



**CULTIVO DE EMBRIÕES IMATUROS  
PROVENIENTES DE HIBRIDAÇÃO  
CONTROLADA ENTRE 'PÊRA RIO' e 'PONCÃ'**

**EDVAN ALVES CHAGAS**

**2003**

**EDVAN ALVES CHAGAS**

**CULTIVO DE EMBRIÕES IMATUROS PROVENIENTES DE  
HIBRIDAÇÃO CONTROLADA ENTRE ‘PÊRA RIO’ e ‘PONCÃ’**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Moacir Pasqual

**LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2003**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Chagas, Edvan Alves

Cultivo de embriões imaturos provenientes de hibridação controlada entre  
'Pera Rio' e Ponca' / Edvan Alves Chagas. -- Lavras : UFLA, 2003.  
66 p.: il.

Orientador: Moacir Pasqual.

Dissertação (Mestrado) — UFLA.

Bibliografia.

Citros. 2. Cultura de embriões. 3. Cultura de tecidos. 4. Biotecnologia.  
5. Melhoramento genético. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.30423

**EDVAN ALVES CHAGAS**

**CULTIVO DE EMBRIÕES IMATUROS PROVENIENTES DE  
HIBRIDAÇÃO CONTROLADA ENTRE ‘PÊRA RIO’ e ‘PONCÃ’**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em: 27 de fevereiro de 2003

Prof. Dr. José Darlan Ramos UFLA

Pesq. Dr. Leonardo Ferreira Dutra UFLA

Prof. Dr. Moacir Pasqual  
UFLA  
(Orientador)

**LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL**

Aos meus pais, Pedro Alves Chagas e Francisca Alves Chagas,  
pelo incondicional amor que me dedicam,  
pela compreensão e incessante apoio e  
pelo constante incentivo.

### **OFEREÇO**

Aos meus irmãos, Evandro, Regiane, Rosicléa, Pedro Euzébio, Ray e Rosângela.

Aos meus cunhados, Garcia, Lucinaldo e Ednildo.

Às minhas cunhadas, Marinéia e Aparecida.

Aos meus sobrinhos, Lucas, Athirson, Uilenderson, Wingra,

Wingrid, Émile, Bruno, Luís Henrique, Eduardo,

Ângela, Caroline e Lucas Ryan.

À minha noiva, Pollyana Cardoso.

### **DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

À Universidade Federal de Lavras, por meio do Departamento de Agricultura, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento e Pesquisa do Ensino Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Moacir Pasqual, pela orientação, amizade, apoio, incentivo e confiança.

Aos professores do Departamento de Agricultura, em especial José Darlan Ramos, Nilton Nagib Jorge Chalfun e Márcio Ribeiro do Vale, pelo companheirismo, apoio e auxílio nos trabalhos acadêmicos.

Ao pesquisador Leonardo Ferreira Dutra, pela amizade, apoio, incentivo e ajuda nos trabalhos científicos.

Aos laboratoristas Vantuil Antônio Rodrigues e Antônio Claret, pelo auxílio na realização dos trabalhos e amizade.

Aos funcionários do Pomar e do Departamento de Agricultura, pelo apoio e momentos de descontração.

Aos alunos de graduação Daniela, Marilza, Juliana, Milene, Keize, Flávia, Tiago, Ednei, pela colaboração na condução dos trabalhos.

Aos colegas de curso Adriano, em especial; Leila, Vander, Sebastião, Regina, Tatiana, Adriana Madeira e Aparecida, pelo companheirismo, apoio na realização dos trabalhos e momentos de descontração.

Aos amigos de convívio, Maurício, Fabiane, Peterson e Luiz, pela amizade incondicional, conselhos e momentos de descontração.

À família de meu grande amigo Enoque, Salwa (esposa) e Bruno (filho), pelo carinho infinito, minha gratidão.

À família da minha noiva, Alaércio, Célia, Rafael, Irany, Carlos, Michelliny, Gabriel, Fernando, Sandra, Rafaela, Letícia, Paulo, Maria, Érick, Marcelo, Tânia, Jean e Felipe, pelo ambiente familiar que me foi proporcionado, apoio e amizade, minha gratidão.

Aos irmãos da Igreja Presbiteriana Betel, pelo carinho e amizade.

Enfim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu respeito e infinita gratidão.

## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

**Edvan Alves Chagas**, filho de Pedro Alves Chagas e Francisca Alves Chagas, nasceu em Porto Velho, RO, em 23 de novembro de 1977. Ingressou no curso de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal de Pelotas em 1996, concluindo-o em 27 de janeiro de 2001.

Ingressou no Programa de Pós-Graduação em março de 2001 no curso de mestrado em Agronomia, área de concentração Fitotecnia/Cultura de Tecidos, da Universidade Federal de Lavras, defendendo a dissertação em 27 de fevereiro de 2003.



## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	ii
1 INTRODUÇÃO .....	01
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	03
2.1 Citricultura .....	03
2.2 Melhoramento genético de citros .....	05
2.3 Apomixia .....	07
2.4 Poliembrionia .....	09
2.5 Cultura de tecidos e de embriões .....	11
2.6 Componentes do meio de cultura .....	13
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	19
3.1 Experimento 1 - estádios de desenvolvimento x meio MT .....	22
3.2 Experimento 2 - meio MT x sacarose .....	22
3.3 Experimento 3 - vitaminas x sacarose .....	23
3.4 Experimento 4 - carvão ativado x giberelina .....	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	24
4.1 Experimento 1 - estádios de desenvolvimento x meio MT .....	24
4.2 Experimento 2 - meio MT x sacarose .....	30
4.3 Experimento 3 - vitaminas x sacarose .....	40
4.4 Experimento 4 - carvão ativado x giberelina .....	49
5 CONCLUSÕES .....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	57

## RESUMO

CHAGAS, Edvan Alves. **Cultivo de embriões imaturos provenientes de hibridação controlada entre ‘Pêra Rio’ e ‘Poncã’**. 2003. 66p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia)–Universidade Federal de Lavras, Lavras.\*

Objetivou-se estudar os diferentes estádios de desenvolvimento embrionário, a influência de diversas concentrações do meio MT (Murashige & Tucker, 1969), sacarose, vitaminas, carvão vegetal e ácido giberélico no cultivo de embriões imaturos oriundos do cruzamento entre laranjeira ‘Pêra Rio’ x tangerineira ‘Poncã’. Os embriões foram excisados sob condições assépticas e inoculados em 15 mL do meio de cultura MT, de acordo com cada experimento a seguir: 1) estádios de desenvolvimento (globular, cordiforme e cotiledonar) associados às concentrações 0%, 50%, 100% e 150% do meio de cultura MT; 2) concentrações do meio de cultura MT (0%, 50%, 100%, 150% e 200%) combinados com 0, 30, 60 e 90 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; 3) concentrações de vitaminas do meio MT (0%, 50%, 100%, 150% e 200%) combinados com 0, 30, 60 e 90 g.L<sup>-1</sup> de sacarose; 4) concentrações de carvão ativado (0; 0,5; 1; 1,5 e 2 g.L<sup>-1</sup>) combinados com GA<sub>3</sub> (0; 0,01; 0,1; 1 e 10 mg.L<sup>-1</sup>). Após a inoculação, os embriões foram mantidos por 90 dias em sala de crescimento à temperatura de 27±1°C, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 32 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Maior desenvolvimento de embriões foi obtido no estádio cotiledonar. A utilização de 50% e 100% do meio MT associado a 60 e 90 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, respectivamente, acrescido de 0,01 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, proporcionou melhor desenvolvimento de embriões globulares. Não há necessidade da adição de carvão ativado e vitaminas no meio MT para o cultivo de embriões globulares.

---

\* Comitê Orientador: Moacir Pasqual – UFLA (Orientador); José Darlan Ramos – UFLA.

## ABSTRACT

CHAGAS, Edvan Alves. **Culture of immature embryos from hibridatization between 'Pêra Rio' and 'Poncã'**. 2003. 66p. Dissertation (Master of Science in Agronomy/Crop Science)–Universidade Federal de Lavras, Lavras.\*

The aim of this research was to study the embryonic development at different stages, the influence of diverse concentrations of MT medium (Murashige & Tucker, 1969), sucrose, vitamins, activated charcoal and gibberellic acid on the culture of immature embryos from cross between 'Pêra Rio' x 'Poncã'. The embryos were excised under aseptic conditions and inoculated in 15 mL of MT according to each of the following experiments: 1) stages of development (globular, heart-shaped and cotyledonary) associated with concentrations of 0%, 50%, 100% and 150% of the MT medium; 2) MT concentrations (0%, 50%, 100%, 150% and 200%) combined with 0, 30, 60 and 90 g.L<sup>-1</sup> of sucrose; 3) vitamins concentrations of the MT (0%, 50%, 100%, 150% and 200%) combined with 0, 30, 60 and 90 g.L<sup>-1</sup> of sucrose; 4) activated charcoal concentrations (0, 0.5, 1, 1.5 and 2 g.L<sup>-1</sup>) combined with GA<sub>3</sub> (0, 0.01, 0.1; 1 and 10 mg.L<sup>-1</sup>). After the inoculation, the embryos were maintained for 90 days in growth room at 27±1°C temperature, 16-hour photoperiod and 32 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> of irradiance. High development was obtained with embryos at cotyledonary stage. High development at the globular embryos stage were obtained using 50% of the MT added to 60 g.L<sup>-1</sup> of sucrose and 100% of the same medium added to 90 g.L<sup>-1</sup> of sucrose. Both supplemented with 0,01 mg.L<sup>-1</sup> of GA<sub>3</sub>. There was no need to add activated charcoal and vitamins in the MT to globular embryos culture.

---

\* Guidance Committee: Moacir Pasqual – UFLA (Major Professor); José Darlan Ramos – UFLA

## 1 INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira é uma atividade de destaque no panorama agrícola nacional e internacional. A participação do Brasil no comércio mundial de suco de laranja concentrado e congelado (SLCC) é superior a 80%, representando uma cifra de 1,2 bilhão de dólares e um volume anual exportado de 1,2 milhão de toneladas de suco de laranja. O Brasil é o maior produtor mundial de citros com 34% da produção total, sendo o estado de São Paulo responsável por 86% da produção brasileira.

Apesar desse grande destaque no cenário mundial, a citricultura brasileira vem enfrentando novos desafios. O surgimento de doenças, como a clorose variegada dos citros (CVC), o declínio e mais recentemente a morte súbita dos citros (MSC), desconsiderando ainda o reaparecimento de vários focos de cancro cítrico, têm colocado a citricultura em um momento crucial de mudanças.

Visando minimizar os impactos provocados pelos entraves que tem enfrentado a citricultura, o melhoramento dos citros está voltado para obtenção de plantas com maior resistência ao frio, variedades copas ou híbridos de alto valor comercial que possibilitem conviver com as principais doenças, como o CVC, cancro cítrico, gomose, tristeza, entre outras características agronômicas desejáveis.

Neste contexto, diversos trabalhos de melhoramento têm sido conduzidos no sentido de obter novas variedades resistentes ou adaptadas à realidade atual. Entretanto, são diversos os entraves ao melhoramento genético dos citros. Um dos fatores responsáveis por estas dificuldades é a alta taxa de poliembrionia apresentada pelos cítricos, o que resulta normalmente em elevada

taxa de aborto do embrião zigótico, devido à competição exercida sobre ele pelos embriões nucelares, geralmente mais vigorosos.

A laranjeira 'Pêra' é a mais importante variedade cítrica brasileira, sendo utilizada tanto pela indústria como pelos mercados interno e externo de fruta fresca. Na indústria, seu rendimento é muito bom e as qualidades de seu suco colocaram-na no topo da preferência entre outras variedades.

A escolha da tangerineira 'Poncã' se deve ao fato de que a mesma possui diversas características agrônômicas desejáveis, além de ser bastante apreciada no mercado interno para o consumo *in natura*. Do ponto de vista fitossanitário, sua principal vantagem é a presença de alta resistência ao cancro cítrico, resistência à CVC e alta tolerância ao ácaro da leprose.

A cultura de embriões é uma técnica que pode contribuir significativamente com o melhoramento dos cítricos por propiciar o resgate de embriões híbridos imaturos, oriundos de cruzamentos interespecíficos e intergenéricos. Todavia, é necessário adequar um meio de cultura que possa sustentar o seu crescimento e desenvolvimento.

Objetivou-se estudar os diferentes estádios de desenvolvimento embrionário e a influência de diversos componentes do meio de cultura MT (Murashige & Skoog, 1969) no cultivo de embriões imaturos oriundos de frutos provenientes do cruzamento controlado entre laranjeira 'Pêra Rio' Tardia x tangerineira 'Poncã'.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Citricultura

Comercialmente, existe um número elevado de espécies cítricas, tais como: laranja, tangerinas, limões, pomelos, cidras e kunquates. As laranjeiras compreendem o grupo mais importante de frutos cítricos em todos os países, seguidas pelas tangerineiras. Atualmente, as laranjeiras abrangem cerca de dois terços de toda a produção mundial, sendo a ‘Valência’, ‘Baía’, ‘Hamlin’, ‘Shamouti’ e ‘Pêra’ as variedades mais cultivadas (Figueiredo, 1991).

O Brasil tem apresentado grande incremento na produção de frutas cítricas nas últimas décadas, sendo o maior produtor, detendo 34% da produção mundial, o que a torna uma atividade de grande importância econômica e social para o país. A citricultura brasileira exportou aproximadamente 1,2 milhão de toneladas de suco de laranja concentrado e congelado (SLCC) em 2002, o que rendeu valor de U\$\$ 1,2 bilhão (FAO, 2002) e próximo de 1,05 milhão de toneladas de SLCC em 2001 (Agrianual, 2002).

A ocorrência e a alta velocidade de disseminação de doenças como a clorose variegada dos citros (CVC), gomose, tristeza do citros, cancro cítrico, morte súbita dos citros (MSC), entre outras, têm trazido sérios problemas à exploração da atividade. Apesar da hegemonia brasileira na produção, a citricultura apresenta inúmeros problemas que dificultam sua maior competitividade no mercado externo e se converte em entrave à expansão da atividade no país.

A laranjeira ‘Pêra’ é a mais importante variedade cítrica brasileira, sendo utilizada tanto pela indústria como pelos mercados interno e externo de fruta fresca. Na indústria, seu rendimento é muito bom e as qualidades de seu

suco colocaram-na no topo da preferência entre as outras variedades (Donadio, 1999).

Classificada como *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, a laranja 'Pêra', apesar de ser considerada brasileira por muitos, não tem sua origem bem definida. Possui um florescimento fora da época normal, com duas a três floradas por ano, dificultando os tratamentos culturais e é suscetível à tristeza, problema contornado em parte pelo uso de clones pré-imunizados (Donadio, 1999).

A tangerineira 'Poncã', originada da Índia, é classificada como *Citrus reticulata* Blanco e tem grande importância comercial. No Brasil, alcança expressão econômica em muitos estados brasileiros, principalmente em Minas Gerais, São Paulo e na região norte do país (Figueiredo, 1991).

