

EDUARDO OSSAMU NAGAO

"EFEITOS DA SACAROSE, NITROGÊNIO INORGÂNICO E
ÁCIDO INDOL BUTIRICO NA PROPAGAÇÃO IN VITRO DO
PORTA-ENXERTO **Poncirus trifoliata** (L.) Raf."

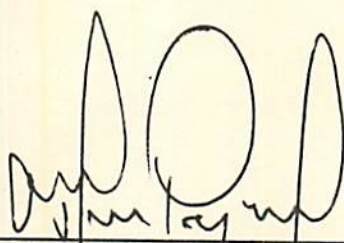
Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras como parte das exigências do curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal para obtenção do grau de "Mestre",

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS
LAVRAS - MINAS GERAIS

199

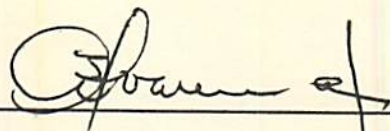
**EFEITOS DA SACAROSE, NITROGÊNIO INORGÂNICO E
ÁCIDO INDOL BUTÍRICO NA PROPAGAÇÃO IN VITRO
DO PORTA-ENXERTO *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.**

Aprovada em: 12/07/1993

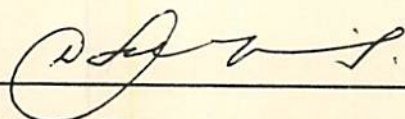


Prof. Dr. Moacir Pasqual

Orientador



Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga



Prof. Dr. Nilton Nagib J. Chalfun

Aos meus pais

Yoruzu e Humie

Às minhas irmãs

Nair, Elizabete, Eloiza e Eunice

Ao meu irmão

Alberto (in memoriam)

À minha tia

Odete

Aos parentes

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo;

Aos meus pais e irmãs, pelo carinho que me dedicaram durante o curso;

À Escola Superior de Agricultura de Lavras, particularmente ao Departamento de Biologia e ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela concessão da bolsa de estudos durante a realização do curso;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais, FAPEMIG, pelo auxílio na execução de projetos;

Ao professor Moacir Pasqual, pela orientação, amizade e sugestões apresentadas;

Aos professores Amauri Alves de Alvarenga e Luiz Motta de Oliveira, pelo estímulo e colaboração e acima de tudo, pelo exemplo profissional;

Aos amigos, Cícero, Claudinéia, Fátima, Jailson, Arie, Ricardo, Vicente, Regina, Waldir e demais amigos do curso de mestrado, pela amizade e incentivo nas horas mais difíceis;

À amiga Márcia Pereira da Costa pela amizade e incentivo durante o curso;

À Universidade do Amazonas, particularmente ao ICB e DBI, pela oportunidade;

Aos professores, funcionários e colegas da ESAL, com os quais convivi e que de uma forma ou outra contribuíram para a realização deste trabalho;

Aos laboratoristas Vantuil e Evaldo pelo auxílio durante a execução dos experimentos;

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

BIOGRAFIA

EDUARDO OSSAMU NAGAO, filho de Yorozu Nagao e Humie Nagao, nasceu em Assaí, PR, em 9 de dezembro de 1964.

Graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Londrina, UEL, em setembro de 1987.

Iniciou o curso de Mestrado em Fisiologia Vegetal, na Escola Superior de Agricultura de Lavras, em fevereiro de 1990.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Cultura "In Vitro" de Citros	3
2.2. Efeitos do meio de cultura	4
2.2.1. Papel dos carboidratos	5
2.2.2. Papel do nitrogênio inorgânico	8
2.2.3. Vitaminas e outras substâncias orgânicas	10
2.3. Enraizamento	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Experimento A: Efeitos da Concentração de Sacarose e Nitrogênio na Multiplicação "In Vitro" do Porta-enxerto <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.	17
3.2. Experimento B: Efeitos da Concentração de Sacarose e IBA no Enraizamento de Brotos do Porta-enxerto <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	19
4.1. Experimento A	19
4.1.1. Número médio de brotos e número de brotos superiores a 1 cm	19
4.1.2. Tamanho médio de brotos e peso total da matéria seca	27

	Página
4.2. Experimento B: Sacarose × AIB	34
5. CONCLUSÕES	41
6. RESUMO	42
7. SUMMARY	44
8. LITERATURA CITADA	46

LISTA DE QUADROS

Quadro		Página
1	Composição química do meio "MS" (Murashige & Skoog, 1962) e suas respectivas concentrações	15
2	Resumo da análise de variância e regressão para o número médio de brotos do porta-enxerto <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf. nos diferentes níveis de sacarose e nitrogênio inorgânico. ESAL, Lavras/MG, 1992	20
3	Médias do número total de brotos por explante do porta-enxerto <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf., obtidos in vitro, em diferentes concentrações de sacarose e nitrogênio. ESAL, Lavras/MG, 1992 ..	21
4	Resumo da análise de variância e regressão para o número médio de brotos maiores que 1cm de comprimento do porta-enxerto <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf., nas diferentes concentrações de sacarose e nitrogênio. ESAL, Lavras/MG, 1992	24
5	Número médio de brotos maiores que 1cm de comprimento por explante obtido "in vitro" do porta-enxerto <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf., em diferentes concentrações de sacarose e nitrogênio. ESAL, Lavras/MG, 1992	25

Quadro	Página
6 Resumo da análise de variância e regressão para o tamanho médio de brotos do porta-enxerto <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf., nas diferentes concentrações de sacarose e nitrogênio. ESAL, Lavras/MG, 1992	28
7 Tamanho médio de brotos por explante do porta-enxerto <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf., em diferentes concentrações de sacarose e nitrogênio. ESAL, Lavras/MG, 1992	29
8 Resumo da análise de variância e regressão para peso da matéria seca do porta-enxerto <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf., nas diferentes concentrações de sacarose e nitrogênio; após 45 dias de cultivo "in vitro". ESAL, Lavras/MG, 1992	31
9 Média do peso da matéria seca (g) do porta-enxerto <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf. após 45 dias de cultivo "in vitro" nas diferentes concentrações de sacarose e nitrogênio. ESAL, Lavras/MG, 1992 ..	32
10 Resumo da análise de variância para percentagem de enraizamento do porta-enxerto <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf., 21 dias após a inoculação nas diferentes concentrações de sacarose e AIB. ESAL, Lavras/MG, 1992	34

Quadro	Página
11 Percentagem de enraizamento das brotações do porta-enxerto <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf., nas diferentes concentrações de sacarose e AIB, 7 e 21 dias após a inoculação. ESAL, Lavras/MG, 1992	35
12 Percentagem média de enraizamento do porta-enxerto <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf., 21 dias após a inoculação nas diferentes concentrações de sacarose e AIB. ESAL, Lavras/MG, 1992	36
13 Resumo da análise de variância para o número médio de raízes do porta-enxerto <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf., nas diferentes concentrações de sacarose e AIB. ESAL, Lavras/MG, 1992	37
14 Médias do número de raízes emitidas por explante do porta-enxerto <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf., nas diferentes concentrações de sacarose e AIB. ESAL, Lavras/MG, 1992	38

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Efeito das combinações de sacarose e nitrogênio no número médio de brotos do porta-enxerto <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf. obtido em condições "in vitro". ESAL, Lavras/MG, 1992	22
2	Efeito das combinações de sacarose e nitrogênio inorgânico sobre o número médio de brotos maiores que 1 cm de comprimento do porta-enxerto <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf. obtido em condições "in vitro". ESAL, Lavras/MG, 1992	26
3	Efeito das combinações de sacarose e nitrogênio inorgânico sobre o tamanho médio de brotos do porta-enxerto <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf. obtido em condições "in vitro". ESAL, Lavras/MG, 1992	30
4	Efeito das combinações de sacarose e nitrogênio inorgânico sobre o peso da matéria seca do porta-enxerto <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf. após 45 dias de cultivo "in vitro". ESAL, Lavras/MG, 1992	33
5	Efeito das combinações de sacarose e AIB sobre o número de raízes do porta-enxerto <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf. obtidas "in vitro". ESAL, Lavras/MG, 1992	39

1. INTRODUÇÃO

A propagação "in vitro" é uma das técnicas de cultura de tecidos vegetais mais bem sucedida e tem sido amplamente utilizada principalmente em espécies ornamentais (MANGAT et alii, 1989), frutíferas (INFANTE et alii, 1989 e BARALDI et alii, 1988) e algumas essências florestais (NOH et alii, 1988; RUTLEDGE & DOUGLAS, 1988; GUPTA, 1980 e BENNETT & McCOMB, 1982). Em associação com outras técnicas de cultura de tecidos de plantas, propicia certas vantagens sobre os métodos de propagação convencional, permitindo a obtenção em curto espaço de tempo, em qualquer época do ano, de um grande número de plantas de boa qualidade fitossanitária e autenticidade varietal.

No caso dos citros esta técnica pode ser uma alternativa na propagação de porta-enxertos, principalmente de espécies com características importantes como o *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., que apresenta fatores de resistência ao vírus causador da tristeza e principalmente tolerância a temperaturas baixas (HEARN et alii, 1974).

Segundo MURASHIGE & SKOOG (1962), a propagação "in vitro" compreende várias etapas: (a) indução ou ativação das gemas axilares, (b) desenvolvimento das gemas, (c) indução de raízes e finalmente (d) aclimação das plântulas. Normalmente cada fase exige diferentes requerimentos por carboidratos, nitrogênio, reguladores de crescimento e outras substâncias orgânicas necessárias para o processo de crescimento e desenvolvimento dos explantes. Entretanto, o sucesso

da micropropagação depende, não só dos fatores inerentes ao tecido vegetal (genéticos e fisiológicos), das condições térmicas e luminosas em que a cultura é mantida, mas também de um meio de cultura apropriado que permita a indução, multiplicação e crescimento das brotações adventícias. As exigências nutricionais requeridas para o crescimento de um tecido em condições "in vitro" varia de espécie para espécie, de variedade para variedade e até mesmo dentro da própria planta, o que torna necessária a otimização dos meios de cultura.

Este trabalho objetivou estudar os efeitos da sacarose, nitrogênio inorgânico e AIB (ácido indol butírico) sobre a multiplicação e enraizamento "in vitro" de brotações apicais do porta-enxerto *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cultura "In Vitro" de Citros

Um dos primeiros trabalhos no estabelecimento "in vitro" de citros foi o de MAHESHWARI & RANGASWANY (1958) cultivando óvulos e sementes em várias fases de desenvolvimento, anterior e após a sua fertilização. Recentemente nove diferentes espécies de citros, uma espécie de *Poncirus trifoliata* e um cruzamento intergenérico entre *Citrus* e *Poncirus* foram cultivados "in vitro" com sucesso (BARLASS & SKENE, 1986; SPIEGEL-ROY & VARDI, 1985; DURAN-VILA, et alii, 1989; BELOUALY, 1991; SIM et alii, 1989; GAVISH, 1991 e PASQUAL, 1985).

SAUTON et alii (1982) verificaram que o processo de regeneração de plantas "in vitro" nas espécies citricas pode ocorrer diretamente do explante ou indiretamente após a formação de calos. Conforme BELOUALY (1991) plantas completas foram regeneradas a partir de calos derivados de cultura de embriões de *Citrus aurantium*, *Poncirus trifoliata* e de "Carrizo citrange" via embriogênese somática e ou organogênese. Resultados similares foram descritos por vários outros autores (GAVISH, 1991; DURAN-VILA et alii, 1989; PASQUAL, 1985; SPIEGEL-ROY & VARDI, 1985 e CHATUVERDI & MITRA, 1974).

