. Redwood City, The Benjamin/Cummings, 1991. Cap. 5, p. 100-19.
74. UEDA, Y., ISHIYAMA, H., FUNKUI, M. & NISHI, A. Invertase in cultured *Daucus carota* cells. *Phytochemistry*, Oxford, 13:383-7, 1974.
75. WAKANA, A. & UEMOTO, S. Adventive embryogenesis in *Citrus*. I. The occurrence of adventive embryos Without pollination or fertilization. *American Journal Botany*, Columbus, 74(4):517-30, 1987.

76. WANG, Y. C. & JANICK, J. Sucrose Concentration and osmolarity as factors affecting "in vitro" Wax accumulation in jojoba embryos. *Hortscience, Virginia*, 21(4): 1048-9, 1986.
77. WILMS, H. J., WENT, J. L.; CRESTI, M. & CIAMPOLINI, F. Adventive embryogenesis in *Citrus*. *Caryologia, Firenze*, 36(1): 65-78, 1983.

9. APENDICE

Quadro 1A - Resumo da Regressão Polinomial dos teores de sais na ausência de sacarose para o porta-enxerto 'Cravo'. ESAL, Lavras-MG, 1992.

REGRESSÃO	SIGNIFICANCIA	EQUAÇÃO	R ²
Linear	NS	—	—
Quadrática	**	$Y=0,847702+0,0584804X-0,00051376X^2$	89,84

*** Significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Quadro 2 A- Resumo da Regressão Polinomial dos teores de sais na presença de 15 g de sacarose para o porta-enxerto 'Cravo'. ESAL, Lavras - MG, 1992

REGRESSÃO	SIGNIFICANCIA	EQUAÇÃO	R ²
Linear	**	$Y=1,337881 + 0,0208764 X$	71,90
Quadratica	**	$Y=0,903923 + 0,0555930X - 0,00034717X^2$	89,30

*** Significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Quadro 3 A- Resumo da Regressão Polinomial dos teores de sais na presença de 30 g de sacarose para o porta-enxerto 'Cravo'. ESAL, Lavras - MG, 1992

REGRESSÃO	SIGNIFICANCIA	EQUAÇÃO	R ²
Linear	**	$Y=0,916299 + 0,0305252 X$	76,31
Quadratica	NS	—	—

*** Significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Quadro 4 A - Resumo da Regressão Polinomial dos teores de sais na presença de 45 g de sacarose para o porta-enxerto 'Cravo'. ESAL, Lavras - MG, 1992.

REGRESSÃO	SIGNIFICANCIA	EQUAÇÃO	R ²
Linear	**	$Y=0,733156+0,0297337 X$	85,81
Quadrática	NS	_____	_____

*** Significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Quadro 5 A - Resumo da Regressão Polinomial dos teores de sais na presença de 60 g de sacarose para o porta-enxerto 'Cravo'. ESAL, Lavras - MG, 1992.

REGRESSÃO	SIGNIFICANCIA	EQUAÇÃO	R ²
Linear	**	$Y=0,659754+0,0335120 X$	89,77
Quadrática	NS	_____	_____

*** Significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Quadro 6 A- Resumo da Regressão Polinomial dos teores de sais na presença de 75 g de sacarose para o porta-enxerto 'Cravo'. ESAL, Lavras - MG, 1992.

REGRESSÃO	SIGNIFICANCIA	EQUAÇÃO	R ²
Linear	**	$Y=0,277881+0,0308365 X$	92,02
Quadrática	*	$Y=0,606156+0,0045745X+0,00026262 X^2$	97,86

*** Significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Quadro 7 A - Resumo da Regressão Polinomial das doses de sacarose na ausência de sais para o porta-enxerto 'Cravo'. ESAL, Lavras - MG, 1992.

	SIGNIFICANCIA	EQUAÇÃO	R ²
REGRESSÕES	NS	_____	_____

*** Significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Quadro 8 A - Resumo da Regressão Polinomial das doses de sacarose na presença de 25 % de sais para o porta-enxerto 'Cravo'. ESAL, Lavras - MG, 1992.