Caracteriza-se por apresentar árvores de porte médio, esguias, típicas e com folhas laceoladas. Sua produtividade é muito boa podendo atingir até 250 kg.planta<sup>-1</sup>. Os frutos apresentam a forma achatada com massa média de 138 g, de cor alaranjada forte e com casca de textura frouxa. O suco corresponde a 43% da massa do fruto, com teores médios de brix - 10,8%, acidez - 0,85% e "ratio" de 12,7. A variedade apresenta maturação dos frutos de meio estação, sendo produzida essencialmente visando ao consumo *in natura* (Figueiredo, 1991).

Possui alta capacidade de produção de sementes, acompanhada de alta taxa poliembriônica, chegando a produzir até 30 embriões por semente.

No que diz respeito às condições fitossanitárias, sua principal vantagem é a alta resistência ao cancro cítrico (Namekata, 1991), resistência à CVC e alta resistência ao ácaro da leprose.

## 2.2 Melhoramento genético de citros

Segundo Koller (1994), todas as espécies cítricas são originadas das regiões tropicais e subtropicais da Ásia e do Arquipélago Malaio. A família Rutaceae, subfamília Aurantioideae, que inclui as espécies cítricas, é formada por 32 gêneros afins, três deles com importância econômica *Citrus*, *Fortunella* e *Poncirus* (Giacometti, 1991). Entre eles, é possível a polinização com a obtenção de híbridos, algumas vezes de interesse comercial (Moreira & Pio, 1991). Dessa forma, deveria ser relativamente fácil incorporar em uma variedade as características desejáveis existentes em outras variedades, espécies ou gêneros (Koller, 1994). Entretanto, o melhoramento genético dos citros pelos métodos convencionais tem sido seriamente limitado, principalmente pela poliembrião das sementes da maioria das espécies e variedades (Morais, 1997).

Devido à elevada heterozigose observada nos citros, em progênies de natureza zigótica provenientes de hibridações, os caracteres fenotípicos não são uniformes, conforme se verifica por uma ampla variação de fenótipos na geração  $F_1$ , sendo a ocorrência de herança simples raramente verificada (Furr, 1969). Ocasionalmente, há segregação de um caráter em progênies de citros, indicando a ação de um ou poucos genes (Soost & Cameron, 1975). A grande variabilidade das progênies zigóticas parece ser constante em todos os citros que produzem embriões nucleares, sendo constatada mesmo quando os pais são da mesma espécie, de espécies ou gêneros distintos. Às vezes, as diferenças entre plantas zigóticas de mesmos pais, dada a alta heterozigose, são maiores entre si do que entre duas variedades. Frequentemente, porém, os híbridos apresentam caracteres semelhantes aos dos pais ou parentes próximos.

Hanna & Bashaw (1987) citam que a presença de embriões nucleares possibilita a perpetuação natural de características varietais desejáveis, mas, por



outro lado, a poliembrionia prejudica a germinação dos embriões zigóticos e a distinção dos “seedlings” híbridos dos nucelares (Koller, 1994).

O melhoramento genético de citros tem como objetivo obter plantas com maior resistência ao frio, resistência às doenças (gomose, cancro, leprose, entre outras), melhor coloração dos frutos, ampliação do período de safras, menor número de sementes, porte menor, tolerância à tristeza e efeito ornamental. Mais especificamente no Brasil, uma das metas para o melhoramento de citros é obter copas de variedades (tangerinas) ou híbridos (tangor) de alto valor comercial que capazes de conviver com as principais doenças, como o cancro cítrico (Moreira & Pio, 1991).

Visando contornar esse problema, diversos trabalhos de melhoramento têm sido conduzidos com o objetivo de obter novas variedades copas e porta-enxertos melhor adaptadas as condições tropicais, sendo apoiados pelas técnicas de hibridações realizadas a campo, resgate de embriões imaturos e identificação dos híbridos por meio de marcadores moleculares.

Machado et al. (2000) ressaltam ainda que os trabalhos de melhoramento de citros são favoráveis devido à alta demanda do setor produtivo por plantas com tolerância à CVC, tristeza, gomose, cancro cítrico e principais pragas, existência de um banco de germoplasma com alta variabilidade genética a ser explorada e a utilização rotineira de alguns marcadores moleculares, como os RAPDs e RFLPs.

Assim, a regeneração de plântulas oriundas de embriões imaturos provenientes do cruzamento realizado entre laranjeira ‘Pêra Rio’ tardia x tangerineira ‘Poncã’ pode proporcionar a obtenção de plantas híbridas com possível presença de características de resistência ou tolerância a doenças, como a CVC e/ou cancro cítrico, além do surgimento de outras características agronômicas desejáveis.

### 2.3 Apomixia

Apomixia refere-se ao termo utilizado para designar a reprodução assexuada que ocorre no óvulo das plantas angiospérmicas (Koltunow 1993).

As sementes constituem a forma de reprodução sexual mais comum entre as plantas, em que os embriões zigóticos são resultantes da fusão de gametas masculinos e femininos. Entretanto, ocorre, em algumas espécies, uma forma de reprodução assexuada por meio de sementes, em que um ou mais embriões são formados sem redução do número cromossômico e sem fertilização, caracterizando assim o fenômeno da apomixia (Nijs & Van Dijk, 1994).

O processo apomítico, em alguns aspectos, assemelha-se a vários eventos da reprodução sexual. Os embriões apomíticos apresentam uma constituição genética idêntica à planta-mãe e sua formação ocorre diretamente de células localizadas na estrutura gametofítica ou nas proximidades desta estrutura. O padrão morfológico de formação dos embriões em espécies apomíticas é freqüentemente indistinguível do seu relativo sexual (Nogler, 1984).

Existem duas formas diferentes de apomixia: a gametofítica, na qual o embrião se desenvolve a partir do gametófito e a esporofítica, na qual o embrião se desenvolve a partir do esporófito.

Em *Citrus* ocorre a apomixia do tipo esporofítica, com embriogênese adventícia nucelar, de tal forma que o embrião desenvolve-se diretamente do tecido esporofítico, sem a formação anterior de um gametófito. Este tipo de apomixia assemelha-se muito à reprodução assexual pura (Nijs & Van Dijk, 1994). O processo apomítico e o assexual ocorrem de forma concomitante, dentro de um mesmo óvulo, no gênero *Citrus*. Enquanto, a partir da fertilização da célula-ovo e do núcleo polar são produzidos o embrião zigótico e o

endosperma, os embriões apomíticos são oriundos do tecido nucelar, a partir de células nucleares especiais, denominadas “iniciadoras”, que distinguem-se das demais células nucleares pela presença de núcleos e de citoplasmas densos (Koltunow, 1993).

O desenvolvimento dos embriões nucleares é morfológicamente similar, senão idêntico, ao desenvolvimento do embrião sexual em *Citrus*. A primeira divisão das células nucleares iniciadoras ocorre sincronizadamente com a primeira divisão zigótica. Entretanto, o crescimento do embrião zigótico é mais lento quando comparado com o crescimento mais vigoroso do embrião nucelar, e nem sempre completa o seu desenvolvimento quando a semente contém numerosos embriões nucleares. A semente de *Citrus* cujo óvulo foi fertilizado poderá ser poliembriônica, contendo embriões em diferentes estádios de maturação, como decorrência de diferentes períodos de iniciação da embriogênese ou, ainda, por competição pelos nutrientes disponíveis. Independente da fertilização ou não do óvulo, ocorre um provável sinal do ovário, estimulando o desenvolvimento de embriões nucleares. Por outro lado, o embrião nucelar depende da reprodução sexual para que seja produzido endosperma, importante para seu crescimento e desenvolvimento (Koltunow, 1993).

Com relação à herança da embriogênese adventícia ou nucelar em *Citrus*, já foi observado que o cruzamento entre parentais sexuais produz híbridos de reprodução sexual; cruzamentos entre um parental sexual e um parental nucelar, freqüentemente produzem híbridos de ambos os tipos e parentais que são reproduzidos por embriogênese nucelar podem, algumas vezes, produzir progênies que são totalmente sexuais. Plantas estritamente sexuais aparentemente são homozigotas recessivos para esses genes (Cameron & Soost, 1982).

Em *Citrus*, a embriogênese nucelar parece ser dominante e controlada por um único gene. Entretanto, os genes envolvidos na reprodução apomítica ainda não foram isolados, permanecendo ainda como incógnita a identificação de seus produtos e de suas funções (Cameron & Soost, 1982; Koltunow, 1993 e Koltunow et al., 1995).

Em termos agronômicos, a apomixia implica em vantagens e desvantagens. Como vantagens, podem-se citar a uniformidade das variedades, a fixação de efeitos epistáticos, a fixação de heterose, a limpeza de vírus (Davies & Albrigo, 1994), a substituição da reprodução vegetativa por sementes e a transformação direta de genótipos elites em cultivares (Dijk & Damme, 2000). Entretanto, a apomixia, em alguns casos, constitui-se em barreira ao melhoramento, dificultando a recuperação de recombinantes e impedindo a geração de maior variabilidade no material usado pelo melhorista. A ocorrência de embriões nucleares em *Citrus* é o maior obstáculo para a produção sistemática de híbridos, visto que muitas variedades produzem quase que somente embriões nucleares, os quais podem ser muitos, em uma única semente.

Para algumas espécies apomíticas novos métodos de melhoramento, que empregam a biotecnologia, vêm sendo sugeridos. Dentre estes métodos, podem-se citar a cultura de tecidos, a hibridização somática e a manipulação genética, as quais trazem grande contribuição aos melhoristas na manipulação e estudo da apomixia (Nijs & Van Dijk, 1994).

## **2.4 Poliembrionia**

Os primeiros relatos sobre poliembrionia foram feitos por Strasburger, em 1878 (Moreira et al., 1947). Ela caracteriza-se pela presença de dois ou mais embriões na mesma semente, dos quais, na maioria das vezes, apenas um é de origem sexual, sendo os demais de natureza agâmica, provenientes do

desenvolvimento de células do nucelo (Gurgel, 1952). A grande maioria das variedades cítricas produz sementes poliembriônicas devido ao forte potencial embriogênico do tecido nucelar do ovário circundante ao saco embrionário, que normalmente origina de um a múltiplos embriões adventícios ao redor do embrião sexual, fenômeno denominado embrionia adventícia (Koltunov, 1993). O desenvolvimento desses embriões ocorre concomitantemente com o dos embriões sexuais na extremidade micropilar do nucelo, projetando-se para dentro do saco embrionário (Maheshwari & Ranga-Swamy, 1958).

De ocorrência em muitas espécies frutíferas, é nos cítricos que seu estudo e utilização têm alcançado maior importância econômica (Prates, 1978). Contudo, a poliembrionia tem sido uma das maiores limitações ao melhoramento dessas espécies, pois dificulta o desenvolvimento e a identificação dos híbridos, embora proporcione a multiplicação de clones nucleares sadios para serem utilizados como porta-enxertos (Ballve et al., 1991).

Em espécies cítricas, raramente ocorre a formação de mais de um embrião sexuado em uma mesma semente. Quando ocorre, isto se deve ao desenvolvimento de dois sacos embrionários ou à clivagem do zigoto, neste caso originando indivíduos geneticamente idênticos (Soubihe Sobrinho & Gurgel, 1953). Em muitas variedades cítricas, pode-se encontrar de um a 40 embriões por nucelo (Ohta & Furusato, 1957).

Maheshwari & Ranga-Swamy (1958) observaram que o caráter poliembriônico é controlado por genes recessivos e ligados a uma série de genes múltiplos. Ao contrário, diversos trabalhos compreendendo cruzamentos entre variedades mono e poliembriônicas mostram que a poliembrionia é dominante (Parlevliet & Cameron, 1959).

Independentemente das variações genéticas que influenciam a taxa de poliembrionia nos cítricos, o número de embriões encontrados nas sementes das variedades poliembriônicas é determinado por vários fatores, além do grau de

poliembrião típico de cada variedade: a espécie polinizadora, o estado nutricional da planta e a disponibilidade hídrica, por exemplo, podem influenciar na formação dos embriões. Esta variação pode ocorrer entre frutos da mesma planta, em ramos diferentes e em anos diferentes (Ramos & Pasqual, 1992; Pescador, 1993), idade da árvore, carga de frutos e orientação dos ramos na árvore (Morais, 1997).

Rodrigues et al. (1999) observaram, ao estudar a poliembrião e o número de sementes nas variedades de tangerineiras 'Caí', 'Montenegrina', 'King' e 'Poncã', que esta última, embora tenha apresentado o menor número de sementes por fruto (13,3), é a mais poliembriônica quando comparada às demais, apresentando, em média, taxa poliembriônica de 7,66. Já no presente trabalho, observou-se um número médio de 18 sementes por fruto e poliembrião média de 14,36.

## **2.5 Cultura de tecidos e de embriões**

As técnicas de cultura de tecidos têm sido empregadas de diferentes formas no desenvolvimento de cultivares superiores de plantas. Em geral, são utilizadas em uma ou outra etapa do melhoramento, não necessariamente no desenvolvimento direto de novas variedades. Mas, podem oferecer novas alternativas aos programas de melhoramento em suas diferentes fases (Ferreira et al., 1998).

Lameira et al. (2000) citam que um dos principais objetivos da cultura de tecidos é prover uma alternativa de manipular plantas no âmbito da célula. Portanto, o conhecimento dos mecanismos de regeneração de plantas é fundamental, pois é a maior limitação na aplicação biotecnológica para o melhoramento vegetal. A aplicação no melhoramento é, principalmente, para

aquelas espécies cujos problemas não podem ser solucionados por meio de métodos de melhoramento convencional.

A cultura de tecidos tem sido utilizada como ferramenta auxiliar no melhoramento genético e na investigação em vários aspectos da embriologia nucelar (Frost & Soost, 1968). Segundo Pasqual & Pinto (1988), a técnica permite estudar os fatores que influenciam o crescimento e os aspectos metabólicos e bioquímicos da germinação e dormência dos embriões, possibilitando conhecer também as necessidades físicas e nutricionais para o desenvolvimento, germinação e recuperação de embriões oriundos de cruzamentos incompatíveis.

Especificamente nas espécies cítricas, existem vários problemas, como esterilidade gamética, longo período juvenil, incompatibilidade (Soost & Cameron, 1975) e, principalmente, elevada taxa de poliembriologia generalizada entre espécies deste gênero (Soost et al., 1980). Esta última resulta, normalmente, em elevada taxa de aborto do embrião zigótico, devido à competição exercida sobre eles pelos embriões nucleares, geralmente mais vigorosos, sendo este último um dos entraves à exploração de cruzamentos por polinização controlada.

De maneira geral, o embrião, durante o seu desenvolvimento, passa pelas fases globular, cordiforme, torpedo e adulto ou cotiledonar. O embrião maduro, com raras exceções, é uma estrutura bipolar plenamente desenvolvida, consistindo de um meristema em cada extremidade: a radícula ou primórdio radicular e a plúmula ou primórdio foliar e um dos dois apêndices laterais, os cotilédones (Pasqual & Pinto, 1988).

O embrião zigótico localiza-se comumente próximo ao ápice do saco embrionário, mais precisamente na região micropilar. Em sementes poliembriônicas, ele parece menos favorecido com respeito ao transporte de nutrientes pelo sistema vascular, tendo, inclusive, limitações de espaço dentro do

saco embrionário, tornando-se menos competitivo (Frost & Soost, 1968). As probabilidades de sobrevivência dos híbridos aumentam na medida em que se reduz o número de embriões desenvolvidos em uma semente, com conseqüente incremento no tamanho dos mesmos (Diaz et al., 1979).