O processo de regeneração de plântulas é também influenciado pela origem e tamanho dos explantes. ALTMAN & GOREN (1977), trabalhando com

Citrus sinensis, observaram que pequenas gemas laterais quando apresentavam segmentos de caule, cresciam formando brotos bem desenvolvidos. BARLASS & SKENE (1986), utilizando segmentos nodais com menos de 1 cm retirados de ramos jovens e adultos, verificaram que os explantes originados dos ramos jovens possuíam maior capacidade de regeneração do que aqueles originados de ramos adultos.

Em casos de explantes originados de culturas já estabelecidas "in vitro", JOHN & MURRAY (1981) verificaram que explantes que eram ápices na cultura anterior apresentavam maior capacidade de multiplicação do que aqueles que tinham sido laterais.

Tecidos nucelares de sementes são interessantes fontes de explantes, pois são geneticamente idênticos a planta matriz e apresentam grande capacidade morfogênica. Em citros, é bem conhecido o potencial embriogênico do nucelo de sementes imaturas, o qual pode ser fonte de explante inicial para micropropagação de variedades mono e poliembriônicas (WAKANA & UEMOTO, 1987; PASQUAL, 1985; NAVARRO et alii, 1985; ESAN, 1973; KOCHBA et alii, 1972 e RANGAN et alii, 1968).

2.2. Efeitos do Meio de Cultura

Os meios de cultura geralmente são compostos de uma fonte de carboidrato, macro e micronutrientes e outras substâncias orgânicas. Normalmente para o cultivo de citros são utilizados os meios MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e ou meio M.T. (MURASHIGE & TUCKER, 1969).

Na literatura, encontram-se várias formulações de meio para as mais diversas espécies cultivadas "in vitro"; verifica-se também muitas vezes, a necessidade da formulação de um meio apropriado dentro da mesma espécie ou até mesmo para o tipo de explante utilizado.

Nesta revisão será dado maior importância aos carboidratos e nitrogênio inorgânico presentes no meio, sendo que para aos outros componentes far-se-ão apenas considerações gerais.

2.2.1. Papel dos carboidratos

As células, tecidos e órgãos, bem como as plântulas cultivada "in vitro", possuem uma baixa ou quase inexistente capacidade fotossintética, razão pela qual requerem carboidratos no meio de cultura para suprimento de suas necessidades metabólicas. Os carboidratos, a partir de sua hidrólise, fornecem energia metabólica e esqueletos carbônicos para os vários processos biossintéticos implicados na diferenciação e crescimento das células "in vitro".

→ A sacarose tem sido o carboidrato preferencialmente utilizado no meio de cultivo devido a certas características, como: alta solubilidade, rápida metabolização, ser o açúcar mais transportado e armazenado pela maioria das células vegetais (THORPE & BEAUDOINEAGAN, 1984 e THOMPSON & THORPE, 1987). Além da sacarose outros açúcares tem sido utilizados como fonte de energia e de esqueletos de carbono (SIPKINS, 1970 e TREMBLAY & TREMBLAY, 1991). THOMPSON & THORPE (1987), demonstraram que ápices de amora cresciam melhor em meios suplementados com frutose e glicose. Outros autores verificaram que a taxa de crescimento de células de álamo eram semelhantes quando crescidas em meios com sacarose, glicose e frutose, entretanto quando crescidas em meio contendo amido solúvel, rafinose, galactose, trealose e maltose a taxa de crescimento das células diminuía.

→ Em citros tem sido verificado que a embriogênese é induzida em meio contendo como fontes de carboidratos a galactose, lactose e rafinose (GAVISH, 1991).

Não só a fonte de açúcar tem grande influência nos processos de cultivo "in vitro", mas a sua concentração efetiva tem mostrado atuar na formação de brotos. Em muitas espécies, a sacarose é utilizada em uma concentração entre 2 a 4%. Em porta-enxertos de maçã, a sacarose à 3% propicia a iniciação de brotos em segmentos nodais e boa taxa de multiplicação e desenvolvimento normal dos propágulos (CHONG & PUA, 1985).

⇒ Concentrações mais elevadas de sacarose (5%) tem sido consideradas ótimas para citros (PASQUAL 1985 e CHATUVERDI & MITRA, 1974). Entretanto, há casos em que essa concentração tende a ser superior ou inferior a 5% (NAVARRO et alii, 1985 e SAID & MURASHIGE, 1979).

De acordo com GAMBORG et alii (1970), a concentração de sacarose também afeta a assimilação de nitrogênio do meio de cultura pelas células, este efeito poderia estar relacionado com a necessidade energética requerida pelo processo. O mesmo autor também relata que o efeito da citocinina na divisão celular pode também depender da disponibilidade do açúcar. Meios contendo altas concentrações de sacarose e baixas de citocinina favorecem a diferenciação e crescimento de brotações.

Os carboidratos, bem como suas concentrações efetivas no meio de cultura, podem estimular determinado processo e inibir outro. Muitas vezes as concentrações utilizadas para promover o crescimento dos explantes são inibitórias para síntese de clorofila (CALDAS et alii, 1990 e YAMADA & SATO, 1978). Esta inibição, segundo PAMPLIN & CHAPMAN (1975) poderia estar relacionada com a inibição da atividade da enzima ALAsintetase que atua na síntese do ácido amino levulínico, precursor das moléculas de porfirina componentes da clorofila.

A concentração efetiva da sacarose no meio também influencia a produção de metabólitos secundários (SAKUTA, 1987 e WIJNSMA, 1980). Estas substâncias são de grande importância nos processos metabólicos e, dependendo de

sua natureza química, podem fazer parte de componentes da parede celular ou atuar como precursores de alguma substância orgânica, como por exemplo os fenólicos (WESTCOTT & HENSHAW, 1976).

Os processos de influxo de substâncias orgânicas ou minerais nas células são controlados pela membrana plasmática, que em função de suas características estruturais, constitui uma barreira seletiva.

A sacarose, principal fonte de carboidratos, para entrar na célula e ser prontamente metabolizada deve ser quebrada em moléculas menores e, nestas condições, é transportada através das membranas. Similarmente, nas plantas cultivadas em condições "in vivo", a hidrólise da sacarose em glicose e frutose são realizadas por enzimas específicas localizadas na parede celular (MARETZKI et alii, 1971). Os produtos da hidrólise da sacarose, glicose ou frutose, uma vez no interior da célula, podem entrar na via glicolítica, rota da pentose fosfato ou serem armazenadas nos vacúolos na forma de amido. A metabolização da sacarose fornece ATP e precursores intermediários para o ciclo do ácido tricarbóxico e a rota da pentose fosfato fornece poder redutor na forma de NADP, pentose para a síntese de ácidos nucleicos e outros compostos intermediários (THORPE, 1982 e BROWN & THORPE, 1982). O poder redutor pode ser utilizado na redução de nitrato em amônio no processo de assimilação do nitrogênio e os ácidos nucleicos na síntese de várias proteínas.

THORPE (1982), trabalhando com calos de fumo, observou que os carboidratos e seus produtos de degradação atuavam para manter um alto potencial hídrico e osmótico nas células em fase de diferenciação em brotos. O possível significado de tal efeito estaria envolvido com as propriedades da membrana plasmática, que poderiam alterar o balanço iônico das células bem como as propriedades das proteínas presentes na membrana, como a ATPase (ZIMMERMANN, 1978).

Um aumento da pressão osmótica provoca um aumento na atividade mitocondrial, sugerindo que para manter um alto potencial osmótico necessitaria alta quantidade energética, que também é requerida para os processos de formação de brotos.

2.2.2. Papel do nitrogênio inorgânico

O nitrogênio é um dos elementos essenciais e ativos para diversos processos metabólicos da planta, pois é constituinte de várias biomoléculas essenciais tais como: amino ácidos, ácidos nucleicos, proteínas, enzimas e outros (MAGALHÃES & WILCOX, 1987 e SAKUTA et alii, 1987). Além disso, o nitrogênio juntamente com a sacarose, é o principal componente em quantidade no meio de cultura, contribuindo de forma efetiva tanto no metabolismo celular como na regulação do potencial osmótico do meio.

O crescimento e a morfogênese de células e tecidos de plantas cultivadas "in vitro" são marcadamente influenciadas pela disponibilidade e a forma na qual o nitrogênio é suplementado no meio de cultivo. De acordo com DOUGALL (1980), o nitrogênio além de exercer um papel importante no crescimento, também pode influenciar na produção de metabólitos secundários em plantas superiores.

O nitrogênio inorgânico, geralmente, é fornecido no meio de cultura principalmente na forma de sais de nitrato e ou na forma de amônio. Muitos meios utilizam somente nitrato como fonte de nitrogênio inorgânico, sendo que o íon amônio muitas vezes pode ser tóxico para as células vegetais. O amônio livre, quando acumulado em altas concentrações no citoplasma celular, pode desencadear vários desarranjos no metabolismo celular, tais como: desacoplamento na cadeia de transporte de elétrons, oxidação dos nucleotídeos pirimídicos e inibição de algumas

enzimas, entre outros (CALDAS et alii, 1990; YATTAZAWA & FURUHASHI, 1978 e GAMBORG & SHYLUK, 1970).

No entanto, esta toxicidade pode ser eliminada quando há disponibilidade de alfa-ceto ácidos e fotossintatos, incluindo piruvato, malato e citrato, onde o íon amônio pode ser incorporado diretamente em aminoácido (GAMBORG & SHYLUK, 1970).

A presença de íons nitrato e amônio também se faz necessária no meio de cultura para o estabelecimento "in vitro" de muitas espécies. Estes íons são de grande importância no controle de um pH adequado no meio de cultura, atuando como agente tamponante, favorecendo a absorção tanto dos íons amônio e nitrato como de outros íons presentes no meio de cultura.

Um aspecto importante da presença destes dois íons como fontes de nitrogênio é que a assimilação do nitrato requer maior demanda energética quando comparada com a assimilação do amônio. Esta demanda energética provavelmente é fornecida pelo metabolismo de carboidratos suplementados no meio após sua hidrólise.

→ Vários são os relatos evidenciando que não só a quantidade relativa de nitrato ou amônio pode ser crítica no processo de morfogênese e no crescimento, mas também a sua concentração total possui grande influência (SAKUTA, 1987 e GAMBORG, 1970).

⇒ MARGARA (1969) mostrou que a formação de brotos adventícios a partir de pedúnculo de couve-flor dependia do conteúdo total de nitrogênio no meio. Resultados similares foram obtidos por → ROEST & BOKELMANN (1981), evidenciando que a formação de brotos adventícios era afetada pela quantidade de nitrogênio total do meio, e que a taxa de consumo de sacarose presente no meio de cultura estaria relacionada com o nível e a natureza da fonte de nitrogênio.

O metabolismo de nitrogênio é bastante complexo e a sua assimilação bem como as respostas da planta depende da forma em que o nutriente é fornecido (MAGALHÃES & WILCOX, 1987). A assimilação e incorporação do nitrogênio em compostos orgânicos requerem a participação de várias enzimas. A redução de nitrato e amônio via redutase do nitrato, redutase do nitrito, glutamina sintetase e glutamina sintase tem sido demonstrada em células cultivadas "in vitro" (DOUGAL, 1980). Segundo LENEÉ & CHAPEAU (1986), a redutase do nitrato é induzida pela presença de ions nitrato e inibida por ions amônio.