REGRESSÃO	SIGNIFICANCIA	EQUAÇÃO	R ²
Linear	**	$Y=2,519291 - 0,0240336 X$	86,12
Quadrática	NS	—	—

*** Significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Quadro 9 A - Resumo da Regressão Polinomial das doses de sacarose na presença de 50 % de sais para o porta-enxerto 'Cravo'. ESAL, Lavras - MG, 1992.

REGRESSÃO	SIGNIFICANCIA	EQUAÇÃO	R ²
Linear	**	$Y=2,638122 - 0,0110140 X$	28,85
Quadrática	NS	—	—

*** Significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Quadro 10 A- Resumo da Regressão Polinomial das doses de sacarose na presença de 75 % de sais para o porta-enxerto 'Cravo'. ESAL, Lavras - MG, 1992.

REGRESSÃO	SIGNIFICANCIA	EQUAÇÃO	R ²
Linear	*	$Y=2,7277+0,0116249 X$	16,60
Quadrática	**	$Y=1,932968+0,091098X-0,00105964 X^2$	82,80

*** Significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Quadro 11 A- Resumo da Regressão Polinomial das doses de sacarose na presença de 100 % de sais para o porta-enxerto 'Cravo'. ESAL, Lavras - MG, 1992.

REGRESSÃO	SIGNIFICANCIA	EQUAÇÃO	R ²
Linear	**	$Y=2,421756+0,0190142 X$	53,83.
Quadrática	**	$Y=1,968694+0,0643205X-0,00060408 X^2$	79,90

*** Significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Quadro 12 A- Resumo da Regressão Polinomial dos teores de sais na ausência de de sacarose para o porta-enxerto 'Trifoliata'. ESAL, Lavras - MG, 1992.

REGRESSÃO	SIGNIFICANCIA	EQUAÇÃO	R ²
Linear	**	$Y=2,147506+0,0165750 X$	42,09
Quadrática	**	$Y=1,560523+0,0635336X-0,00046959X^2$	71,65

*** Significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Quadro 13 A- Resumo da Regressão Polinomial dos teores de sais na presença de 15 g de sacarose para o porta-enxerto 'Trifoliata'. ESAL, Lavras - MG, 1992.

REGRESSÃO	SIGNIFICANCIA	EQUAÇÃO	R ²
Linear	**	$Y=1,914514+0,0385912 X$	89,37
Quadrática	*	$Y=1,583183+0,0650978X-0,00026507X^2$	93,06

*** Significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Quadro 14 A- Resumo da Regressão Polinomial dos teores de sais na presença de 30 g de sacarose para o porta-enxerto 'Trifoliata'. ESAL, Lavras - MG, 1992.

REGRESSÃO	SIGNIFICANCIA	EQUAÇÃO	R ²
Linear	**	$Y=1,365309+0,0192676 X$	65,67
Quadrática	**	$Y=0,783648+0,0658004X-0,00046533 X^2$	99,18

*** Significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Quadro 15 A- Resumo da Regressão Polinomial dos teores de sais na presença de 45 g de sacarose para o porta-enxerto 'Trifoliata'. ESAL, Lavras - MG, 1992.

REGRESSÃO	SIGNIFICANCIA	EQUAÇÃO	R ²
Linear	**	$Y=0,807226+0,0309496 X$	95,49
Quadrática	NS	—	—

*** Significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Quadro 16 A- Resumo da Regressão Polinomial dos teores de sais na presença de 60 g de sacarose para o porta-enxerto 'Trifoliata'. ESAL, Lavras - MG, 1992.

REGRESSÃO	SIGNIFICANCIA	EQUAÇÃO	R ²
Linear	**	$Y=0,892695 + 0,0220037 X$	84,21
Quadrática	*	$Y=0,571518 + 0,0476979X - 0,00025694 X^2$	94,26

*** Significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Quadro 17 A- Resumo da Regressão Polinomial dos teores de sais na presença de 75 g de sacarose para o porta-enxerto 'Trifoliata'. ESAL, Lavras - MG, 1992.

REGRESSÃO	SIGNIFICANCIA	EQUAÇÃO	R ²
Linear	**	$Y=0,618084 + 0,0195007 X$	97,60
Quadrática	NS	—	—

*** Significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.