A cultura de embriões é de grande importância no melhoramento dos citros por proporcionar o resgate de embriões híbridos imaturos, oriundos de cruzamentos interespecíficos e intergenéricos. Incompatibilidades são, muitas vezes, encontradas em tais cruzamentos, o que resulta em sementes com embriões abortivos (Hu & Ferreira, 1998). Estes embriões geralmente abortam sem germinar, mas podem, em muitos casos, ser resgatados mediante um apropriado procedimento *in vitro* (Sharma et al., 1996) e postos a se desenvolver em meio de cultura adequado.

Diversos meios de cultura ou suas modificações têm sido utilizados no cultivo *in vitro* de embriões em diferentes estádios de desenvolvimento embrionário de acordo com o gênero, espécie ou variedades. Entretanto, definir o meio de cultura que possa sustentar o crescimento e desenvolvimento de embriões imaturos se constitui no aspecto mais importante da cultura de embriões (Pasqual et al., 2001).

## **2.6 Componentes do meio de cultura**

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de tecidos de plantas fornecem substâncias essenciais para o crescimento e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (Caldas et al., 1998). No entanto, as exigências nutricionais para o crescimento ótimo de um tecido *in vitro* podem variar com a espécie e, mesmo na própria planta, explantes de diferentes partes podem requerer meios de cultura distintos para o crescimento satisfatório (Pasqual, 2001).



Para o perfeito desenvolvimento e crescimento dos embriões, estádios morfológicos de desenvolvimento embrionário como globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar, necessitam ser cumpridos para a perfeita formação do “seedling”. Ocorre, porém, que embriões em estádios de desenvolvimento globular e cordiforme são mais exigentes em relação ao meio de cultivo *in vitro*, necessitando-se da adequação do mesmo. Quanto mais jovens os embriões, mais difícil é o cultivo *in vitro*, devido ao seu pequeno tamanho e danos durante a excisão, e mais complexas são suas exigências nutricionais (Hu & Ferreira, 1998). O sucesso no resgate de embriões híbridos vai depender, principalmente, do estádio em que o embrião está sendo excisado e a composição do meio no qual está sendo posto a germinar.

O meio White (1943) foi utilizado por muito tempo como meio básico para a cultura de uma grande variedade de tecidos de diversas espécies (Caldas et al., 1998). Especificamente em citros, Schroeder & Spector (1957) e Kordan (1959) desenvolveram os primeiros trabalhos de melhoramento com a cultura. Posteriormente, novas modificações no meio de cultura envolveram, principalmente, aumento das concentrações dos sais em geral, diminuição na concentração de sódio e acréscimo de nitrogênio na forma de amônio para complementar o nitrato, originando o meio MS (Murashige & Skoog, 1962). Mais tarde, Murashige & Tucker (1969) adequaram uma nova formulação de meio de cultura propício à propagação *in vitro*. Desta vez, as modificações foram realizadas visando aumentar a concentração de sacarose e vitaminas do meio de cultura, bem como acrescentar novos constituintes como caseína hidrolisada e extrato de malte, objetivando adequar o meio de cultura às necessidades de resgate de embriões híbridos de citros. Têm-se buscado novas alternativas de meios nutritivos que se aproximem da composição do endosperma ou do saco embrionário e possibilitem o desenvolvimento dos embriões, independentemente do estádio em que se encontram (Andreoli, 1986).

Em razão disso, têm sido realizados inúmeros trabalhos com o objetivo de elucidar os efeitos de diversos fatores no cultivo *in vitro* de embriões de citros, dentre eles o pH, ágar, concentrações do meio MS, sacarose, ácido giberélico e carvão ativado (Ribeiro et al., 1997, 1998, 1999a, 1999b, 2000.), a concentração ótima de macro e micronutrientes, vitaminas e misturas complexas do meio de cultura MT (Morais, 1997), além de estudos de identificação dos estádios de desenvolvimento embrionário (Ribeiro et al., 1999a).

O meio nutritivo possui uma fração inorgânica composta por macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) e micronutrientes (Fe, Cu, Mn, B, Cl, Mo, e Zn), que são considerados como essenciais às plantas clorofiladas, os quais são fornecidos por reagentes químicos de elevada qualidade (Caldas et al., 1998).

Os carboidratos desempenham papel importante na manutenção de uma osmolaridade adequada do meio e promoção do crescimento dos primórdios foliares (Pasqual & Pinto, 1988), além de serem utilizados na substituição do carbono que a planta normalmente fixa da atmosfera por fotossíntese, melhorando o crescimento dos embriões. Norstog & Smith (1963) expressaram a preocupação de que o meio desenvolvido para o cultivo de embriões *in vitro* deve refletir adequadamente a nutrição que o endosperma fornece ao embrião, quando ainda dentro da semente e aderido à planta-mãe.

Embora as células apresentem potencial para realizar fotossíntese *in vitro*, o crescimento da maioria das culturas é sustentado pela fonte de carboidrato adicionado ao meio de cultura (Caldas et al., 1998).

A sacarose é o carboidrato mais utilizado nos meios nutritivos, suportando as mais altas taxas de crescimento na maioria das culturas. Os embriões nos estádios iniciais de desenvolvimento necessitam de concentrações elevadas de sacarose, entre 12% e 18% (Caldas et al., 1998). Em *Citrus*, concentrações ótimas podem variar de 2% a 7%, de acordo com o tipo de explante (Navarro et al., 1985). É importante evitar a germinação precoce *in vitro*, pois as plântulas resultantes poderão ser

anormais ou fracas. Meios com alta concentração de sacarose têm sido utilizados para minimizar esse processo (Pasqual & Pinto, 1988). Ribeiro et al. (1998), estudando o comportamento de embriões de laranjeira 'Pêra' em diferentes concentrações de sacarose e do meio MS, concluíram que o melhor desenvolvimento dos embriões foi observado em meio MS com 75% da concentração original e  $60 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose.

Em muitos meios também são adicionados traços de certos compostos orgânicos, vitaminas e aminoácidos (George, 1993). As necessidades de vitaminas variam com a espécie e tipo de cultura. Têm-se constatado que uma ou até mesmo todas as vitaminas são dispensáveis para algumas culturas (Pasqual et al., 2001). O efeito benéfico da inclusão de determinada vitamina no meio nutritivo dependerá, em grande parte, da capacidade de biossíntese de cada um dos tecidos ou órgãos cultivados.

Os primeiros estudos envolvendo a utilização de vitaminas em cultura de tecidos foram realizados com cultura de raízes, em que se definiu uma mistura básica de vitaminas a serem utilizadas, e que é empregada até hoje (Bonner, 1937; Robbins & Bartley, 1937 e White, 1943, citados por Caldas et al., 1998). Essa mistura consiste de tiamina (vitamina B<sub>1</sub>), ácido nicotínico (niacina) e piridoxina (vitamina B<sub>6</sub>), à qual normalmente se adiciona o aminoácido glicina.

A tiamina é um co-fator essencial para reações críticas da respiração aeróbica, da fotossíntese e da biossíntese de alguns aminoácidos e terpenóides em plantas. A piridoxina está envolvida na biossíntese de aminoácidos durante a fotorrespiração, na transaminação de aminoácidos aromáticos que formam a auxina AIA endógena e na biossíntese de alcalóides. O ácido nicotínico também contribui como substrato para a biossíntese de alcalóides (Goodwin & Mercer, 1983).

Caldas et al. (1998) citam que a concentração de tiamina no meio MS é de  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ , sendo, freqüentemente, aumentada de 0,4 a  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ , para

culturas específicas (Linsmaier & Skoog, 1965; Chaturvedi & Mitra, 1974) ou em meios como B5 (Gamborg et al., 1968). Tanto a piridoxina quanto o ácido nicotínico são utilizados na concentração de  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  no meio MS. Já o meio de cultura MT possui alta concentração de vitaminas em sua composição, vinte vezes mais tiamina e piridoxina e dez vezes mais ácido nicotínico do que o meio MS, considerado o meio padrão para a cultura de tecidos em geral.

O carvão ativado, por adsorver substâncias inibitórias do meio ou produtos tóxicos liberados pelos explantes, promove o crescimento de embriões, podendo ser utilizado com sucesso por diferentes culturas entre 0,2% a 3% (Pasqual et al., 2001). Outra propriedade atribuída ao carvão ativado, como sendo benéfica no processo de enraizamento, diz respeito à redução da intensidade de luz na região de formação de raízes. A utilização de  $1 \text{ g.L}^{-1}$  de carvão ativado em meios nutritivos foi importante para estimular o enraizamento de *Cassava* sp (Tilquin, 1979).

Há evidências de que o efeito das giberelinas é dependente da idade dos embriões e do sítio de absorção do hormônio (Raghavan & Torrey, 1964). As giberelinas participam de muitas atividades fisiológicas importantes nos vegetais, tendo efeito no crescimento, especialmente no alongamento celular (Crocomo & Cabral, 1988). Um dos principais efeitos e aplicações das giberelinas em cultura de tecidos é o alongamento das brotações durante a multiplicação ou, antes, do enraizamento. As giberelinas possuem um efeito notável no alongamento do caule primário e esse efeito em tecidos e centros de crescimento (meristemas) é caracterizado por um aumento no tamanho das células, ou alta taxa de divisão celular, ou ambas (Nickell, 1982). Outros benefícios desse regulador de crescimento são os de promover o desenvolvimento ontogênico natural dos embriões sem primórdio radicular, aqueles com primórdio e proporcionar a iniciação de uma zona radicular existente.

Em alguns casos, o ácido giberélico tem sido usado para a conversão de embriões somáticos em plantas (Guerra et al., 1998). A concentração de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$  estimulou a formação de raízes em embriões somáticos de nucelos de *Citrus* (Button & Borgnman, 1971).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados em duas etapas: a primeira correspondeu às atividades de hibridações controladas realizadas no Pomar Didático da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, no período de setembro a outubro de 2001. A segunda consistiu no cultivo *in vitro* de embriões imaturos provenientes dos frutos coletados entre janeiro e fevereiro de 2002 e foi conduzida no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura da UFLA.

Plantas de laranjeira ‘Pêra Rio’ tardia (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.) e tangerineira ‘Poncã’ (*Citrus reticulata* Blanco), apresentando bom estado fitossanitário, foram selecionadas para os trabalhos de hibridação como genitores masculino e feminino, respectivamente.

Botões florais de ‘Pêra Rio’ tardia (genitor masculino) no estágio de balão foram coletados, armazenados em placas de petri e incubados em sala de crescimento a  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ , com 80% de umidade, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de  $32 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  por aproximadamente 24 a 48 horas até a antese. Inflorescências da tangerineira ‘Poncã’ (genitora feminina), que também se encontravam no estágio de balão, foram emasculadas e polinizadas nas horas de insolação mais branda, das 7:00 às 10:00 horas da manhã e após às 16:00 horas, num total de 170 cruzamentos. Após a polinização, cada flor foi protegida com saco de papel e etiquetada.

Após 118 dias da polinização, os frutos, apresentando 3 a 4 cm de diâmetro, foram coletados, colocados em sacos de polietileno de cor branca (tamanho 20 x 28 com 0,03 cm de espessura) e armazenados em refrigerador a  $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, suas sementes foram removidas e tratadas com álcool (70%) por cinco minutos e, posteriormente, em hipoclorito de sódio (2%), por

20 minutos, sendo em seguida lavadas três vezes em água destilada e autoclavada.

Em câmara de fluxo laminar e com auxílio de microscópio estereoscópico, bisturi e pinça, os tegumentos das sementes foram separados longitudinalmente pela região oposta à micrópila, tomando-se o cuidado de não provocar danos aos embriões. Os embriões imaturos foram excisados e inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio MT (Tabela 1), modificado de acordo com cada experimento.

TABELA 1. Componentes básicos do meio de cultura MT. UFLA, Lavras, MG, 2002.

<b>Componentes</b>	<b>MT</b>
<b>Macronutrientes</b>	<b>(mg.L<sup>-1</sup>)</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.650
KNO <sub>3</sub>	1.900
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	370
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	170
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37,3
<b>Micronutrientes</b>	
KI	0,83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,3
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
<b>Vitaminas</b>	
Tiamina – HCl	10,0
Piridoxina – HCl	10,0
Ácido nicotínico	5,0
Glicina	2,0
Inositol	100
<b>Outros suplementos</b>	
Caseína hidrolisada	500
Extrato de malte	500

Fonte: Murashige & Tucker (1969).



### **3.1 Experimento 1 - estádios de desenvolvimento x meio MT**

Embriões nos estádios globular, cordiforme e cotiledonar foram excisados e inoculados em meio de cultura MT nas concentrações de 0%, 50%, 100% e 150%, acrescido de 50 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 4, com quatro repetições, sendo cada uma constituída por três tubos de ensaio.

A poliembrionia dificulta a identificação do embrião zigótico e compromete seu desenvolvimento, pela competição com os embriões nucleares. Dessa forma, quanto mais precocemente for excisado o embrião, maior é a garantia da retirada do embrião zigótico.

Considerando que as plântulas obtidas nos experimentos 2, 3 e 4 serão aclimatizadas para posterior identificação quanto ao seu caráter híbrido, optou-se por trabalhar com embriões no estágio globular, buscando maior controle no resgate dos embriões zigóticos e, conseqüentemente, obtenção de plântulas híbridas.

Os demais embriões localizados no interior da semente, em estádios mais desenvolvidos, também foram excisados e inoculados separadamente em tubos de ensaio.

### **3.2 Experimento 2 - meio MT x sacarose**

Embriões no estágio globular foram excisados e inoculados em diferentes concentrações do meio de cultura MT (0%, 50%, 100%, 150% e 200%) combinados com 0, 30, 60 e 90 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 4, com quatro repetições, sendo cada uma constituída por três tubos de ensaio.

### **3.3 Experimento 3 - vitaminas x sacarose**

Embriões no estágio globular foram excisados e imediatamente inoculados em meio de cultura MT, acrescido de diferentes concentrações de vitaminas (0%, 50%, 100%, 150% e 200% do meio padrão) combinados com 0, 30, 60 e 90 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 4, com quatro repetições, sendo cada uma constituída por três tubos de ensaio.

### **3.4 Experimento 4 - carvão ativado x giberelina**

Embriões no estágio globular foram excisados e inoculados em meio de cultura MT, adicionado de diferentes concentrações de carvão ativado (0; 0,5; 1; 1,5 e 2 g.L<sup>-1</sup>), combinados com GA<sub>3</sub> (0; 0,01; 0,1; 1 e 10 mg.L<sup>-1</sup>), acrescido de 50 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 5, com quatro repetições, sendo cada uma constituída por três tubos de ensaio.

Após a excisão e inoculação, os embriões foram incubados em sala de crescimento com temperatura de 27±1°C, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 32 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

Para todos os experimentos, após 90 dias, as plântulas foram avaliadas com base no comprimento da parte aérea e do sistema radicular, massa fresca de plântula e número de folhas.