O ion amônio normalmente é a via preferencial de assimilação do nitrogênio nos compostos orgânicos, comparado ao ion nitrato. Além do favorecimento do pH do meio (aproximadamente 5,7), a assimilação do ion amônio requer uma demanda energética menor em relação a assimilação do ion nitrato. Segundo STAFFORD & FOWLER (1983), a assimilação do ion nitrato necessita de poderes redutores (NADP e NADPH) para o funcionamento da rota biossintética até a síntese de glutamina. JESSUP & FOWLER (1977) verificaram em seus trabalhos que a principal fonte de poder redutor para redução do nitrato em amônio era proveniente da rota da pentose fosfato.

2.2.3. Vitaminas e outras substâncias orgânicas

Para algumas espécies cultivadas "in vitro" o requerimento por vitaminas e outras substâncias orgânicas complexas se faz necessário para o processo que envolve a indução e desenvolvimento de brotos. Em citrus, o aumento das concentrações relativas de vitaminas no meio de cultura, tem beneficiado o processo de crescimento e desenvolvimento de explantes cultivados "in vitro" (PASQUAL, 1985; CHATUVERDI & MITRA, 1974 e MURASHIGE & TUCKER, 1969). No

entanto, os tipos de vitaminas e suas devidas concentrações variam de acordo com a espécie, o tipo de explante utilizado e o objetivo de estudo.

Misturas complexas orgânicas tais como: extrato de malte, suco de laranja, água de côco, tem sido utilizadas com frequência para cultivo "in vitro" de citrus e outras espécies. Tais substâncias fornecem um conjunto de aminoácidos e outros co- fatores orgânicos que estimulam o crescimento e desenvolvimento dos explantes.

Geralmente o uso destas substâncias ocorre quando os explantes apresentam baixa resposta em meio normal de cultivo, todavia, o seu uso é criticado devido a sua composição química ser variável.

2.3. - *Enraizamento*

O enraizamento é a etapa que antecede a aclimação das plântulas obtidas "in vitro". A formação de um sistema radicular bem definido é de extrema importância para a sobrevivência e o crescimento das plântulas nas novas condições do ambiente.

SOMMER & CALDAS (1981) observaram que a sobrevivência das plântulas não dependia apenas da formação de um sistema radicular bem definido, mas também do desenvolvimento de um bom sistema vascular entre o broto e a raiz e uma boa relação raiz/broto.

O processo de enraizamento pode ser realizado tanto "in vitro" com o em condições "in vivo" (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990 e MOHAMMED & VIVADER, 1988). No primeiro sistema, as raízes são regeneradas ainda em condições assépticas no próprio meio de cultura e as plântulas completas são transplantadas para o substrato. No segundo, também denominado "ex vitro", os brotos são retirados dos frascos e manipulados como microestacas.

GRATTAPAGLIA & MACHADO (1990) também verificaram que as plântulas enraizadas pelo sistema "ex vitro" produziram um sistema radicular mais completo e funcional do que as obtidas através do sistema "in vitro".

A habilidade dos tecidos formarem raízes depende de vários fatores, endógenos e ou exógenos e suas interações (NÉMETH, 1986; HAISSING, 1982 e THOMPSON & THORPE, 1987).

O papel das auxinas na indução e no desenvolvimento de raízes tem sido amplamente estudado. SRISKANDARAJAH & MULLINS (1981) verificaram que a aplicação exógena de auxina induzia a formação de raízes em várias espécies. Diversas auxinas sozinhas ou combinadas podem ser utilizadas no processo de indução de raiz, cujas concentrações variam conforme a espécie.

As principais auxinas utilizadas foram: o ácido indol butírico (AIB), o ácido naftaleno acético (ANA) e o ácido indol acético (AIA) (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990; MOHAMMED & VIVADER, 1988; BONGA, 1987; NÉMETH, 1986; HYNDMAN et alii, 1989 e JONES et alii, 1977).

SRISKANDARAJAH & MULLINS (1981) também observaram o comportamento de diferentes auxinas no meio de enraizamento e concluíram que o melhor resultado foi obtido com AIB, onde ocorreu o desenvolvimento da raiz diretamente da epiderme, ao passo que com o ANA houve a formação de raízes somente na superfície da base dos brotos.

KITTO & YOUNG (1981) deteminaram como sendo o ANA a melhor auxina para o enraizamento de brotações de "Citrange Carrizo". BARLASS & SKENE (1986) utilizando-se de brotações com mais de 1 cm, verificaram que estas enraizavam em meio WHITE (1964) com elevados níveis de ANA. PASQUAL (1985) obteve melhor enraizamento de brotações oriundas a partir de gemas axilares juvenis de "Valência", utilizando o meio MT (MURASHIGE & TUCKER, 1969)

suplementado com ANA - 0.1 a 1.0 mg/L mais AIB - 2.0 mg/L, e de "Trifoliata" com AIB - 1.0 a 2.0 mg/L ou com ANA - 5.0 mg/L mais BAP - 0.1 mg/L.

A iniciação de raízes é um processo que demanda bastante energia e o requerimento por carboidratos no meio muitas vezes faz se necessário (MOHAMMED & VIVADER, 1988; THORPE, 1982 e LANE, 1978). De acordo com GEORGE & SHERRINGTON (1984), a presença de carboidratos tem mostrado ser essencial para a formação de raízes "in vitro" de muitas espécies. LANE (1978) observou em plântulas de maçã que a indução de raiz diminuía proporcionalmente com o decréscimo de sacarose, e que os brotos enraizados na ausência de sacarose não sobreviviam quando transferidas para o substrato em casa de vegetação.

Já alguns autores observaram que, para algumas espécies, a redução de sacarose no meio tem sido benéfica para o processo de indução de raízes (ZIMMERMANN, 1983 e SRISKANDARAJAH & MULLINS, 1981). Estudos sobre enraizamento indicaram que existe um requerimento para carboidratos e um nível ótimo, que alguns são mais eficientes do que outros (NANDA & JAIN, 1972) e também existe uma interação do nível de carboidratos como o nível hormonal endógeno (NÉMETH, 1986 e HYNDMAN et alii, 1989).

BHOJWANI & RAZDAN (1983) verificaram que a diferenciação em tecidos vasculares é afetada pela auxina e sacarose. De acordo, com os mesmos autores, o efeito da auxina na diferenciação em tecidos vasculares está relacionado com a presença de sacarose. A quantidade relativa de floema e xilema em calos de feijão pode ser alterado pela variação da concentração de sacarose na presença de baixas concentrações de auxina.

Baixos níveis de sacarose (em torno de 2%) favorecem a formação de xilema, mas quando utiliza-se uma concentração entre 2.5 a 3.5%, tanto xilema quanto floema são formados e acima de 4% favorece a formação de floema (BHOJWANI & RAZDAN, 1983).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de Agricultura da Escola Superior de Agricultura de Lavras, em Lavras Minas Gerais, utilizando-se o porta-enxerto *Poncirus trifoliata* (L) Raf

Os ensaios foram realizados "in vitro" em duas etapas, a partir da obtenção dos propágulos: (1) multiplicação das brotações e (2) enraizamento das brotações. Todo o material utilizado foi previamente esterilizado e as operações de inoculação foram efetuadas assepticamente em câmara de fluxo laminar do tipo vertical.

O meio de cultura básico utilizado nos ensaios foi o "MS" descrito por MURASHIGE & SKOOG (1962), cujos componentes e suas respectivas concentrações estão apresentados no Quadro 1. No experimento de multiplicação das brotações, as concentrações de nitrogênio inorgânico total presentes na composição do meio foram variadas.

O meio de cultura básico (MS) foi suplementado com reguladores de crescimento nas seguintes concentrações: ANA (1.0 mg/L) e BAP (1.0 mg/L).

As soluções estoques de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas e aminoácidos constituintes do meio de cultura, foram preparadas e armazenadas a 4°C, tendo sido o frasco de solução de Fe-EDTA revestido de papel alumínio. As

QUADRO 1. Composição química do meio "MS" (Murashige & Skoog, 1962) e suas respectivas concentrações.

SAIS	SOLUCAO FINAL		
MACRONUTRIENTES	P.M.	mg/L	mM
1 - NH_4NO_3	80.04	1.649	20.6
2 - KNO_3	101.11	1.901	18.8
3 - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	147.02	441	3.0
4 - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246.50	370	1.5
5 - KH_2PO_4	136.09	170	1.25
6 - Na_2 EDTA	372.25	37.25	30.23
7 - $\text{FeSO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	278.03	27.80	0.1
MICRONUTRIENTES	P.M.	mg/L	μM
8 - H_3BO_3	61.83	6.18	100
9 - $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	169.01	16.90	100
10 - $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	287.93	8.63	30
12 - $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	241.93	0.242	1.0
13 - $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	237.93	0.0238	0.1
14 - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	249.68	0.0250	0.1
SUPLEMENTOS ORGÂNICOS	P.M.	mg/L	μM
15 - INOSITOL	180.20	99.11	550
16 - TIAMINA.HCL	337.27	10.11	30
17 - PIRIDOXINA.HCL	205.64	2.05	10
18 - ACIDO NICOTÍNICO	123.11	1.84	15

soluções estoques de reguladores de crescimento foram preparadas no dia de sua utilização no meio de cultura e foram dissolvidos em KOH 0.5 N.

O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5.7 ± 0.1 , antes da adição do ágar, utilizando-se KOH ou HCl a 0.1 ou 0.5N. Os meios de cultura foram solidificados com 0.7% de ágar, distribuindo 15 mL por tubo de ensaio (2.5 x 15 cm) os quais foram vedados com tampas de polipropileno.

A esterilização do meio de cultura foi realizada por autoclavagem à temperatura de 121°C e à pressão de 1.05 Kg/cm^2 , durante 15 minutos. Após a autoclavagem os meios foram acondicionados em sala com condições apropriadas por 72 horas. Tal procedimento objetivou averiguar a eficiência da esterilização, no sentido de precaver-se contra contaminações e perdas de material vegetal.

Os ensaios foram conduzidos em sala de crescimento com as seguintes condições: temperatura de $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 2.500 lux, fornecidas por lâmpadas fluorescentes branca fria intercaladas com lâmpadas Grolux.

Para instalação dos ensaios foi necessária a obtenção de um número adequado de explantes, os quais foram multiplicados sucessivamente em meio MS suplementado com 30 g/L de sacarose, 1 mg/L de BAP e 1.0 mg/L de ANA (PASQUAL, 1985). Os explantes iniciais do porta-enxerto *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. foram oriundos da coleção mantida "in vitro" no próprio laboratório.

As brotações obtidas foram individualizadas, selecionadas e posteriormente cuidadosamente inoculadas nos tubos de ensaio em número de 1 explante por tubo, nos devidos experimentos, de multiplicação e enraizamento. Antes da instalação dos experimentos os brotos foram mantidos por aproximadamente 15 dias em meio MS desprovido de reguladores de crescimento. Esta fase é de extrema importância devido a necessidade de uma homogeneidade dos explantes, eliminando-se resíduos do meio de cultura anterior, que podem interferir

na precisão da estimativa da multiplicação ou enraizamento dos explantes nos diferentes tratamentos.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, as análises estatísticas foram realizadas de acordo com o modelo apropriado para o delineamento.

Os resultados foram interpretados estatisticamente, por meio de análises de variância, teste de média (teste de Duncan) e regressão polinomial. Para efeito das análises estatísticas os dados de contagem, tamanho e peso seco não sofreram qualquer tipo de transformação. Os dados de percentagem foram transformados em $\sqrt{x+0.5}$.

