

VALTEMIR GONÇALVES RIBEIRO

LOCALIZAÇÃO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS E NUCELARES EM SEMENTES
DE CITROS E AJUSTES DO MEIO MS PARA O RESGATE
DE EMBRIÕES IMATUROS *IN VITRO*

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

Orientador

Prof. Dr. MOACIR PASQUAL



LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

1997

Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Classificação e Catalogação da
Biblioteca Central da UFLA

Ribeiro, Valtemir Gonçalves

Localização de embriões zigóticos e nucelares em sementes de citros e ajustes do meio MS para o resgate de embriões imaturos *in vitro* / Valtemir Gonçalves Ribeiro. -- Lavras : UFLA, 1997.
61p. : il.

Orientador: Prof. Dr. Moacir Pasqual.
Dissertação (Mestrado) - UFLA.
Bibliografia.

1. Biotecnologia. 2. Cultura de tecidos. 3. Meio de cultivo
4. Melhoramento 5. Citros. 6. Hibridação 7. Embrião zigótico
8. Embrião nucelar 9. Hibridação I. Universidade Federal de Lavras.
II. Título.

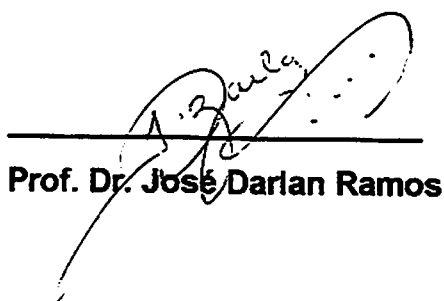
CDD-634.30421
-634.3043

VALTEMIR GONÇALVES RIBEIRO

**LOCALIZAÇÃO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS E NUCELARES EM SEMENTES
DE CITROS E AJUSTES DO MEIO MS PARA O RESGATE
DE EMBRIÕES IMATUROS *IN VITRO***

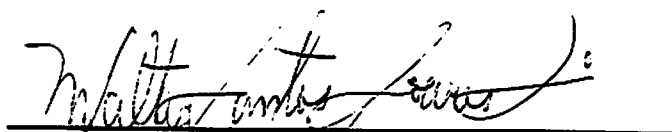
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de "Mestre"

APROVADA em 10 abril de 1997



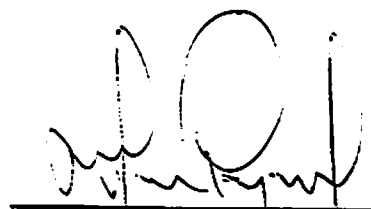
Handwritten signature of Prof. Dr. José Darlan Ramos in black ink, written over a horizontal line.

Prof. Dr. José Darlan Ramos



Handwritten signature of Pesq. Dr. Walter dos Santos Soares Filho in black ink, written over a horizontal line.

Pesq. Dr. Walter dos Santos Soares Filho



Handwritten signature of Prof. Dr. Moacir Pasqual in black ink, written over a horizontal line.

Prof. Dr. Moacir Pasqual

(Orientador)

Aos meus pais,

José Gonçalves da Cunha e Albertina Ribeiro Gonçalves.

Irmãos,

Waldemir, José Wilson, William, walkiria, Wilson, Waldeciria e Walter.

Sobrinhos,

Amanda, Cauê, Erika, Jade, Jaqueline, Juliana, Luan, Simone, Vinícius e Willinha.

OFEREÇO

À esposa Roseli e à minha filha Lívia

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À instituição 'Escola Superior de Agricultura de Lavras/Universidade Federal de Lavras', por muito tempo minha casa, com apreço.

Ao prof. Dr. Moacir Pasqual, pelo apoio, dedicação, orientação e amizade.

Ao prof. Dr. José Darlan, pelo companheirismo, co-orientação e amizade;

Ao prof. Dr. Nilton Nagib, pela sinceridade auxílio e amizade.

Ao Prof. Dr. Eduardo Bearzoti, pela orientação nas análises estatísticas e amizade.

Ao Pesq. Dr. Walter dos Santos Soares Filho, pela contribuição, humildade e amizade.

Aos amigos: Arnaldo de Freitas, Carla de Pádua, Deny Sanábio, Fernando Souza, Gladyston, Marcelo Vichiato e Mívia Medeiros, Maria Elvira, Deny Sanábio, Paulo Antonio ("Jerry"), Ariosvaldo ("Tiquinho") e Dalton, pelo convívio.

Aos laboratoristas Vantuil, Evaldo e Clarete pela amizade;

E àqueles que direta ou indiretamente contribuíram no decorrer dos tempos.

BIOGRAFIA DO AUTOR

VALTEMIR GONÇALVES RIBEIRO, filho de José Gonçalves da Cunha e Albertina Ribeiro Gonçalves, nasceu em Fernandópolis - SP, a 05 de dezembro de 1963.

Concluiu seu estudos de Graduação em Engenharia Agrônômica na Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), em dezembro de 1992.

Foi bolsista de Aperfeiçoamento em Atividade de Pesquisa pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) no período de agosto/1994 a julho/1995.

Participou do curso de Pós-Graduação "Latu Sensu" em 'Fruticultura Comercial' (Tutoria a distância - UFLA) de junho/1996 a julho/1997.

Foi bolsista de Iniciação Científica (CNPq) no período de agosto/1988 a julho/1990 e monitor da disciplina 'Cultura de Tecidos de Plantas' de setembro/1987 a agosto/1988.

Iniciou o curso de Mestrado em Agosto de 1995.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
ABREVIATURAS.....	XII
RESUMO.....	XIII
SUMMARY	XV
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	3
•Estádios de desenvolvimento embrionário e a localização do embrião zigótico em sementes de citros.....	3
•Influência do pH e do ágar sobre o cultivo <i>in vitro</i> de embriões de citros.....	6
•Cultivo <i>in vitro</i> de citros: concentração de sais do meio MS e sacarose.....	9
•Cultivo <i>in vitro</i> de embriões de citros: efeitos do ácido giberélico e do carvão ativado	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Experimento: Estádios de desenvolvimento embrionário e a localização do embrião zigótico em sementes de citros	13

3.2. Experimento: Influência do pH e do ágar sobre o cultivo de embriões de laranjas 'Pêra' e 'Natal'	15
3.3. Experimentos: "Cultivo <i>in vitro</i> de embriões de laranjeira 'Pêra': concentrações de sais do meio MS e sacarose". "cultivo <i>in vitro</i> de embriões de <i>Citrus limonia</i> χ <i>Poncirus trifoliata</i> : efeitos do ácido giberélico e do carvão ativado."	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1. Experimento 1: Estádio de desenvolvimento embrionário e a localização do embrião zigótico em sementes de citros	18
4.2. Experimento 2: Influência do pH e do ágar sobre o cultivo de embriões de laranjas 'Pêra' e 'Natal'	24
4.2.1. Laranja 'Pêra'	24
4.2.2. Laranja 'Natal'	29
4.3. Cultivo <i>in vitro</i> de embriões de laranja 'Pêra': concentrações de sais do meio MS e sacarose	35
4.4. Cultivo <i>in vitro</i> de embriões de <i>Citrus limonia</i> χ <i>Poncirus trifoliata</i> : efeitos do ácido giberélico (ga_3) e do carvão ativado	39
5. CONCLUSÕES.....	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
APÊNDICES	53

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1 Características físicas apresentadas pelos frutos obtidos pelo cruzamento de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck \times <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf., aos 120, 130, 140 e 150 dias após a polinização. UFLA, Lavras, MG, 1997.....	19
2. Freqüências observadas de embriões em diferentes estádios de desenvolvimento após 130, 140 e 150 dias da polinização, em relação as suas localizações na semente. UFLA, Lavras, MG, 1997.....	22
3. Freqüências observadas dos embriões zigóticos e nucelares em relação às localizações na semente, UFLA, Lavras, MG, 1997.....	23
4. Freqüências observadas de embriões nos diferentes estádios de desenvolvimento após 130, 140 e 150 dias da polinização. UFLA, Lavras, MG, 1997.	24
5. Análise de variância considerando as variáveis comprimentos da parte aérea e do sistema radicular, peso da matéria fresca e porcentual de sobrevivência de embriões de laranjeira 'Pêra' [<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck]. UFLA, Lavras, MG, 1997.....	25

6. Análise de variância considerando as variáveis comprimentos da haste caulinar e do sistema radicular, peso da matéria fresca, porcentagem de sobrevivência e número de folhas de embriões da laranjeira 'Natal' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. UFLA, Lavras, MG, 1997..... 29
7. Análise de variância considerando as variáveis comprimentos do sistema radicular e da parte aérea, porcentual de sobrevivência e número de folhas de embriões de laranjeira 'Pêra' [*Citrus sinensis* (L.) Osb.]. UFLA, Lavras, MG, 1997 35
8. Análise de variância considerando as variáveis comprimentos do sistema radicular e da haste caulinar e porcentual de sobrevivência dos embriões do híbrido *Citrus limonia* \times *Poncirus trifoliata*. UFLA. Lavras, MG, 1997..... 40

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Frequência de embriões nos diferentes estádios de desenvolvimento após 130 a 150 dias da polinização (G- globular; c/T- cordiforme/torpedo; C- cotiledonar). UFLA, Lavras, MG, 1997.....	23
2. Efeito do pH sobre o peso da matéria fresca de embriões de laranjeira 'Pêra' [<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck.]. UFLA, Lavras, MG, 1997.....	26
3. Efeito do pH sobre o comprimento da haste caulinar de embriões de laranjeira 'Pêra' [<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck.]. UFLA, Lavras, MG, 1997.....	26
4. Efeito do pH na presença do ágar sobre o comprimento do sistema radicular de embriões de laranjeira 'Pêra' [<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck.]. UFLA, Lavras, MG, 1997.....	28
5. Efeito do pH na presença do ágar sobre a porcentagem de sobrevivência de embriões de laranjeira 'Pêra' [<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck.]. UFLA, Lavras, MG, 1997.....	28
6. Efeito do ágar na presença do pH sobre o percentual de sobrevivência de embriões de laranjeira 'Natal' [<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck.]. UFLA, Lavras, MG, 1997.....	30

7. Efeito do ágar na presença do pH sobre o comprimento do sistema radicular de embriões de laranja 'Natal' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. UFLA, Lavras, MG, 1997. 31
8. Efeito do ágar na presença do pH sobre o número de folhas de embriões de laranja 'Natal' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. UFLA, Lavras, MG, 1997. 32
9. Efeito do ágar sobre o comprimento da parte aérea de embriões de laranja 'Natal' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. UFLA, Lavras, MG, 1997. 33
10. Efeito do ágar na presença do pH sobre o peso da matéria fresca de embriões de laranja 'Natal' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. UFLA, Lavras, MG, 1997. 33
11. Efeito dos sais do meio MS na presença da sacarose sobre o comprimento da parte aérea de embriões de laranja 'Pêra' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], UFLA, Lavras, MG, 1997. 36
12. Efeito dos sais do meio MS na presença da sacarose sobre o número de folhas de embriões de laranja 'Pêra' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. UFLA, Lavras, MG, 1997. 37
13. Efeito dos sais do meio MS na presença da sacarose sobre o comprimento do sistema radicular de embriões de laranja 'Pêra' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), UFLA, Lavras, MG, 1997. 38
14. Efeito dos sais do meio MS na presença da sacarose sobre o percentual de sobrevivência de embriões de laranja 'Pêra' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. UFLA, Lavras, MG, 1997. 39

15. Efeito do ácido giberélico (GA₃) na presença do carvão ativado sobre o comprimento do sistema radicular de embriões do híbrido *Citrus limonia* Osbeck \times *Poncirus trifoliata*. UFLA, Lavras, MG, 1997..... 41
16. Efeito do ácido giberélico (GA₃) na presença do carvão ativado sobre o comprimento da parte aérea de embriões do híbrido *Citrus limonia* Osbeck \times *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. UFLA, Lavras, MG, 1997.. 41
17. Efeito do ácido giberélico (GA₃) na presença do carvão ativado sobre o percentual de sobrevivência de embriões do híbrido *Citrus limonia* Osbeck \times *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. UFLA, Lavras, MG, 1997... 42

ABREVIATURAS

AIB - ácido indolbutírico

ANA - ácido naftaleno acético

GA₃ - ácido giberélico

cm - centímetro

mg/L - miligrama por litro

ml - mililitro

MS - meio de cultura Murashige & Skoog

RESUMO

RIBEIRO, Valtemir Gonçalves. **Localização de embriões zigóticos e nucelares em sementes de citros e ajustes do meio MS para o resgate de embriões imaturos *in vitro***. Lavras: UFLA, 1997. 58p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).¹

Com o objetivo de se estudar a localização, desenvolvimento e crescimento de embriões zigóticos e nucelares em sementes de citros foram realizados cinco experimentos, conduzidos no Setor de Fruticultura e no Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG. No primeiro experimento foram realizados cruzamentos controlados entre os parentais *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. cv. Natal \times *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. e após 120 a 150 dias das polinizações os embriões excisados foram notificados quanto a localização e estádios de desenvolvimento na semente. Nos demais experimentos foram estudados os efeitos dos fatores pH e ágar (em cv_s Pêra e Natal); sacarose e concentração dos sais do meio MS (em cv. Pêra); e ácido giberélico (GA₃) e carvão ativado (em embriões de *Citrus limonia* Osbeck \times *Poncirus trifoliata* L. Raf.), pelas seguintes características apresentadas: comprimentos da haste caulinar e do sistema radicular, peso da matéria fresca, número de pares de folhas e porcentual de sobrevivência. Concluiu-se que no intervalo de tempo observado os embriões sexuais localizam-se na região micropilar da semente e estão em grande maioria em estágio globular de desenvolvimento. Aos níveis dos fatores estudados, observou-se que: pH: 6,7; ágar: 10,5 g/L; sacarose: 60,0

¹ Orientador: Moacir Pasqual. Membros da Banca: José Darlan Ramos e Walter dos Santos Soares Filho.

g/L; concentração dos sais do meio MS: 75%; GA₃: 0,01 mg/L e carvão ativado: 1,35 g/L, maximizam o desenvolvimento e o crescimento de embriões cultivados *in vitro*.

ABSTRACT

LOCALIZATION OF ZYGOTIC AND NUCELLAR EMBRYOS IN CITRINE SEEDS AND ADJUSTMENT OF MS MEDIUM CULTURE FOR THE RANSOM OF *IN VITRO* EMBRYOS.

With a view to studying the localization, development and growth of nucellar and zygotic embryos in citrine seeds, five experiments were undertaken, were conducted at the Fruticulture sector and in the Tissue Culture laboratory of the Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG. In the first experiment, cross breeding controlled were performed between the parents *Citrus limonia* Osbeck cv. Natal \times *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. and after 120 to 150 days from the pollinations the excised embryos were recorded as regards their localization and developmental stages in the seed. In the other experiments the effects of the factors pH and agar (on 'Pêra' and 'Natal' sweet oranges), sucrose and salt concentration in the MS medium (in 'Pêra' sweet orange) and giberellic acid (GA₃) and activated coal (in embryos of *C. limonia* \times *P. trifoliata*) by the following characteristics presented: length of the stem stalk and of the root system, weight of the fresh matter, number of pair of leaves and survival percent. It follows that in the period of time observed, sexual embryos lie in the micropilar region of the seed and are in large quantity at globular developmental stage. At the levels of the investigated factors, it was found that: pH: 6.7; agar: 10.5 g/L; sucrose: 60.0 g/L; concentration of the salts in the MS medium: 75%; GA₃: 0.01 mg/L and activated coal: 1.35 g/L, maximize the development and the growth of *in vitro* grown embryos.

1. INTRODUÇÃO

A partir da década de sessenta surgiu no Brasil uma citricultura competitiva e de alto nível no que se refere à industrialização e processamento de suco de laranja concentrado, estando alicerçada principalmente nas cultivares Pêra, Natal, Valência e Hamlin.

No entanto, dado às crescentes ofertas de suco de laranja no mercado internacional e à retomada da produção dos Estados Unidos, atenta-se para a necessidade de se produzir frutas frescas, objetivando-se a abertura de novos mercados para a sobrevivência da citricultura, em um mercado cada vez mais competitivo.

A demanda do mercado internacional de frutas frescas é suprida por países como Israel e Espanha, que produzem frutas de alto padrão que têm por características o baixo número de sementes, facilidade de soltura da casca, coloração e formato atrativos, dentre outros aspectos que podem variar com as especificações de cada mercado.

Outros desafios assistidos pela citricultura nacional são as introduções de doenças e pragas sem a existência de clones tolerantes, como também a indisponibilidade de variedades adaptadas às novas fronteiras citrícolas, adaptadas principalmente à toxidez causada por alumínio e ao estresse hídrico.

A obtenção de novas cultivares de citros deve-se principalmente a seleção de plantas resultantes de mutações espontânea (Soares Filho et al., 1994b) e a facilidade de hibridação do gênero *Citrus* e afins. No Brasil, poucas respostas têm-se verificado pelo melhoramento genético, seja pelo baixo número de pesquisadores na

área ou por fatores como longo período de juvenildade; e o fenômeno da poliembrionia, largamente encontrado nas espécies de citros, em que vários embriões morfológicamente semelhantes desenvolvem-se em uma mesma semente, dificultando o resgate do embrião sexual, pela não distinção do “seedling” híbrido caso este não possua caracteres morfológicos evidentes que possibilitem a sua separação, a exemplo da característica trifoliolada presente em *P. trifoliata*.

A origem e o desenvolvimento inicial do embrião zigótico, conforme Maheswari e Rangaswamy (1958), são verificados na região micropilar da semente, havendo distanciamento do embrião sexual desta região ao centro da semente com o passar do tempo.

Para o perfeito desenvolvimento e crescimento dos embriões nucelares ou zigóticos, estádios morfológicos de desenvolvimento embrionário como globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar necessitam ser cumpridos. 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 meio de cultivo para resgatar o embrião sexual que porventura esteja em estágio globular ou pró-embrionário.

Uma adequação do meio de cultivo *in vitro* para embriões em diferentes estádios de desenvolvimento embrionário, através de ajustes aos níveis das exigências nutricionais, pode ser requerida de acordo com o gênero, espécie ou cultivares tratadas. Portanto, os níveis dos fatores exógenos adicionados ao meio de cultura como elementos orgânicos e inorgânicos, reguladores de crescimento, agente geleificante e o pH do meio de cultivo podem favorecer o desenvolvimento e crescimento *in vitro* dos embriões.

O presente estudo teve por objetivos confirmar a localização dos embriões de natureza sexual na semente e adequar o meio de cultivo MS para o resgate de embriões *in vitro*, em todos os estádios de desenvolvimento, independentemente de serem de natureza sexual ou nucelar.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

•ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E A LOCALIZAÇÃO DO EMBRIÃO ZIGÓTICO EM SEMENTES DE CITROS

Os primeiros trabalhos de melhoramento com espécies cítricas foram iniciados por W.T.Swingle e H.J.Weber, objetivando inicialmente resistência a doenças e, logo a seguir, resistência ao frio, mediante hibridação com *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., segundo Soost e Cameron (1975).

Porém a obtenção de novos híbridos de valor comercial tem sido limitada pelos empecilhos da esterilidade masculina, incompatibilidade, longo período de juvenilidade dos "seedlings", e poucos conhecimentos disponíveis sobre o controle genético da grande maioria dos caracteres relacionados aos citros; caracteres fenotípicos não uniformes conforme se verifica por uma ampla variação fenotípica na geração F_1 , como consequência da elevada heterose observada em citros (Furr, 1969), e a elevada poliembrionia da maioria das espécies e variedades cultivadas.