Os dados foram submetidos à análise de variância e a comparação dos resultados por meio de teste de médias e regressão polinomial, de acordo com cada experimento. Para tal, utilizou-se o programa SISVAR (Ferreira, 2000).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Experimento 1 - Estádios de desenvolvimento x meio MT

A análise de variância para as variáveis analisadas está apresentada na Tabela 2. Houve diferença significativa no comprimento da parte aérea (CPA) para os fatores concentração do meio de cultura MT e estádios de desenvolvimento. Para comprimento do sistema radicular (CSR), massa fresca (MF) e número de folhas (NF) de plântulas, houve interação significativa entre os fatores testados, a 1% de probabilidade.

TABELA 2. Resumo da análise de variância para comprimento da parte aérea (CPA) e do sistema radicular (CSR), massa fresca (MF) e número de folhas (NF) de plântulas. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Fontes de variação	G.L	Quadrado médio			
		CPA (cm)	CSR (cm)	MF (g)	NF (un)
% MT	3	17,69250**	54,49638**	0,011884**	148,68750**
Estádios	2	1,75521**	25,43770**	0,012037**	17,89583**
% MT x estádios	6	0,08938 <sup>ns</sup>	2,49243**	0,000981**	1,729167**
Resíduo	36	0,11931	0,38611	0,000133	0,451389
C.V.		27,18	25,06	27,99	26,65

\*\* significativo a 1% de probabilidade, segundo o teste F.

<sup>ns</sup> não significativo.

#### Comprimento da parte aérea

Maior comprimento da parte aérea (1,63 cm) foi obtido com embriões no estágio cotiledonar, seguido por aqueles nos estádios torpeda,

independentemente da concentração do meio de cultura utilizado. Embriões no estágio globular apresentaram menor comprimento da parte aérea (Tabela 3).

TABELA 3. Comprimento da parte aérea de plântulas. UFLA, Lavras, MG, 2002.

<b>Estádios de desenvolvimento</b>	<b>CPA (cm)</b>
Globular	0,97 c
Torpedo	1,22 b
Cotiledonar	1,63 a

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si a 1% de probabilidade, segundo o teste de Tukey.

Independentemente do estágio em que os embriões foram excisados, o comprimento da parte aérea aumentou linearmente com o incremento das concentrações do meio de cultura MT (Figura 1). Embora a concentração de sais do meio MT seja alta, o que poderia causar toxidez aos embriões, provavelmente a alta concentração de sacarose ( $50 \text{ g.L}^{-1}$ ) mantém um alto potencial osmótico do meio, evitando danos aos embriões. Hu & Ferreira (1998) citam que os carboidratos desempenham importante papel na manutenção da osmolaridade adequada do meio de cultura. Os mesmos autores ainda descrevem que quanto mais jovem for o embrião, mais alta deverá ser a osmolaridade do meio.

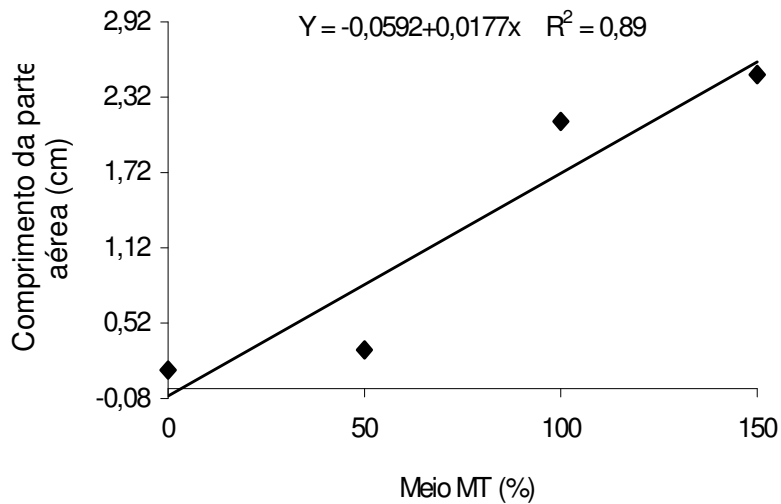


FIGURA 1. Comprimento da parte aérea de plântulas. UFLA, Lavras, MG, 2002.

### **Comprimento do sistema radicular, massa fresca e número de folhas de plântulas**

O comprimento do sistema radicular, massa fresca e número de folhas de plântulas aumentou linearmente com o incremento das concentrações do meio de cultura MT para os embriões nos estádios globular, torpedo e cotiledonar. Os maiores valores para as variáveis analisadas foram obtidos com embriões que se encontravam no estágio cotiledonar, seguidos por aqueles no estágio torpedo (Figuras 2, 3 e 4).

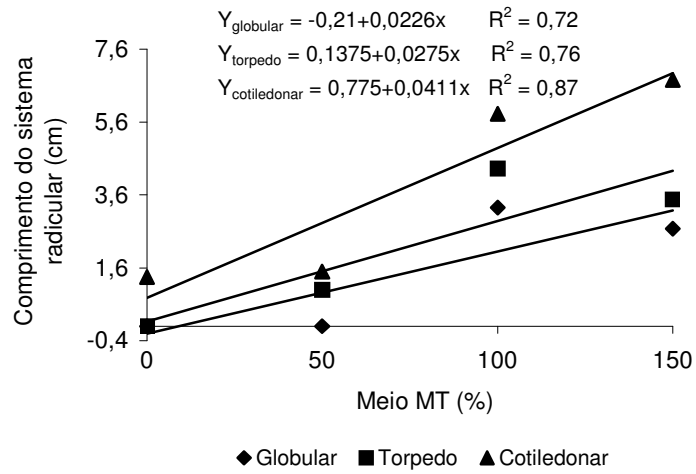


FIGURA 2. Comprimento do sistema radicular de plântulas. UFLA, Lavras, MG, 2002.

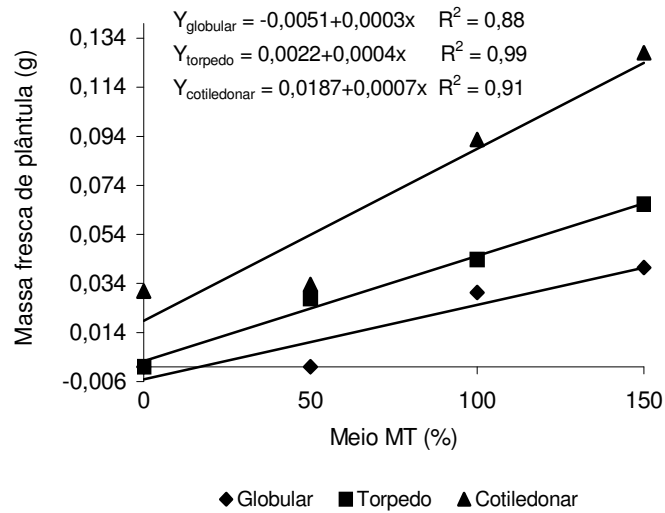


FIGURA 3. Massa fresca de plântulas. UFLA, Lavras, MG, 2002.

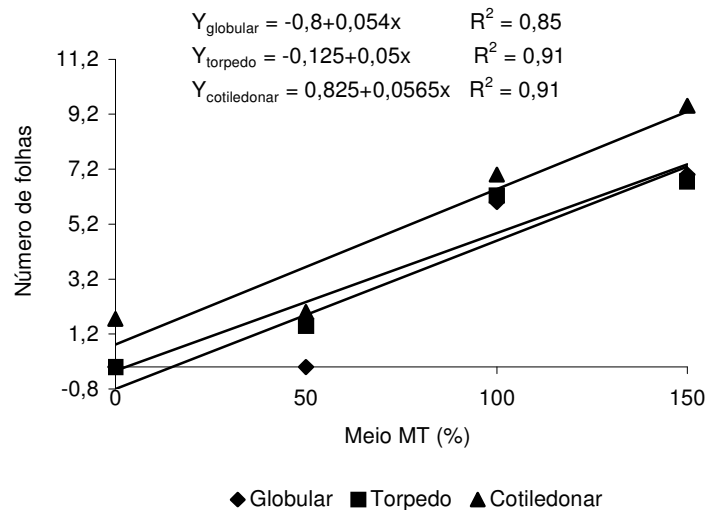


FIGURA 4. Número de folhas de plântulas. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Embriões no estágio globular, embora tenham apresentado aumento linear no comprimento do sistema radicular, massa fresca e número de folhas de plântulas com o incremento das concentrações do meio de cultura MT, apresentaram os menores valores para estas variáveis quando comparado com os embriões nos outros estádios (Figuras 2, 3 e 4).

De maneira geral, pode-se observar que o maior desenvolvimento de embriões foi obtido no estágio cotiledonar, seguido pelo estágio torpedo. Independentemente do estágio em que foram excisados, houve desenvolvimento significativo dos embriões com o incremento das concentrações do meio de cultura MT (Figuras 1, 2, 3 e 4).

O maior potencial de desenvolvimento dos embriões, nos estádios cotiledonar e torpedo, juntamente com a disponibilidade de nutrientes do meio de cultura, permitiram o maior desenvolvimento de embriões. Carimi et al. (1998) verificaram que a germinação dos embriões de citros foi incrementada

em estágio de desenvolvimento mais avançados do embrião, com valores máximos obtidos no estágio cotiledonar. Em contrapartida, aqueles no estágio globular tiveram baixa germinação e desenvolvimento lento.

Rhagavan (1976; 1980) descreve que os embriões em fases mais desenvolvidas adquirem uma capacidade autotrófica e, por vezes, podem responder melhor às condições do meio de cultura. Soares Filho et al. (2000), estudando a poliembrionia e frequência de híbridos em *Citrus* spp, observaram que há uma associação negativa entre o grau de poliembrionia e frequência de embriões de maior tamanho na semente. Estes, devido o fato de apresentarem maior tamanho ( $\geq 5$  mm), germinam mais facilmente e desenvolvem-se em *seedlings*, pela maior quantidade de reservas de nutrição presentes em seus cotilédones. Ribeiro et al. (1999a), trabalhando com estádios de desenvolvimento embrionário e localização do embrião zigótico em sementes de citros, também observaram que embriões zigóticos que alcançaram o pleno desenvolvimento encontravam-se no estágio cotiledonar, caracterizando-se pelas baixas exigências exógenas para germinar e desenvolver. Observações realizadas por Frost & Soost (1968), Diaz et al. (1979), Vásquez Araújo (1991), Soares Filho et al. (1994) e Moreira (1996) reforçam essas afirmações.

Bruck & Walker (1985) relatam que o meio de cultura MS é o mais utilizado para o cultivo de embriões. Entretanto, embora a constituição do meio MT seja semelhante ao do meio MS, deve-se ressaltar o efeito estimulatório causado pelo aumento das concentrações de sais, vitaminas e sacarose.

O aumento da disponibilidade de nutrientes, aliado ao potencial de crescimento dos embriões contribuiu para o maior desenvolvimento daqueles que se encontravam no estágio cotiledonar e torpedado. Em contrapartida, embriões no estágio globular apresentavam-se em fase de menor desenvolvimento. Esses resultados concordam com Bruck & Walker (1985) ao mencionarem que o cultivo de embriões é dependente do genótipo e estágio de



desenvolvimento, sendo a taxa de germinação inversamente proporcional à idade do embrião. Hu & Ferreira (1998) constataram que quanto mais jovem for o embrião, mais complexa é a exigência nutricional em relação ao meio de cultivo *in vitro* que permita o seu desenvolvimento. Rhagavan (1976; 1980) também descreve que embriões em fase inicial de desenvolvimento são heterotróficos e, muitas vezes, as condições ideais de nutrição são desconhecidas (Rhagavan, 1966).

#### 4.2 Experimento 2 - meio MT x sacarose

A análise de variância para as variáveis analisadas está apresentada na Tabela 4. Houve diferença significativa tanto para concentração do meio de cultura MT e sacarose isolados como também para a interação entre os dois fatores testados para todas as variáveis estudadas, a 1% de probabilidade.

TABELA 4. Resumo da análise de variância para comprimento da parte aérea (CPA) e do sistema radicular (CSR), massa fresca (MF) e número de folhas (NF) de plântulas. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Fontes de variação	G.L	Quadrado médio			
		CPA (cm)	CSR (cm)	MF (g)	NF (un)
% MT	4	2,552313**	58,15343**	0,003963**	15,70625**
Sacarose	3	1,258833**	90,27945**	0,006033**	7,04583**
% MT x sacarose	12	0,824146**	18,12102**	0,001998**	6,55625**
Resíduo	60	0,045667	0,72304	0,000090	0,70417
C.V.		20,50	23,58	26,06	27,63

\*\* significativo a 1% de probabilidade, segundo o teste F.

## Comprimento da parte aérea

Maior comprimento da parte aérea (2.4 cm) foi obtido quando os embriões foram cultivados em meio de cultura MT, com 150% de sua concentração original, associado com 90 g.L<sup>-1</sup> de sacarose (Figura 5).

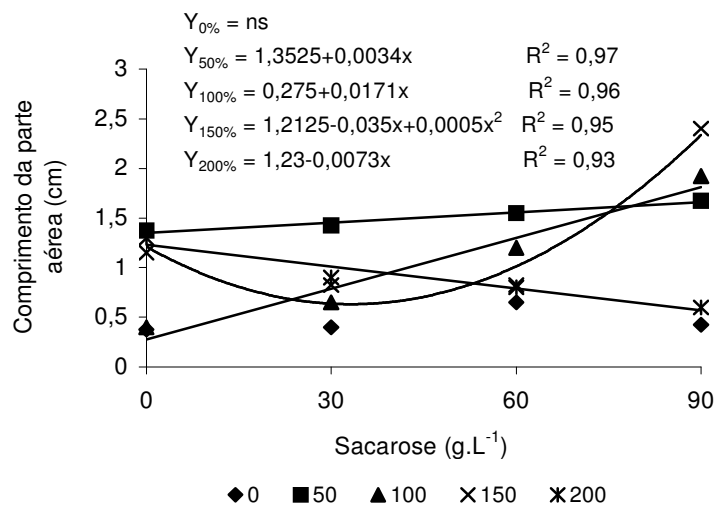


FIGURA 5. Comprimento da parte aérea de plântulas. UFLA, Lavras, MG, 2002.

A utilização de 50% e 100% do meio de cultura proporcionou um aumento linear no comprimento da parte aérea com o incremento da concentração de sacarose. Observa-se, ainda, que os embriões foram mais responsivos na presença de 100% do meio, evidenciando-se a necessidade de maior quantidade de sacarose à medida que se eleva a concentração do meio de cultura (Figura 5). Morais (1997) também obteve melhores resultados para

comprimento de plântula oriunda de embriões imaturos de tangerineira Cleópatra quando cultivados com a concentração normal do meio MT.

Nas demais concentrações não houve um bom desempenho na variável estudada. Para a concentração de 200%, observa-se que o maior comprimento foi obtido na ausência de sacarose. Em concentrações mais elevadas deste carboidrato, verifica-se o menor valor para o comprimento da parte aérea, mostrando que concentrações demasiadamente altas do meio de cultura são prejudiciais ao crescimento de embriões, mesmo na presença de elevadas concentrações de sacarose (Figura 5).

Não houve variação no comprimento da parte aérea com o aumento da concentração de sacarose e ausência de sais e demais componentes do meio de cultura MT, evidenciando a exigência nutricional dos embriões nos estádios iniciais de desenvolvimento.