3.1. Experimento A: Efeitos de Concentrações de Sacarose e Nitrogênio na Multiplicação "In Vitro" do Porta-enxerto *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.

Os explantes constituíram-se de brotações apicais com 1 cm de comprimento com 2 gemas. O meio de cultura utilizado foi baseado no "MS" (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com exceção das concentrações de nitrogênio inorgânico total (KNO_3 e NH_4NO_3).

Neste ensaio foram testados 6 concentrações de sacarose e 5 níveis de nitrogênio inorgânico total, num fatorial simples 6 x 5, com 5 repetições, sendo cada repetição constituída por 10 tubos de ensaio. O calculo para os níveis de nitrogênio inorgânico foi de acordo com a concentração total presente no meio MS (1 MS), diluindo (1/4 MS e 1/2MS) ou dobrando (2 MS) sua concentração.

As respectivas concentrações utilizadas foram: para sacarose (g/L) 0.0; 7.5; 15; 30; 45 e 60 e 0 MS; 1/4 MS; 1/2 MS; 1 MS e 2 MS da concentração de nitrogênio inorgânico presente no meio "MS".

As avaliações foram realizadas 45 dias após a instalação do experimento, através da contagem do número total de brotos, número de brotos maiores que 1 cm, tamanho médio de brotos e peso de matéria seca total.

3.2. Experimento B: Efeitos de Concentrações de Sacarose e de AIB no Enraizamento de Brotos do Porta-enxerto Poncirus trifoliata (L.) Raf.

As brotações apresentando em média 3.0 cm de comprimento, serviram de explantes, os quais foram inoculadas em tubo de ensaio contendo meio de cultura "MS" com todas as combinações possíveis de 5 concentrações de sacarose (g/L) 0.0; 15; 30; 45 e 60 e 4 níveis de AIB (mg/L) 0.0; 1.0; 3.0 e 5.0, num fatorial 5 x 4 com 5 repetições, sendo que cada repetição foi constituída por 10 tubos de ensaio. No decorrer do experimento foram realizadas duas avaliações, uma visual após 7 dias de inoculação para verificar o início de emissão de raízes e outra no final do ensaio (21 dias).

As características avaliadas foram percentagem de enraizamento e número médio de raízes.



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Experimento A

4.1.1. Número médio de brotações e número de brotações maiores que 1 cm de comprimento

Os resumos das análises de variância e regressão para o número médio de brotos referentes a sacarose e nitrogênio inorgânico encontram-se no Quadro 2. Verifica-se que houve diferença significativa a nível de 1% de probabilidade, pelo teste de F, entre os diversos níveis de sacarose e nitrogênio inorgânico, bem como para a interação destes fatores.

No Quadro 3 e Figura 1 são apresentados os efeitos da interação entre os fatores sacarose e nitrogênio inorgânico. Observa-se que para cada concentração de sacarose existe um nível de nitrogênio inorgânico ideal e vice-versa. Verifica-se pela curva de regressão (Figura 1) que a melhor combinação foi 35 g/L de sacarose com o dobro (2 MS) das concentrações de nitrogênio inorgânico presentes no meio MS, produzindo 13.5 novas brotações por explante.

Estes dados corroboram resultados encontrados por GRATTAPAGLIA & MACHADO (1990), onde concentrações entre 2 a 4% de sacarose apresentaram efeito benéfico sobre a taxa de multiplicação e o crescimento de brotos. Abaixo desta faixa pode ocorrer clorose generalizada na cultura e acima dela, pode haver

problema osmótico no meio, podendo levar a uma deterioração da cultura. A importância do potencial osmótico equilibrado nos primeiros dias de cultivo seria benéfico, porque os explantes quando transferidos para um novo meio sofrem um estresse devido à sua manipulação e requerem um período de adaptação a nova condição.

QUADRO 2. Resumo da análise de variância e regressão para o número médio de brotos do porta-enxerto *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. nos diferentes níveis de sacarose e nitrogênio inorgânico. ESAL, Lavras/MG, 1992.

Causas da Variação	G.L.	Quadrados médios e Significância ^{1/}
Sacarose	(5)	38.08**
Linear	1	0.98*
Quadrática	1	129.19*
Cúbica	1	1.60 ^{n.s}
Nitrogênio	(4)	137.36**
Linear	1	229.46*
Quadrática	1	254.53*
Cúbica	1	59.80 ^{n.s}
Sac. x Nitro.	20	9.97**
Resíduo	120	0.06
C.V.(%)		2.93
R ²		0.99

^{1/} dados não transformados

** significativo a nível de 1% de probabilidade

* significativo a nível de 5% de probabilidade

n.s não significativo

QUADRO 3. Médias do número total de brotos por explante do porta-enxerto *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., obtidos in vitro, em diferentes concentrações de sacarose e nitrogênio. ESAL, Lavras/MG, 1992.

SACAROSE (g/L)	NITROGÊNIO INORGÂNICO					médias
	0 MS	1/4 MS	1/2 MS	1 MS	2 MS	
0.0	5.60 aD	8.15 cA	7.85 dAB	7.70 eB	6.30 eC	7.12 F
7.5	4.90 bcD	9.80 bB	11.10 bA	11.10 bA	9.30 dC	9.24 C
15	5.30 abD	11.80 aB	11.15 bC	13.50 aA	10.85 cC	10.52 A
30	5.50 aD	7.85 cdC	12.50 aA	11.45 bB	11.70 bB	9.80 B
45	4.50 cE	7.80 cdD	8.40 cC	10.20 cB	12.45 aA	8.67 D
60	5.50 aE	7.50 dD	8.30 cC	8.95 dB	9.60 dA	7.97 E
médias	5.21 d	8.81 c	9.88 b	10.48 a	10.03 b	

As médias seguidas da mesma letra (maiúsculas para sacarose e minúscula para nitrogênio) não diferem entre si pelo teste de Duncan à 1%.

Os resultados encontrados são condizentes com a literatura consultada, uma vez que o balanço entre carboidratos (sacarose) e nitrogênio suplementado no meio, é citado como sendo benéfico nos processo de indução e desenvolvimento das novas brotações (BROWN & THORPE, 1982 e GAMBORG, 1984).

A sacarose participa no fornecimento de esqueletos de carbono e energia necessária para promover os processo de multiplicação de gemas (THORPE & BEAUDOIN-EAGAN, 1984; BROWN & THORPE, 1982 e MURASHIGE & SKOOG, 1962), uma vez que, as culturas "in vitro", em função da baixa intensidade luminosa, condições limitadas de troca gasosa e possivelmente pela não funcionabilidade dos estômatos, a sua habilidade fotossintética é deficiente, tornando-se necessário o suprimento exógeno de carboidratos.

0 MS : $Y = 5,47 - 0,02X + 0,0004X^2$	$R^2 = 0,75$
1/4 MS : $Y = 9,27 + 0,03X - 0,0012X^2$	$R^2 = 0,78$
1/2 MS : $Y = 8,79 + 0,20X - 0,0037X^2$	$R^2 = 0,81$
1 MS : $Y = 8,94 + 0,23X - 0,0041X^2$	$R^2 = 0,81$
2 MS : $Y = 6,64 + 0,33X - 0,0040X^2$	$R^2 = 0,95$

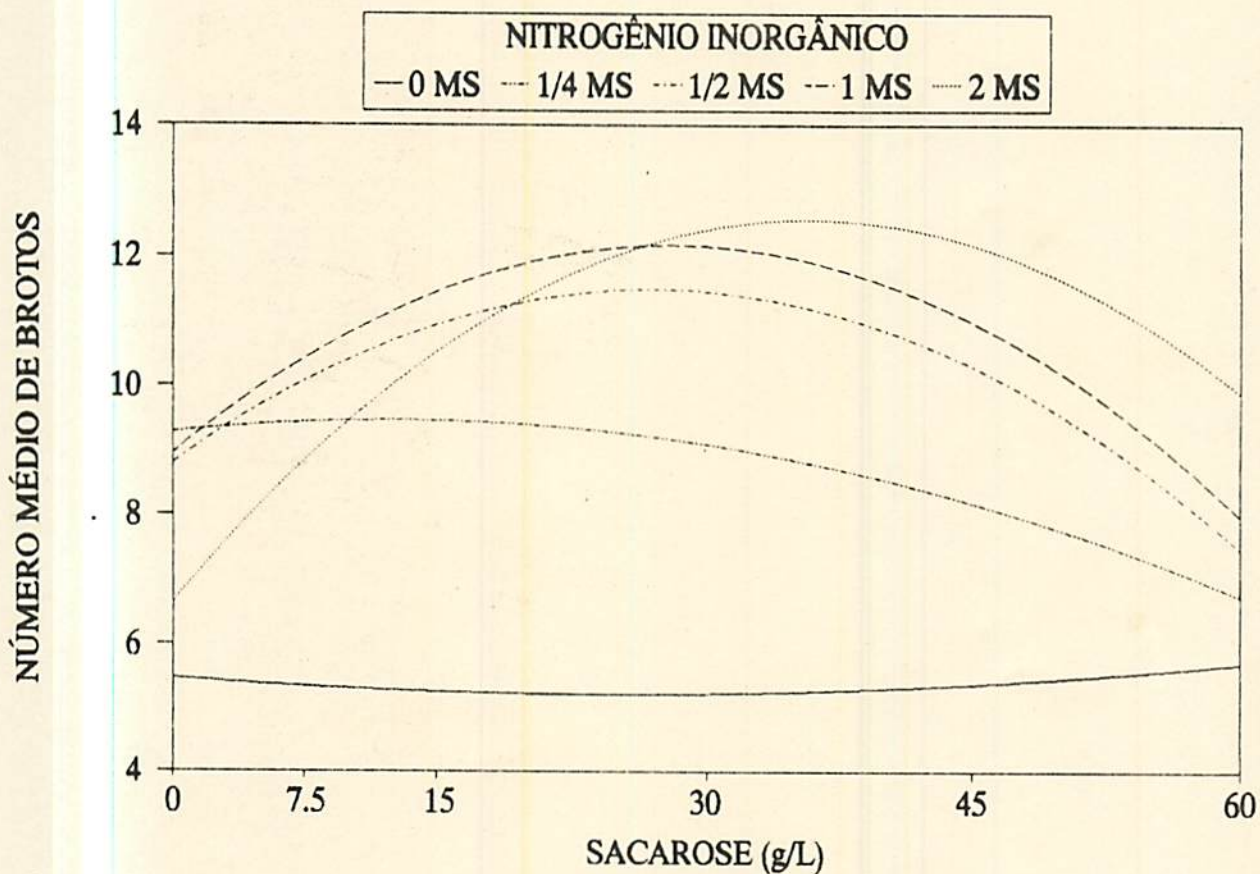


FIGURA 1 - Efeito das combinações de sacarose e nitrogênio no número médio de brotos do porta-enxerto *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. obtido em condições "in vitro". ESAL, Lavras/MG, 1992.

Segundo BROWN & THORPE (1982), a sacarose também estaria relacionada com o aumento do metabolismo de carboidratos, via glicolítica ou rota pentose fosfato, fornecendo uma produção extra de ATP e poder redutor (NADP), requeridos para o processo de multiplicação. A grande demanda energética também estaria relacionada com o processo de assimilação de nitrogênio. De acordo com GAMBORG (1984), os níveis de sacarose e nitrogênio presentes no meio de cultura poderiam afetar os processos morfogênicos, além de atuar na eficiência de alguns reguladores de crescimento, como as citocininas, responsáveis pela indução de novas brotações.