Devido a elevada heterose observada nos citros, 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 e Cameron, 1975).

No Brasil, os principais objetivos traçados pelo melhoramento de citros têm sido resistência a moléstias, melhor coloração dos frutos, ampliação do período de safra, menor número de sementes, porte menor, tolerância à tristeza e efeito ornamental das plantas (Moreira e Pio, 1991), e adaptação de cultivares a regiões com problemas de toxidez de alumínio e a déficit hídrico (Vásquez Araujo et al., 1994).

Muitas espécies e cultivares dos gêneros *Citrus* e *Poncirus* possuem a característica de reproduzirem-se agamicamente por apomixia do tipo agamosperma apospórica ou poliembrionia (Moreira, Gurgel e Arruda, 1947; Frost e Soost, 1968; Rangan, Murashige e Bitters, 1969), formando vários embriões a partir da diferenciação de células individuais do nucelo, apresentando dois ou mais embriões na mesma semente (Pasqual, 1990). O tecido nucelar é o corpo do óvulo que contém o saco embrionário e é o principal alimento para o embrião durante o desenvolvimento (Popinigis, 1985).

Os embriões normalmente se originam e se desenvolvem na extremidade micropilar do nucelo (Maheswari e Rangaswamy, 1958), projetando-se para dentro do saco embrionário, juntamente com o embrião sexual, originado pela fecundação da oosfera. Os embriões, tanto o sexual como os nucleares, durante seu processo de desenvolvimento, assumem aspectos morfológicos característicos como globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar, o que dificulta a separação entre si.

Fertilização e fecundação da célula-ovo foram consideradas um pré-requisito essencial para a embriogênese nucelar em citros (Maheshwari e Rangaswamy, 1958; Frost e Soost, 1968; Button e Bornman, 1971), apesar de ter sido registrada a formação de sementes sem fertilização em *C. sinensis* (L.) Osb. e *C. paradisi* Macf. e de embriões *in vitro* (Button e Bornman, 1971; Kochba, Spiegel-Roy e Safran, 1972).

O desenvolvimento completo das sementes cítricas requer a polinização, fecundação e pegamento dos frutos. A relação entre esses processos é bastante variável porque as plantas cítricas apresentam diversos graus de partenocarpia, como o que ocorre com os frutos da laranjeira 'Baía' (*C. Sinensis*) e da limeira ácida 'Taiti' (*C. Latifolia* Tan.), de acordo com Moreira e Pio (1991).

. A época da iniciação do desenvolvimento dos embriões tem sido questionada. A fecundação, segundo Spiegel-Roy e Kochba (1980), ocorre de 3 a 30 dias após a fertilização e logo a seguir inicia-se a divisão do zigoto, juntamente com o desenvolvimento dos embriões.

Em sementes de 'Ponkan' (*C. Reticulata* Blanco), excisadas 47 dias após a polinização, foram encontrados embriões no estágio unicelulado, independentemente da presença do zigoto (Esen e Soost, 1977). Embriões de sementes imaturas de 'Satsuma' (*C. unshiu* Marc.) polinizada por *P. trifoliata*, mostraram desenvolvimento satisfatório se isolados aos 90 e 120 dias da fertilização. Rangan, Murashige e Bitters (1969) não verificaram a iniciação de embriões em *C. aurantium* L. 100 a 120 dias após a polinização, quando o zigoto estava no estágio globular ou cordiforme.

. A extensão da poliembrião é influenciada por fatores ambientais, pela cultivar e estado nutritivo do fruto (Frost e Soost, 1968); podendo haver modificações quanto ao grau da poliembrião entre sementes de um mesmo fruto, frutos, talhões, anos de produção e pelas específicas interações entre os parentais envolvidos (Soares Filho et al., 1995).

. A embrião nucelar nas sementes de citros tem provocado sérios problemas na hibridação artificial. Poucos ou nenhum embrião zigótico são produzidos quando cultivares poliembriônicas são utilizadas como planta-mãe. Frequentemente o embrião sexual é suplantado pelos embriões nucleares, antes mesmo da maturação da semente (Moreira e Pio, 1991).

. A técnica de cultura de tecidos vegetais tem sido utilizada com sucesso para o resgate de embriões híbridos imaturos oriundos de cruzamentos incompatíveis, onde ocorrem barreiras sexuais na formação de sementes (Andreoli, 1986; Pasqual e Pinto, 1988).

. Várias tentativas foram feitas para distinguir plântulas nucleares das sexuais de citros: através da análise por raio infravermelho de óleos essenciais contidos nas folhas (Pieringer e Edwards, 1965); pela morfologia das folhas das progênies (Teich e Spiegel-Roy, 1972); pelas características morfológicas dos

embriões (Vásquez Araujo, 1991); por métodos bioquímicos, com análise de flavonóides (Esen, 1977); pelo uso de hidro-carbonos de cadeia longa e isoenzimas peroxidases e esterases (Spiegel-Roy e Kochba, 1977); por escurecimento enzimático (Soares Filho et al., 1994a).

Portanto, vários estudos com marcadores morfológicos e bioquímicos foram realizados objetivando-se a distinção de "seedlings" obtidos em cruzamentos intergenéricos e alguns cruzamentos interespecíficos, não se prestando conquanto para muitos cruzamentos interespecíficos e para a maioria absoluta dos cruzamentos intraespecíficos.

Em espécies de citros pode-se, embora com dificuldade, distinguir embriões nucelares do sexual pela falta do suspensor, posição lateral e formas irregulares (Damião Filho, 1993). O gênero *Poncirus* é muito empregado na produção de híbridos quando a variedade receptora é poliembriônica e de limbo foliar simples, pois seus descendentes herdam folhas trifoliadas e com pecíolos alados (Cameron e Frost, 1968), distintamente dos embriões nucelares.

Como já foi abordado, todo processo de formação do embrião zigótico inicia-se com a fertilização pelo grão de pólen. O tubo polínico cresce por dentro dos tecidos do estilete e termina penetrando pela parede do ovário até ao óvulo, onde entra pela micrópila e um dos núcleos gaméticos fecunda a oosfera (Ferri, 1990).

Devido à oosfera situar-se próxima à micrópila, é de se supor que o embrião sexual aí permaneça durante uma determinada fase de seu desenvolvimento embrionário e que, se ele se deslocar para dentro do saco embrionário durante a sua maturação, em uma variante poliembriônica, o seu distanciamento da micrópila deve ser limitado pela presença dos embriões nucelares também em desenvolvimento.

•INFLUÊNCIA DO pH E DO ÁGAR SOBRE O CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE CITROS

No Brasil, os trabalhos de melhoramento genético de citros tiveram início por volta de 1935, na Estação Experimental do Instituto Agrônomo de Campinas, em

Cordeirópolis - SP, com testes comparativos entre diferentes porta-enxertos e produção de plantas nucelares (Moreira, 1980).

* Uma barreira para os trabalhos de melhoramento é a ocorrência da poliembrião, que é caracterizada pela presença de dois ou mais embriões na mesma semente (Chapot, 1975; Hearn, 1977). Em trabalhos de hibridação, o embrião zigótico normalmente não se desenvolve quando cultivares poliembriônicas são utilizadas como planta-mãe; freqüentemente, o embrião sexual é suplantado pelos embriões nucelares, antes mesmo da maturação da semente (Moreira e Pio, 1991), havendo a tendência do tamanho do embrião zigótico ser inversamente proporcional a taxa de poliembrião (Soares Filho, 1994b), devendo-se provavelmente ao fato da competição dos embriões por nutrientes e pelo espaço no interior da semente ser menor.

Do ponto de vista prático, a técnica de cultura de tecidos vegetais permite estudar as necessidades nutricionais e físicas dos embriões durante o desenvolvimento *in vitro*, superar a dormência em certos tipos de sementes e, como ferramenta primordial para o melhoramento, resgatar embriões híbridos imaturos de cruzamentos incompatíveis, onde ocorrem barreiras sexuais na formação de sementes (Andreoli, 1986; Pasqual e Pinto, 1988).

O sucesso do cultivo *in vitro* de embriões depende dos fatores genéticos e fisiológicos inerentes aos embriões nucelares e zigóticos, das condições térmicas, fotoperiodismo e meio de cultura, que são também responsáveis pela formação e crescimento dos embriões. Essas exigências podem variar para cada espécie do gênero *Citrus* e, também, dentro de cada cultivar.

Um importante aspecto da cultura de embriões imaturos é definir um meio de cultura que possa sustentar seu crescimento e desenvolvimento. Isto requer, muitas vezes, testar diferentes meios de cultura, não raro modificados de forma empírica (Hu e Ferreira, 1990).

Os elementos minerais são absorvidos pelas diferentes culturas de acordo com as respectivas exigências nutricionais. Todavia, o valor do pH do meio de cultivo, quando bem ajustado, pode promover maior e melhor aproveitamento dos nutrientes pelo explante. Shingha, Oberly e Townsend (1987) citam que a variação de pH no meio de cultura pode ser devida à absorção diferencial dos NH_4^+ e NO_3^- e que a

absorção preferencial de NH_4^+ acarreta uma redução no pH e o meio pode tornar-se líquido dependendo da concentração de ágar. Uma vez em pH ácido, o explante passa absorver NO_3^- e, subseqüentemente, o pH do meio aumenta (Mezzetti, Conte e Rosati, 1991).

Um valor de pH baixo conduz à competição do H^+ com os nutrientes catiônicos (NH_4^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , Cu^{++} , Fe^{++} , Mn^{++} e Zn^{++}) pelas células dos tecidos radiculares e, em valores mais elevados de pH, diminui a absorção de nutrientes aniônicos como o NO_3^- , $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$, Cl^- , e MoO_4^{2-} (Torres e Caldas, 1990; Faquin, Furtini Neto e Vilela, 1996). Quando os íons NH_4^+ desaparecem da solução, os íons NO_3^- passam a ser absorvidos em maior proporção que outros íons e são trocados por OH^- ou HCO_3^- e o pH se eleva rapidamente (Furlani e Furlani, 1988).

Segundo Marino e Battistini (1990), a regeneração e a sobrevivência de brotos de *Actinidia deliciosa* foram intensamente reduzidas em níveis de pH acima de 5,7. Entretanto, melhores respostas de crescimento de calo foram encontradas em valores de pH 7,0 e 7,5.

O ágar é reconhecido por sua ação gelificante. Aspectos relacionados a sua natureza biológica e de produção têm provocado consideráveis variações em sua qualidade, incluindo-se nível e natureza dos contaminantes orgânicos e inorgânicos (Debergh, 1983); essas variações podem ser significativas para o sucesso do cultivo *in vitro*. O ágar, também utilizado como agente tamponante (Shinga, 1982) e controlador de fenômenos de vitrificação e hiperhidratação (Williams e Leopold, 1989), pode ser hidrolisado com a acidez do meio de cultura (Romberger e Tambor, 1971), não polimerizando ao esfriar. Normalmente o ágar é utilizado na faixa de 0,4 a 1,0 % (p/v) para cultura de tecidos de plantas (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1990). George (1993) atribui ao ágar as vantagens de não ser digerido pelas enzimas vegetais e não reagir com os constituintes do meio de cultura.

Stoltz (1971), estudando embriões germinados de *Iris* sp., sugere que a concentração de ágar no meio de cultivo deve ser mantida baixa, suficiente para suportar o peso físico dos embriões, devido às altas concentrações causarem restrição no crescimento dos embriões pela redução na disponibilidade de água.

. Existem diversas marcas comerciais de ágar que freqüentemente são utilizadas em concentrações que variam de 0,4 a 1,0% (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1990; Grattapaglia e Machado, 1990). Na maior parte dos experimentos utiliza-se concentrações que variam de 0,7 a 1,0%, de acordo com a marca (George, 1993), porém recomenda-se minimizar o seu uso ou otimizá-lo no preparo do meio, visto que o ágar é considerado como um componente de custo elevado no preparo do meio de cultura (Shinga, 1984; George, 1993; Peixoto e Pasqual, 1995).

Para a obtenção de uma consistência adequada ao explante a ser cultivado, a concentração de ágar necessária varia conforme a qualidade do ágar e o pH do meio. Geralmente concentrações inferiores a 0,4%, associadas a níveis de pH abaixo de 4,5, resultam em meios menos sólidos ou até mesmo líquidos (Murashige, 1974; Pierik, 1987), a polimerização do ágar após a autoclavagem é bastante reduzida (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1990). Mesmo utilizando uma concentração intermediária de ágar (0,6 %) associada a níveis de pH baixos, Pierik (1987) notou que o meio não se solidifica adequadamente.

Grattapaglia e Machado (1990) e Brand (1993) verificaram um decréscimo percentual de explantes vitrificados quando a concentração de agente solidificante foi aumentada no meio de cultura, porém ocorreu uma redução significativa na multiplicação e crescimento de brotos.

•CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE CITROS: CONCENTRAÇÃO DE SAIS DO MEIO MS E SACAROSE.

Os fatores que mais freqüentemente determinam o sucesso da cultura *in vitro* são a origem do explante e o meio de cultura associados ao conhecimento prévio das células e tecidos cultivados (Gamborg, 1982). O meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) é o mais utilizado na cultura de tecidos da grande maioria das espécies estudadas. Entretanto, na procura de otimizar o crescimento *in vitro*, modificações visando melhor adaptá-lo às exigências dos explantes são comumente utilizadas.

Células, tecidos, órgãos e as plântulas desenvolvidas, possuem baixa ou quase inexistente capacidade fotossintética, razão pela qual requerem carboidratos no meio de cultura para suprimento de suas necessidades metabólicas, participando como fonte de esqueletos carbônicos para vários processos biossintéticos implicados na diferenciação e crescimento das células (Nagao, 1993).

Segundo Caldas, Haridasan e Ferreira (1990), os carboidratos, nas concentrações efetivas do meio de cultura, podem estimular determinado processo e inibir outro, e muitas vezes as concentrações utilizadas para promover o crescimento dos explantes são inibitórias para a síntese de clorofila. Entre os carboidratos a sacarose é a mais utilizada, seja pela sua alta solubilidade ou pela rápida metabolização, pois os produtos de sua hidrólise (glicose e frutose), quando no interior da célula, entram na via glicolítica, rota da pentose fosfato, ou são armazenados na forma de amido (Thorpe e Beaudoin-Eagan, 1984).

Na cultura de embriões há a tendência de embriões imaturos germinarem, não obedecendo os estádios normais de embriogênese, originando "seedlings" fracos e mal formados. Meios com alta concentração de sacarose têm sido usados para minimizar esse processo (Pasqual e Pinto, 1988). Culturas de embriões de *Datura* nos estádios iniciais de desenvolvimento necessitam de concentrações elevadas de sacarose (8 - 12%), que é gradativamente reduzida até atingir a maturidade (Hu e Ferreira, 1990). Para os citros, concentrações ótimas podem variar de 2 a 7 % de acordo com o explante utilizado (Navarro, Ortiz e Juarez, 1985).

→ A alta concentração de sais do meio MS, comparada a outros meios, e especificamente nos níveis de amônio ($-NH_4$) e nitrato ($-NO_3^-$), pode ser crítica no processo de morfogênese e crescimento (Sakuta e Komamine, 1987), estando, pois, a demanda energética fornecida pelo metabolismo de carboidratos para a assimilação desses íons relacionada com o sucesso da cultura *in vitro*.

•CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE CITROS: EFEITOS DO ÁCIDO GIBERÉLICO E DO CARVÃO ATIVADO

• A citricultura gerou divisas de US\$ 1,5 bilhão no exercício de 1990/1991, atingindo uma área cultivada superior a um milhão de hectares, elevando o Brasil ao primeiro lugar na produção de frutos e exportação de suco concentrado congelado de laranja (EMBRAPA, 1992). Contudo, para a manutenção desta supremacia, a citricultura brasileira necessita que pesquisas avancem principalmente nas áreas de melhoramento de copas e porta-enxertos, buscando cultivares compatíveis e adaptadas às várias regiões que apresentam potencial para a citricultura no País.

Inúmeros são os porta-enxertos usados devido à diversidade existente entre as copas utilizadas comercialmente e, também, por consequência da facilidade de hibridações e alta taxa de mutação nas espécies e variedades cítricas (Moreira e Pio, 1991). O porta-enxerto limão 'Cravo' é utilizado em mais de 80% dos pomares implantados (Pompeu Junior, 1991). Já o *P. trifoliata* tem entre suas características a adaptação às regiões de temperaturas baixas e/ou com solos rasos. Híbridos intergenéricos provenientes desses dois parentais podem vir a apresentar características satisfatórias para a adaptação dos citros a novas regiões.

→ • Uma barreira para os trabalhos de melhoramento é a ocorrência da poliembrião, que é caracterizada pela presença de dois ou mais embriões na semente em diferentes fases de desenvolvimento: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar, o que dificulta a identificação do embrião zigótico e compromete o seu desenvolvimento, pela competição com os embriões nucelares (Pasqual, 1990). Esses embriões originam "seedlings" mal formados quando germinam antes de atingirem o completo desenvolvimento. O cultivo dos embriões *in vitro* pode assegurar-lhes a sobrevivência e auxiliar na identificação do embrião zigótico.

• Evidências mostram que o efeito de giberelinas é dependente da idade dos embriões e do sítio de absorção do hormônio (Raghavan e Torrey, 1964). Segundo Rêgo (1984), dados analíticos comprovam o fato de que as giberelinas aumentam a produção de auxina, sendo provável que elas estejam relacionadas com múltiplos

processos bioquímicos, inclusive na conversão do triptofano em auxina. Nos vegetais, as giberelinas participam de muitas atividades fisiológicas importantes (Crocomo e Cabral, 1988), tendo efeito no crescimento, especialmente no alongamento caulinar.

• O número de giberelinas conhecidas supera a marca de sessenta, de modo que a resposta do tecido pode depender da utilização da giberelina específica apropriada para cada espécie. O ácido giberélico (GA_3) e uma mistura de GA_4+GA_7 , são os mais disponíveis comercialmente, contudo, poucas culturas *in vitro* mostram respostas às giberelinas (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1990).

Os efeitos do GA_3 , de acordo com Kochba et al. (1974), são os de promover o desenvolvimento ontogênico natural dos embriões sem primórdio radicular àqueles com primórdio, e proporcionar diretamente a iniciação de uma zona meristemática radicular e/ou estimular o desenvolvimento de uma zona radicular existente.

• A incorporação de 1,0 mg/L de GA_3 aumenta o desenvolvimento de raízes em embriões de citros, plenamente ou parcialmente desenvolvidos (Button e Bormman, 1971; Kochba et al., 1974).

• 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 3,0 % (Pasqual, 1990). Tilquin (1979) relata o uso de 1,0 g/L de carvão ativado em meios nutritivos para estimular o enraizamento de *Cassava* sp.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1: ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E A LOCALIZAÇÃO DO EMBRIÃO ZIGÓTICO EM SEMENTES DE CITROS

Os experimentos foram realizados no Setor de Fruticultura e Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Lavras, MG, Brasil, no período de Setembro de 1994 a Junho de 1995.

Plantas adultas de laranjeira 'Natal' (*C. sinensis*) e *P. trifoliata* apresentando bom estado sanitário foram, respectivamente, selecionadas como progenitores feminino e masculino para os trabalhos de hibridação.