### **Comprimento do sistema radicular**

Maior comprimento do sistema radicular (11,7 cm) foi obtido quando os embriões foram cultivados com 50% do meio de cultura MT combinado com 90 g.L<sup>-1</sup> de sacarose (Figura 6). Observa-se, ainda para a concentração de 50%, que houve maior resposta no comprimento do sistema radicular a partir de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose.

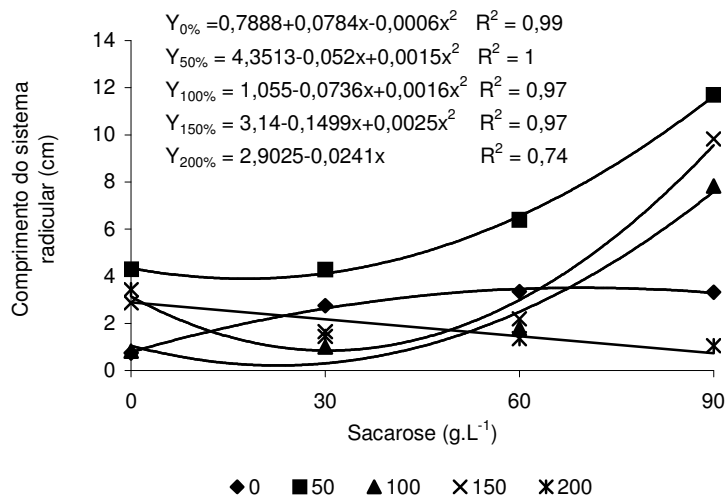


FIGURA 6. Comprimento do sistema radicular de plântulas. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Comportamento semelhante é observado com a utilização de 100% e 150% do meio de cultura MT, associado com 90 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, os quais proporcionaram bons resultados para o comprimento do sistema radicular alcançando 7,83 e 9,83 cm, respectivamente. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Alves (2000), quando testou diferentes concentrações do meio MS e sacarose em embriões de tangerineira “Poncã”. Entretanto, a concentração de sacarose requerida no presente trabalho foi mais elevada, devido o fato do meio MT possuir maior quantidade de vitaminas, além da adição de extrato de malte e caseína hidrolisada quando comparado ao meio MS.

Na presença de baixa concentração (50%) do meio, houve maior crescimento do sistema radicular, possivelmente, como forma de explorar melhor o meio nutritivo e melhorar absorção de nutrientes. Ao contrário,

quando as concentrações do meio foram maiores (100% e 150%), a plântula não precisou desenvolver tanto o seu sistema radicular (Figura 6).

Provavelmente, houve efeito sinérgico entre a sacarose e os componentes do meio MT. A disponibilidade da fonte de energia é indispensável para a rizogênese, fato comprovado por Snir & Erez (1980), que verificaram a absoluta dependência de sacarose para o enraizamento de macieira. Tal constatação foi observada no presente trabalho, uma vez que se verificou menor comprimento do sistema radicular na ausência de sacarose para todas as concentrações do meio MT testadas, com exceção para a concentração de 200%.

Quando os embriões foram cultivados com 200% do meio de cultura, observou-se menor comprimento do sistema radicular, mesmo na presença de concentrações mais elevadas de sacarose, possivelmente devido à toxidez causada pela alta concentração do meio de cultura. Observou-se também que, apenas utilizando-se a sacarose como fonte de nutrientes e energia para os embriões (0% do meio MT), houve uma resposta inicial de crescimento radicular (3,35 cm) até a concentração máxima de 65,33 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, alcançando valores menores em concentrações mais elevadas deste carboidrato. Os tratamentos com 0% e 200% do meio MT, foram os que proporcionaram os menores valores para o comprimento do sistema radicular (Figura 6).

### **Massa fresca de plântulas**

Maior massa fresca de plântula (0,12 g) foi obtido com a concentração de 150% do meio de cultura combinado com 90 g.L<sup>-1</sup> de sacarose (Figura 7).

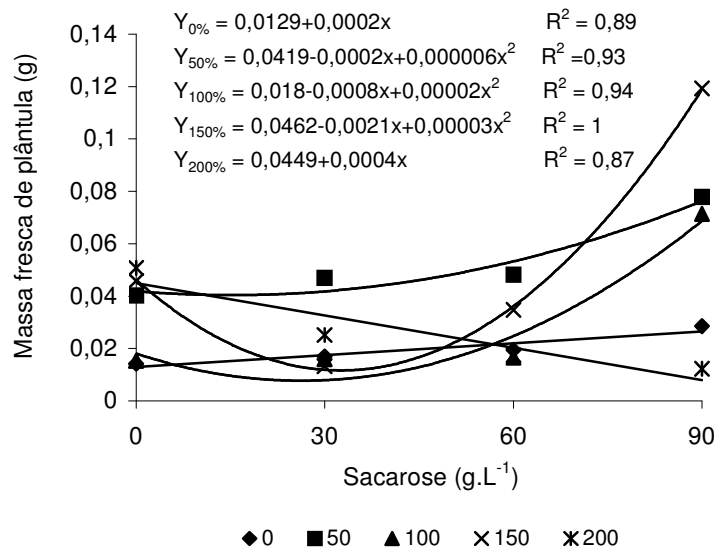


FIGURA 7. Massa fresca de plântulas. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Quando os embriões foram cultivados em meio de cultura com 50% e 100%, apresentaram ganhos satisfatórios de massa fresca de plântula, sendo os melhores resultados (0,078 e 0,071 g, respectivamente) obtidos quando combinados com 90 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. O incremento de massa fresca de plântula observado nas concentrações de 50%, 100% e 150% do meio MT, possivelmente, foi devido ao maior aporte de energia e carboidratos estruturais para as plantas, fornecidos pela sacarose (Figura 7).

A ausência de sais e componentes do meio de cultura não influenciou na massa fresca de plântula. Já a utilização de 200% acarretou decréscimo desta variável à medida que se aumentou a concentração de sacarose (Figura 7). Possivelmente, a elevada concentração de sais e componentes do meio MT refletiu em toxidez aos embriões, mesmo na presença de concentrações elevadas de sacarose.

## **Número de folhas**

Maior número de folhas foi obtido com 150% da concentração do meio de cultura MT combinado com 90 g.L<sup>-1</sup> de sacarose (Figura 8). Resultado semelhante também é observado quando se utilizam 100% da concentração padrão do meio na mesma concentração de sacarose. Com o aumento da concentração de sacarose, constata-se um equilíbrio no potencial osmótico do meio de cultura, proporcionando melhores condições para as reações metabólicas da planta, induzindo um aumento significativo no número de folhas formadas. Estes resultados confirmam aqueles obtidos no parâmetro massa fresca, em que o maior número de folhas aumenta, consideravelmente, a massa das plântulas.

Ao se utilizar 100% da concentração do meio de cultura, verificou-se um aumento linear no número de folhas à medida que se elevou a concentração de sacarose. Na concentração de 50%, houve um aumento no número de folhas (4,52 folhas) até o valor de 44,5 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, decrescendo na presença de concentração mais elevadas. Entretanto, na ausência de sacarose também pode-se observar bom número de folhas formadas. De forma semelhante aos resultados obtidos nas variáveis anteriormente analisadas, para a concentração de 200% do meio de cultura MT houve menor número de folhas com o aumento das concentrações de sacarose (Figura 8).

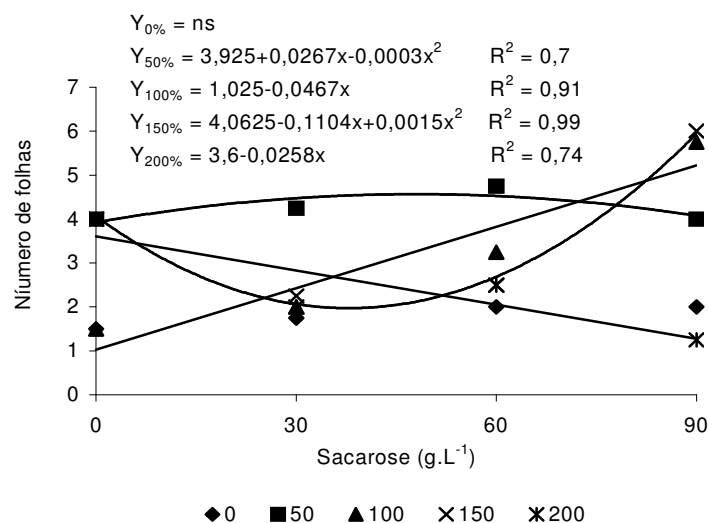


FIGURA 8. Número de folhas de plântulas. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Resumidamente, os melhores resultados para todas as variáveis analisadas foram obtidos com a utilização de 50%, 100% e 150% do meio de cultura MT combinado com concentrações crescentes de sacarose. O aumento observado nas variáveis com o aumento da concentração do meio de cultura está de acordo com os resultados obtidos por Sharp et al. (1971), ao observarem que altas concentrações do meio estimularam a formação de embriões de anteras de fumo. Meios com alta concentração salina, tais como o MS (Murashige & Skoog, 1962), (Murashige & Tucker, 1969), o B5 (Gamborg et al., 1968) e o SH (Schenk & Hildebrandt, 1972), têm sido usados no cultivo de embriões pelos efeitos positivos no crescimento e desenvolvimento de embriões somáticos. Kunitake et al. (1991), cultivando embriões de tangerineira ‘Satsuma’ no estágio cordiforme, observaram que 50% da concentração de sais do meio MT, suplementado com 1 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> e 10g.L<sup>-1</sup> de sacarose, não proporcionaram boas condições para o cultivo *in vitro* de embriões. O estudo mostrou após



incubação por dois meses, que somente 5% dos embriões tiveram um desenvolvimento normal, com 50% a 60% das plantas regeneradas apresentando crescimento anormal. Entretanto, esses resultados discordam, em parte, das afirmações de Ammirato & Steward (1971), que observaram melhor desenvolvimento de estruturas pró-embriônicas em meio com baixa concentração salina, como o de White (1943).

Altas concentrações de sacarose atestam a importância da utilização desse carboidrato para a cultura de embriões, o que está de acordo com Caldas, Haridasan & Ferreira (1998) de que os embriões em estádios iniciais de desenvolvimento necessitam de concentrações elevadas de sacarose. Carimi et al., (1998) também observaram que a germinação e o desenvolvimento de embriões de dois genótipos de *Citrus aurantium* foram significativamente menores em baixa concentração de sacarose (0 e 5 g.L<sup>-1</sup>).

Culturas *in vitro* apresentam uma baixa taxa fotossintética e, assim, devem dispor de uma fonte de carboidrato, normalmente na forma de sacarose (Grattapaglia & Machado, 1998). Isto se deve ao fato deste carboidrato fornecer energia metabólica para a biossíntese de aminoácidos, celulose e demais compostos orgânicos, bem como suprimento de compostos carbônicos estruturais necessários para o crescimento das células. Ao mesmo tempo, reconhece-se que a presença dos carboidratos inibe a capacidade fotossintética das culturas (Edelman & Hanson, 1971; Yamada & Sato, 1978).

Alta concentração de sacarose no meio de cultura, além de contribuir para obtenção de um crescimento ótimo suportando as mais altas taxas de crescimento na maioria das espécies, também desempenha uma função importante na manutenção da osmolaridade adequada do meio de cultura (Hu & Ferreira, 1998), principalmente evitando a toxidez de sais minerais quando a sua concentração é elevada no meio de cultura.

Pode-se constatar também que nas concentrações de 50% e 100% do meio MT associado com 60 e 90 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, respectivamente, obtiveram-se bons resultados, indicando que a simples redução na concentração de sais do meio MT para 50% é suficiente para o desenvolvimento de embriões imaturos de citros.

Em cultura de tecidos é importante a otimização dos componentes dos meios de cultura, visando também uma redução de custos. Em função dos resultados obtidos, pode-se observar que o meio de cultura MT em 50% e 100% de sua concentração, associado com a utilização de 60 até 90 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, mostrou bom desempenho. Ribeiro et al. (1998), estudando o comportamento de embriões de laranjeira 'Pêra' em diferentes concentrações de sacarose e do meio MS, concluíram que o melhor desenvolvimento dos embriões foi observado em meio MS com 75% da concentração original, acrescido de 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Carimi et al. (1998) também obtiveram a melhor germinação e desenvolvimento de embriões de *Citrus aurantium* quando estes foram cultivados em meio MS ou MT contendo 50 g.L<sup>-1</sup> de sacarose.

Esses resultados diferem daqueles obtidos por Pasqual et al. (2002) ao verificarem que o melhor crescimento e desenvolvimento de embriões de tangerineira 'Poncã' são obtidos com uso de meio MS na sua concentração original, suplementado com 15 a 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Semelhantemente, Tomaz et al. (2001) obtiveram maior número de plântulas da variedade 'Seleção Vermelha', quando os embriões foram cultivados em meio de cultura com 15 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Já para tangerineira 'Cravo', alto número de plântulas foi obtido com 25 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Já Ricci et al. (2002), trabalhando com embriões, também induziram formação de alto número de plântulas de laranjeira 'Valência' e tangerineira 'Poncã' cultivando-os em meio de cultura

MT, acrescido de 20 e 25 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 0,5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, respectivamente.

Em contrapartida, quando utilizou-se meio MT na concentração de 200%, os melhores resultados ocorreram na ausência de sacarose, havendo um decréscimo em função do aumento da concentração desse carboidrato. Essa alta concentração do meio MT, aliada a alta concentração de sacarose, pode ter criado condições impróprias para o desenvolvimento de embriões, como toxicidade e baixo potencial osmótico do meio.

Contudo, é importante ressaltar que a concentração ótima do meio de cultura e sacarose é dependente do genótipo e estágio de desenvolvimento. Assim, concentrações ótimas de sacarose podem variar de 12% a 18% (Caldas et al., 1998) ou, mais especificamente em *Citrus* de 2% a 7% (Navarro et al., 1985).

### **4.3 Experimento 3 - vitaminas x sacarose**

A análise de variância para as variáveis analisadas está apresentada na Tabela 5. Houve diferença significativa, tanto para concentração de vitaminas do meio de cultura MT e sacarose isolados, como também para a interação entre os dois fatores testados, a 1% de probabilidade, para todas as variáveis.

TABELA 5. Resumo da análise de variância para comprimento da parte aérea (CPA) e do sistema radicular (CSR), massa fresca (MF) e número de folhas (NF) de plântulas. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Fontes de variação	G.L	Quadrado médio			
		CPA (cm)	CSR (cm)	MF (g)	NF (un)
Vitaminas	4	0,79706**	3,480813**	0,00166**	5,10625**
Sacarose	3	7,28967**	134,065125**	0,01272**	45,24583**
Vitaminas x sacarose	12	0,88746**	2,908979**	0,00105**	3,00625**
Resíduo	60	0,12201	0,363042	0,00010	0,78750
C.V.		20,46	16,72	28,08	17,27

\*\* significativo a 1% de probabilidade, segundo o teste F.

### Comprimento da parte aérea

O comprimento da parte aérea aumentou linearmente com o incremento da concentração de sacarose quando os embriões foram cultivados em meio de cultura MT com 50%, 150% e 200% de vitaminas (Figura 9). Moraes (1997) observou uma superioridade no comprimento de plântulas de tangerineira Cleópatra quando cultivada em meio MT contendo a concentração de 100% de vitaminas.