O resumo da análise de variância e regressão para o número médio de brotos superiores a 1 cm de comprimento referentes a sacarose e nitrogênio inorgânico encontra-se no Quadro 4. Verifica-se que houve diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste de F, entre os diversos níveis de sacarose e nitrogênio inorgânico, bem como para a interação entre os dois fatores.

Observa-se no Quadro 5 e Figura 2, que à medida que se aumentaram as concentrações de sacarose e de nitrogênio inorgânico (MS), houve uma tendência de aumento no número médio de novas brotações por explante e melhor expansão foliar. Verifica-se pela curva de regressão (Figura 2) que as melhores combinações entre os dois fatores foram 30 e 45 g/L de sacarose associadas com 1 MS e 2 MS de nitrogênio inorgânico presente no meio "MS", obtendo um número máximo de 5.5 novos brotos superiores a 1.0 cm de comprimento por explante.

Quando compara-se os dados do número médio de brotações e número de brotos maiores que 1.0 cm de comprimento (Quadro 3 e 5 e Figura 1 e 2), observa-se que os melhores resultados situam-se na mesma faixa de sacarose e nitrogênio inorgânico. Segundo ZENK et alii (1977), a biossíntese de alcalóides indólicos é beneficiada em altas concentrações de sacarose, levando possivelmente a

QUADRO 4. Resumo da análise de variância e regressão para o número médio de brotos maiores que 1cm de comprimento do porta- enxerto *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., nas diferentes concentrações de sacarose e nitrogênio. ESAL, Lavras/MG, 1992.

Causas da Variação	G.L.	Quadrados médios e Significância ^{1/}
Sacarose	(5)	25.83**
Linear	1	32.22*
Quadrática	1	85.92*
Cúbica	1	8.25n.s
Nitrogênio	(4)	24.26**
Linear	1	67.09*
Quadrática	1	23.59*
Cúbica	1	6.29n.s
Sac. x Nitro.	20	6.64**
Resíduo	120	0.03
C.V. (%)		6.28
R ²		0.95

^{1/} dados não transformados

** significativo a nível de 1% de probabilidade

* significativo a nível de 5% de probabilidade

n.s não significativo

síntese de auxinas e promovendo, juntamente com a giberelina, o alongamento dos entrenós das novas brotações, proporcionando um aumento no tamanho dos brotos.

Metabólicamente, a tendência de aumento das brotações poderia estar relacionada com a atuação das concentrações de sacarose nas propriedades das

QUADRO 5. Número médio de brotos maiores que 1cm de comprimento por explante obtido "in vitro" do porta-enxerto *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., em diferentes concentrações de sacarose e nitrogênio. ESAL, Lavras/MG, 1992.

SACAROSE (g/L)	NITROGÊNIO INORGÂNICO					médias
	0 MS	1/4 MS	1/2 MS	1 MS	2 MS	
0.0	1.05 Ca	1.05 Ea	1.30 Fa	1.15 Fa	1.10 Ea	1.13 e
7.5	1.10 Ce	3.20 Bb	3.55 Ca	2.45 Dc	1.40 Dd	2.39 d
15	1.15 Ce	3.90 Ac	4.30 Ab	4.60 Ba	2.80 Cd	3.35 b
30	1.55 Bd	2.80 Cc	3.95 Bb	6.20 Aa	6.00 Aa	4.10 a
45	1.50 Be	2.25 Dd	3.00 Dc	3.35 Cb	6.00 Aa	3.22 b
60	2.05 Ac	2.10 Dc	2.40 Eb	2.55 Db	4.85 Ba	2.79 c
médias	1.40 E	2.55 D	3.08 C	3.38 B	3.69 A	

As médias seguidas da mesma letra (maiúscula para nitrogênio e minúscula para sacarose) não diferem entre si pelo teste de Duncan 1% de probabilidade.

proteínas presentes á nível de membranas (ZIMMERMANN, 1978), e ou contribuindo no aumento da atividade mitocondrial, pelo aumento da pressão osmótica (ZIMMERMANN, 1978). O aumento na atividade mitocondrial estaria relacionado com a produção energética requerida pelos processos que levam a indução e desenvolvimento de novas brotações. Segundo MANGAT et alii (1989), o excesso de sacarose metabolizado poderia ser transformado em amido e ser armazenado nos vacúolos, posteriormente, de acordo com a necessidade atuaria como reserva de substrato para gerar energia ou como agente regulador osmótico, o que beneficiaria a iniciação e desenvolvimento dos novas brotações.

0 MS : $Y = 1,048 + 0,007X + 0,0001X^2$	$R^2 = 0,92$
1/4 MS : $Y = 1,900 + 0,097X - 0,0016X^2$	$R^2 = 0,92$
1/2 MS : $Y = 2,008 + 0,145X - 0,0020X^2$	$R^2 = 0,88$
1 MS : $Y = 1,160 + 0,263X - 0,0040X^2$	$R^2 = 0,81$
2 MS : $Y = 0,036 + 0,250X - 0,0028X^2$	$R^2 = 0,91$

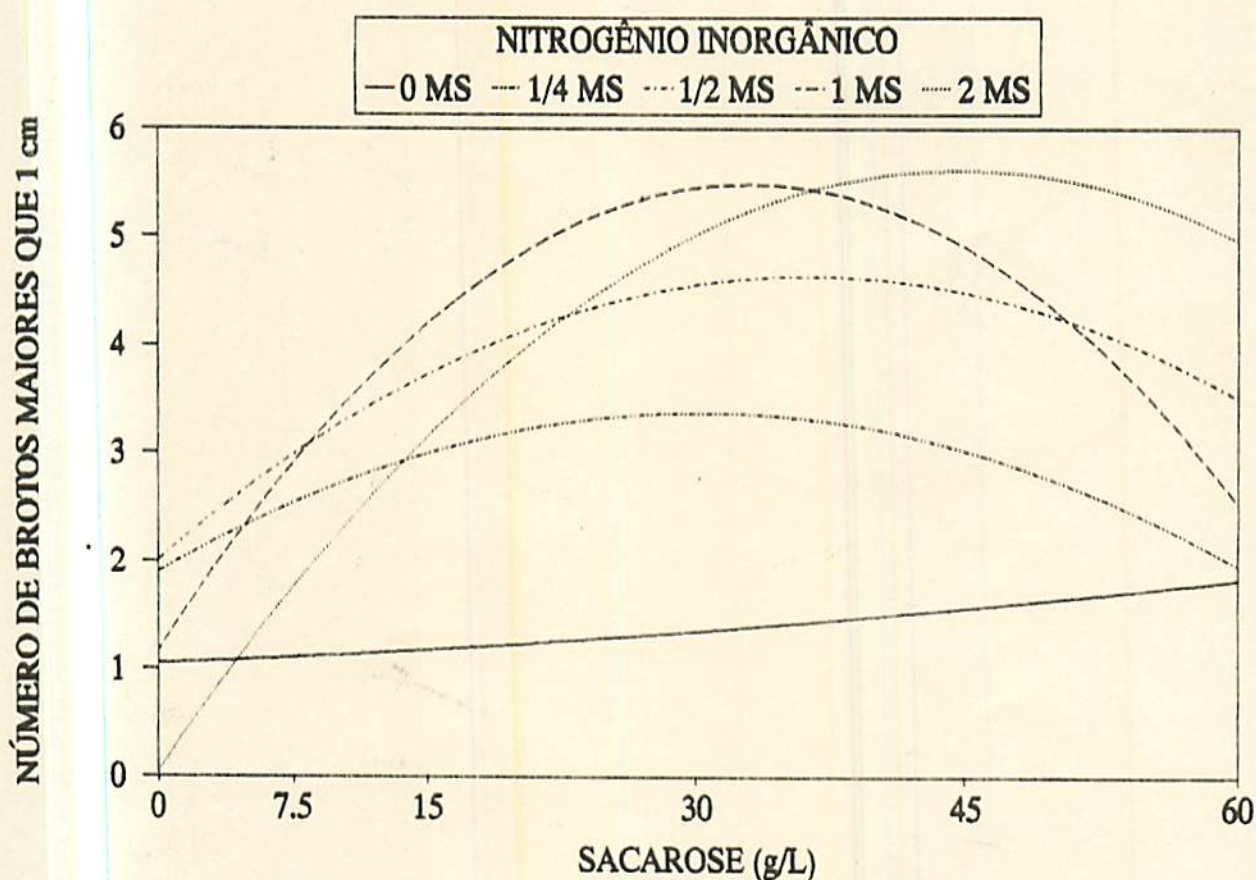


FIGURA 2 - Efeito das combinações de sacarose e nitrogênio inorgânico sobre o número médio de brotos maiores que 1 cm de comprimento do porta-enxerto *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. obtido em condições "in vitro". ESAL, Lavras/MG, 1992.

Entretanto, a absorção e assimilação de nitrogênio, até a biossíntese de aminoácidos e compostos nitrogenados, depende da energia gerada pelo metabolismo da sacarose presente no meio de cultura, uma vez que sua capacidade fotossintética é baixa ou quase inexistente. Do ponto de vista geral, a energia gerada via glicólise ou rota da pentose fosfato poderia ser utilizada na assimilação e redução do nitrogênio absorvido, na biossíntese de compostos orgânicos estruturais e ou metabólicos, e na própria absorção de outros íons presentes no meio de cultura.

4.1.2 Tamanho médio de brotos e peso total da matéria seca

O resumo da análise de variância e regressão, para o tamanho médio de brotos, encontra-se no Quadro 6. Verifica-se que houve diferença, pelo teste de F, a 1% de probabilidade, para a sacarose e nitrogênio inorgânico e para sua interação.

No Quadro 7 e Figura 3, são mostrados os efeitos da interação entre sacarose e nitrogênio inorgânico. Verifica-se que pela Figura 3 que o modelo quadrático apresentou melhor ajuste aos dados obtidos, sendo que a combinação que propicia um melhor comprimento médio de brotos foi com 45 g/L de sacarose associado com o dobro (2 MS) de nitrogênio inorgânico presentes no meio MS, com 1.33 cm de comprimento para novas brotações.

No entanto, observa-se que de uma forma geral as mesmas combinações que proporcionaram uma boa taxa de multiplicação, foram ideais para tamanho médio de novas brotações. Segundo OTONI (1988), o número médio, o tamanho e o vigor dos novos brotos são influenciados pelo tipo, localização e o tamanho do explante utilizado na cultura. Segmentos nodais de 0.5 cm proporcionaram melhor taxa de multiplicação; e tamanhos superiores à 0.5 cm diminuíram o número médio de novas brotações, todavia o comprimento e o vigor dos brotos aumentaram.

QUADRO 6. Resumo da análise de variância e regressão para o tamanho médio de brotos do porta-enxerto *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., nas diferentes concentrações de sacarose e nitrogênio. ESAL, Lavras/MG, 1992.

Causas da Variação	G.L.	Quadrados médios e Significância ^{1/}
Sacarose	(5)	0.574**
Linear	1	1.032*
Quadrática	1	1.437*
Nitrogênio	(4)	0.351**
Linear	1	1.161*
Quadrática	1	0.232*
Cúbica	1	0.010 ^{n.s}
Sac. x Nitro.	20	0.123**
Resíduo	120	0.0029
C.V. (%)		6.79
R ²		0.95

^{1/} dados não transformados

** significativo a nível de 1% de probabilidade

* significativo a nível de 5% de probabilidade

n.s não significativo

Com relação ao acúmulo de peso da matéria seca, verifica-se pelo Quadro 8, que houve diferença significativa, a nível de 1% de probabilidade, pelo teste de F, para ambos os fatores estudados e para sua interação.