Botões florais de *P. trifoliata* no estágio de balão foram coletados e armazenados em placas de petri por aproximadamente 48 h até a antese e abertura das anteras, quando foram fertilizadas as inflorescências da laranjeira 'Natal', que também se encontravam no estágio de balão.

As polinizações foram executadas nas horas de insolação mais brandas, ou seja, até às 9:00 h e após às 16:00 h, compreendendo seis plantas, totalizando 208 cruzamentos intergenéricos.

As flores femininas foram emasculadas e depois de friccionar anteras em fase de liberação de grãos de pólen sobre seus estigmas, cada flor foi protegida com saco de papel e etiquetada, eliminando-se as demais flores, deixando apenas uma flor por ramo.

Das 208 flores polinizadas, 10 flores foram de fato fecundadas e, destas, seis frutos sofreram queda fisiológica. Os frutos restantes que permaneceram nas plantas e identificados como 1, 2, 3, e 4, foram coletados para análise ao completarem respectivamente 120, 130, 140 e 150 dias após a hibridação. No Laboratório de Cultura de Tecidos, da UFLA, suas sementes removidas foram tratadas com álcool- 70% por dois minutos e em seguida com hipoclorito de sódio- 1% por 15 minutos.

Os seguintes caracteres físicos dos frutos foram avaliados: peso da matéria fresca, peso da matéria seca, número de lóculos, número de sementes, diâmetro longitudinal e diâmetro transversal.

Em câmara de fluxo laminar contínuo os embriões pertencentes a cada semente foram excisados e inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo alíquotas de 15 ml do meio nutritivo MS (Murashige e Skoog, 1962) acrescido de 60 g/L de sacarose. Ao se inocular, foram avaliados os seguintes caracteres: estágio de desenvolvimento dos embriões (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar), cor do embrião (clorofilado ou não), localização do embrião no saco embrionário (próximo à inserção micropilar da semente ou mais interiormente no saco embrionário).

Os embriões permaneceram na ausência de luminosidade por 48 horas, sendo depois levados à sala de crescimento à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de $35 \mu \text{ moles m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Os embriões germinados, ao atingirem o estágio de "seedling", foram classificados quanto a origem (sexual ou nucelar) pela presença ou não de folhas trilobadas.

A partir da observação desses caracteres foram construídas tabelas de contingência de dupla entrada, para testar relações de dependência entre elas, duas a duas. Para tanto, foi utilizado o teste de χ^2 (qui-quadrado), agrupando as classes cordiforme e torpedo devido ao baixo número, para evitar muitas ocorrências de frequência esperada menor do que cinco. No caso dos caracteres natureza do "seedling" (zigótico ou nucelar) e localização na semente, por se tratar de uma tabela de contingência 2x2, foi aplicado o teste exato de Fisher (Pimentel Gomes, 1987).

Foram também avaliados aspectos gerais como desenvolvimento de raiz e da parte aérea, formação de embriões e embriões não germinados.

3.2 INFLUÊNCIA DO pH E DO ÁGAR SOBRE O CULTIVO DE EMBRIÕES DE LARANJAS 'PÊRA' E 'NATAL'.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram utilizados frutos de polinização livre com aproximadamente 5,5 cm de comprimento, coletados na mesma planta, de laranjeira 'Pêra' (Experimento 3.2.1.) e 'Natal' (Experimento 3.2.2.), previamente selecionadas por apresentarem melhores condições fitossanitárias.

A amostragem relativa ao número de frutos e sementes, utilizados de cada cultivar, esteve pautada à quantidade de embriões necessários a cada experimento, inoculando-se todos os embriões encontrados, independentemente de seus estádios de desenvolvimento.

Os frutos após serem lavados tiveram suas sementes removidas e, em câmara de fluxo laminar, sofreram assepsia com álcool - 70% por cinco minutos e hipoclorito de sódio - 2% por 20 minutos, sendo em seguida lavadas três vezes em água bidestilada autoclavada. Com o auxílio de microscópio estereoscópico, bisturi e pinça, os tegumentos das sementes foram excisados longitudinalmente a partir da região oposta à micrópila, tomando-se o cuidado de não provocar injúrias aos embriões.

Todos os embriões, independentemente dos estádios em que se encontravam, foram inoculados em meio MS, acrescido de ágar (0,0; 3,5; 7,0; 10,5 e 14,0 g/L), ajustados em diferentes valores de pH (3,7; 4,7; 5,7 e 6,7), em todas as combinações possíveis. Esses tratamentos permaneceram por 48 h no escuro e, posteriormente, em sala de crescimento à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 16 h diárias em intensidade luminosa de $35 \mu \text{ moles m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Passados 45 dias, as plântulas foram avaliadas com base nos seguintes caracteres:

- Experimento 3.2.1 - Comprimentos da haste caulinar e do sistema radicular, peso da matéria fresca e porcentagem de sobrevivência.

- Experimento 3.2.2 - Porcentagem de sobrevivência, comprimento do sistema radicular, número de pares de folhas, comprimento da haste caulinar e peso da matéria fresca por plântula.

Em delineamento inteiramente casualizado, foram usadas quatro repetições, cada uma constituída por quatro tubos de ensaio com 15 ml do meio, em esquema fatorial, sendo as variáveis comprimento do sistema radicular e número de pares de folhas transformadas segundo raiz ($X+0,5$) e porcentual de sobrevivência segundo $\log(x+1)$, para fins de análise estatística.

3.3 EXPERIMENTOS: 3.31. "CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE LARANJEIRA 'PÊRA': CONCENTRAÇÕES DE SAIS DO MEIO MS E SACAROSE".

3.3.2. "CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE *Citrus limonia* \times *Poncirus trifoliata*: EFEITOS DO ÁCIDO GIBERÉLICO E DO CARVÃO ATIVADO."

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram utilizados frutos de uma única planta de laranja 'Pêra' (Experimento 3.3.1.), e de uma planta híbrida (*C. limonia* \times *P. trifoliata*. - Experimento 3.3.2.).

Os frutos colhidos foram lavados, suas sementes removidas e, em câmara de fluxo laminar, sofreram assepsia com álcool - 70 % por cinco minutos e hipoclorito de sódio - 2 % por 20 minutos, sendo em seguida lavadas três vezes em água bidestilada e autoclavada. Com o auxílio de lupa, bisturi e pinça, as sementes foram excisadas longitudinalmente inicialmente pela região oposta à micrópila, tomando-se o cuidado de não causar injúrias nos embriões.

i) Tratamentos:

- **Experimento 3.3.1.** - Todos os embriões de laranja 'Pêra', independentemente dos estádios em que se encontravam, foram inoculados em tubos de ensaio (150 x 20 mm) contendo meio Murashige e Skoog (1962): (0/4; 1/4; 2/4; 3/4 e

4/4) acrescido de sacarose (0,0; 15,0; 30,0 e 60,0 g/L), em todas as combinações possíveis.

- **Experimento 3.3.2.** - Todos os embriões de *C. limonia* χ *P. trifoliata*, independentemente dos estádios em que se encontravam, foram inoculados em meio acrescido de GA₃ (0,0; 0,01; 0,1 e 1,0 mg/L) e carvão ativado (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 g/L), em todas as combinações possíveis.

Os experimentos permaneceram por 48 h no escuro e, posteriormente, em sala de crescimento à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ com 16 h de iluminação a 1500 lux. A quantidade de frutos, sementes e embriões utilizados nos experimentos 3.3.1. e 3.3.2., seguiram os mesmos critérios dos experimentos 3.2.1. e 3.2.2.

ii) Avaliações:

Passados 45 dias, os "seedlings" foram avaliados pelas características apresentadas:

- **Experimento 3.3.1.** - Comprimento da parte aérea e do sistema radicular, porcentagem de sobrevivência e número de pares de folhas.
- **Experimento 3.3.2.** - Comprimento da parte aérea e do sistema radicular e porcentual de sobrevivência.

Foram usadas 4 repetições, cada uma constituída de quatro tubos de ensaio com 15 ml do meio em delineamento em blocos casualizados e esquema fatorial 4x4, sendo os dados das variáveis comprimento da parte aérea e do sistema radicular transformados em raiz quadrada ($X+0,5$) e o porcentual de sobrevivência em $\log(x+1)$, para efeito de análise estatística.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXPERIMENTO 1: ESTÁDIO DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E A LOCALIZAÇÃO DO EMBRIÃO ZIGÓTICO EM SEMENTES DE CITROS

A Tabela1 apresenta as características físicas dos frutos aos 120, 130, 140 e 150 dias de idade. O fruto obtido 120 dias após a polinização não continha sementes e possivelmente se desenvolveu partenocarpicamente devido à incompatibilidade intergenérica inerente ao cruzamento. Porém esta hipótese contrasta com os demais cruzamentos entre os mesmos parentais que produziram frutos com sementes.

A hipótese mais provável, com base nos resultados de pesquisa realizada por Pasqual, Ribeiro e Ramos (1990) com sementes de frutos decorrentes de fertilização não controlada em laranjeira 'Natal', é a de que frutos com idade precoce podem ainda não possuir sementes plenamente desenvolvidas. A quantidade de sementes por fruto pode também variar em função de fertilidade, clima (Wong, 1940), hereditariedade, fatores evolucionários, ambientais e fisiológicos. Já o número de embriões contidos numa semente é influenciado pela cultivar, estado nutritivo do fruto, fatores ambientais e parental polinizador (Frost e Soost, 1968; Ogata, 1981).

Os embriões das sementes colhidas nos demais frutos foram agrupados em uma única classe, ou seja, com idades de 130 , 140 e 150 dias, visando uma ampla visão desse intervalo a partir da fecundação.

Pela Tabela 1A (Apêndices) são apresentadas todas as características avaliadas pertinentes aos resultados do experimento. Do total de 39 embriões excisados das oito sementes obtidas, 26 embriões apresentaram folhas iguais às da planta-mãe e três não germinaram; dos 10 embriões restantes, três apresentaram folhas trilobadas, sendo portanto embriões de natureza sexual.

Tabela 1. Características físicas apresentadas pelos frutos obtidos pelo cruzamento de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Natal \times *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., aos 120, 130, 140 e 150 dias após a polinização. UFLA, Lavras, MG, 1997.

Características físicas dos frutos	120 dias	130 dias	140 dias	150 dias
Diâmetro longitudinal (cm)	4,30	4,30	4,00	4,60
Diâmetro. Transversal (cm)	3,20	3,80	4,00	4,20
Peso da matéria fresca (g)	33,30	35,98	32,66	36,50
Peso da matéria seca (g)	2,70	4,63	3,26	2,75
Número de gomos	8	9	10	10
Número de sementes	0	3	2	3
Número de embriões	0	20	4	15

Como dos cruzamentos efetuados foram desenvolvidas oito sementes, foi esperado igual número de embriões zigóticos. Supõe-se, por exclusão, que os cinco híbridos restantes estejam contidos entre os embriões que não germinaram ou que ao germinar originaram "seedlings" mal formados, para os respectivos comportamentos de cada semente. Os três embriões zigóticos que alcançaram o pleno desenvolvimento nas três sementes relatadas (Foto 1c), encontravam-se no estágio cotiledonar, caracterizado pelas baixas exigências exógenas para germinar e desenvolver.

Os embriões sexuais desenvolvidos das sementes nº 2 e 3 do fruto de 130 dias e de nº 1 do fruto de 140 dias, corroboram a hipótese de haver um embrião zigótico por semente. Verifica-se também pela semente nº 2 do fruto de 130 dias a proliferação de embriões a partir de embrião em fase cordiforme, juntamente com o

desenvolvimento do embrião sexual (estádio cotiledonar), caracterizando o surgimento de embriões a partir de um único embrião inoculado como fenômeno relacionado ao estágio de desenvolvimento embrionário, independente de sua natureza ser zigótica ou não. Segundo Moreira e Pio (1991), as sementes pertencentes aos frutos dos citros freqüentemente contêm embriões desenvolvidos de origem nucelar, além do embrião zigótico.

Esses dados vão ao encontro das afirmações de Pasqual e Pinto (1988), de que embriões imaturos podem germinar precocemente com tendência a pularem estádios normais de embriogênese, originando "seedlings" fracos e mal formados, sendo a germinação precoce caracterizada por um período de rápidas divisões celulares não acompanhadas por alongamento celular.

Embriões raramente germinam se não permanecem unidos ao nucelo, calo, ou outros embriões e ao atingirem o tamanho de três a seis mm necessitam ser individualizados em meio de cultura fresco, para que tenha continuidade seu processo de desenvolvimento (Navarro e Juarez, 1977). Se individualizados há proliferação de embriões pelo processo de gemação (Esau, 1973), na maioria dos casos a partir de seus hipocótilos ou células superficiais (Kochba, Spiegel-Roy e Safran, 1972). A alta atividade meristemática dos tecidos jovens do embrião, em fase de diferenciação celular, é observada já inicialmente quando o zigoto sofre a sua primeira divisão, direcionando uma das duas células à formação do suspensor e a outra, através de divisões celulares freqüentes, ao embrião (Esau, 1974; Ferri, 1990). Logo, pode ter ocorrido em certa fase a separação entre células de alta atividade meristemática que quando individualizadas e diferenciadas, deram origem aos embriões relatados.

Ainda pela Tabela 1A, observa-se que para as cinco sementes restantes não ocorreu a germinação do embrião zigótico, surgindo apenas embriões de natureza nucelar e a proliferação de embriões a partir da inoculação de embriões em fase globular e cordiforme, que ao germinarem desenvolveram-se em plântulas mal formadas.

O surgimento de somente embriões nucleares e a proliferação de embriões a partir de um único embrião nas sementes nº 2 do fruto de 140 dias, e nas sementes de nºs 1, 2, e 3 do fruto de 150 dias de idade, leva a crer que sejam estes os

embriões sexuais. Observa-se também para a semente nº 2 do fruto de 150 dias, a proliferação de embriões a partir de dois embriões inoculados separadamente (estádios globular e cordiforme), devendo ser um deles o de natureza zigótica. Já para a semente nº 1 do fruto de 130 dias de idade, observa-se que o embrião zigótico deve ser aquele inoculado no tubo em que houve proliferação de embriões ou algum dos outros três embriões que não chegaram a se desenvolver, e ainda, observa-se que os mesmos foram encontrados na região micropilar da semente e em grande maioria em estádios globular e cordiforme de desenvolvimento.

Também verifica-se na semente nº 1 do fruto de 140 dias a singularidade da característica monoembriônica para essa semente e do embrião zigótico encontrar-se na região micropilar e em estágio cotiledonar, contrastando, pois, com os dois embriões zigóticos desenvolvidos em sementes poliembriônicas que em igual estágio de desenvolvimento situaram-se mais interiormente na semente. Esses dados estão de acordo com os obtidos por Maheswari e Rangaswamy (1958), que relatam a origem e o desenvolvimento de embriões na extremidade do nucelo e que os embriões nucleares ao se projetarem para dentro do saco embrionário levam consigo o sexual.

Para as análises estatísticas considerou-se a possibilidade da existência de somente um embrião zigótico em cada semente formada; entretanto, a existência de outro tipo de poliembrião é citada por Bacchi (1943), onde a formação de mais de um embrião por semente pode estar relacionada a uma divisão da oosfera após a fecundação, em duas ou mais.

Observa-se ainda, pela Tabela 1A, que dos sete embriões que se manifestaram na formação de embriões seis localizaram-se na região micropilar da semente, cinco encontravam-se em estádios globulares e dois em estádios cordiformes de desenvolvimento.

Os estádios de desenvolvimento embrionário e a localização na semente mostraram relação de dependência significativa pelo teste de χ^2 (qui-quadrado), com $\alpha < 0,0100$ (Tabela 2). Embriões em fases de menor desenvolvimento situam-se mais próximos à micropila, antagonicamente aos mais desenvolvidos. Isso sugere que o desenvolvimento embrionário se dê neste sentido, possivelmente pelo maior espaço físico disponível no interior da semente ou em razão da necessidade do desenvolvimento

com o endosperma por esses embriões devido a fatores relacionados à nutrição. Pela Figura 1 visualiza-se a distribuição dos embriões em estádios de desenvolvimento embrionário em relação às regiões da micrópila e ao interior da semente.

Tabela 2 - Frequências observadas de embriões em diferentes estádios de desenvolvimento após 130, 140 e 150 dias da polinização, em relação as suas localizações na semente. UFLA, Lavras, MG, 1997.

LOCALIZAÇÃO	ESTÁDIOS		
	globular	cordiforme/torpedo	cotiledonar
Na região micropilar da semente	9(3,92)	7(7,41)	1(5,67)
No interior da semente	0(5,08)	10(9,59)	12(7,33)

$\chi^2_{\text{calculado}} = 18,53$ ($\alpha < 0,0100$)

Frequência esperada, entre parênteses.

A Tabela 3 especifica a localização dos embriões zigóticos e nucelares na semente. Estas características apresentaram relação de dependência significativa, de acordo com o teste exato de Fisher ($\alpha < 0,0800$). Observa-se que cinco dos oito embriões sexuais encontravam-se na região micropilar do saco embrionário. Este dado é embasado pela localização da oosfera na estrutura do óvulo próximo à micrópila (Maheswari e Rangaswamy, 1958; Ferri, 1990; Damião Filho, 1993), delegando à região micropilar o local de origem e de desenvolvimento inicial do embrião zigótico.

Pode-se fazer inferências de que na faixa de 130 a 150 dias após a fertilização os embriões híbridos situam-se em grande maioria na região micropilar da semente, em estágio globular de desenvolvimento (Figura 1), não tendo sido ainda encaminhados para dentro da semente pelo supensor (Damião Filho, 1993; Maheswari e Rangaswamy, 1958), ou pela ação dos embriões nucelares.

As Fotos 1b e 1c retratam a posição do embrião globular na região micropilar da semente, que acredita ser o zigótico. Observou-se nestes embriões, embora não tenha sido constatado estatisticamente, uma coloração esverdeada intensa, maior intumescimento em contraste aos demais embriões em mesmo estágio

de desenvolvimento e, ao tentar removê-los, notava-se também estarem firmemente ligados aos demais tecidos, acarretando uma maior dificuldade no processo.

Tabela 3 - Frequências observadas dos embriões zigóticos e nucelares em relação às localizações na semente, UFLA, Lavras, MG, 1997.