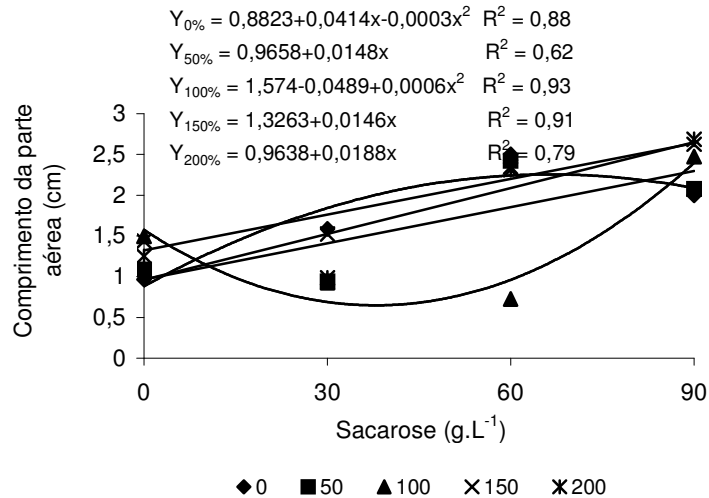


FIGURA 9. Comprimento da parte aérea de plântulas. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Outro fator importante a ser ressaltado é que não houve diferença entre as concentrações de vitaminas testadas no meio MT com tendência de maiores resultados para as concentrações de 150% e 200% (Figura 9). Estas, provavelmente, seriam as principais responsáveis pelo incremento na parte aérea. Caldas et al. (1998) citam que, para algumas espécies cultivadas *in vitro*, há necessidade de se aumentar a concentração das vitaminas do meio padrão. O aumento na quantidade de vitaminas para obter maior sucesso no cultivo *in vitro* de tecidos somáticos de *Citrus* também é enfatizado por Chatuverdi & Mitra (1974).

Na ausência de vitaminas, pode-se observar um aumento no comprimento da parte aérea até a concentração de 69 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, decrescendo com aumento das concentrações deste carboidrato. Entretanto, se compararmos o maior comprimento da parte aérea (2,69 cm) obtido com 150% e 200% de vitaminas com o valor obtido quando da ausência destas (2,31 cm),

pode-se afirmar que boa resposta foi obtida em meio sem adição de vitaminas, que são co-fatores essenciais para a biossíntese de terpenóides e aminoácidos (Figura 9). É muito provável que a composição do meio de cultura MT, que contém caseína hidrolisada e extrato de malte, tenha suprido a necessidade de se adicionar vitaminas, uma vez que estes componentes apresentam na sua formulação um complexo de aminoácidos.

### Comprimento do sistema radicular

Observou-se um incremento linear no comprimento do sistema radicular à medida que se elevou a concentração de sacarose no meio de cultura. Em relação às vitaminas, os comprimentos finais obtidos para o sistema radicular não diferiram muito entre si, sendo os maiores resultados (6,68 cm) obtidos com 0%, 100%, 150% e 200% e o menor (6,15 cm) com 50% de vitaminas, ambas as concentrações combinadas com a concentração máxima (90 g.L<sup>-1</sup>) de sacarose (Figura 10).

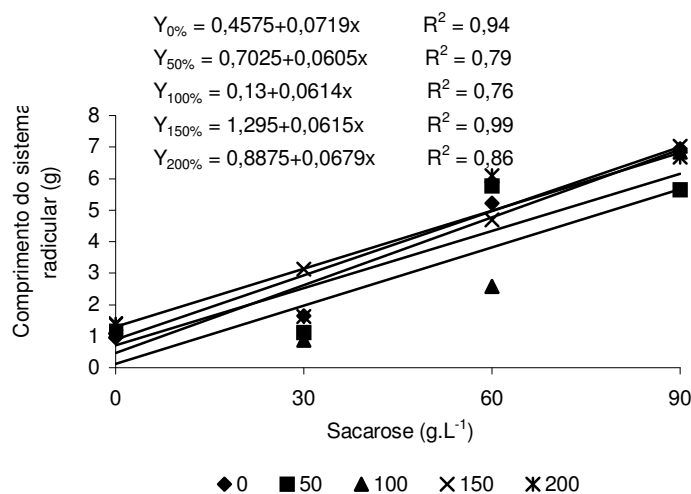


FIGURA 10. Comprimento do sistema radicular de plântulas. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Pode-se afirmar que o aumento das concentrações de vitaminas não influenciou no aumento do sistema radicular. Este resultado foi evidenciado pelos valores obtidos quando utilizou-se 0% de vitaminas, pois o meio sem vitaminas apresentou crescimento radicular semelhante aos demais.

Em contraposição, a sacarose mostrou-se um componente do meio de cultura indispensável para o crescimento e desenvolvimento do sistema radicular.

Para Grattapaglia & Machado (1998), a presença de vitaminas e inositol nos meios de multiplicação pode proporcionar bons resultados no enraizamento. Mas, para a presente variável, as vitaminas não se mostraram como um fator indispensável, provavelmente em função da composição do meio de cultura utilizado.

### **Massa fresca de plântulas**

A utilização de 50%, 100% e 200% de vitaminas proporcionaram efeito linear no incremento da massa fresca de plântula à medida que se elevou a concentração de sacarose no meio de cultura, sendo observado o maior valor (0,093 g) com 200% de vitaminas (Figura 11).

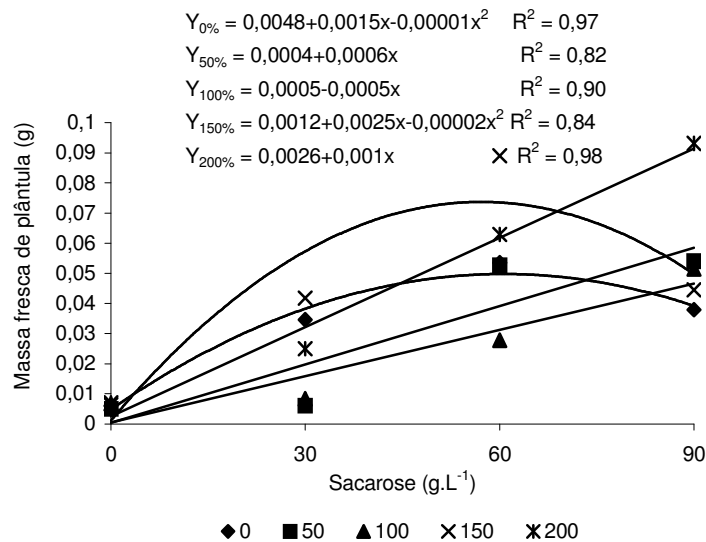


FIGURA 11. Massa fresca de plântulas. UFLA, Lavras, MG, 2002.

A concentração de 150% de vitaminas também proporcionou um aumento significativo na massa fresca (0,079 g) quando combinada com 62,5 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, havendo menores valores para esta variável em concentrações mais elevadas deste carboidrato (Figura 11). As vitaminas, principalmente a tiamina, são co-fatores essenciais à fotossíntese e à biossíntese de aminoácidos e terpenóides em plantas. A piridoxina está envolvida com a biossíntese de aminoácidos durante a fotorrespiração, na transaminação de aminoácidos aromáticos que formam o AIA endógeno. O ácido nicotínico é considerado um substrato na biossíntese de alcalóides (Goodwin & Mercer, 1983). Isto explica, em grande parte, o ganho de massa observado nos meios de cultura que contêm um acréscimo de vitaminas em sua composição.

Quando se cultivou embrião em meio desprovido de vitaminas, verificou-se um incremento até 0,061 g de massa fresca quando combinado com



a concentração máxima de 75 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, a partir do que observaram-se resultados inferiores (Figura 11).

### Número de folhas

Maior número de folhas (6,9) foi obtido com 0% e 150% de vitaminas associadas com 72 e 69,6 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, respectivamente. Em concentrações mais elevadas de sacarose observou-se um decréscimo nesta variável, em ambas as concentrações de vitaminas (Figura 12).

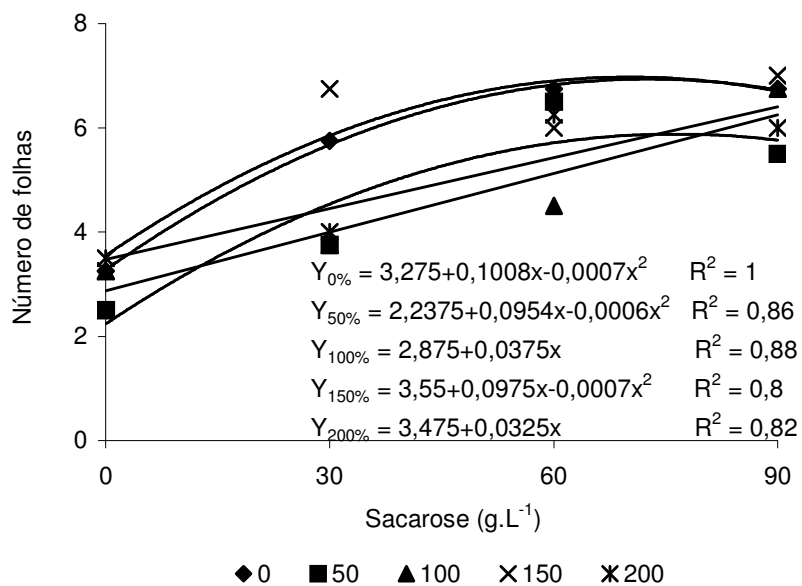


FIGURA 12. Número de folhas de plântulas. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Para as concentrações de 100% e 200% de vitaminas, verificou-se aumento no número de folhas à medida que se elevou a concentração de sacarose. Na concentração de 50% de vitaminas, maior valor (6 folhas) para esta variável foi obtido quando associado com a concentração máxima de 79,5 g.L<sup>-1</sup> de sacarose (Figura 12).

Analisando-se os resultados obtidos no presente experimento (Figuras 9, 10, 11 e 12), verificou-se a essencialidade da sacarose como fonte de carboidrato para o crescimento e desenvolvimento de embriões imaturos, sendo esta a fonte de energia mais comumente utilizada para a cultura de embriões (Pasqual et al., 2001). Sua importância no cultivo de embriões é confirmada em inúmeros trabalhos realizados com embriões imaturos de citros (Navarro et al., 1985; Pasqual & Pinto, 1988; Caldas et al., 1998; Carimi et al., 1998; Ribeiro et al., 1998; Tomaz et al., 2001; Ricci et al., 2002; Pasqual et al., 2002). Entretanto, as vitaminas não se mostraram totalmente necessárias, uma vez que, na sua ausência houve boa resposta para todas as variáveis analisadas. Pasqual et al. (2001) relatam que as vitaminas utilizadas em vários meios de cultura não têm se mostrado indispensáveis, pois é provável que os embriões são capazes de satisfazer às suas necessidades em vitaminas pela biossíntese celular.

Apesar das vitaminas serem frequentemente utilizadas de acordo com a formulação de Murashige & Skoog (1962), o trabalho posterior de Linsmaier & Skoog (1965) mostrou que apenas a tiamina tinha efeito estimulador, ou melhor, era essencial para o crescimento de calo de fumo. Estes autores sugeriram um aumento na concentração de tiamina para 0,4 mg.L<sup>-1</sup> e a eliminação de piridoxina e ácido nicotínico, pois essas eram ligeiramente inibitórias ao crescimento. Para algumas espécies cultivadas *in vitro*, há necessidade de aumentar a concentração das vitaminas, sendo preciso, às vezes, acrescentar outros tipos à mistura. Tal constatação é reforçada por Chatuverdi & Mitra (1974) no seu estudo com tecidos somáticos de *Citrus*.

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), as vitaminas que compõem o meio de cultura (tiamina, piridoxina e ácido nicotínico) desempenham funções essenciais na planta; outras vitaminas também podem exercer papéis importantes. Portanto, o efeito benéfico da inclusão de determinada vitamina no meio nutritivo dependerá, em grande parte, da capacidade de biossíntese de cada uma nos tecidos e nos órgãos cultivados. Por outro lado, as misturas complexas, como extrato de levedura, extrato de malte e caseína hidrolisada, fornecem um conjunto de aminoácidos que estimula o crescimento de muitas espécies *in vitro* (Caldas et al., 1998). Esse estímulo foi observado já nos primeiros trabalhos de White (1932; 1939) e, posteriormente, naqueles com várias outras culturas como, por exemplo, o arroz (Yatazawa & Furuhashi, 1968).

A composição dos aminoácidos presentes no extrato de malte e na caseína hidrolisada foi determinada por Steinhart et al. (1961). Sendo assim, é provável que a elevada concentração destes componentes no meio de cultura tenham suprido a ausência de vitaminas.

Hu & Ferreira (1998) citam que o extrato de malte e a caseína hidrolisada são comumente utilizadas no meio de cultura para estimular o crescimento e desenvolvimento de embriões. Resultados que comprovam a importância de extrato de malte no cultivo de embriões de citros foram verificados por Carimi et al. (1998) ao observarem bons resultados no desenvolvimento de embriões quando substituiu a sacarose por 5 g.L<sup>-1</sup> de extrato de malte. Ghazvini & Shirani (2002) verificaram que 0,3 g.L<sup>-1</sup> de extrato de malte incrementou a formação de embriões de citros. Rangan et al. (1969) também cultivaram com sucesso embriões de *Citrus aurantium* em meio White suplementado com 0,4 g.L<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada. Outros trabalhos também mostram a utilização com sucesso de extrato de malte e caseína hidrolisada no cultivo de embriões (Zdrujkovskala-Richter, 1981; Gmitter et al., 1990; Ikeda et al., 1993; Jumin & Nito, 1996; Glória et al., 2000).

#### 4.4 Experimento 4 - carvão ativado x giberelina

A análise de variância para as variáveis analisadas está apresentada na Tabela 6. Houve diferença significativa, tanto para carvão ativado e giberelina isolados, como para a interação entre os dois fatores testados, a 1% de probabilidade, para todas as variáveis testadas.

TABELA 6. Resumo da análise de variância para comprimento da parte aérea (CPA) e do sistema radicular (CSR), massa fresca (MF) e número de folhas (NF) de plântulas. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Fontes de variação	G.L	Quadrado médio			
		CPA (cm)	CSR (cm)	MF (g)	NF (un)
Carvão	4	3,9757 **	33,0426 **	0,006987 **	23,0350 **
GA <sub>3</sub>	4	1,3734 **	37,3969 **	0,003003 **	10,1350 **
Carvão x GA <sub>3</sub>	16	1,0185 **	15,7841 **	0,002420 **	7,7163 **
Resíduo	75	0,1897	1,0926	0,000200	1,2433
C.V.		24,83	23,51	26,86	25,87

\*\* significativo a 1% de probabilidade, segundo o teste F.

#### Comprimento da parte aérea

Houve aumento no comprimento da parte aérea à medida que adicionaram-se maiores concentrações de carvão ativado ao meio de cultura (Figura 13). Os maiores comprimentos foram observados quando adicionaram-se 0,1; 1 e 10 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> ao meio de cultura. Quando não se adicionou giberelina, observou-se o menor valor para comprimento da parte aérea. Bons resultados também são observados utilizando-se 0,01 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> na presença de 0,5 ou 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado.