No Quadro 9 e Figura 4, são mostrados os efeitos da interação entre sacarose e nitrogênio inorgânico sobre o acúmulo de peso da matéria seca após 45 dias de cultivo. O melhor resultado foi obtido com 45 g/L de sacarose com o dobro

QUADRO 7. Tamanho médio de brotos por explante do porta-enxerto *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., em diferentes concentrações de sacarose e nitrogênio. ESAL, Lavras/MG, 1992.

SACAROSE (g/L)	NITROGÊNIO INORGÂNICO					médias
	0 MS	1/4 MS	1/2 MS	1 MS	2 MS	
0.0	0.58 ABbc	0.49 Bd	0.62 Ac	0.55 ABe	0.61 Ad	0.57 D
7.5	0.63 Bab	0.79 Ab	0.77 Ab	0.70 Abd	0.54 Cd	0.68 C
15	0.51 Dc	0.86 Bab	0.96 Aa	0.92 Abd	0.76 Cc	0.80 B
30	0.71 Da	0.93 Ba	0.82 Cb	1.33 Aa	1.29 Aa	1.02 A
45	0.67 Ca	0.66 Cc	0.83 Bb	0.91 Bb	1.11 Ab	0.84 B
60	0.72 BCa	0.68 Cc	0.76 BCb	0.80 Bc	1.14 Ab	0.82 B
médias	0.64 e	0.73 d	0.79 c	0.87 b	0.91 a	

As médias seguidas da mesma letra (maiúscula para sacarose e minúscula para nitrogênio) não diferem entre si pelo teste de Duncan 1%.

(2 MS) do nível de nitrogênio inorgânico presente no meio "MS", obtendo um acúmulo de peso da matéria seca na ordem de 0.49 g. De acordo com WIJNSMA (1980), a relação carbono/nitrogênio influencia o ganho de peso da matéria seca; quando a razão aumenta o rendimento aumenta. O mesmo autor enfatiza que o aumento do peso é diretamente proporcional a concentração inicial de sacarose no meio: quanto maior a concentração de sacarose maior o acúmulo de peso. Sugerem também que a conversão da sacarose em biomassa é mais eficiente entre as concentrações de 20 a 50 g/L.

0 MS : $Y = 0,570 - 0,002X + 0,0000006X^2$	$R^2 = 0,71$
1/4 MS : $Y = 0,581 + 0,020X - 0,0003200X^2$	$R^2 = 0,80$
1/2 MS : $Y = 0,678 + 0,013X - 0,0002000X^2$	$R^2 = 0,74$
1 MS : $Y = 0,514 + 0,038X - 0,0005700X^2$	$R^2 = 0,80$
2 MS : $Y = 0,490 + 0,029X - 0,0003100X^2$	$R^2 = 0,80$

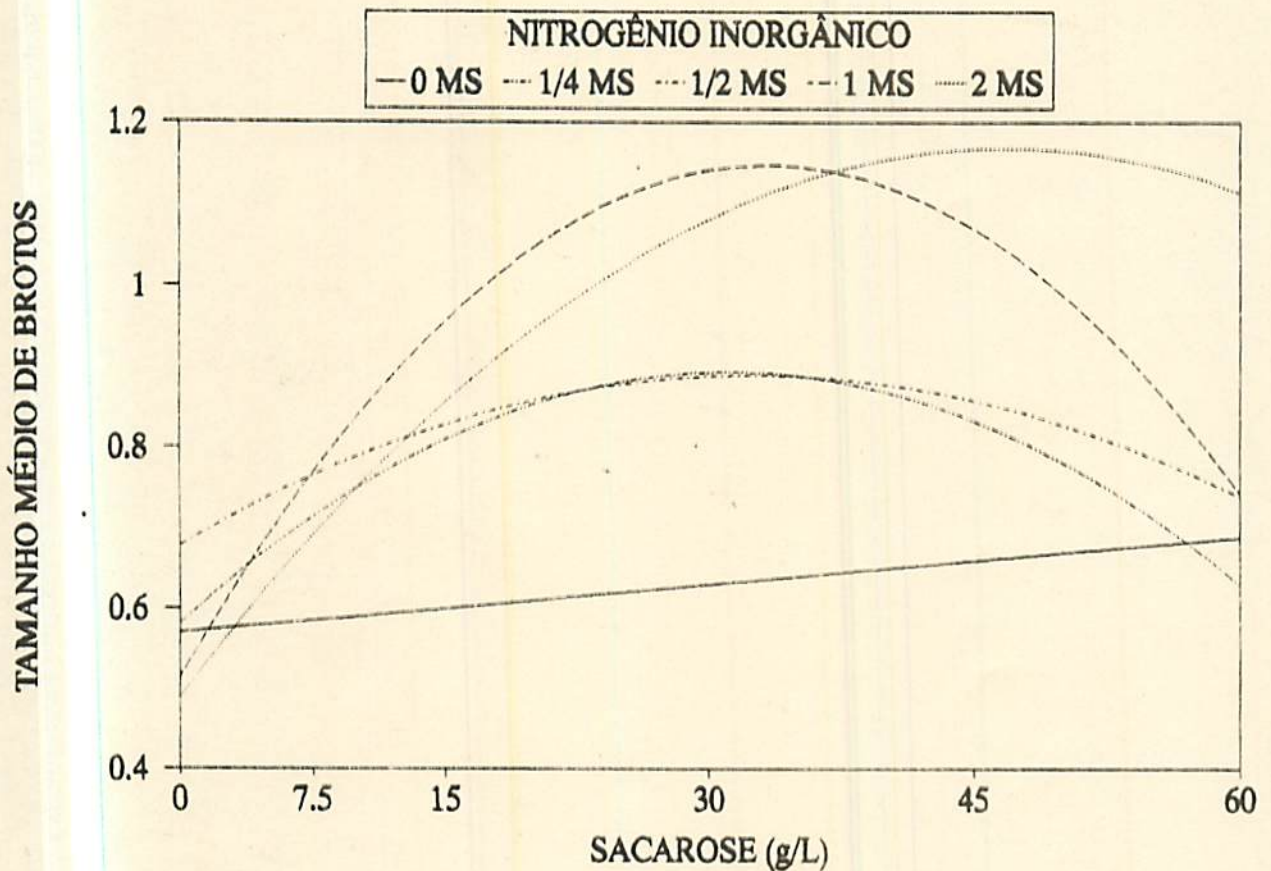


FIGURA 3 - Efeito das combinações de sacarose e nitrogênio inorgânico sobre o tamanho médio de brotos do porta-enxerto *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. obtido em condições "in vitro". ESAL, Lavras - MG, 1992.

QUADRO 8. Resumo da análise de variância e regressão para peso da matéria seca do porta-enxerto *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., nas diferentes concentrações de sacarose e nitrogênio, após 45 dias de cultivo "in vitro". ESAL, Lavras/MG, 1992.

Causas de Variação	G.L.	Quadrados médios e Significância ^{1/}
Sacarose	(5)	0.284**
Linear	1	0.930*
Quadrática	1	0.345*
Cúbica	1	0.116 ^{n.s}
Nitrogênio	(4)	0.166**
Linear	1	0.487*
Quadrática	1	0.146*
Cúbica	1	0.030 ^{n.s}
Sac. x Nitro.	20	1.026**
Resíduo	120	0.0004
C. V. (%)		12.39
R ²		0.98

^{1/} dados não transformados

** significativo a nível de 1% de probabilidade

* significativo a nível de 5% de probabilidade

n.s não significativo

No entanto, o aumento de matéria seca também estaria relacionado com a taxa de multiplicação e o tamanho médio das novas brotações, uma vez que, as combinações tanto para uma como para outra característica foram semelhantes, o que pode ser visto pelos dados anteriores.

QUADRO 9. Média do peso da matéria seca(g) do porta-enxerto *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. após 45 dias de cultivo "in vitro" nas diferentes concentrações de sacarose e nitrogênio. ESAL, Lavras/Mg, 1992.

SACAROSE (g/L)	NITROGÊNIO INORGÂNICO					médias
	0 MS	1/4 MS	1/2 MS	1 MS	2 MS	
0.0	0.043 Aa	0.036 Da	0.054 Da	0.052 Ea	0.048 Ea	0.046 e
7.5	0.041 Ab	0.092 Ca	0.083 Da	0.092 Da	0.061 Eab	0.075 d
15	0.052 Ac	0.094 Cb	0.123 Cb	0.169 Ca	0.097 Db	0.107 c
30	0.061 Ad	0.259 Ac	0.268 Bc	0.365 Ab	0.455 Ba	0.282 a
45	0.060 Ae	0.214 Bd	0.330 Ac	0.367 Ab	0.493 Aa	0.293 a
60	0.065 Ad	0.192 Bc	0.237 Bb	0.263 Bb	0.318 Ca	0.318 b
médias	0.054 E	0.148 D	0.183 C	0.219 B	0.245 A	

As médias seguidas da mesma letra (minúscula para sacarose e maiúscula para nitrogênio) não diferem entre si a nível de 1% pelo teste de Duncan.

A formação de calos na base dos explantes foi observada em todos os tratamentos, mas com maior intensidade nos tratamentos cujas concentrações de sacarose e nitrogênio inorgânico eram mais elevadas. Estes calos apresentavam uma coloração verde e alta capacidade morfogênica, ou seja, diferenciavam-se em brotos; a presença de calos muitas vezes é indesejável devido a variação somaclonal. De acordo com a literatura consultada, em citrus o processo de regeneração pode ocorrer via direta, formando parte aérea diretamente dos explantes, sem a passagem pela fase de calos, ou via indireta, ocorrendo formação de calos e em seguida regeneração de brotos (GAVISH, 1991; BELOUALY, 1991; DURAN-VILA et alii, 1989; PASQUAL, 1985 e CHATUVERDI & MITRA, 1974).