LOCALIZAÇÃO	EMBRIÃO	
	zigótico	nucelar
na região micropilar da semente	5	7
no interior da semente	3	19

$\alpha < 0,0800$, pelo Teste Exato de Fisher

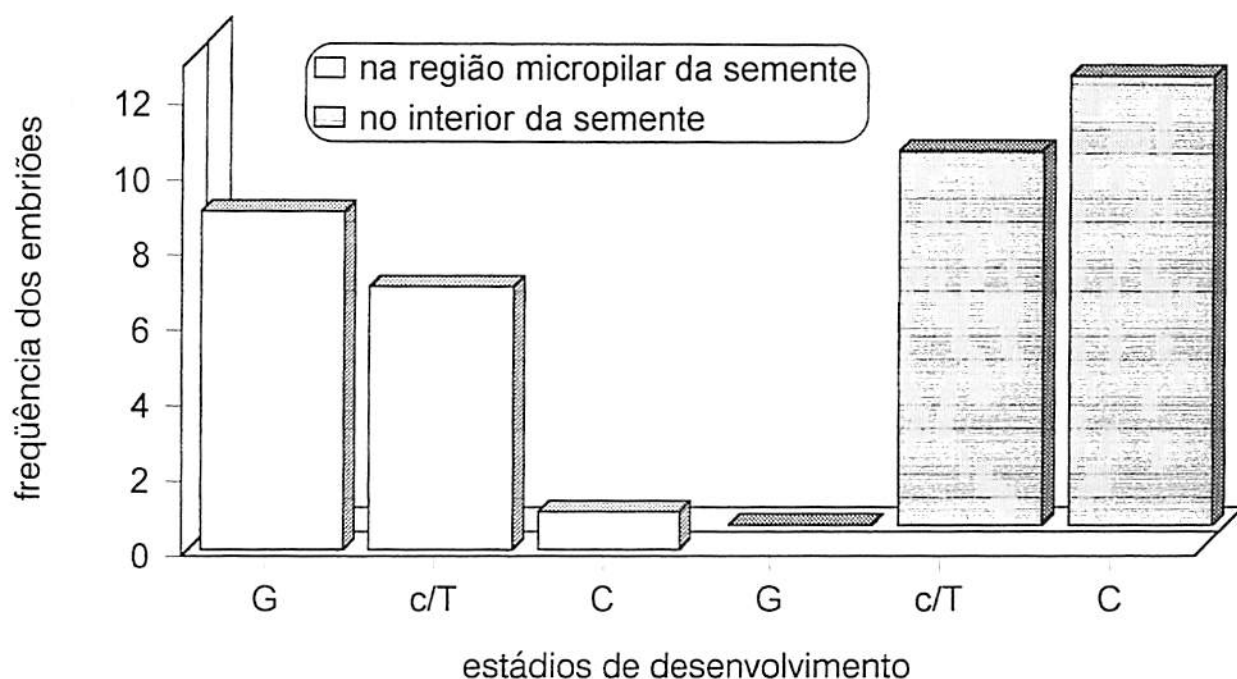


Figura 1 - Frequência de embriões nos diferentes estágios de desenvolvimento após 130 a 150 dias da polinização (G- globular; c/T- cordiforme/torpedo; C- cotiledonar). UFLA, Lavras, MG, 1997.

A relação entre estádios de desenvolvimento embrionário e a caracterização da origem do embrião, quanto sexual ou nucelar, foi significativa pelo teste de qui quadrado ($\alpha < 0,0500$), conforme demonstra a Tabela 4.

Tabela 4 - Frequências observadas de embriões nos diferentes estádios de desenvolvimento após 130, 140 e 150 dias da polinização. UFLA, Lavras, MG, 1997.

EMBRIÃO	ESTÁDIOS		
	globular	cordiforme/torpedo	cotiledonar
zigótico	4(1,65)	1(3,29)	3(3,06)
nucelar	3(5,35)	13(10,71)	10(9,94)

$\chi^2_{\text{calculado}} = 6,46$ ($\alpha < 0,0500$)

Frequência esperada, entre parênteses

Pela Tabela 4 nota-se que os cinco embriões referidos na Tabela 2, localizados na região micropilar, devem ser os embriões com as características globular (4) e cordiforme/torpedo (1). O fato dos três embriões zigóticos, que foram identificados pelas folhas trifoliadas presentes, estarem no estágio cotiledonar (Tabela 4), ratifica o processo pelo qual o embrião sexual durante o crescimento é projetado pelo suspensor para junto do endosperma, encontrando-se nesta região em estágio ulterior de desenvolvimento.

4.2 - EXPERIMENTO 2: INFLUÊNCIA DO pH E DO ÁGAR SOBRE O CULTIVO DE EMBRIÕES DE LARANJAS 'PÊRA' E 'NATAL'.

• 4.2.1. Laranja 'Pêra'.

O fator pH, ao contrário do fator ágar, apresentou resposta significativa pelo teste F ($\alpha < 0,0100$) para todas as variáveis avaliadas (Tabela 5); a interação entre

os dois fatores foi significativa para as variáveis comprimento do sistema radicular e porcentagem de sobrevivência aos níveis de 1% e 5%, respectivamente.

Na Tabela 2A, apresenta-se o resumo das equações de regressão das concentrações do fator ágar dentro do fator pH, para as variáveis porcentagem de sobrevivência e comprimento do sistema radicular dos embriões de laranja 'Pêra'.

A Figura 2 indica uma queda linear no peso da matéria fresca com o aumento dos valores do pH. O maior peso da matéria fresca, obtido em pH 3,7 (156 mg), pode ser explicado pela tendência de absorção de água pelos tecidos das plântulas quando cultivadas em meio mais aquoso (Stoltz, 1971; Williams e Leopoldo, 1989), devido à hidrólise do ágar autoclavado em meio mais acidificado (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1990).

Tabela 5. Análise de variância considerando as variáveis comprimentos da parte aérea e do sistema radicular, peso da matéria fresca e porcentual de sobrevivência de embriões de laranja 'Pêra' (*Citrus sinensis* L. Osbeck). UFLA, Lavras, MG, 1997.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio			
		Comprimento da raiz	Comprimento da parte aérea	Peso da matéria fresca	Porcentagem de sobrevivência
pH	3	4,9681**	1,7228**	0,0681**	1,0865**
Ágar	4	0,5351*	0,1676	0,0041	0,0613
pH * Ágar	12	0,4902**	0,2492	0,0090	0,0494*
Resíduo	60	0,1880	0,1800	0,0100	0,0250
** $\alpha < 0,0100$	C.V.=	29,421 %	39,140 %	18,925 %	18,466 %
* $\alpha < 0,0500$					

Analisando num sentido mais amplo o desenvolvimento das plântulas pelos comprimentos da haste caulinar e do sistema radicular (Figuras 3 e 4 respectivamente), observa-se que o pH 4,7 foi o que promoveu maior crescimento da haste caulinar (1,5 cm).

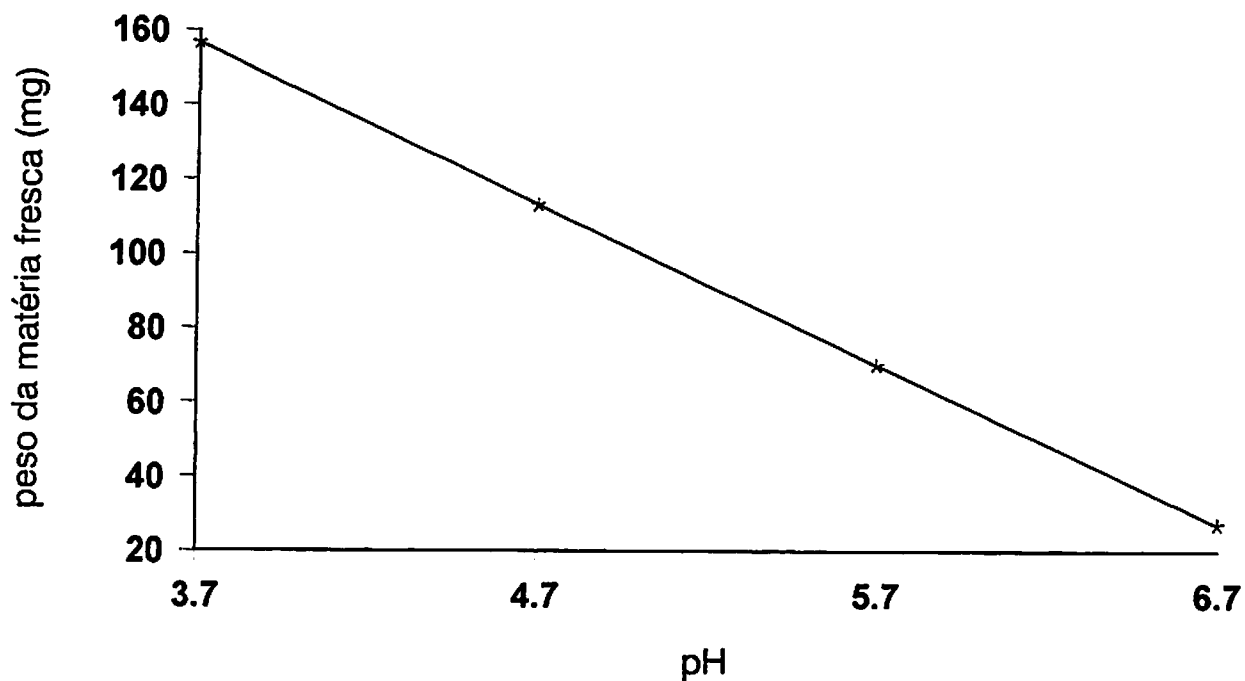


Figura 2 - Efeito do pH sobre o peso da matéria fresca de embriões de laranjeira 'Pêra' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.]. UFLA, Lavras, MG, 1997.

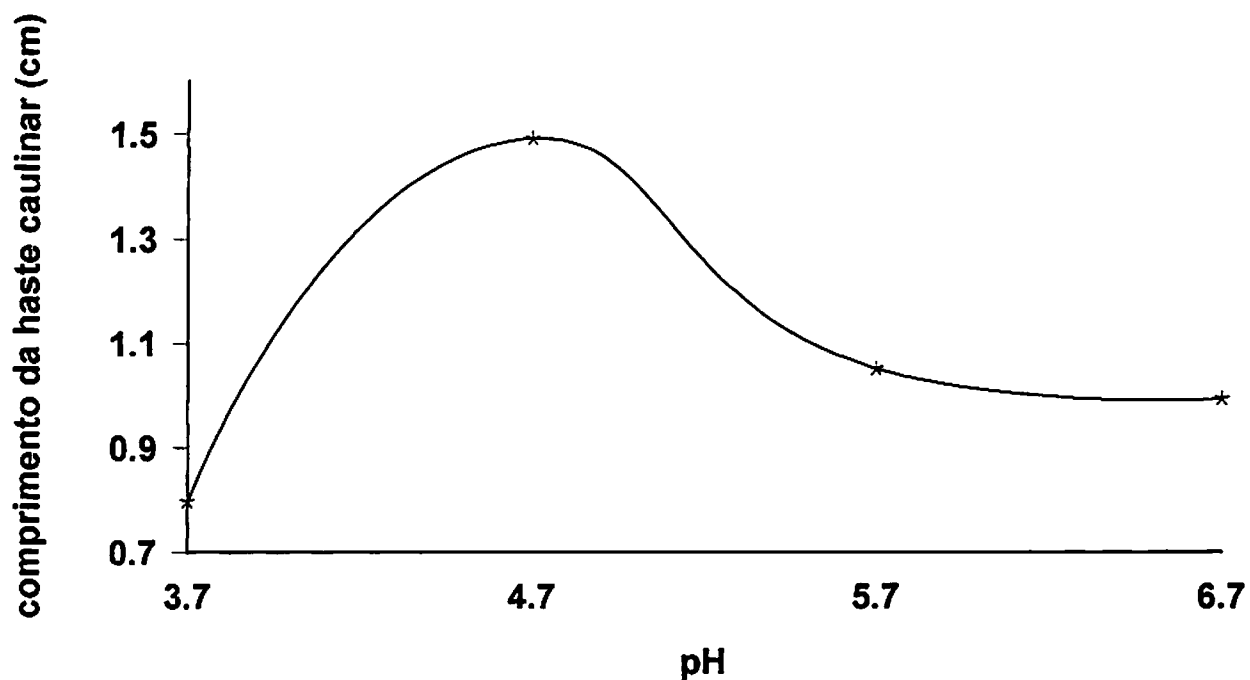


Figura 3 - Efeito do pH sobre o comprimento da haste caulinar de embriões de laranjeira 'Pêra' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.]. UFLA, Lavras, MG, 1997.

Independentemente da concentração de ágar utilizada, o maior comprimento do sistema radicular foi alcançado na faixa situada entre pH 4,5 e 5,2, indicando, portanto, que o pH em torno de 4,7 foi o mais adequado para o cultivo *in vitro* de embriões de laranjeira 'Pêra'.

De forma semelhante, Handro e Floh (1990) relatam que o controle da organogênese é feito mediante a introdução exógena de sais e de substâncias diversas e que fatores físicos do meio podem exercer efeitos sobre as culturas assim como o pH, a temperatura e a luz. Para algumas culturas, variações nesses fatores podem ocasionar diferentes respostas morfogênicas. Calo de *Solanum tuberosum* cresceu num pH de 5,0 ou 5,5 e cultura de raízes de tomateiro teve o crescimento ótimo com o pH inicial de 4,9, segundo Lingappa e Petru, citados por Caldas Haridasan e Ferreira (1990).

Observa-se, pela Figura 4, que as concentrações de 0,0 e 10,5 g/L de ágar promoveram um maior crescimento radicular com o pH situado em 4,7; e que a concentração de 7,5 g/L de ágar manteve a menor oscilação para todos os níveis de pH, com comprimentos variando entre 1,4 a 2,0 cm, em pH 6,7 e 3,7, respectivamente.

De acordo com Romberger e Tabor (1971), altas concentrações de ágar, ou meios muito consistentes, podem limitar a difusão de nutrientes até o explante. O pH afeta a consistência do meio de cultura e, se este for autoclavado em pH abaixo de 4,5 ocorre hidrólise do ágar, que impede a sua polimerização ao esfriar e, considerando-se as altas concentrações dos níveis de sais do meio MS, a concentração de 7,0 g/L de ágar é a recomendada (Murashige e Skoog, 1962).

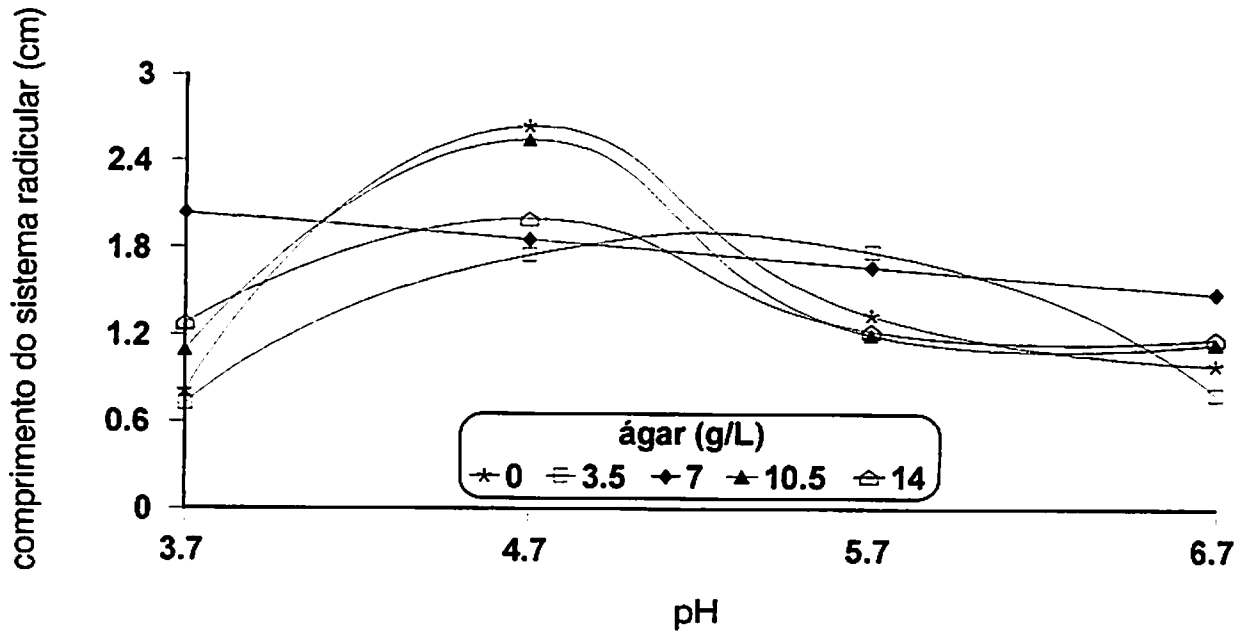


Figura 4 - Efeito do pH na presença do ágar sobre o comprimento do sistema radicular de embriões de laranja 'Pêra' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. UFLA, Lavras, MG, 1997.

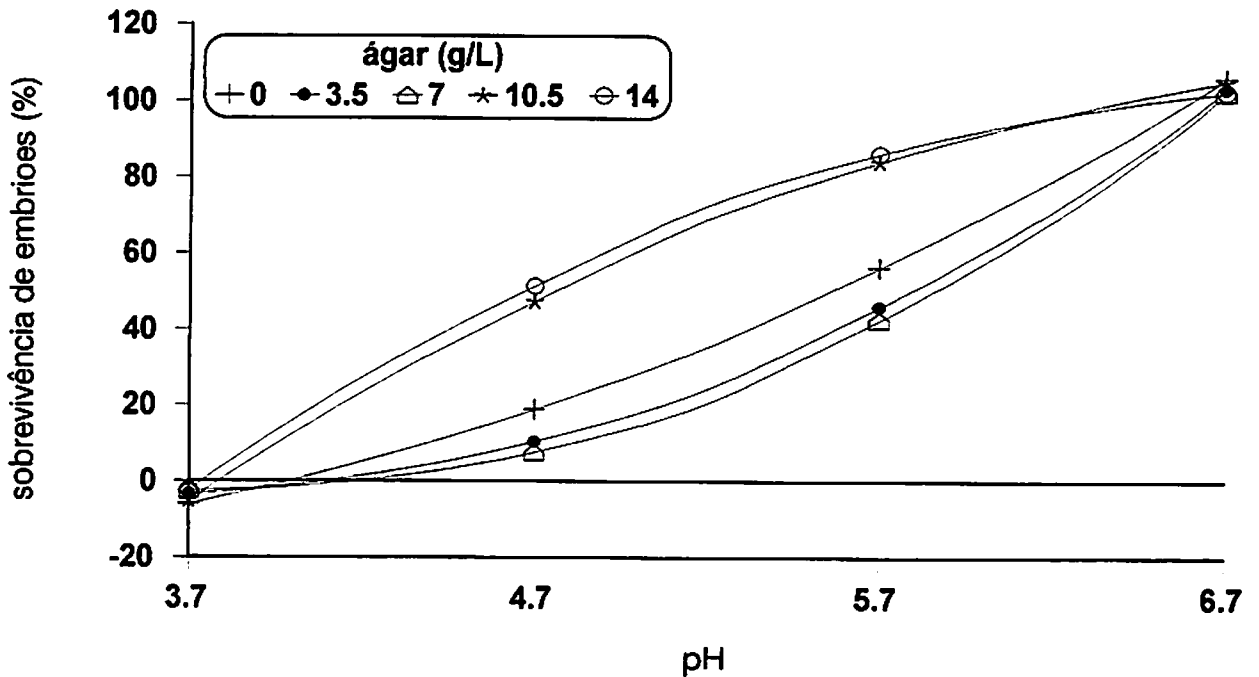


Figura 5 - Efeito do pH na presença do ágar sobre a porcentagem de sobrevivência de embriões de laranja 'Pêra' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.]. UFLA, Lavras, MG, 1997.

Observa-se, na Figura 5, que para todas as concentrações de ágar, dentro do fator pH, houve acréscimo do porcentual de sobrevivência com a elevação do pH do meio.

Esses dados corroboram com as observações de Hu e Ferreira (1990), segundo as quais o intervalo de pH entre 5,0 e 6,0 parece satisfatório para o crescimento dos embriões da maioria das espécies.

• 4.2.2. Laranja 'Natal'.

Observa-se na Tabela 6 que o fator ágar, ao contrário do fator pH, apresentou respostas significativas para todas as variáveis, havendo ainda interação significativa entre os fatores para as variáveis comprimento de raiz, peso da matéria fresca, porcentagem de sobrevivência e número de pares de folhas.