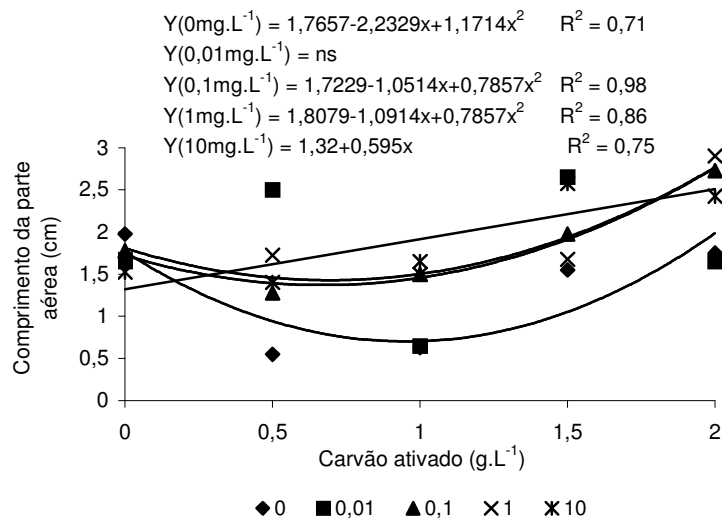


FIGURA 13. Comprimento da parte aérea de plântulas. UFLA, Lavras, MG, 2002.

O efeito estimulatório observado no comprimento da parte aérea já era esperado, visto que, nos vegetais, esse fitorregulador participa de muitas atividades fisiológicas importantes, tendo efeito no crescimento, especialmente no alongamento caulinar (Crocomo & Cabral, 1988).

Parthasarathy & Parthasarathy (1993), trabalhando com embriões de *Citrus reticulata* Blanco, observaram que 1 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> promoveram a formação de plântulas com crescimento aéreo e radicular. Ribeiro et al. (2000), trabalhando com citros, constataram a eficiência do carvão ativado no comprimento da parte aérea quando utilizaram 0,5 e 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado. Entretanto, a concentração de 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> interagiu antagonicamente em meio de cultivo contendo 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado. Mas, a concentração de 0,01 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, associada às concentrações de 0,5 até 2 g.L<sup>-1</sup>, maximizou o percentual de sobrevivência dos embriões. Ricci et al. (2002) verificaram que a

utilização de  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  de carvão ativado também teve efeito positivo na formação de plântulas de tangerineira 'Poncã' e 'Kinow' oriundas de embriões imaturos.

O carvão ativado, por adsorver substâncias inibitórias do meio ou produtos tóxicos liberados pelos explantes, promove o crescimento de embriões, podendo ser utilizado com sucesso em diferentes culturas entre 0,2% a 3% (Pasqual et al., 1990).

### **Comprimento do sistema radicular**

Maior comprimento do sistema radicular foi obtido com a utilização de  $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$ , na ausência de carvão ativado. A não utilização de  $\text{GA}_3$  ou a utilização de concentrações mais elevadas desse fitorregulador na presença de carvão ativado não proporcionou efeito benéfico para a variável analisada, mostrando, inclusive, os menores resultados. Pode-se observar, ainda, que concentrações mais elevadas de carvão ativado, principalmente nos tratamentos com baixa concentração de  $\text{GA}_3$  ( $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ ), tiveram efeito negativo, proporcionando diminuição nesta variável (Figura 14).

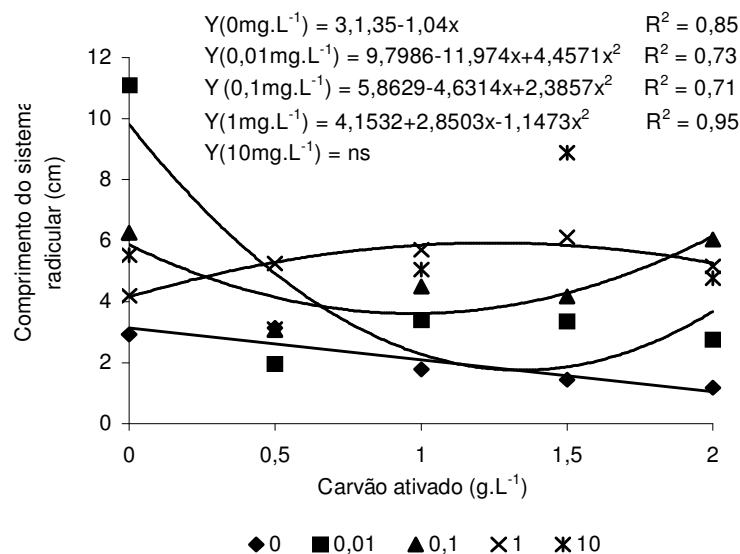


FIGURA 14. Comprimento do sistema radicular de plântulas. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Este resultado está de acordo com os obtidos por Pasqual et al. (1990), em laranjeira 'Natal' e com Ribeiro et al. (2000), em híbrido *Poncirus trifoliata* x *Citrus limonia*, os quais obtiveram excelentes resultados com adição de GA<sub>3</sub> no meio de cultura, na ausência de carvão ativado. Segundo Boulay (1984), elevadas concentrações de carvão ativado podem até mesmo impedir o enraizamento, embora Tisserat (1982) tenha constatado que a utilização de carvão ativado estimula o enraizamento, restaura a capacidade embriogênica das culturas velhas e diminui a intoxicação causada pelos fenóis. Os resultados obtidos no presente trabalho não constataram efeito benéfico para o crescimento radicular.

## Massa fresca e número de folhas de plântulas

Resultados semelhantes ao comprimento do sistema radicular podem ser observados para as variáveis massa fresca (Figura 15) e número de folhas (Figura 16). Em ambas as variáveis houve redução com o aumento das concentrações de carvão ativado, sendo os maiores valores obtidos na ausência desta substância e com adição de 0,01 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> no meio de cultura.

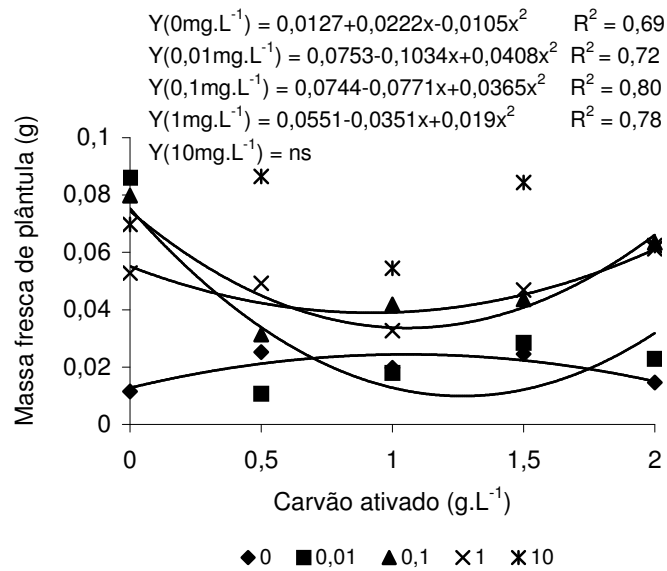


FIGURA 15. Massa fresca de plântulas. UFLA, Lavras, MG, 2002.



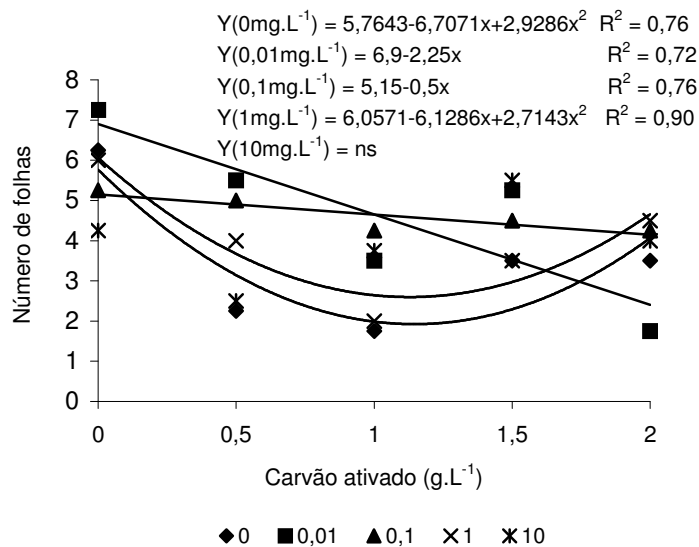


FIGURA 16. Número de folhas de plântulas. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Especialmente em relação à massa fresca de plântula, ainda podem-se ressaltar os bons resultados obtidos utilizando-se 0,5 ou 1,5 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado combinado com 10 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> (Figura 15). Provavelmente, quando adicionou-se carvão ativado no meio de cultura, houve a necessidade de concentrações maiores de GA<sub>3</sub> para proporcionar algum efeito estimulatório, pois este fitorregulador pode ser em parte adsorvido pelo carvão ativado.

Em síntese, maior comprimento do sistema radicular, massa fresca e número de folhas de plântulas foram obtidos com a utilização de 0,01 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> na ausência de carvão ativado (Figuras 14, 15 e 16). A baixa exigência de ácido giberélico verificada nestas variáveis pode ser explicada pelo fato de os embriões possuírem capacidade de produzir certa quantidade endógena deste fitohormônio, como foi verificado por Jiménez et al. (2001). Contudo, há

necessidade de se adicionar certa quantidade de ácido giberélico no meio de cultura para promover melhor desenvolvimento de embriões (Norstog, 1979).

Esses resultados concordam com os obtidos por Ribeiro et al. (2000), ao observarem que a suplementação do meio MS com  $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$  favoreceu o crescimento e o desenvolvimento de embriões oriundos do cruzamento entre *Citrus limonia* x *Poncirus trifoliata*. Das et al. (2000), trabalhando com embriões maduros zigóticos e nucelares de laranja doce, cultivados em meio MS, observaram que a presença de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$  induziu à formação de plântulas. Entretanto, estas apresentaram crescimento lento, evidenciando que, dependendo da espécie ou variedade, concentrações maiores de ácido giberélico não são benéficas para o desenvolvimento de embriões. Tal interpretação também foi verificada por De Fossard et al. (1978) e Jarvis (1986).

Entretanto, tais resultados discordam daqueles em que as concentrações de  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$  (Schooler, 1960; Pasqual et al., 1990; Jumin & Nito, 1996),  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  (Kunitake et al., 1991; Carimi et al., 1998) ou  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  (Zdrujkovskaja-Richter, 1981; Gmitter et al., 1990) de  $\text{GA}_3$  proporcionaram melhores resultados no cultivo *in vitro* de embriões.

Por outro lado, o carvão ativado, quando adicionado ao meio de cultura, possui a capacidade de adsorver substâncias tóxicas liberadas pelos explantes ou impurezas de outros componentes, como sacarose e sais, sendo benéfico, em alguns casos, em concentrações entre 0,1% e 2% (Tilquin, 1979; Boulay, 1984; Grattapaglia & Machado, 1998; Ricci et al., 2002). Entretanto, pode também interferir nos reguladores de crescimento acrescentados ao meio, reduzindo seu efeito.

Tomaz et al. (2001) observaram que o carvão mostrou efeito negativo na germinação de embriões de 'Seleta Vermelha'. Este estudo sugere que o carvão ativado adsorve compostos que estão envolvidos no processo de germinação. Os mesmos autores observaram que o número de embriões germinados de laranja

‘Seleta Vermelha’ foi 16% maior quando cultivado em meio com 25 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e ausência de carvão ativado.

Contrariando esses resultados, o aumento do comprimento da parte aérea em maiores concentrações de carvão ativado pode ser atribuído ao efeito da giberelina, cuja ação mais pronunciada é o alongamento caulinar.

## 5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados, pôde-se concluir que:

- a) maior desenvolvimento de embriões é obtido no estágio cotiledonar;
- b) a utilização de 50% e 100% do meio MT associado a 60 e 90 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, respectivamente, acrescido de 0,01 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, proporcionou melhor desenvolvimento de embriões globulares;
- c) não há necessidade da adição de carvão ativado e vitaminas no meio MT para o cultivo de embriões globulares.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultória e Comércio, 2002. p.285-311.

ALVES, G.P. **Resgate de embriões imaturos obtidos por polinização natural e controlada de tangerineira Poncã**. 2000. 88p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

AMMIRATO, P.V.; ESTEWARD, F.C. Some effects of environment on the development of embryos from cultured free cells. **Botanical Gazette**, v.132, p.149-158, 1971.

ANDREOLI, C. Cultura de embriões. In: SIMPÓSIO DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1., 1985, Brasília. **Anais...** Brasília: ABCTP/EMBRAPA, 1986. p.25-28.

BALLVE, R.M.L. et al. Isoenzimas na identificação precoce de híbridos e clones nucelares no melhoramento de citros. **Bragantia**, Campinas, v.50, n.1, p.57-76, 1991.

BOULAY, M. Aspects pratiques de la multiplication *in vitro* des essences forestiers. **Annales de Recherches Sylvicoles AFOCEL**, Nangis, p.7-43, 1984.

BRUCK, D.K.; WALKER, D.B. Cell determination during embryogenesis in *Citrus jambhiri*. I. Ontogeny of the epidermis. **Botanical Gazette**, Chicago, v.146, n.2, p.188-195, 1985.

BUTTON, J.; BORGSMAN, C.H. Development of nucellar plants from unpollinated and unfertilized ovules of the Washington navel orange *in vitro*. **Journal of South Africa Botany**, v.37, p.127-134, 1971.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. ; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas**. Brasília, EMBRAPA, CBAB, 1998. p.87-132.

CAMERON, J.W.; SOOST, R.K. Breeding and development in 75 years of citrus research. **California Agriculture**, Oakland. v.36, p.4-6, 1982.

CARIMI, F.; PASQUALE, F. de; PUGLIA, A.M. *In vitro* rescue of zygotic embryos of sour orange, *Citrus aurantium* L., and their detection based on RFLP analysis. **Plant Breeding**, v.117, n.3, p.261-266, 1998.

CHATUVERDI, H.C.; MITRA, G.C. Clonal propagation of *Citrus* from somatic callus cultures. **HortScience**, v.9, p.118-120, 1974.

CROCOMO, O.J.; CABRAL, J.B. **A biotecnologia no melhoramento de plantas tropicais**. Brasília: Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior, 1988. 39p. (Curso de Agricultura Tropical. Módulo I: O Ambiente e as Plantas Tropicais).

DAS, A.; PAUL, A.K.; CHAUDHURIS, S. Micropropagation of sweet orange *Citrus sinensis* Osbeck for the development of nucellar *seedling*. **Indian Journal of Experimental Botany**, v.38, n.3, p.269-272, 2000.

DAVIES, F.S.; ALBRIGO, L.G. **Crop production science in horticulture – Citrus**. CAB International Wallingford, 1994. 254p.

DE FOSSARD, R.A. et al. Tissue culture propagation of *Eucalyptus ficifolia* F. Muell. **Combined Proceedings of the International Plant Propagators' Society**, v.28, p.427-435, 1978.

DIAZ, E.D.L. et al. La poliembrionia en el género *Citrus*. **Ciência y Técnica en la Agricultura: cítricos y otros frutales**, v.2, n.1, p.95-104, 1979.

DIJK, P.V.; DAMME, J.V. Apomixis technology and the paradox of sex. **Trends in Plant Science**, v.5, n.2, p.81-84, 2000.