0 MS : $Y = 0,040 + 0,0007X - 0,000006X^2$	$R^2 = 0,89$
1/4 MS : $Y = 0,021 + 0,0090X - 0,000100X^2$	$R^2 = 0,86$
1/2 MS : $Y = 0,020 + 0,0110X - 0,000130X^2$	$R^2 = 0,90$
1 MS : $Y = 0,012 + 0,0160X - 0,000200X^2$	$R^2 = 0,92$
2 MS : $Y = 0,039 + 0,0210X - 0,000240X^2$	$R^2 = 0,81$

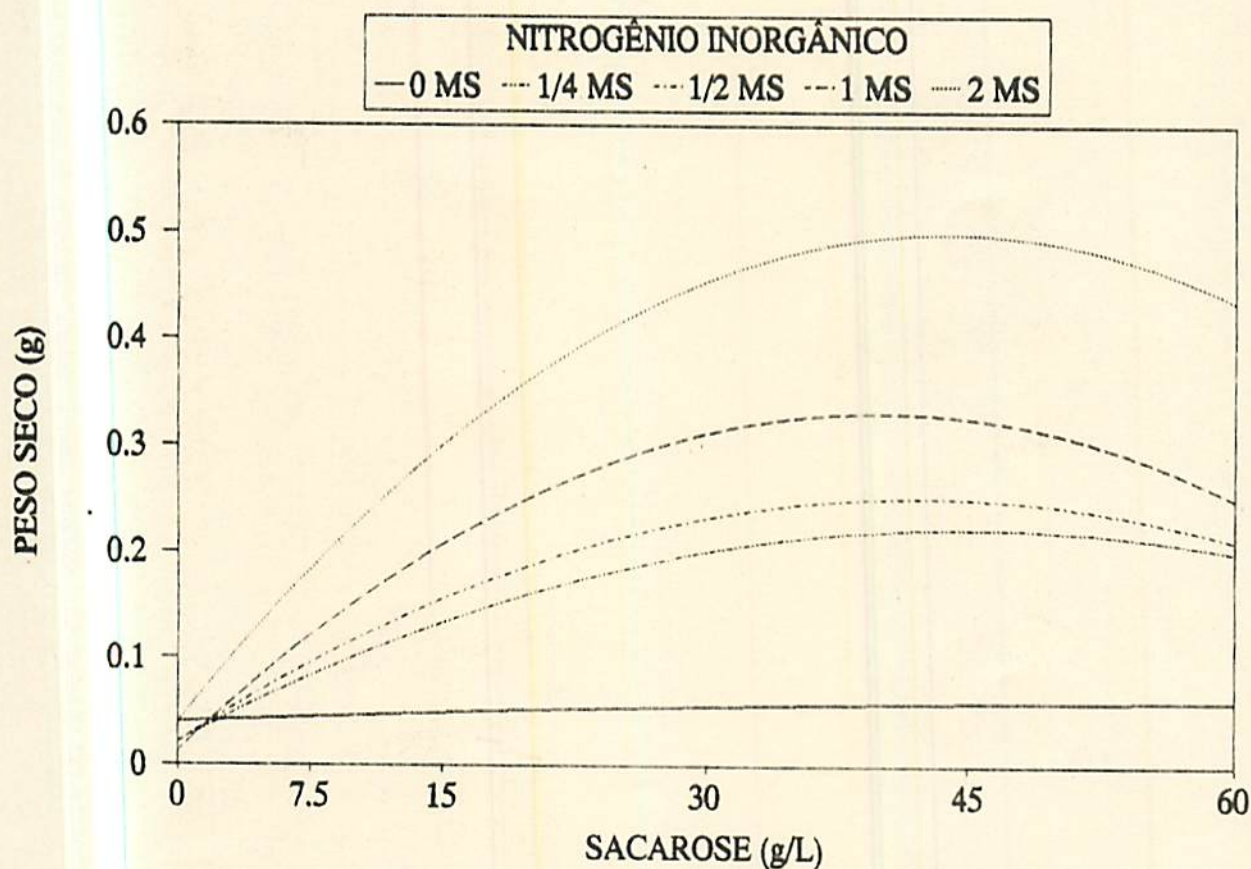


FIGURA 4 - Efeito das combinações de sacarose e nitrogênio inorgânico sobre o peso da matéria seca do porta-enxerto *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. após 45 dias de cultivo "in vitro". ESAL, Lavras - MG, 1992.

4.2. Experimento B: Sacarose x AIB

O resumo da análise de variância referente a percentagem de enraizamento "in vitro" nas diferentes concentrações de sacarose e AIB, encontram-se no Quadro 10. Verifica-se que houve diferença significativa somente para os níveis de AIB.

QUADRO 10. Resumo da análise de variância para percentagem de enraizamento do porta-enxerto *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., 21 dias após a inoculação nas diferentes concentrações de sacarose e AIB. ESAL, Lavras/MG, 1992.

Causas da Variação	G.L.	Quadrados médios e Significância ^{1/}
Sacarose	4	1.018 ^{n.s}
IBA	3	44.61 ^{**}
Sac. x Nitro.	12	1.93 ^{n.s}
Resíduo	40	1.27
C.V. (%)		6.00
R ²		0.95

^{1/} dados transformados em $\sqrt{x+0.5}$.

** significativo a nível de 1% de probabilidade.

n.s não significativo.

Verifica-se no Quadro 11 que aos 7 dias após a inoculação dos explantes, houve, na maioria dos tratamentos, início de enraizamento, à exceção daqueles nos quais o AIB estava ausente. Aos 21 dias, o enraizamento era visível na

quase totalidade dos explantes, e novamente, os tratamentos sem AIB mostraram uma percentagem de enraizamento sensivelmente inferior aos demais.

QUADRO 11. Percentagem de enraizamento das brotações do porta-enxerto *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., nas diferentes concentrações de sacarose e AIB, 7 e 21 dias após a inoculação. ESAL, Lavras/MG, 1992.

Sacarose (g/L)	AIB (mg/L)	Enraizamento (%)	
		7 dias	21 dias
0.0	0.0	0	73
0.0	1.0	90	96
0.0	3.0	83	100
0.0	5.0	80	100
15.0	0.0	0	53
15.0	1.0	100	100
15.0	3.0	90	100
15.0	5.0	76	93
30.0	0.0	10	66
30.0	1.0	66	100
30.0	3.0	96	100
30.0	5.0	53	80
45.0	0.0	10	66
45.0	1.0	66	100
45.0	3.0	96	100
45.0	5.0	53	80
60.0	0.0	4	73
60.0	1.0	0	100
60.0	3.0	66	100
60.0	5.0	80	100

A concentração de AIB que promoveu o melhor enraizamento dos explantes foi a de 1 mg/L, apesar de não diferir estatisticamente das concentrações de 3.0 e 5.0 mg/L (Quadro 12). Esses dados estão de acordo com PASQUAL (1985), que obteve melhor enraizamento de brotações obtidas a partir de gemas axilares juvenis de *Trifoliata*, utilizando AIB entre 1.0 a 2.0 mg/L. Observou-se ainda que as diversas concentrações de sacarose não influenciaram a percentagem final de enraizamento.

QUADRO 12. Percentagem média de enraizamento do porta-enxerto *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., 21 dias após a inoculação nas diferentes concentrações de sacarose e AIB. ESAL, Lavras/MG, 1992.

SACAROSE (g/L)	AIB (mg/L)				média
	0.0	1.0	3.0	5.0	
0.0	73	96	93	100	90 A
15.0	73	100	100	93	85 A
30.0	53	100	100	79	85 A
45.0	65	100	100	100	90 A
60.0	73	100	90	100	90 A
média	65 b	99 a	96 a	94 a	

As médias seguidas da mesma letra (maiúscula para sacarose e minúscula para AIB) não diferem entre si a nível de 1% de probabilidade pelo teste de Duncan.

Segundo OTONI (1988), explantes vigorosos possuem uma maior facilidade de enraizar, possivelmente devido as reservas e níveis hormonais endógenos serem maiores. Deduz-se, que as brotações utilizadas possuíam uma

quantidade de carboidratos endógenos suficiente para promoção do enraizamento, não requerendo sacarose para o processo de rizogênese, embora a literatura cite que a sacarose é benéfica no processo de enraizamento (THOMPSON & THORPE, 1987).

A partir dos resultados obtidos verifica-se que a presença do AIB foi benéfica no processo de indução de raízes, concordando com as observações de GRATAPAGLIA & MACHADO (1990) e SRISKANDARAJAH & MULLINS (1981), os quais demonstraram que adição de uma auxina no meio era benéfica no processo de indução de raízes, embora inibisse o alongamento destas.

Para o número médio de raízes (Quadro 13) houve diferença significativa pelo teste de Duncan a nível de 1% de probabilidade, entre os diferentes níveis de AIB e sacarose, como também para a interação entre estes dois fatores.

QUADRO 13. Resumo da análise de variância para o número médio de raízes do porta-enxerto *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., nas diferentes concentrações de sacarose e AIB. ESAL, Lavras/Mg, 1992.

Causas de Variância	G.L.	Quadrados médios e Significância ^{1/}
Sacarose	4	5.14**
AIB	3	25.51**
Sac. x Nitro.	12	1.18**
Resíduo	20	0.039
C.V. (%)		6.24
R ²		0.98

^{1/} dados não transformados

** significativos a nível de 1% de probabilidade

A melhor combinação (Quadro 14 e Figura 5) foi registrada com sacarose entre a faixa de 45 a 60 g/L associado a 5 mg/L de AIB, com 4.80 e 5.73 raízes por explante, respectivamente. Os resultados obtidos reforçam a idéia de que a capacidade de enraizamento está relacionada com a condição fisiológica e as concentrações de AIB, resultando no maior ou menor desenvolvimento de raízes.

QUADRO 14. Médias do número de raízes emitidas por explante do porta-enxerto *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., nas diferentes concentrações de sacarose e AIB. ESAL, Lavras/MG, 1992.

Sacarose (g/L)	AIB (mg/L)				médias
	0.0	1.0	3.0	5.0	
0.0	1.06 Bd	2.06 Dc	2.70 Cb	3.15 Da	2.24 E
15.0	0.93 Bb	3.40 Ca	3.36 Ba	3.80 Ca	2.87 D
30.0	1.80 Ac	4.13 Ba	3.86 Ba	3.26 Db	3.26 C
45.0	1.40 ABb	4.83 Aa	4.53 Aa	4.80 Ba	3.89 A
60.0	1.33 Bd	4.20 Bb	3.40 Bc	5.73 Aa	3.66 B
médias	1.30 c	3.72 b	3.57 b	4.15 a	

As médias seguidas da mesma letra (maiúscula para AIB e minúscula para sacarose) não diferem entre si a nível de 1% de probabilidade pelo teste de Duncan.

A adição de sacarose no meio poderia atuar como substrato para o processo de respiração celular, fornecendo um quantidade extra de energia para processo o de rizogênese, o qual demanda muita energia, e também atuaria na manutenção do potencial osmótico do meio. Segundo GEORGE & SHERINGTON (1984), a presença de carboidratos no meio tem demonstrado ser essencial para a