Tabela 6. Análise de variância considerando as variáveis comprimentos da haste caulinar e do sistema radicular, peso da matéria fresca, porcentagem de sobrevivência e número de folhas de embriões da laranjeira 'Natal' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. UFLA, Lavras, MG, 1997.

Fonte de variação	GL	Quadrado				
		Comprimento de raiz	Comprimento da haste caulinar	Peso da matéria fresca	Porcentagem de sobrevivência	Número de folhas
Ágar	4	2.6242**	0.8866**	20028.4326**	5237.8938**	4.1699**
pH	3	0.2459	0.0092	2635.6022	597.5458	0.2615
Ágar * pH	12	0.5527**	0.0795	4086.0557 **	751.2438**	0.3523**
Resíduo	60	0.1027	0.0418	1708.4111	253.8125	0.1116
** $\alpha < 0.0100$	CV=	19.181 %	18.668 %	50.159 %	21.628 %	20.401 %

Na Tabela 3A são apresentadas as equações de regressão dos níveis do fator pH na presença do ágar. Observa-se pela Figura 6 que maior percentual de sobrevivência (100%) foi conseguido com o valor de pH 6,7 quando associado à concentração de 9,39 g/L de ágar. Segundo Malavolta (1980), o pH exerce efeito indireto na absorção dos elementos, nutrientes ou não, sendo os valores de pH de 6,0 a 6,5 os mais favoráveis para o crescimento das plantas, visto que nesta faixa a disponibilidade é máxima para os macronutrientes e não limitante para os micronutrientes. Hu e Ferreira (1990) relatam que o intervalo de pH entre 5,0 e 6,0 parece satisfatório para o crescimento dos embriões da maioria das espécies.

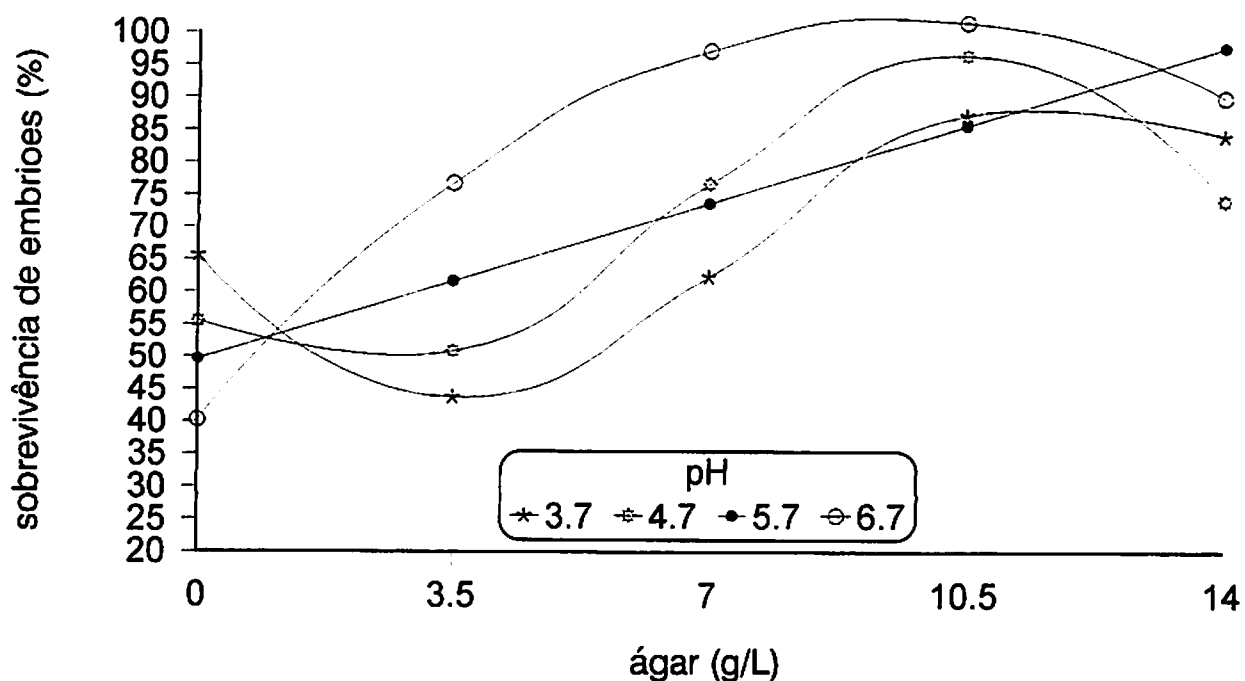


Figura 6 - Efeito do ágar na presença do pH sobre o percentual de sobrevivência de embriões de larajeira 'Natal' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. UFLA, Lavras, MG, 1997.

A Figura 7 demonstra que quando os valores de pH passaram de 6,7 a 4,7 maiores foram os comprimentos de raízes, obtendo-se 2,29 cm de comprimento com o valor de pH 4,7, em concentração de 7,92 g/L de ágar. Calo de *Solanum tuberosum* cresceu num pH de 5,0 ou 5,5, e cultura de raízes de tomateiro teve o

crescimento ótimo com o pH inicial de 4,9, segundo Lingappa e Petru, citados por Caldas, Haridasan e Ferreira (1990).

Semelhante resposta ocorreu para a variável número de folhas (Figura 8), em que o valor de pH 4,7 na concentração de 8,42 g/L de ágar promoveu o surgimento de maior quantidade de folhas (2,35 pares de folhas/"seedlings").

O fato dos valores de pH diferirem no porcentual de sobrevivência (pH 6,7), com o pH ideal para as variáveis comprimento de raiz e número de folhas (pH 4,7), pode ser resultante do estágio de diferenciação dos tecidos dos "seedlings", que em pH mais baixo podem necessitar não dos nutrientes em maior concentração (pH 6,0 a 6,5) e sim de elementos como o Fe, Cu, Mn, e Zn, que são mais absorvidos pelas membranas em valor de pH 5,0 (Malavolta, 1980).

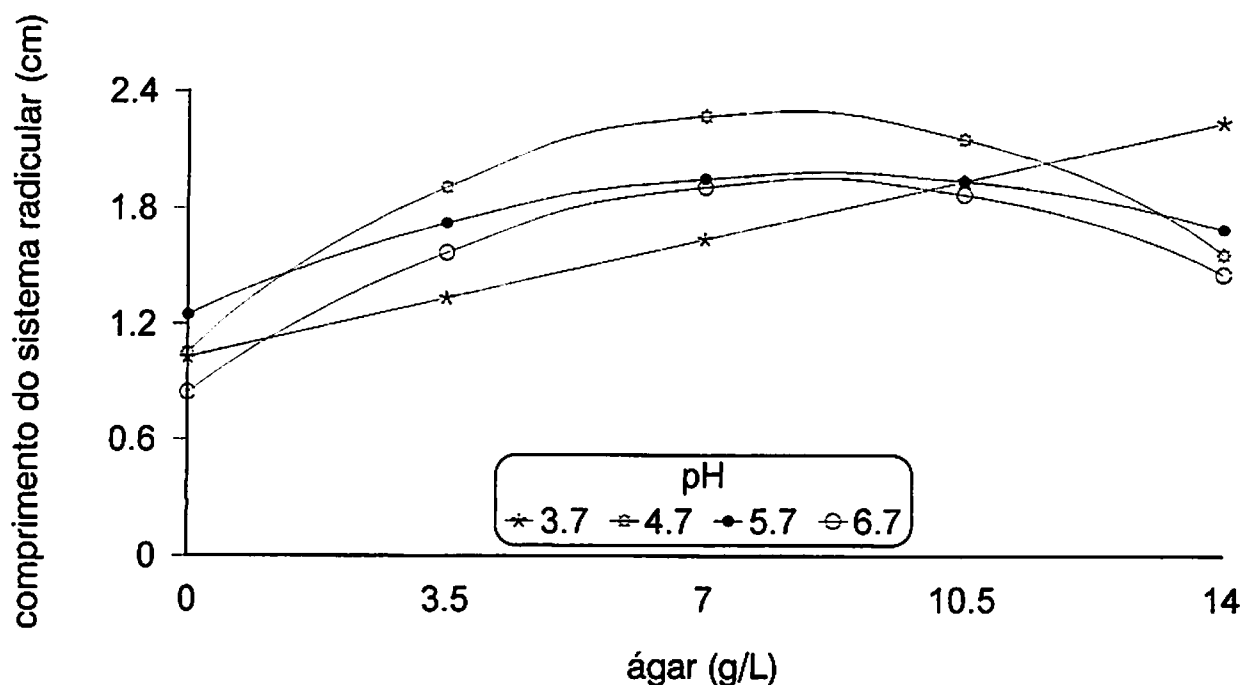


Figura 7 - Efeito do ágar na presença do pH sobre o comprimento do sistema radicular de embriões de laranjeira 'Natal' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. UFLA, Lavras, MG, 1997.

A Figura 9 indica que a concentração de 8,98 g/L de ágar promoveu o maior comprimento da parte aérea (1,31 cm). Analisando num sentido mais amplo a

ação do ágar para porcentual de sobrevivência, comprimento de raiz, número de folhas e comprimento da parte aérea dos embriões de laranjeira 'Natal', observa-se que em média a concentração de 8,68 g/L de ágar foi a mais responsiva.

Pela Figura 10, referente ao peso da matéria fresca dos "seedlings", completa-se o estudo dos efeitos do pH e do ágar no desenvolvimento e crescimento dos embriões *in vitro*, indicando que concentrações mais elevadas de ágar determinam a menor hidratação dos tecidos dos "seedlings", mesmo em valores diferenciados de pH.

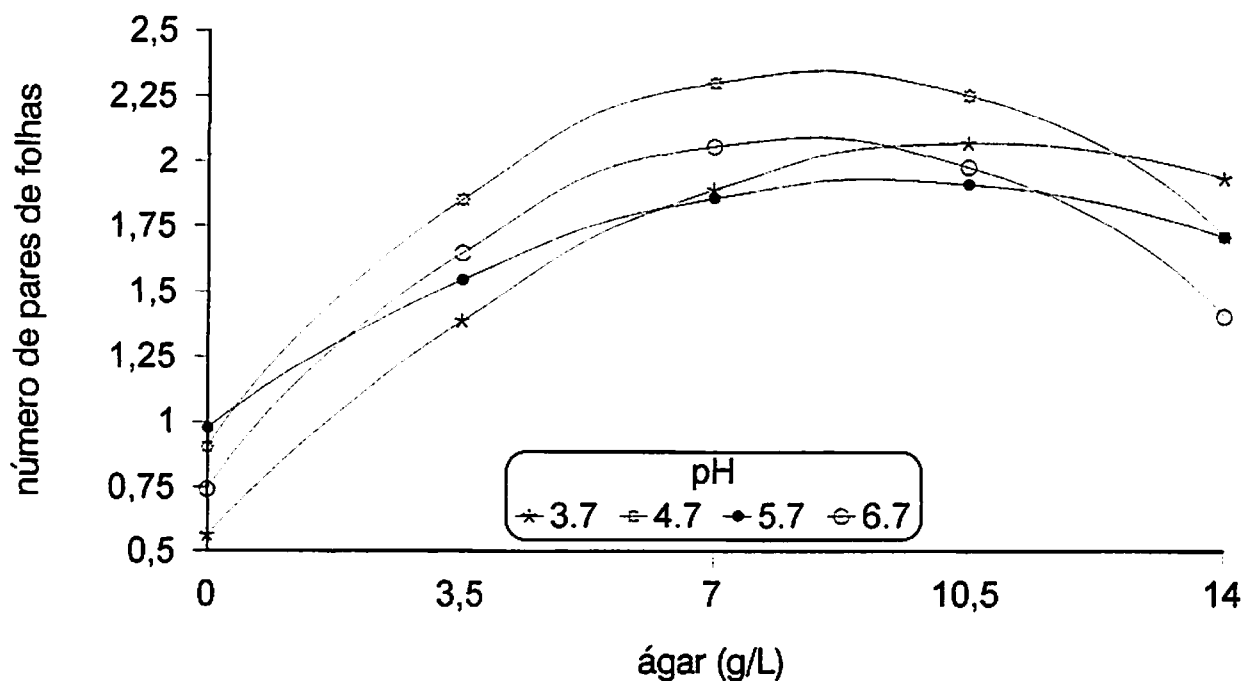


Figura 8 - Efeito do ágar na presença do pH sobre o número de folhas de embriões de laranjeira 'Natal' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. UFLA, Lavras, MG, 1997.

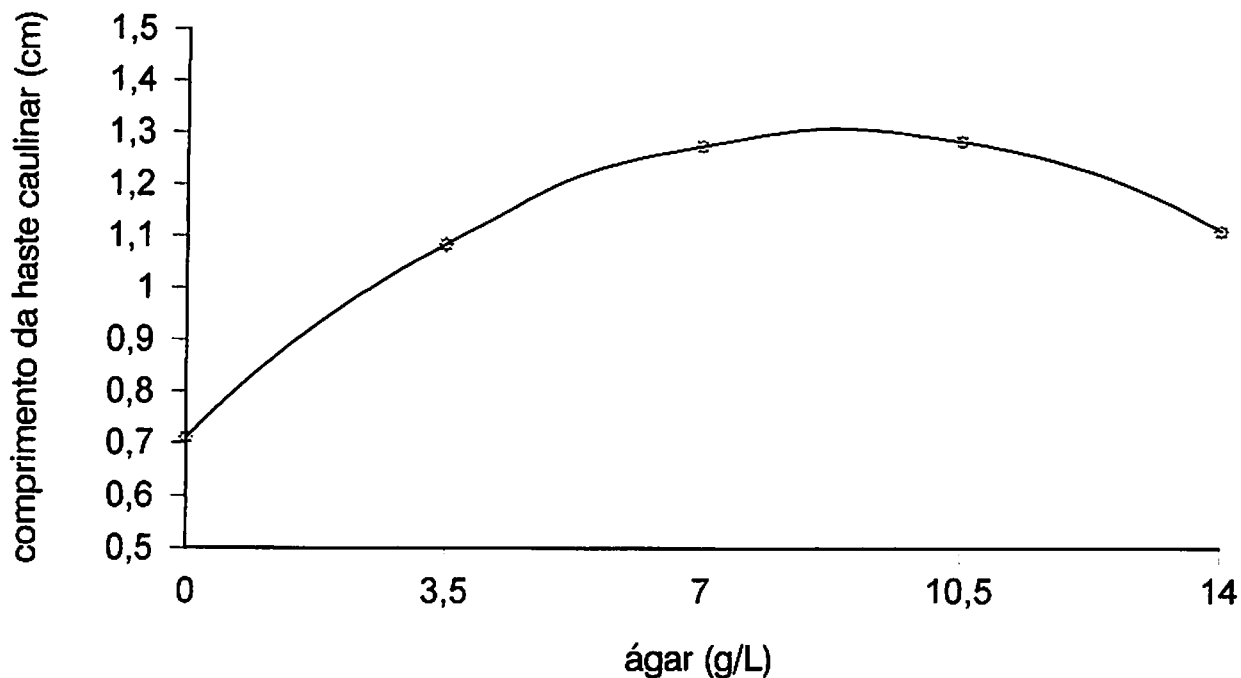


Figura 9 - Efeito do ágar sobre o comprimento da parte aérea de embriões de laranjeira 'Natal' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. UFLA, Lavras, MG, 1997.

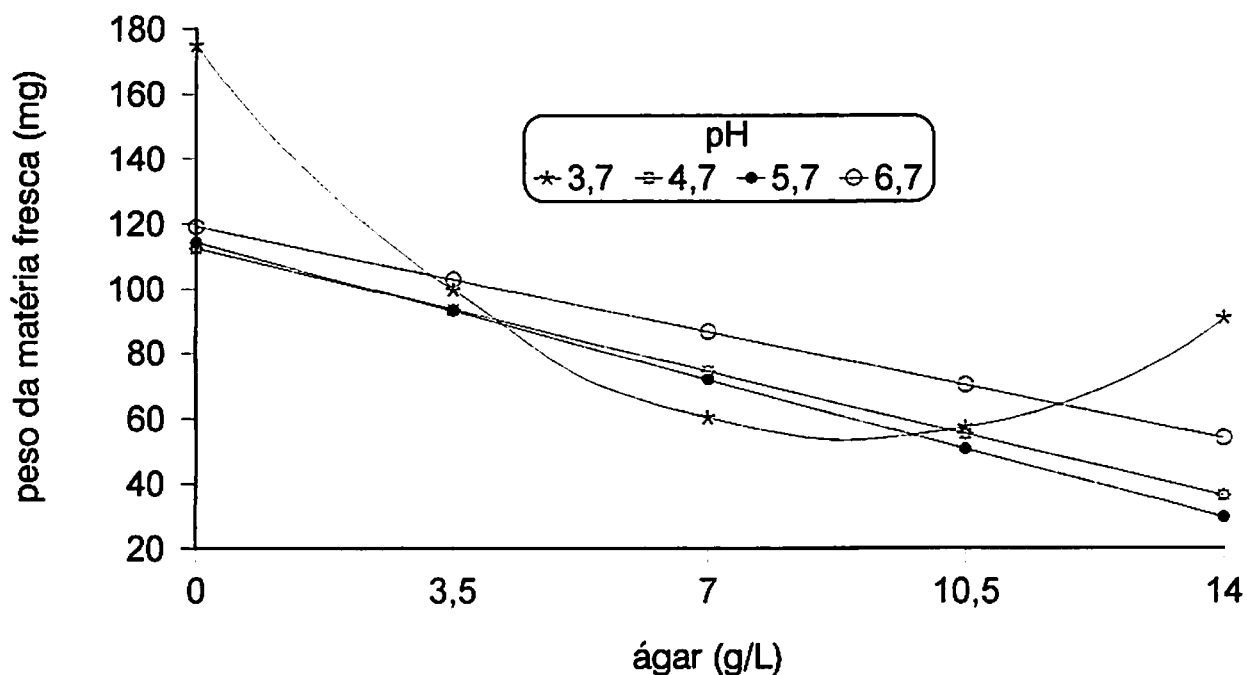


Figura 10 - Efeito do ágar na presença do pH sobre o peso da matéria fresca de embriões de laranjeira 'Natal' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. UFLA, Lavras, MG, 1997.

Essa constatação é corroborada por Shingha (1984) e Peixoto e Pasqual (1995), que também obtiveram menores valores de peso da matéria fresca em maiores concentrações de ágar. O mesmo foi constatado com o ganho relativo de peso fresco das culturas de ápices de brotações de Kiwi (Monette, 1986). Caldas, Haridasan e Ferreira (1990), relatam que o ágar após ser dissolvido em água em fervura é gelificado na presença de cátions e que, se autoclavado com o pH abaixo de 4,5, ocorre hidrólise do ágar, impedindo-o de polimerizar ao resfriar.

Analisando-se as variáveis comprimentos da parte aérea e do sistema radicular, número de folhas e porcentual de sobrevivência, em relação do peso da matéria fresca dos "seedlings", observa-se disparidades entre as melhores concentrações de ágar e valores de pH dos demais caracteres com esta variável. Conclui-se, portanto, que os maiores ganhos em peso deveram-se à maior hidratação dos tecidos dos embriões nas mais baixas concentrações de ágar, e não especificamente a ganhos proporcionados pelo desenvolvimento e crescimento dos "seedlings", que em média ocorreram na concentração de 8,98 g/L de ágar adicionado ao meio de cultura.