DONADIO, L.C. **Laranja Pêra**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 1999. (Boletim Citrícola, 11).

EDELMAN, J.; HANSON, A.D. Sucrose suppression of chlorophyll synthesis in carrot callus cultures. **Planta**, v.98, p.150-156, 1971.

FAO. **World Orange Juice Production**. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 29 de dez. 2002.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos. 2000.

FERREIRA, M.E.; CALDAS, L.S.; PEREIRA, E.A. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. ; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas**. Brasília: EMBRAPA/ CBAB, 1998. p.21-43.

FIGUEIREDO, J.O. Variedades copas de valor comercial. In: \_\_\_\_\_. **Citricultura brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1991. p.228-264.

FROST, H.B.; SOOST, G.K. Seed reproduction development of gamets and embryos. In: BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J. **The citrus industry**. Berkeley: University of California, 1968. v.2, p.290-323.

FURR, J.R. Citrus breeding for the arid Southwestern United States. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1969, Riverside. **Proceedings...** Riverside: University of California, 1969. p.191-197.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean roots cells. **Experimental Cell Research**, v.50, p.151-158, 1968.

GEORGE, E.F. The components of culture media. In: GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture**: party 1. The technology. Eversley, England: Exegetics, 1993. p.273-343.

GHAZVINI, R.F.; SHIRANI, S. Study of the effects of somatic embryogenesis of unfertilized ovules from Mexican lime (*Citrus aurantifolia* L.) on different media. **Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources**, v.6, n.2, p.44-52, 2002.

GIACOMETTI, D.C. Taxonomia das espécies cultivadas de citros baseadas em filogenéticas. In: RODRIGUES, O. et al. **Citricultura brasileira**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991, p.99-115.

GLORIA, F.J.M. da. et al. Plant regeneration from protoplast of Brazilian citros cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.4, p.727-732, 2000.

GMITTER, F.G.; LING, X.B.; DENG, X.X. Induction of triploid *Citrus* plants from endosperm calli *in vitro*. **Theory Applied Genetic**, v.80, p.785-790, 1990.

GOODWIN, T.W.; MERCER, E.I. **Introduction to plant biochemistry**. 2.ed. Oxford: Pergamon, 1983. 677p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. ; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1998. p.183-260.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. ; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1998. p.533-568.

GURGEL, J.T.A. Poliembriõnia e embriõnia adventícia em *Citrus*, *Mangifera* e *Eugenia*. **Dusenya**, Curitiba, v., n.6, p.443-450, 1952.

HANNA, W.W.; BASHAW, E.C. Apomixis: its identification and use in plant breeding. **Crop Science**, Madison, v.27, n.6, p.1136-1139. Nov./Dec. 1987.

HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPH/CBAB, 1998. v.2, p.371-393.

IKEDA, M. et al. Artificial control of polyembryogenesis and production of hybrids by chronic gamma irradiation of *Citrus* ovule *in vitro*. **Bulletin of the National Institute of Agrobiological Resources**, n.8, p.25-46, 1993.

JARVIS, B.C. Endogenous control of adventitious rooting in non-woody cuttings. In: JACKSON, M.B. **New root formation in plants and cuttings**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1986. p.191-222.

JIMENEZ, V.M. et al. Endogenous hormone levels in habituated nucellar *Citrus* callus during the initial stages of regeneration. **Plant Cell Reports**, v.20, n.1, p.92-100, 2001.

JUMIN, H.B.; NITO, N. Plant regeneration via somatic embryogenesis from protoplast of six plant species related to *Citrus*. **Plant Cell Reports**, v.15, n.5, p.332-336, 1996.

KOLLER, O.C. Melhoramento. In: \_\_\_\_\_. **Citricultura: laranja, limão e tangerina**. Porto Alegre: Rígel, 1994. 446p.

KOLTUNOW, A.M. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilisation in ovules. **Plant Cell**, v.5, p.1245-1437, 1993.

- KOLTUNOW, A.M.; BICKNELL, R.A.; CHAUDHURY, A.M. Apomixis: Molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. **Plant Physiology**, v.108, p.1345-1352, 1995.
- KORDAN, H.A. Proliferation of excised juice vesicles of limon *in vitro*. **Science**, Washington, v.129, p.779-780, 1959.
- KUNITAKE, H. KAGAMI, H.; MII, M. Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts of 'Satsuma' mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). **Scientia Horticulturae**, v.47, p.27-33, 1991.
- LAMEIRA, O.A. et al. **Cultura de tecidos**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. 41p. (Manual Embrapa, 66).
- LINSMAIER, E.M.; SKOOG, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.18, p.100-127, 1965.
- MACHADO, M.A. et al. Melhoramento de citros para resistência à doenças. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE FRUTEIRAS, 2., 2000, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa-MG: UFV, 2000. p.82-86.
- MAHESHWARI, P.; RANGA-SWAMY, N.S. Polyembryony and *in vitro* culture of embryos of *Citrus* and *Mangifera*. **The Indian Journal of Horticulture**, Bangalore, v.15, p.175-282, 1958.
- MORAIS, L.S. **Ajuste do meio de Murashige e Tucker (MT) para o cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerina "Cleópatra"** 1997. 86p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, BA.
- MOREIRA, C. dos S. **Frequência de híbridos em citros (*Citrus* spp.) em relação ao grau de poliembryonia**. 1996. 78p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, BA.
- MOREIRA, C.S.; PIO, R.M. Melhoramento de citros. In: RODRIGUES, O. et al. **Citricultura brasileira**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. p.116-152.
- MOREIRA, S.; GURGEL, J.T.A.; ARRUDA, L.F. Poliembryonia e embriogênia em *Citrus*. **Bragantia**, Campinas, v.7, n.3, p.69-106, 1947.



MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.6, p.473-479, 1962.

MURASHIGE, T.; TUCKER, D.P.H. Growth factor requirement of citrus tissue culture. In: INTERNACIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., Riverside, 1969. **Proceedings**. Riverside: University of California, 1969. v.3, p.1155-1169.

NAMEKATA, T. Cancro cítrico. In: \_\_\_\_\_. **Citricultura brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, p.722-734, 1991.

NAVARRO, L.; ORTIZ, J.M.; JUAREZ, J. Aberrant citrus plants obtained by somatic embryogenesis of nucelli cultures *in vitro*. **Hortscience**, v.20, p.214-215, 1985.

NICKELL, L.G. Plant growth substances. **Encyclopedia of Chemical Technology**, v.18, p.1-23, 1982.

NIJS, A.P.M.; VAN DIJK, G.E. Apomixis. In: HAYWARD, M.O.; BOSEMARK, N.O.; ROMAGOSA, I. (Ed.). **Plant breeding: principles and prospect**. 1994. Chapman e Hal, p.229-245.

NOGLER, G.A. Gametophytic apomixis. In: JOHRI B.M. **Embryology of angiosperms**. Berlím: Spring-Verlag, 1984. p.475-518.

NORSTOG, K.J. Embryo culture as a tool in the study of comparative and development morphology. In: SHARP, W.R. et al. (Ed.). **Plant cell and tissue culture**. Columbus: Ohio State University, 1979. p.197-202.

NORSTOG, K.; SMITH, J.E. Culture of small barley embryos on defined medium. **Science**, v.142, p.1655-1656. 1963.

OHTA, Y.; FURUSATO, K. Embryoculture in *Citrus*. **Rept. Kihara Inst. Biol. Res.** Yokohana, v.8, p.49-54, 1957.

PARLEVLIT, J.E.; CAMERON, J.W. Evidence on the inheritance of nucellar embryony in *Citrus*. **Proceedings of the American of Society for Horticultural Science**, Virginia, v.74, p.252-260, 1959.

PARTHASARATHY, V.A.; PARTHASARATHY, U. Effect of growth regulators on transplanted embryoids of *Citrus reticulata* Blanco. **Annals of Plant Physiology**, v.7, n.1, p.21-24, 1993.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações.** Meios de cultura. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 74p.

PASQUAL, M. et al. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos da tangerineira ‘Poncã’: concentrações do meio MS e da sacarose. **Revista Ceres**, v.49, n.282, p.181-189, 2002.

PASQUAL, M.; PINTO, J.E.B.P. Cultura de embriões. **Notícias da Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas**, v.9, p.2-12, 1988.

PASQUAL, M.; RAMOS, J.D.; DUTRA, L.F. **Aplicações no melhoramento genético de plantas.** 2001. 79p. Curso de Pós-Graduação “Lato Sensu” (Especialização em Cultura de Tecidos Vegetais: tecnologia e aplicações)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PASQUAL, M.; RIBEIRO, V.G.; RAMOS, J.D. Influência do GA<sub>3</sub> e do carvão ativado sobre o enraizamento *in vitro* de embriões de laranja “Natal”. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.25, n.10, p.1477-1482, 1990.

PESCADOR, R. **Cultivo de embriões de laranjeira ‘Cipo’ (*Citrus sinensis* Osb.) *in vitro* e uso de padrões isoenzimáticos na identificação dos *Seedlings* zigóticos e nucelares.** 1993. 96p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

PRATES, H.S. **Poliembrionia em *Citrus*:** Jaboticabal: CATI, 1978. 41p.

RANGAN, T.S.; MURASHIGE, T.; BITTERS, W.P. *In vitro* studies of zygotic and nucellar embryogenesis in *Citrus*. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1969, Riverside. **Proceedings...** Riverside: International Society of Citriculture, 1969. v.1, p.225-229.

RAMOS, J.D.; PASQUAL, M. Alterações na poliembrionia e identificação do híbrido em sementes de limão ‘Cravo’ obtidas de cruzamentos com *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.27, n.3, p.423-427, 1992.

RAGHAVAN, V. Embryo culture. **Internantional Revision Cytology**, n.11, p.209-240, 1980.

RAGHAVAN, V. **Experimental embryogenesis in vascular plants.** London: Academic, 1976.

RHAGAVAN, V. Nutrition, growth, and morphogenesis of plant embryos. **Biology Rev.**, v.41, p.1-58, 1966.

RHAGAVAN, V.; TORREY, J.G. Effects of certain growth substances on the growth and morphogenesis of immature embryos of *Capsella* in culture. **Plant Physiology**, Maryland, v.39, n.4, p.691-699, 1964.

RIBEIRO, V.G. et al. Influência do pH e do ágar sobre o cultivo *in vitro* de embriões de laranja 'Pêra'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.32, p.1147-1152, 1997.

RIBEIRO, V.G. D. et al. Cultivo *in vitro* de embriões de laranja 'Pêra': concentrações do meio MS e sacarose. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.22, p.429-434, 1998.

RIBEIRO, V.G. et al. Estádios de desenvolvimento embrionário e localização do embrião zigótico em sementes de citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, p.1327-1333, 1999a.

RIBEIRO, V.G. et al. Influência do ágar e do pH sobre o cultivo *in vitro* de embriões de laranja 'Natal'. **Revista Ceres**, Viçosa, v.46 p.587-595, 1999b.

RIBEIRO, V.G. et al. Efeitos de ácido giberélico e carvão ativado no cultivo *in vitro* de *Citrus limonia* Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, p.27-30, 2000.

RICCI, A.P. et al. Somatic embryogenesis in *Citrus sinensis*, *Citrus reticulata* and *C. nobilis* x *C. deliciosa*. **Scientia Agrícola**, v.59, n.1, p.41-46, 2002.

RODRIGUES, L.R.; DORNELLES, A.L.C.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Poliembrião e número de sementes por fruto de quatro cultivares de tangerineira. **Ciência Rural**, v.29, n.3, p.469-474, 1999.

SCHENCK, R.O.; HILDEBRANDT, A.C. Medium and techniques for induction and growth monocotyledonous plant cell cultures. **Canadian Journal of Botany**, v.50, p.199-204, 1972.

SCHOOLER, A.B. Wild barley hybrids. *Hordeum compressum* x *Hordeum possillum*. **Journal Hered.** v.51, p.179-181, 1960.

SCHROEDER, C.A.; SPECTOR, C. Effect of gibberellic acid and indolacetic acid on growth of excised fruit tissue. **Science**, Washington, v.126, p.701-702. 1957.

SHARMA, D.R.; KAUR, R.; KUMAR, K. Embryo rescue in plants - a review. **Euphytica**, v.89, p.325-337, 1996.

SHARP, W.R.; DOUGALL, D.K.; PADDOCK, E.F. Haploid plantlets and callus from immature pollen grains of *Nicotiana* and *Lycopersicon*. **Bulletin Torrey Botanical Club**, v.98, p.219-222, 1971.

SNIR, I.; EREZ, A. *In vitro* propagation of Malling Merton, apple rootstocks. **HortScience**, v.15, p.597-598, 1980.

SOARES FILHO, W. dos S. et al.. Degree of polyembryony, size and survival of the zygotic embryo in *Citrus*. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 7., 1992, Acireale, Italy. **Proceedings...** Acireale, Italy: International Society of Citriculture, 1994. v.1, p.135-138.

SOARES FILHO, W. dos S. et al. Poliembriõnia e freqüência de híbridos em *Citrus* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.4, p.857-864, 2000.

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

SOOST, R.K.; WILLIAMS, T.E.; TORRES, A.W. Identification of nucelar and zygotic seedlings of *Citrus* with leaf isozymes. **HortScience**, Alexandria, v.15, n.6, p.728-729, 1980.

SOUBIHE SOBRINHO, J.; GURGEL, J.T.A. Poliembriõnia e embriõnia adventícia em *Citrus Mangifera* e *Myrtaceae* frutíferas. **Dusenìa**, Curitiba, v.4, n.5, p.421-428, 1953.

STEINHART, C.E.; STANDIFERJR., L.C.; SKOOG, F. Nutrient requeriments for *in vitro* growth of spruce tissue. **American Journal of Botany**, v.48, p.465-472, 1961.

TILQUIN, J.P. Plant regeneration from stem callus of *Cassava*. **Canadian Journal Botany**, Ottawa, v.57, n.16, p.1761-1763, 1979.

TISSERAT, B. Factors involved in the production of plantlets from date palm callus cultures. **Euphytica**, v.31, p.201-214, 1982.

TOMAZ, M.L. et al. In vitro Cellular and developmental biology, **Plant**, v.37, n.4, p.446-452, 2001.

VÁSQUEZ ARAUJO, J.E. **Identificação de embriões zigóticos em sementes poliembriônicas de citros (*Citrus spp.*) mediante características morfológicas**. 1991. 74p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas.

WHITE, P.R. Influence of some environmental conditions on the growth of excised root tips of wheat *seedlings* in liquid media. **Plant Physiology**, v.7, p.613-628, 1932.

WHITE, P.R. Glycine in the nutrition of excised tomato roots. **Plant Physiology**, v.14, p.527-538, 1939.

WHITE, P.R. **A handbook of plant tissue culture**. Lancaster, Pennsylvania: Costel e Co, 1943. 273p.

YAMADA, Y.; SATO, F. The photoautotrophic culture of chlorophyllous cells. **Plant Cell Physiology**, v.19, p.691-699, 1978.

YATAZAWA, M.; FURUHASHI, K. Nitrogen sources for the growth of rice callus tissue. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.14, p.73-79, 1968.

ZDRUJKOVSKAJA-RICHTER, A.I. **Embryo cultures and development of new forms of plants**. Moscow: University Moscow, 1981. (Abstr.).