4.3. CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE LARANJA 'PÊRA': CONCENTRAÇÕES DE SAIS DO MEIO MS E SACAROSE.

A Tabela 7 apresenta a análise de variância, e no Apêndice 4 são apresentadas as equações de regressão, demonstrando que houve significância ao nível de 1 % de probabilidade em todos os caracteres avaliados, para sacarose, níveis do meio MS e interação entre esses fatores.

Tabela 7 - Análise de variância considerando as variáveis comprimentos do sistema radicular e da parte aérea, percentual de sobrevivência e número de folhas de embriões de laranjeira 'Pêra' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. UFLA, Lavras, MG, 1997

Quadrado médio					
Fonte de variação	G.L.	Comprimento de raiz	Comprimento da parte aérea	Porcentagem de sobrevivência	Número de folhas
Sacarose	3	1,7583**	10,2126**	0,4127**	3,0775**
MS	4	3,0598**	13,1430**	0,3037**	3,9768**
Sacar. * MS	12	1,3728**	3,6656**	0,0492**	0,7739**
Resíduo	60	0,1408	0,4231	0,0043	0,0689
** $\alpha < 0,0100$	CV=	21,790 %	24,731 %	6,303 %	15,525 %

A análise de regressão para comprimento da haste caulinar (Figura 11) evidencia que com 50 a 75 % dos sais do MS há um crescente aumento do comprimento da parte aérea, na medida em que se eleva a concentração de sacarose. O melhor resultado foi verificado com 75 % dos sais associado a 60 g/L de sacarose.

Para os demais níveis de sais (0, 25 e 100 %) houve um significativo incremento no desenvolvimento da parte aérea até 15 g/L de sacarose, decrescendo nas concentrações mais elevadas até 45 g/L e a partir daí registrou-se leve tendência de aumento novamente.

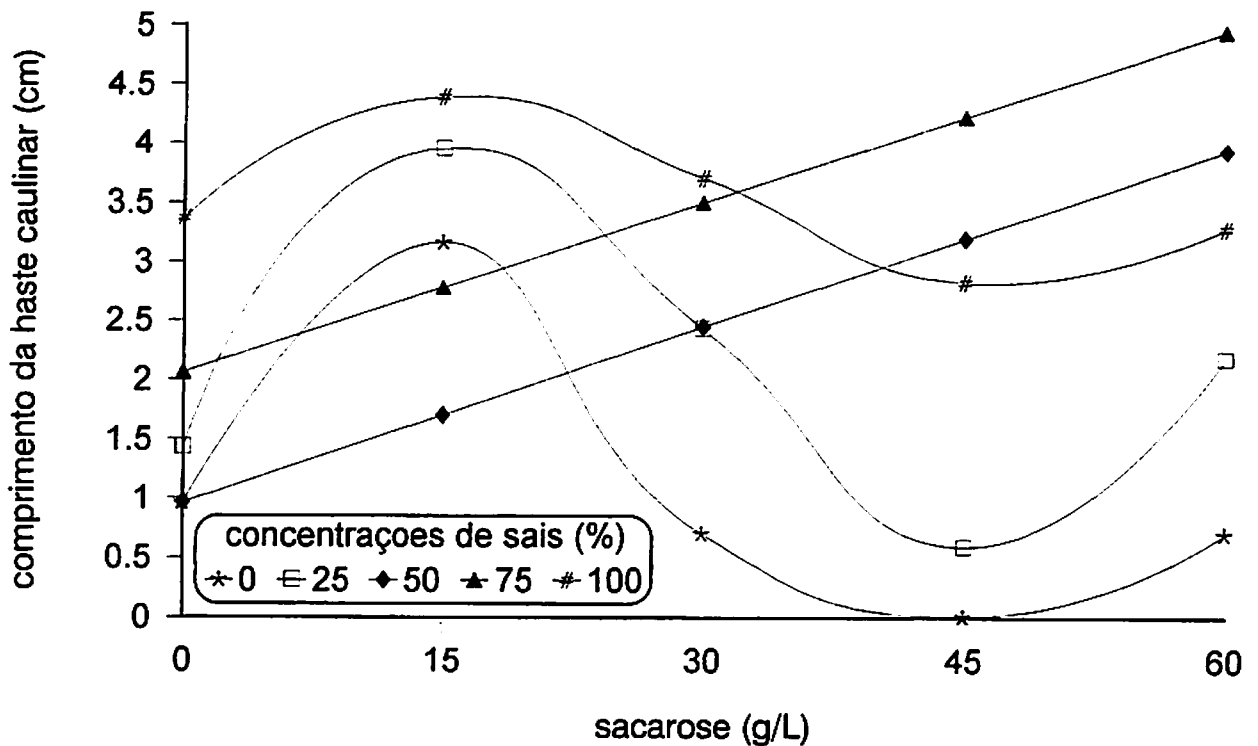


Figura 11 - Efeito dos sais do meio MS na presença da sacarose sobre o comprimento da parte aérea de embriões de laranjeira 'Pêra' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], UFLA, Lavras, MG, 1997.

A interação significativa apontada pela análise de variância fica evidente ao observar-se que o melhor resultado foi apresentado com 75 % dos sais de MS associado a 60 g/L de sacarose, e com valor ligeiramente inferiores 100 % dos sais e apenas 15 g/L de sacarose.

Esses resultados demonstram a importância da sacarose no desenvolvimento *in vitro* de embriões e evidenciam a presença no experimento de diferentes idades, pois embriões imaturos, em estádios iniciais, necessitam concentrações mais elevadas de sacarose para completarem o desenvolvimento, enquanto que embriões adultos são menos exigentes. Os resultados obtidos corroboram as afirmações de Hu e Ferreira (1990); Navarro, Ortiz e Juarez. (1985).

Para emissão de folhas os resultados foram semelhantes (Figura 12). Maior número de folhas foi verificado também com 75 % de sais, porém com 45 g/L de sacarose.

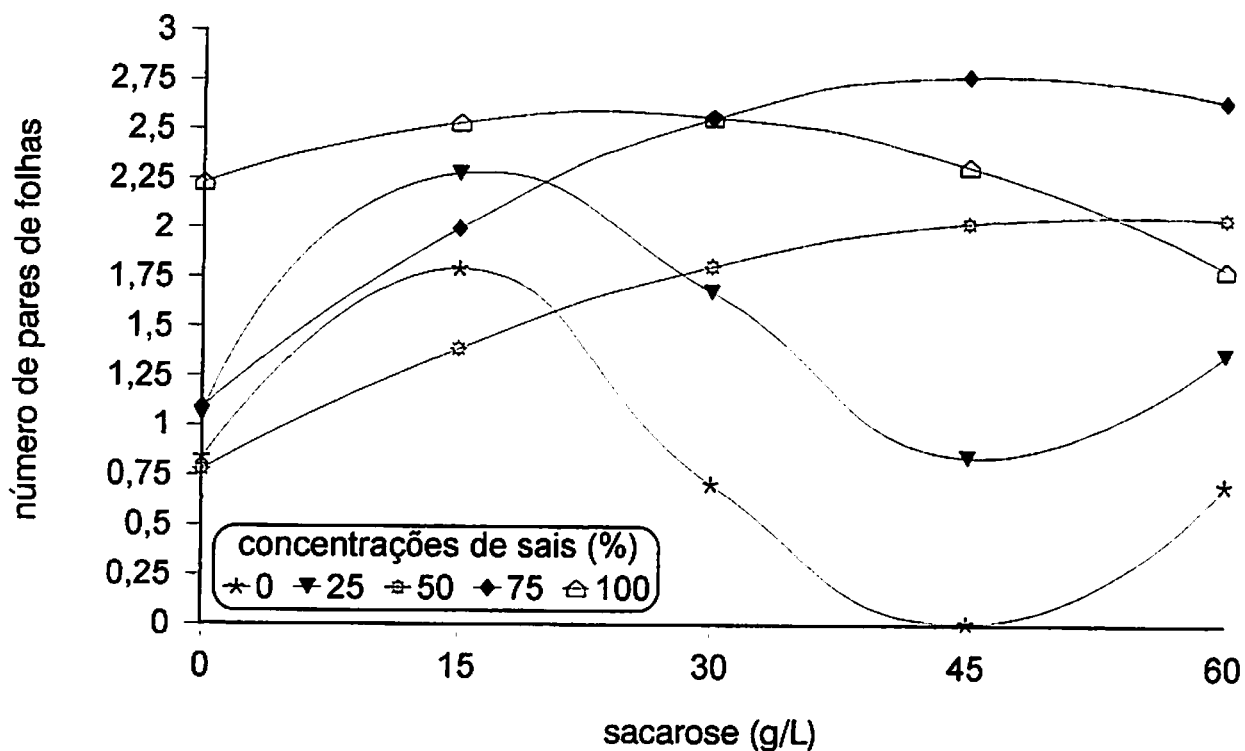


Figura 12 - Efeito dos sais do meio MS na presença da sacarose sobre o número de folhas de embriões de laranjeira 'Pêra' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. UFLA, Lavras, MG, 1997.

Na Figura 13 pode-se perceber que o comportamento do sistema radicular é semelhante ao da parte aérea. Da mesma forma, o tratamento 75 % de sais com 60 g/L de sacarose induziu maior comprimento de raízes, com valores próximos aos registrados em 25 % de sais com 30 a 45 g/L de sacarose.

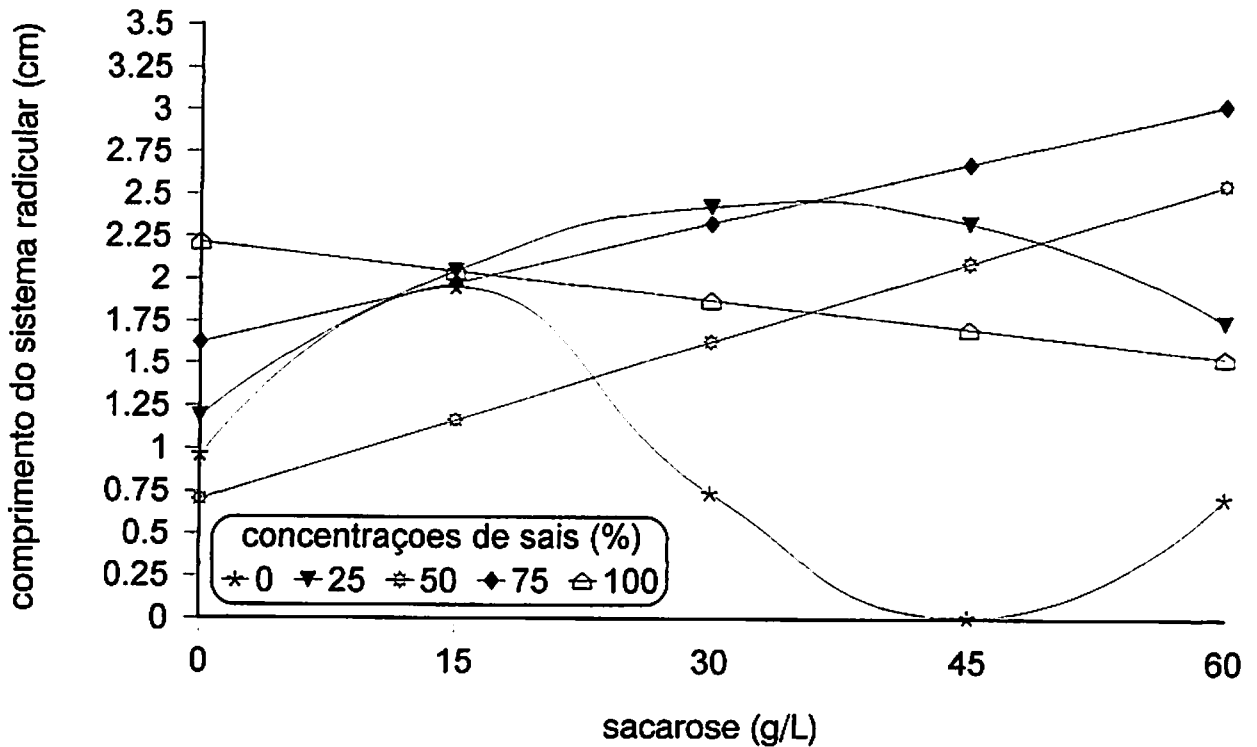


Figura 13 - Efeito dos sais do meio MS na presença da sacarose sobre o comprimento do sistema radicular de embriões de laranjeira 'Pêra' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. UFLA, Lavras, MG, 1997.

De modo geral isto não acontece nos trabalhos de propagação *in vitro* via organogênese indireta, pois os tratamentos que interferem positivamente na parte aérea têm efeito negativo no desenvolvimento do sistema radicular, devido ao balanceamento entre as concentrações de auxina/citocinina. Na cultura de embriões, como primeiro ocorre emissão de raízes, para posteriormente surgir a parte aérea, é normal esta similaridade na resposta.

Houve elevado índice de sobrevivência de embriões em todas as concentrações de sacarose utilizadas (Figura 14), evidenciando ser a sacarose dispensável para o início do desenvolvimento de embriões *in vitro*.

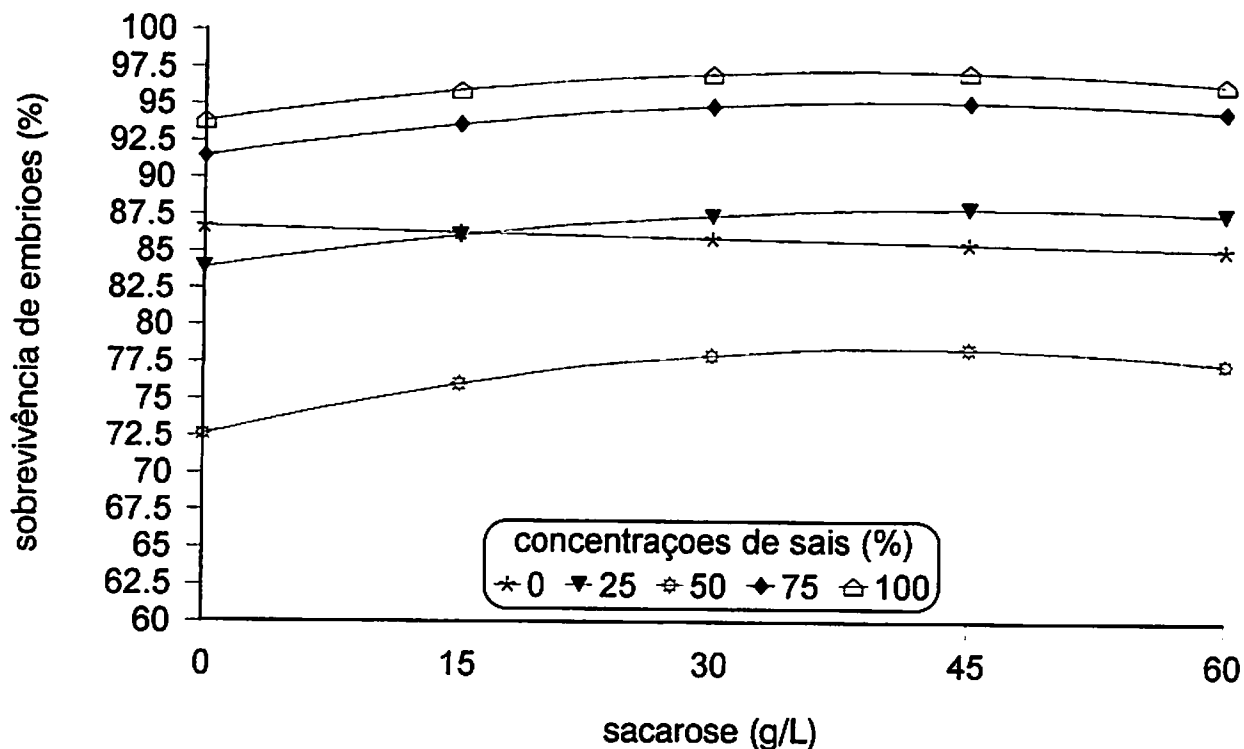


Figura 14 - Efeito dos sais do meio MS na presença da sacarose sobre o percentual de sobrevivência de embriões de laranjeira 'Pêra' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. UFLA, Lavras, MG, 1997.

Maiores variações na sobrevivência foram evidenciadas nos diferentes níveis de sais do meio MS. Melhores resultados foram registrados para 75 e 100%.

4.4. CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE *Citrus limonia* \times *Poncirus trifoliata*: EFEITOS DO ÁCIDO GIBERÉLICO (GA₃) E DO CARVÃO ATIVADO

Observa-se na Tabela 8 que a interação entre os fatores ácido giberélico (GA₃) e carvão ativado (C.A.) foi significativa para as variáveis comprimentos da parte aérea e sistema radicular e percentual de sobrevivência dos embriões do híbrido *C. limonia* \times *P. trifoliata*, sendo também apresentadas as equações de regressão na Tabela 5A.

Tabela 8 - Análise de variância considerando as variáveis comprimentos do sistema radicular e da haste caulinar e porcentual de sobrevivência dos embriões do híbrido *Citrus limonia* x *Poncirus trifoliata*. UFLA, Lavras, MG, 1997.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado médio		
		Comprimento do sistema radicular	Comprimento da haste caulinar	Porcentagem de sobrevivência
Carvão Ativado	3	0,6360**	0,3739**	82,0461ns
GA ₃	3	0,0946ns	0,5155**	220,1361ns
C.A. * GA ₃	9	0,6340**	0,4850**	1095,6494**
Resíduo	30	0,1054	0,0802	169,1329
** $\alpha < 0,0100$ ns = não significativo.	C.V. =	26,53 %	32,53 %	16,88 %

Para as variáveis comprimentos da parte aérea e do sistema radicular (Figuras 15 e 16), observa-se que o ácido giberélico em concentração de 0,1 mg/L foi responsivo ao comprimento de raiz (1,22 cm) e haste caulinar (1,60 cm), pois na ausência deste regulador de crescimento os embriões híbridos apresentaram respectivamente 0,18 cm e 0,08 cm de comprimento para essas mesmas variáveis.

Verifica-se ainda para os dados referentes à variável porcentagem de sobrevivência (Figura 17 - $P < 0,01$), que a regressão linear, embora com o coeficiente de determinação baixo ($r^2 = 0,64$) para a concentração de GA₃ - 0,1 mg/L, ratifica a tendência desta dosagem ter ação antagônica quando suplementada em meios de cultivo com carvão ativado em até 2,0 g/L.

Esses dados são corroborados pelos obtidos por Pasqual, Ribeiro e Ramos (1990), em que a ação do GA₃ - 0,1 mg/L em meios contendo carvão ativado induziu menor taxa de crescimento radicular de embriões de laranja 'Natal', indicando ser essa concentração, juntamente com carvão ativado, prejudicial ao crescimento de embriões cultivados *in vitro*.

Os efeitos do Carvão ativado sobre as variáveis comprimentos do sistema radicular (1,32 g/L) e da parte aérea (1,46 g/L) são respectivamente observados pelas Figuras 15 e 16.

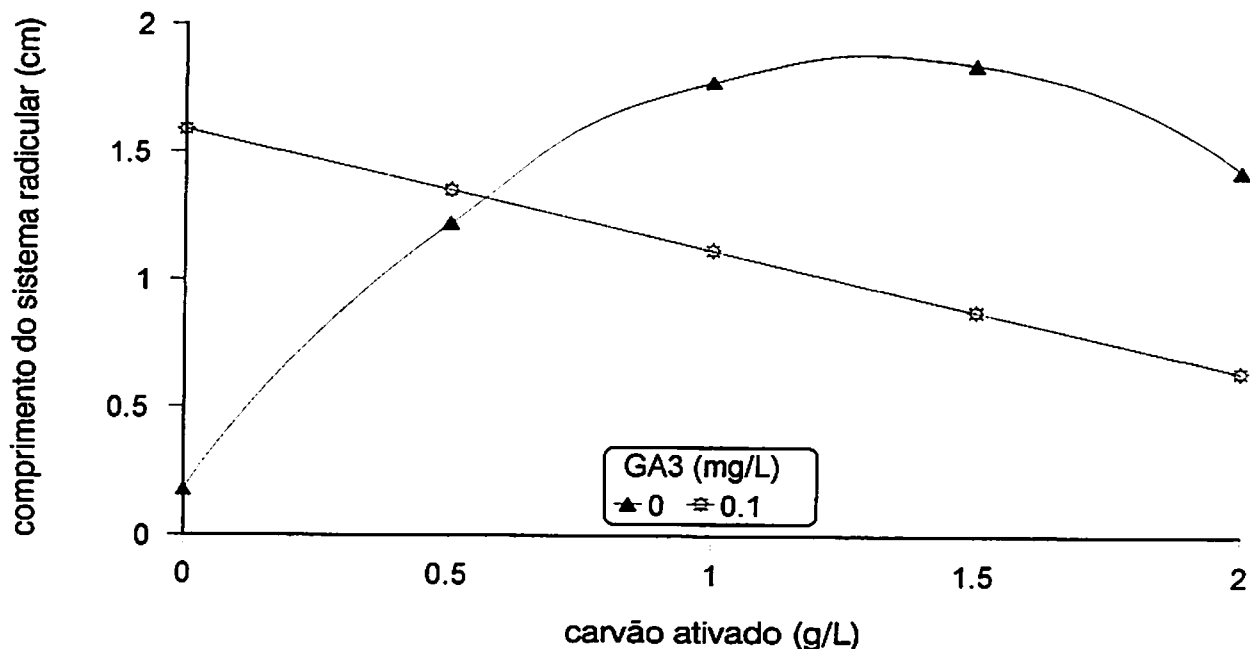


Figura 15 - Efeito do ácido giberélico (GA₃) na presença do carvão ativado sobre o comprimento do sistema radicular de embriões do híbrido *Citrus limonia* Osbeck \times *Poncirus trifoliata*. UFLA, Lavras, MG, 1997.

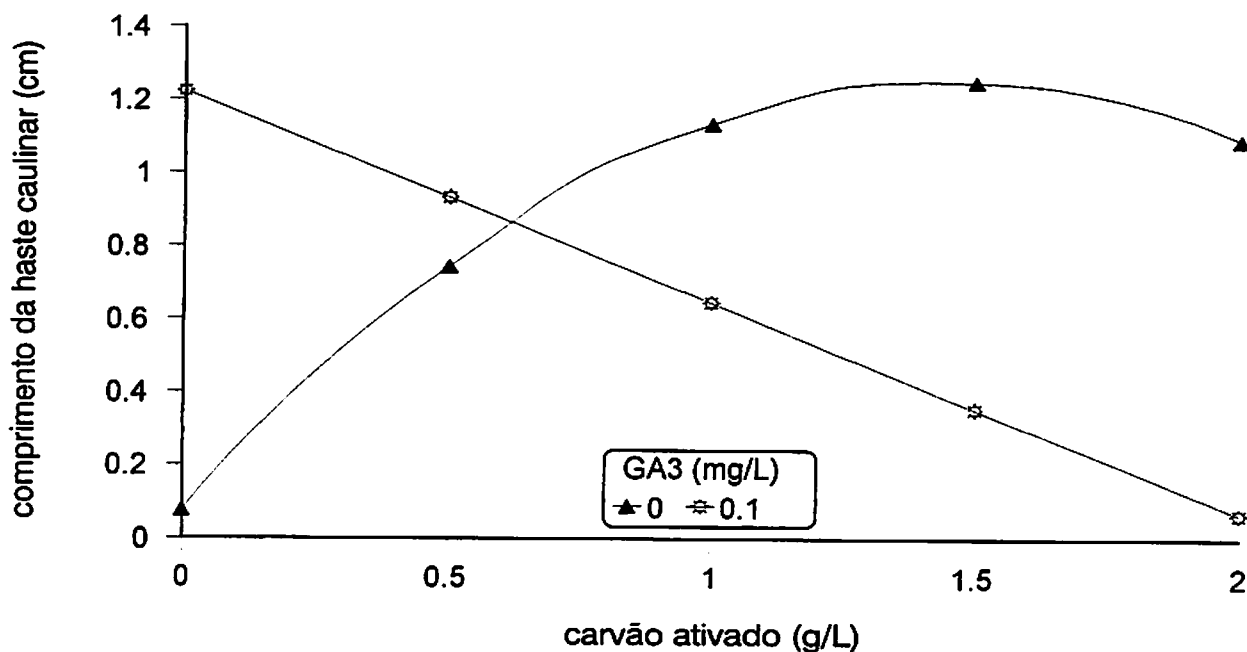


Figura 16 - Efeito do ácido giberélico (GA₃) na presença do carvão ativado sobre o comprimento da parte aérea de embriões do híbrido *Citrus limonia* Osbeck \times *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. UFLA, Lavras, MG, 1997.

Devido à capacidade do carvão ativado em adsorver substâncias tóxicas liberadas pelos explantes ou que casualmente são adicionadas ao meio de cultivo através de seus componentes, a exemplo dos contidos no ágar- pela natureza dos contaminantes orgânicos e inorgânicos e aos aspectos relacionados à sua natureza biológica e de produção (Debergh, 1983)-, assim às comprovadas impurezas dos outros componentes: sacarose e sais, é de se supor que o crescimento e desenvolvimento dos embriões sejam favorecidos quando componentes inibitórios são adsorvidos pelo carvão ativado.

Para maximizar o percentual de sobrevivência, observa-se pela Figura 17, a necessidade da baixa concentração de GA₃ suplementada ao carvão ativado. O percentual de sobrevivência máximo atingido (97,25%) deveu-se às combinações de GA₃ (0,01 mg/L) e carvão ativado (1,35 g/L).

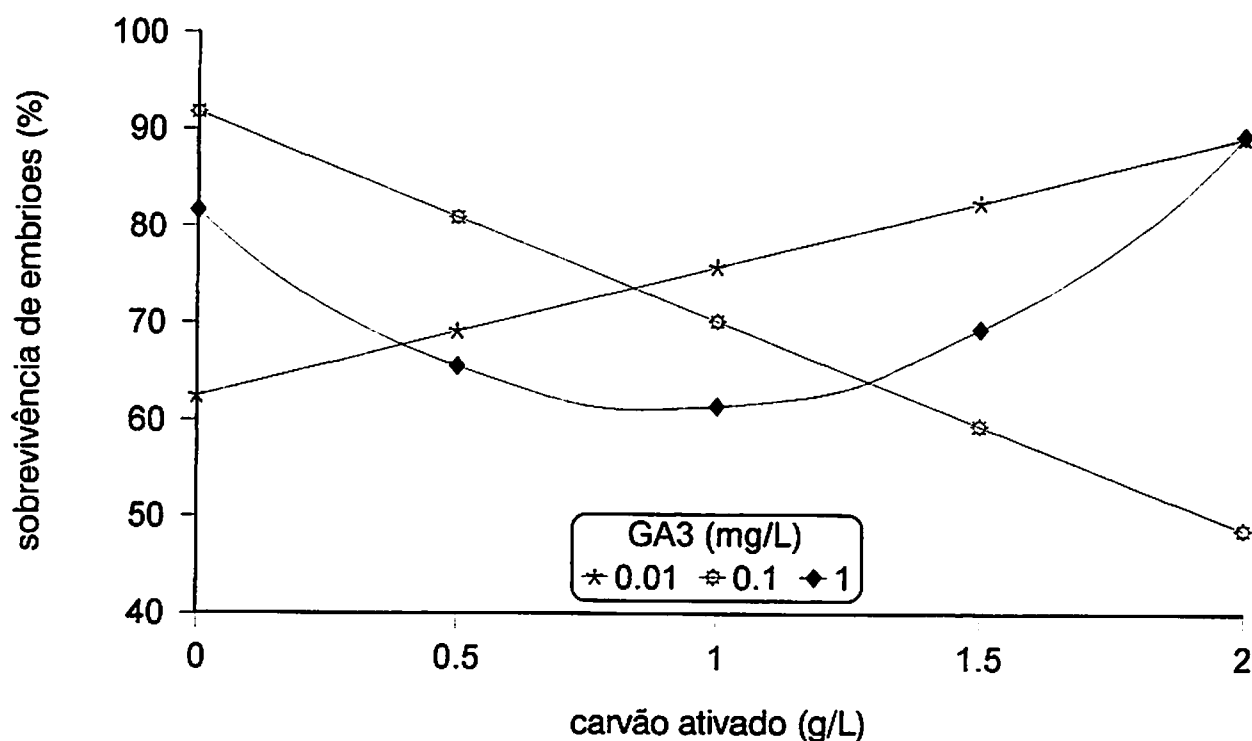


Figura 17 - Efeito do ácido giberélico (GA₃) na presença do carvão ativado sobre o percentual de sobrevivência de embriões do híbrido *Citrus limonia* Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. UFLA, Lavras, MG, 1997.

Autores como Schooler (1960) e Norstog (1979) afirmam a necessidade de se adicionar GA₃ (0,01 mg/L) para o desenvolvimento de embriões de cevada, vindo ao encontro dos resultados obtidos.



5 CONCLUSÕES

1. Há 92% de probabilidade de se encontrar o embrião zigótico na região micropilar das sementes de frutos obtidos de cruzamentos de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck \times *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., com 130 a 150 dias após a polinização. A metodologia adotada neste trabalho pode vir a ser testada em cruzamentos intragenéricos e intraespecíficos, com o objetivo de identificar embriões híbridos imaturos, provenientes de cruzamentos em que variantes femininas poliembriônicas são adotadas; desde que se ajuste ao método de melhoramento genético a eliminação das plantas apomíticas obtidas (8%), via marcadores morfológicos ligados à planta-mãe.

2. Os embriões sexuais de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck \times *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., com 130 a 150 dias após a fertilização, encontram-se em maior proporção em estádios globular e cordiforme de desenvolvimento, na região micropilar da semente.

3. Embriões em estádios globular e cordiforme ao serem individualizados podem não germinar ou germinar originando "seedlings" descaracterizados morfológicamente, necessitando de ajuste do meio de cultura.

4. Concentrações de ágar e valores de pH interagem significativamente no crescimento do sistema radicular e no porcentual de sobrevivência *in vitro* de embriões de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Pêra e Natal.



5. Para aumentar o porcentual de germinação, o valor do pH do meio MS (acrescido de 10,5 g/L de ágar), deve ser aferido inicialmente em 6,7, transferindo-se em seguida os embriões já desenvolvidos a um meio nutritivo com pH 4,7, para maximizar o crescimento.

6. Ocorre queda de peso da matéria fresca de "seedlings" em meio de cultivo mais solidificado, devido a menor hidratação dos tecidos.

7. Embriões imaturos de laranjeira 'Pêra' apresentaram melhor desenvolvimento em meio MS com 75 % da concentração de sais e 60 g/L de sacarose.

8. O meio MS suplementado com carvão ativado ou com ácido giberélico favorece o crescimento de embriões cultivados *in vitro*.

9. O meio MS suplementado com carvão ativado (1,35 g/L) e ácido giberélico (0,01 mg/L) favorece o crescimento de embriões cultivados *in vitro* e possibilitam uma taxa maior de sobrevivência de embriões do híbrido *Citrus limonia* (L.) Osbeck \times *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREOLI, C. Cultura de embriões. In: SIMPÓSIO DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1, Brasília, 1985. **Anais...** Brasília: EMBRAPA-CNP/ABCTP, 1986. p.25-28.
- BACCHI, O. Cytological observations in *Citrus*: III. Megasporogenesis, fertilization and polyembryony. **Botanical Gazette**, Chicago, v.105, p.221-225, 1943.
- BRAND, M.H. Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoots *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.5, n.3, p.203-209, 1993.
- BUTTON, J.; BORNMAN, C.H. Development of nucellar plants from unpollinated and unfertilised ovules of the washington navel orange *in vitro*. **Journal of South African Botany**, Capetown, v.37, n.2, p.237-245, 1971.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNP/ABCTP, 1990. p.37-70.
- CAMERON, J.W.; FROST, H.B. Genetics, breeding and nucellar embryony. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J. (eds.). **The citrus industry**. Berkeley: University of California Press, 1968. v.2, p.325-370.
- CHAPOT, H. **The citrus plant**. In: CITRUS. Switzerland: Ciba-Geigy, 1975. p.6-13. (Technical Monograph, 4).
- CROCOMO, O.J.; CABRAL, J.B. **A biotecnologia no melhoramento de plantas tropicais**. Brasília: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO AGRÍCOLA SUPERIOR, 1988. 39p. (ABEAS. Curso de Agricultura Tropical. Módulo I: O ambiente e as Plantas Tropicais).
- DAMIÃO FILHO, C.F. **Morfologia vegetal**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 1993. 243p.

- DEBERGH, P.C. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.59, p.270-276, 1983.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical. **Citricultura brasileira: difusão de material básico e certificação de mudas**. Cruz das Almas, 1992. 113p. (Documentos, 38).
- ESAN, E.B. **A detailed study of adventive embryogenesis in the rutaceae**. Riverside: University of California, 1973. 233p (Dissertação- Mestrado em Agronomia).
- ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: Edgard Blücher, 1974. 293p.
- ESEN, A. Separation of nucellar and zygotic *Citrus* seedlings by use of polyphenol oxidase-catalyzed browning. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, Orlando, v.2, p.616-618, May 1977.
- ESEN, A.; SOOST, R.K. Adventive embryogenesis in *Citrus* and its relation to pollination and fertilization. **American Journal of Botany**, Miami, v.6, n.6, p.607-614, July 1977.
- FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E.; VILELA, L.A.A. **Produção de alface em hidroponia**. Lavras: UFLA, 1996. 50p.
- FERRI, M.G. **Botânica: morfologia interna das plantas (anatomia)**. 9.ed. São Paulo: Nobel, 1990. 114p.
- FROST, H.D.; SOOST, RLK. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J. (ed.) **The Citrus Industry**. Berkeley: University of California, 1968. v.2, p.290-324.
- FURLANI, A.M.C.; FURLANI, P.R. **Composição e pH de soluções nutritivas para estudos fisiológicos e seleção de plantas em condições nutricionais adversas**. Campinas: IAC, 1988. 29p. (Boletim Técnico, 121).
- FURR, J. R. Citrus breeding for the arid Southwestern United States. In: CHAPMAN, H. D., **Proceedings of the First International Citrus Symposium**. Riverside: Riverside Color Press, 1969. p.191-197.
- GAMBORG, O.L. Callus and cell culture. In: WETTER, L.R.; CONSTABEL, F. **Plant tissue culture methods**. Saskatoon: National Research Council of Canada, 1982. p.1-9.

- GEORGE, E.F. The components of culture media. In: **Plant propagation by tissue culture**. 2.ed. Great Britain: Exegetics, 1993. v.9, p.273-343.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.L.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNP/ABCTP, 1990. p.99-170.
- HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNP/ABCTP, 1990. p.37-70.
- HEARN, C.J. Recognition of zygotic seedlings in certain orange crosses by vegetative characters. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, Orlando, v.2, p.611-614, May 1977.
- © HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNP/ABCTP, 1990. p.37-70.
- KOCHBA, J.; BUTTON, J.; SPIEGEL-ROY, P.; BORNMAN, CH.; KOCHBA, M. Stimulation of rooting of citrus embryoids by giberellic acid and adenine sulphate. **Annals of Botany**, London, v.38, p.795-802, 1974.
- KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P.; SAFRAN, H. Adventive plants from ovules and nucelli in *Citrus*. **Planta**, Berlin. v.106, p.237-245, 1972.
- ◊ MAHESHWARI, P.; RANGASWAMY, N.S. Polyembryony and in vitro culture of *Citrus* and *mangifera*. **The Indian Journal of Horticulture**, Bangalore. v.15, p.275-286, 1958.
- MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. 254p.
- ◊ MARINO, G. BATTISTINI, S. Leaf-callus growth, shoot regeneration and somaclonal variation in *Actinidia deliciosa*: effect of media pH. **Acta Horticulturae**, Leuven, v.280, p.37-44, 1990.
- MEZZETTI, B. ; CONTE, L.S.; ROSATI, P. *Actinidia deliciosa* in vitro. II. Growth and exogenous carbohydrates utilization by explants. **Plants Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.26, n.3, p.153-160, 1991.
- MONETTE, P.L. Micropropagation of kiwifruit using non-axenic shoot tips. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.6, n.1, p.73-82, 1986.

- MOREIRA, C.S. Melhoria de citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F. **Citricultura brasileira**. Campinas: Fundação Cargill, 1980. v.1, p.195-223.
- MOREIRA, C.S.; GURGEL, J.T.A.; ARRUDA, L.F. Poliembrião em *Citrus*. **Bragantia**, Campinas, v.7, n.1, p.69-106, mar. 1947.
- ◉ MOREIRA, C.S.; PIO, R.M. Melhoria de *Citrus*, In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A.A.; (eds.) **Citricultura brasileira**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v.1, p.116-152.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, Califórnia, v.25, p.135-166, 1974.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-479, 1962.
- ◉ NAGAO, E.O. Efeitos da sacarose, nitrogênio inorgânico e ácido indol butírico na propagação in vitro do porta-enxerto *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.. Lavras: ESAL, 1993. 56p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia).
- NAVARRO, L.; JUAREZ, J. Tissue culture techniques used in Spain to recover virus-free *Citrus* plants. **Acta Horticulturae**, Leuven, v.78, p.725-735, 1977.
- ◉ NAVARRO, L.; ORTIZ, J.M.; JUAREZ, J. Aberrant *Citrus* plants obtained by somatic embryogenesis of nucelli cultures in vitro. **HortScience**, Alexandria, v.20, n.2, p.214-215, Apr. 1985.
- NORSTOG, K.J. Embryo culture as a tool in the study of comparative and development morphology. In: SHARP, W.R.; LARSEN, P.O.; PADDOCK, E.F.; RHAGAVAN, V. (eds.). **Plant cell and tissue culture**. Columbus: Ohio State University, 1979. p.197-202.
- OGATA, T. Poliembrião, efeitos do nitrato de potássio e da permanência de sementes no germinador, na separação dos embriões de citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 6, Recife, 1981. **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1981. v.2, p.693-701.
- ◉ PASQUAL, M. **Introdução à cultura de tecidos**. Lavras: ESAL, 1990. 33p. (Apostila do DAG)
- ◉ PASQUAL, M.; PINTO, J.E.B.P. Cultura de embriões. **Notícias da Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas**, Brasília: EMBRAPA-CNPQ/ABCTP, 1988. v.9, p.2-12.

- PASQUAL, M.; RIBEIRO, V.G.; RAMOS, J.D. Influência do GA₃ 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, out. 1990.
- PEIXOTO, P.H.P.; PASQUAL, M. Micropropagação da videira: efeitos do pH e do ágar. **Revista Ceres**, Viçosa, v.42, n.242, p.431-443, ago. 1995.
- PIERIK, R.L.M. **In vitro culture of higher plants**. Dordrecht: Martinus Nyhoff Publishers, 1987. 344p.
- PIERINGER, A.P.; EDWARDS, G.J. Identification of nucellar and zygotic *Citrus* seedlings by infrared spectroscopy. **Proceedings of the American Society of Horticultural Science**, Virginia, v.86, p.226-234, June 1965.
- PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 11.ed. São Paulo: Nobel, 1987. 446p.
- POMPEU JÚNIOR, J.; Porta-enxertos. In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A.A. **Citricultura brasileira**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v.1, p.265-280.
- POPINIGIS, F. Formação da semente. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ENSINO AGRÍCOLA SUPERIOR. **Fisiologia da semente**. Brasília, 1985. cap.6, p.1-17.
- RANGAN, T.S.; MURASHIGE, T.; BITTERS, W.P. In vitro studies of zygotic and nucellar embryogenesis in *Citrus*. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1, Riverside, 1969. **Proceedings...** Riverside, 1969. v.1, p.225-229.
- RÊGO, G.M. **Micropropagação através da cultura de tecidos**. Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMP, 1984. 17p. (EMBRAPA-CNPMP. Apostila do II Curso Intensivo Nacional de Fruticultura).
- 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, July 1964.
- ROMBERGER, J.A.; TABOR, C.A. The *Picea abies* shoot apical meristem in culture. **American Journal of Botany**, Lancaster, v.58, p.131-140, 1971.
- SAKUTA, M; KOMAMINE, A. Effects of nitrogen source on betacyanin accumulation and growth in suspension cultures of *Phytolacca americana*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.71, p.459-463, June 1987.
- SCHOOLER, A.B. The effect of gibberel and gibberellic acid (K salt) in embryo culture media for *Hordeum vulgare*. **Agronomy Journal**, Visconsin, v.52, p.411, 1960.

- SHINGA, S. Influence of agar concentration on *in vitro* shoot proliferation of *Malus* sp. *Almey* and *Pyrus communis* Seckel. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.107, p.657-660, 1982.
- SHINGHA, S. Influence of two commercial agar on *in vitro* proliferation of 'Almey' crabapple and 'Seckel' pear. **HortScience**, Alexandria, v.19, n.2, p.227-228, Apr. 1984.
- SHINGHA, S.; OBERLY, G.H.; TOWNSEND, E.C. Changes in nutrient composition and pH of culture medium during *in vitro* shoot proliferation of crabapple and pear. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.2, p.209-220, 1987.
- SOARES FILHO, W. dos S.; CUNHA, M.A.P. da; CUNHA SOBRINHO, A.P. da; PASSOS, O.S.; SOUZA JÚNIOR, M.T. Identification of zygotic seedlings derived from polyembryonic seeds of *Citrus*: the use of 'browning'. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 7, Acireale, 1992. **Proceedings...** Acireale: International Society of Citriculture, 1994a. v.1, p.139-141.
- SOARES FILHO, W. dos S.; LEE, M.; CUNHA SOBRINHO, A.P. da; PASSOS, O.S.; SOUZA JUNIOR, M.T. Influence of pollinators on polyembryony in *Citrus*. **Acta Horticulturae**, Leuven, v.403, p.256-265, 1995.
- SOARES FILHO, W. dos S.; VÁSQUEZ ARAUJO, J.E.; CUNHA, M.A.P da; CUNHA SOBRINHO, A.P. da; PASSOS, O.S. Degree of polyembryony, size and survival of the zygotic embryo in *Citrus*. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 7, Acireale, 1992. **Proceedings...** Acireale: International Society of Citriculture, 1994b. v.1, p.135-138.
- SOOST, P.K.; CAMERON, J.W. *Citrus*. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. **Advances in fruit breeding**. West Lafayette, Indiana: Purdue University, 1975. p.507-540.
- SPIEGEL-ROY, P.; KOCHBA, J. Application of tissue culture for plant improvement. In: BARR, W.; REINHARD, E.; ZENK, M.H. (eds.). **Plant tissue and it's biotechnological application**. New York: Springer-Verlag, 1977. p.404-413.
- SPIEGEL-ROY, P.; KOCHBA, J. Embryogenesis in *Citrus* tissue culture. In: FIECHTER, A. (ed.). **Advances in biochemical engineering**. Berlin: Spriger-Verlag, 1980. p.27-48.
- STOLTZ, L.P. Agar restriction of the growth of excised mature *Iris* embryos. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.96, n.5, p.681-684, Sept. 1971.
- TEICH, A.H.; SPIEGEL-ROY, P. Differentiaton between nucellar and zygotic *Citrus* seedlings by leaf shape treerat. **Applied Genetics**, Berlin, v.42, p.314-315, 1972.

- THORPE, T.A.; BEAUDOIN-EAGAN, L.D.C. Metabolism during growth and shoot formation in tobacco callus cultures. **Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v.113, p.337-346, 1984.
- TILQUIN, J.P. Plant regeneration from stem callus of cassava. **Canadian Journal Botany**, Ottawa, v.57, n.16, p.1761-1763, Oct. 1979.
- TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPq/ABCTP, 1990. 433p.
- VÁSQUEZ ARAUJO, J.E; Identificação de embriões zigóticos em sementes poliembriônicas de citros (*Citrus* spp.) mediante características morfológicas. Cruz das Almas: EAUFBA, 1991. 74p. (Dissertação- Mestrado em Agronomia). K
- WILLIAMS, R.J.; LEOPOLD, A.C. The glassy state in corn embryos. **Plant Physiology**, Maryland, v.89, p.977-981, 1989.
- WONG, C.Y. The influence of pollination on seed development in certain varieties of *Citrus*. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, Riverside, v.37, p.161-164, 1940.

APÊNDICES

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1 Idade dos frutos de laranja 'Natal' [<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck] polinizados por <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf., número de sementes por fruto, estádios de desenvolvimento embrionário, localização do embrião na semente e caracterização dos "seedlings" aos 130, 140 e 150 dias após a polinização.....	54
2 Resumo das equações de regressão dos níveis de ágar dentro do fator pH, para as variáveis porcentagem de sobrevivência, comprimento do sistema radicular, comprimento da haste caulinar e peso da matéria fresca, em "seedlings" de laranja 'Pêra' (<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck).....	55
3 Resumo das equações de regressão dos níveis de pH dentro do fator ágar para as variáveis porcentagem de sobrevivência, comprimento do sistema radicular, peso da matéria fresca, número de pares de folhas e efeito do ágar sobre o comprimento da haste caulinar, em "seedlings" de laranja 'Natal' (<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck).....	56

- 4 Resumo das equações de regressão das concentrações de sais do meio MS dentro do fator sacarose, para as variáveis comprimento da haste caulinar, número de pares de folhas, comprimento do sistema radicular e porcentagem de sobrevivência em "seedlings" de laranjeira 'Pêra' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)..... 57
- 5 Resumo das equações de regressão das concentrações de ácido giberélico (GA₃) dentro do fator carvão ativado, para as variáveis haste caulinar, sistema radicular e porcentagem de sobrevivência, em "seedlings" híbridos de *Citrus limonia* Osbeck. χ *Poncirus trifoliata* (L.) Raf..... 58

TABELA 1A. Idade dos frutos de laranjeira 'Natal' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] polinizados por *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., número de sementes por fruto, estádios de desenvolvimento embrionário, localização do embrião na semente e caracterização dos "seedlings" aos 130, 140 e 150 dias após a polinização. UFLA, Lavras, MG, 1997.

IDADE DO FRUTO (dias)	SEMENTE	ESTÁDIOS	LOCALIZAÇÃO	EMBRIÃO
130	1	C	S	N
130	1	G	M	***
130	1	c	M	N
130	1	C	S	N
130	1	G	M	não germ..
130	1	c	M	não germ.
130	1	T	M	não germ.
130	1	C	S	N
130	1	G	M	N
130	2	c	M	***
130	2	C	S	N
130	2	C	S	Z
130	2	c	S	N
130	2	T	S	N
130	2	c	S	N
130	2	C	S	N
130	3	T	M	N
130	3	T	M	N
130	3	c	M	N
130	3	C	S	Z
140	1	C	M	Z
140	2	C	S	N
140	2	c	S	N
140	2	c	S	***
150	1	c	S	N
150	1	G	M	N
150	1	G	M	***
150	1	C	S	N
150	1	c	S	N
150	2	G	M	N
150	2	c	S	N
150	2	G	M	***
150	2	C	S	N
150	2	C	S	N
150	2	G	M	***
150	3	c	S	N
150	3	G	M	***
150	3	c	S	N
150	3	C	S	N

"SEEDLINGS": Z(embrião zigótico), N(embrião nucelar), ***(proliferação de embriões)

Estádio embrionário: G(globular), T(torpedo), c(cordiforme), C(cotiledonar)

Localização: M(próximo à micrópila), S(no interior da semente)

TABELA 2A. Resumo das equações de regressão dos níveis de ágar dentro do fator pH, para as variáveis porcentagem de sobrevivência, comprimento do sistema radicular, comprimento da haste caulinar e peso da matéria fresca, em "seedlings" de laranjeira 'Pêra' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). UFLA, Lavras, MG, 1997.

Equações de regressão	Nível de significância	r ²
^{1/}Porcentagem de sobrevivência		
$Y_{0,0} = 9,9374 - 27,4999 x + 6,2499 x^2$	*	0,90
$Y_{3,5} = 135,8906 - 78,1250 x + 10,9375 x^2$	*	0,97
$Y_{7,0} = 177,8750 - 94,9999 x + 12,4999 x^2$	**	0,98
$Y_{10,5} = -335,4219 + 118,1250 x - 7,8120 x^2$	**	0,93
$Y_{14,0} = -364,4064 + 132,5000 x - 9,3750 x^2$	*	0,98
^{2/}Comprimento do sistema radicular		
$Y_{0,0} = -12,1509 + 5,5659 x - 0,5426 x^2$	**	0,60
$Y_{3,5} = -11,8046 + 5,2417 x - 0,5018 x^2$	**	0,99
$Y_{7,0} = 2,7365 - 0,1879 x$	*	0,84
$Y_{10,5} = -96,0790 + 57,6301 x - 10,9960 x^2 + 0,6806 x^3$	**	1,00
$Y_{14,0} = -50,7242 + 30,9482 x - 5,9259 x^2 + 0,3676 x^3$	*	1,00
^{2/}Comprimento da haste caulinar		
$Y = -36,7485 + 21,9906 x - 4,1375 x^2 + 0,2531 x^3$	**	1,00
^{2/}Peso da matéria fresca		
$Y = 316,3940 - 43,1553 x$	**	0,91

^{1/} Observações transformadas segundo arco seno da raiz de X/100

^{2/} Observações transformadas segundo raiz quadrada de X+0,5

** e * $\alpha < 0,0100$ e $0,0500$, respectivamente, pelo teste F.

TABELA 3A. Resumo das equações de regressão dos níveis de pH dentro do fator ágar para as variáveis porcentagem de sobrevivência, comprimento do sistema radicular, peso da matéria fresca, número de pares de folhas e efeito do ágar sobre o comprimento da haste caulinar, em "seedlings" de laranjeira 'Natal' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). UFLA, Lavras, MG, 1997.

Equações de regressão	Níveis de significância	r ²
^{1/}Porcentagem de sobrevivência		
$Y_{3,7} = 65,6250 - 15,3274 x + 3,0612 x^2 - 0,1336 x^3$	**	0,65
$Y_{4,7} = 55,5107 - 9,1097 x + 2,7259 x^2 - 0,1414 x^3$	**	0,97
$Y_{5,7} = 49,6500 + 3,4500 x$	**	0,93
$Y_{6,7} = 40,1786 + 12,7551 x - 0,6560 x^2$	**	0,96
^{2/}Comprimento do sistema radicular		
$Y_{3,7} = 1,0302 + 0,0873 x$	**	0,64
$Y_{4,7} = 1,0543 + 0,3135 x - 0,0198 x^2$	**	0,58
$Y_{5,7} = 1,2475 + 0,1705 x - 0,0099 x^2$	**	0,95
$Y_{6,7} = 0,8454 + 0,2610 x - 0,0155 x^2$	**	0,97
^{2/}Peso da matéria fresca		
$Y_{3,7} = 175,0401 - 26,7349 x + 1,4803 x^2$	**	0,58
$Y_{4,7} = 112,5805 - 5,4483 x$	**	0,72
$Y_{5,7} = 114,2965 - 6,0557 x$	**	0,60
$Y_{6,7} = 119,0785 - 4,6444 x$	**	0,63
^{2/}Número de folhas		
$Y_{3,7} = 0,5636 + 0,2816 x - 0,0131 x^2$	**	0,85
$Y_{4,7} = 0,9039 + 0,3427 x - 0,0203 x^2$	**	0,79
$Y_{5,7} = 0,9764 + 0,1997 x - 0,0105 x^2$	**	0,91
$Y_{6,7} = 0,7433 + 0,3292 x - 0,0201 x^2$	**	0,96
^{2/}Comprimento da haste caulinar		
$Y = 0,7111 + 0,1329 x - 0,0074 x^2$	**	0,98

^{1/} Observações transformadas segundo arco seno da raiz de X/100

^{2/} Observações transformadas segundo raiz quadrada de X+0,5

** $\alpha < 0,0100$, pelo teste F.

TABELA 4A. Resumo das equações de regressão das concentrações de sais do meio MS dentro do fator sacarose, para as variáveis comprimento da haste caulinar, número de pares de folhas, comprimento do sistema radicular e porcentagem de sobrevivência em "seedlings" de laranjeira 'Pêra' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). UFLA, Lavras, MG, 1997.

Equações de regressão	Nível de Significância.	r ²
^{1/}Comprimento da haste caulinar		
$Y_{100} = 3,3657 + 0,1590 x - 0,0072 x^2 + 0,0001 x^3$	*	1,00
$Y_{75} = 2,0612 + 0,0480 x$	**	0,88
$Y_{50} = 0,9656 + 0,0494 x$	**	0,93
$Y_{25} = 1,4335 + 0,3854 x - 0,0173 x^2 + 0,0002 x^3$	**	1,00
$Y_{0,0} = 0,9633 + 0,4069 x - 0,0208x^2 + 0,0002 x^3$	**	1,00
^{1/}Número de pares de folhas		
$Y_{100} = 2,2285 + 0,0292 x - 0,0006 x^2$	**	0,85
$Y_{75} = 1,0917 + 0,0717 x - 0,0008 x^2$	**	0,98
$Y_{50} = 0,7774 + 0,0474 x - 0,0004 x^2$	**	0,94
$Y_{25} = 1,0550 + 0,1773 x - 0,0076 x^2 + 0,0001 x^3$	**	1,00
$Y_{0,0} = 0,8365 + 0,1770 x - 0,0091 x^2 + 0,0001 x^3$	**	1,00
^{1/}Comprimento do sistema radicular		
$Y_{100} = 2,2138 - 0,0113 x$	**	0,79
$Y_{75} = 1,6257 + 0,0233 x$	**	0,94
$Y_{50} = 0,7026 + 0,0309 x$	**	0,91
$Y_{25} = 1,1889 + 0,0732 x - 0,0011 x^2$	**	0,92
$Y_{0,0} = 0,9628 + 0,1888 x - 0,0099 x^2 + 0,0001 x^3$	**	1,00
^{2/}Porcentagem de sobrevivência		
$Y_{100} = 93,8326 + 0,1732 x - 0,0022 x^2$	**	0,93
$Y_{75} = 91,4487 + 0,1759 x - 0,0021 x^2$	**	0,96
$Y_{50} = 72,6177 + 0,2758 x - 0,0032 x^2$	**	0,98
$Y_{25} = 83,8887 + 0,1748 x - 0,0022 x^2$	**	0,72
$Y_{0,0} = 86,6488 - 0,0247 x$	**	0,62

^{1/} Observações transformadas segundo raiz quadrada de X+0,5

^{2/} Observações transformadas segundo arco seno da raiz de X/100

** e * $\alpha < 0,0100$ e $0,0500$, respectivamente, pelo teste F.

TABELA 5A. Resumo das equações de regressão das concentrações de ácido giberélico (GA₃) dentro do fator carvão ativado, para as variáveis haste caulinar, sistema radicular e porcentagem de sobrevivência, em "seedlings" híbridos de *Citrus limonia* Osbeck. \times *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. UFLA, Lavras, MG, 1997.

Equações	Nível de Significância	r ²
^{1/} Haste caulinar		
$Y_{0,00} = 0,0764 + 1,6107 x - 0,5513 x^2$	**	0,91
$Y_{0,10} = 1,2219 - 0,5779 x$	**	0,80
^{1/} Sistema radicular		
$Y_{0,00} = 0,1807 + 2,5708 x - 0,9730 x^2$	**	0,78
$Y_{0,10} = 1,5892 - 0,4737 x$	**	0,86
^{2/} Porcentagem de sobrevivência		
$Y_{0,01} = 62,4545 + 51,5456 x - 19,0909 x^2$	*	0,89
$Y_{0,10} = 91,7030 - 21,5221 x$	**	0,64
$Y_{1,00} = 81,6727 - 44,3181 x + 24,1015 x^2$	**	0,94

^{1/} Observações transformadas segundo log de X+0,5

^{2/} Observações transformadas segundo arco seno da raiz de X/100

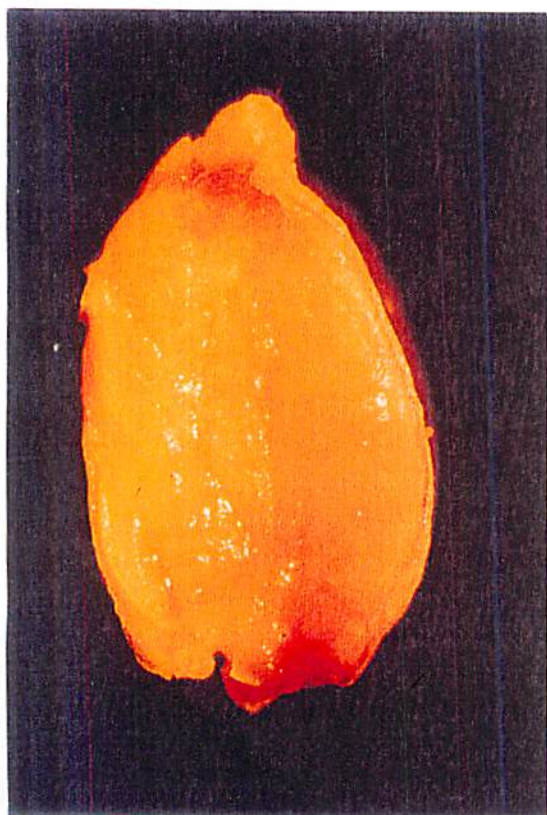
** e * $\alpha < 0,0100$ e $0,0500$, respectivamente, pelo teste F.

TABELA 5 - Foto 1a: "Seedlings" híbridos de *Citrus limonia* Osbeck. \times *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., resgatados em estádios cotiledonares de desenvolvimento.

Fotos 1b e 1c: Embrião em estágio globular de desenvolvimento na região micropilar da semente, que pelas características peculiares demonstradas, sugere-se ser o embrião zigótico (1b e 1c). UFLA, Lavras, MG, 1997.



1a



1b



1c