$$Y1 = 0,94 + 0,028X - 0,00035X^2$$

$$R^2 = 0,82$$

$$Y2 = 2,02 + 0,110X - 0,00120X^2$$

$$R^2 = 0,97$$

$$Y3 = 2,56 + 0,080X - 0,00100X^2$$

$$R^2 = 0,81$$

$$Y4 = 3,29 - 0,009X + 0,00083X^2$$

$$R^2 = 0,88$$

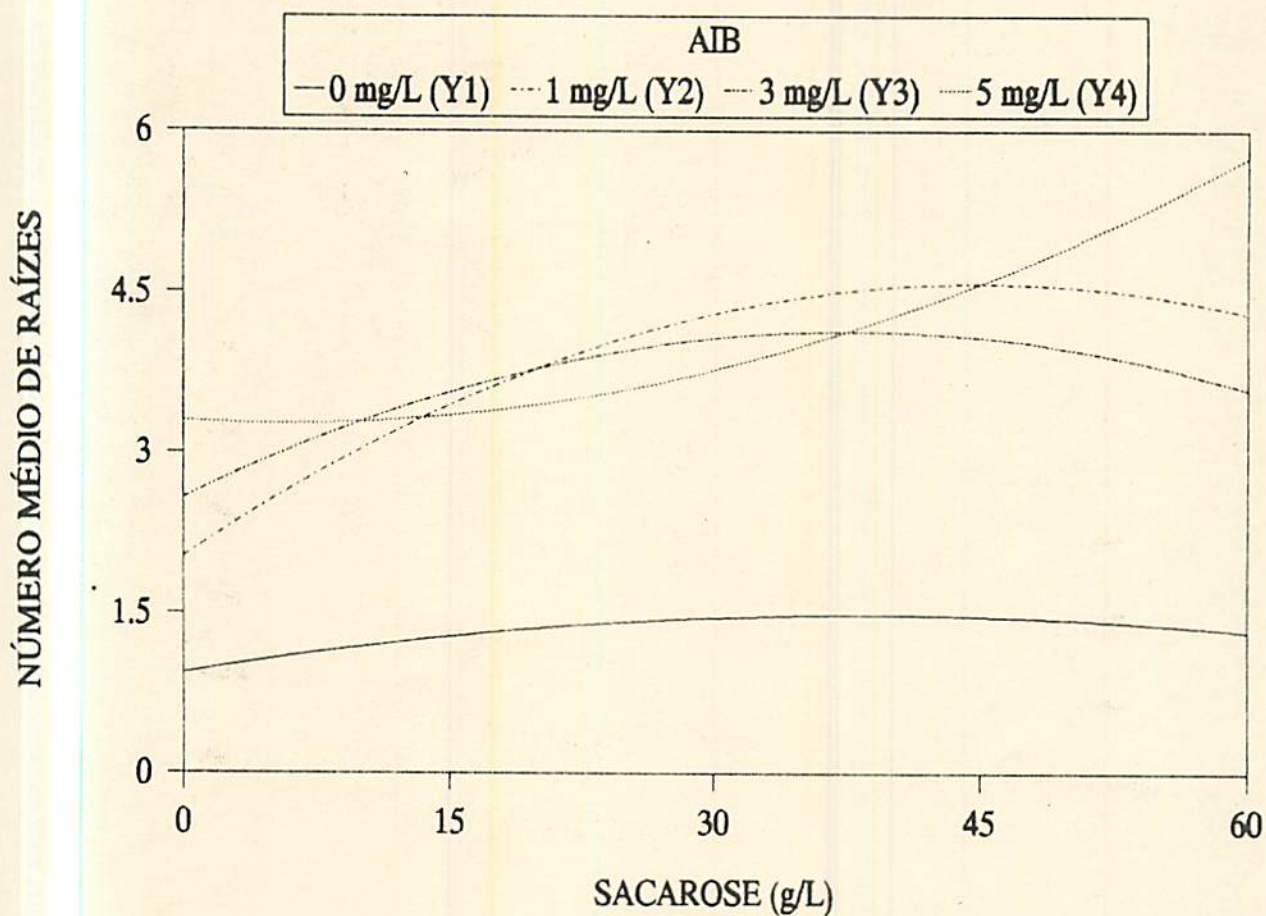


FIGURA 5 - Efeito das combinações de sacarose e AIB sobre o número de raízes do porta-enxerto *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. obtidas "in vitro". ESAL, Lavras - MG, 1992.

indução e desenvolvimento de raízes "in vitro". Por outro lado, NÉMETH (1986) cita que as concentrações de sacarose estariam associadas em manter os níveis endógenos de hormônios.

Um outro aspecto a ser considerado é que a sacarose também contribui na diferenciação dos tecidos vasculares (SRISKANDARAJAH & MULLINS, 1981). Observou-se que nos diferentes tratamentos onde não houve formação de calos na base dos explantes, as raízes surgiram diretamente da epiderme dos explantes. Este acontecimento é de grande importância, pois com a formação de calo, as raízes formadas não são diretamente ligadas aos explantes, podendo acarretar grande taxa de mortalidade das plântulas, por ocasião da transferência para o substrato na fase de aclimação.

Um outro aspecto, é que as concentrações de sacarose que foram ideais para o número de raízes, poderiam ter sido favoráveis no balanço C/N. Segundo HYNDMAN et alii (1989), a interação carbono/nitrogênio poderia atuar na regulação da formação e crescimento de raízes adventícias.

5. CONCLUSÕES

Nas condições em que os experimentos foram conduzidos conclui-se que:

- As combinações entre sacarose e nitrogênio inorgânico foram positivas no processo de multiplicação de novas brotações, sendo que 40 g/L de sacarose associada ao dobro (2 MS) de nitrogênio inorgânico proporcionaram o maior número de brotações, enquanto para o número de brotos superiores a 1 cm de comprimento, melhores resultados foram obtidos com 30 a 45 g/L de sacarose na presença do dobro (2 MS) de nitrogênio presente no meio MS;

- O melhor tamanho médio de brotos foi proporcionado por 45 g/L de sacarose associada com o dobro de nitrogênio e para o acúmulo de matéria seca a concentração anterior também foi benéfica;

- O AIB influenciou positivamente na indução e formação de raízes;

- O número médio de raízes foi influenciado pelas concentrações de sacarose e AIB. A melhor combinação foi 60 g/L de sacarose com 5 mg/L de AIB.

6. RESUMO

Objetivou-se estudar os efeitos de várias concentrações de sacarose, nitrogênio inorgânico e ácido indol butírico (AIB) adicionados ao meio de cultura sobre o a multiplicação e enraizamento "in vitro" do porta-enxerto *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.

No experimento de multiplicação foram testados todas as combinações possíveis de 6 concentrações de sacarose (0.0; 7.5; 15; 30 e 60 g/L) e 5 níveis de nitrogênio inorgânico (0 MS, 1/4 MS, 1/2 MS, 1 MS e 2 MS) das concentrações presentes no meio "MS". Os explantes utilizados foram brotações axilares com aproximadamente 1.0 cm de comprimento a partir de sucessivas multiplicações da coleção mantida "in vitro" no laboratório.

As avaliações foram efetuadas após 45 dias de cultivo, observando os seguintes características: número médio de brotos, número de brotos maiores que 1 cm de comprimento, tamanho médio de brotos e peso da matéria seca total dos brotos.

Na fase de enraizamento foram testadas todas as combinações possíveis de 5 concentrações de sacarose (0.0; 15; 30; 45 e 60 g/L) e 4 níveis de AIB (0.0; 1.0; 3.0 e 5.0 mg/L), os explantes foram brotações com 3 cm de comprimento. Foram realizadas duas avaliações, uma visual após 7 dias da inoculação e outra no final aos 21 dias, verificando a percentagem de enraizamento e número médio de raízes.

Os ensaios foram conduzidos em sala de crescimento nas seguintes condições: temperatura de $\pm 26^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas luz e intensidade luminosa de 2.500 lux. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado e os resultados foram interpretados estatisticamente, por análise de variância e teste de média (Duncan).

De um modo geral a multiplicação de brotos foi influenciada pelas combinações de sacarose e nitrogênio inorgânico empregados, para todos os parâmetros avaliados, sendo que as melhores respostas foram obtidas entre 30 a 45 g/L de sacarose associado ao dobro da concentração (2 MS) de nitrogênio inorgânico presentes no meio "MS".

O percentagem de enraizamento foi influenciada somente pelos níveis de AIB, no entanto o número médio de raízes foi influenciado pelas concentrações de AIB e sacarose, sendo a melhor combinação foi 45 g/L de sacarose com 5 mg/L de AIB.

7. SUMMARY

This work was carried out with the objective of studying the effects of several sucrose, inorganic nitrogen and IBA concentrations added to on MS medium upon *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. rootstock multiplication and rooting. At the multiplication trial all possible combinations of six sucrose concentrations (0.0, 7.5, 15, 30, 45 and 60 g/L) and 5 nitrogen levels (0MS, 1/4 MS, 1/2 MS, 1 MS e 2 MS) of the concentrations existing in the MS medium were tested. The explants used were 1 cm long axilar budding from successive multiplications of the collection kept in vitro at the laboratory. Evaluations were made after 45 days of cultivation by observing the following characteristics: buds average number, over 1 cm long buds, buds average size and total dry weight. At the rooting trial all possible combinations of 5 sucrose concentrations (0.0; 15; 30; 45 and 60 g/L) and 4 IBA levels (0.0; 1.0; 3.0 and 5.0 mg/L) were tested. The explants were 3 cm long buddings. Two evaluations were made as follows, a visual one 7 days after inoculation, and another one at the 21st day in order to find out the rooting and the roots average number.

Essays were carried out in a growth room under the following conditions: temperature around 26°C, photoperiod of 16 light hours and light intensity of 2.500 lux. A randomized block design was used and results were statistically interpreted through the variance analysis and the Duncan test. In general buds multiplication was found to be influenced by sucrose and nitrogen combination

in all parameters evaluated and best responses were noticed when 30 to 45 g/L of sucrose was associated to double of inorganic nitrogen concentration (2 MS) existing in the MS medium were used.

Rooting percentage was found to be only influenced number had been found to be influenced by both IBA and sucrose. The 60 g/L sucrose and the 5 mg/L IBA were found to be the best combination.

8. LITERATURA CITADA

1. ALTMAN, A. & GOREN, R. Horticultural and physiological aspects of citrus bud culture. *Acta Horticulture*, The Hague, 78:51-60, 1977.
2. BARALDI, R.; ROSSI, F. & LERCARI, B. In vitro shoot development of *Prunus* G.F. 655-2: interaction between light and benzyladenine. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 74:440-3, 1988.
3. BARLASS, M. & SKENE, K.G.M. Citrus. In: BAJAJ, Y.P.S., ed. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer-Verlag, Berlin, 1986. p.207-19.
4. BELOUALY, N. Plant regeneration from callus culture of three citrus rootstocks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, 24:29-34, 1991.
5. BENNETT, I.J. & McComb, J.A. Propagation of jarrah (*Eucalyptus marginata*) by organ and tissue culture. *Australian Forestry Research*, East Melbourne, 12:121-7, 1982.
6. BHOJWANI, S.S. & RAZDAN, M.K. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*. New York, Elsevier Science Publishing Company, 1983. 501p.

7. BONGA, J.H.M. Clonal propagation of mature trees: problems and possible solutions. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J. *Cell and Tissue Culture in Forestry*. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers, 1987. p.249-71.
8. BROWN, D.C.W. & THORPE, T.A. Mitochondria activity during shoot formation and growth in tobacco callus. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 54:125-30, 1982.
9. CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P. & FERREIRA, M.E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S., eds. *Técnicas de Cultura de Tecidos de Plantas*. Brasília, ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p.37-70.
10. CHATUVERDI, H.C. & MITRA, G.C. Clonal propagation of Citrus from somatic callus culture. *HortScience*, Virginia, 9(2):118-20, 1974.
11. CHONG, C. & PUA, E. Carbon nutrition of Ottawa 3 apple, rootstock during stages of "in vitro" propagation. *Journal of Horticultural Science*, Ashford, 60:285-90, 1985.
12. DOUGALL, D.K. Nutrition and metabolism. In: STABA, E.J., ed. *Plant tissue culture as a source of biochemicals*. Boca Raton, Florida, 1980. p.51-8.
13. DURAN-VILA, N.; ORTEGA, V & NAVARRO, L. Morphogenesis and tissue cultures of three citrus species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, 16:123-33, 1989.

14. **ESAN, E.B.** A detailed study of embryogenesis in the rutacea. Riverside, University of California, 1973. 233p. (Tese)
15. **GAMBORG, O.L.** The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. *Plant Physiology*, Washington, 45:372-5, 1970.
16. _____. Plant cell cultures: nutrition and media. In: **VASIL, I.K.**, ed. *Cell culture genetics of plant*. New York, Academic Press, 1984. v.1, p.18-26.
17. _____ & **SHYLUK, J.** The culture of plants cells with ammonium salts as the sole nitrogen source. *Plant Physiology*, Washington, 45:598-600, 1970.
18. **GAVISH, H.** Extracellular proteins and early embryo development in Citrus nucellar cell cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 82:606-16, 1991.
19. **GEORGE, E.F.** & **SHERRINGTON, P.D.** Factors affecting growth and morphogenesis. In: _____. *Plant Propagation by tissue culture*. England, 1984. p.125-71.
20. **GRATTAPAGLIA, D.** & **MACHADO, M.A.** Micropropagação. In: **TORRES, A.L.** & **CALDAS, L.S.**, eds. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília, ABCTP/EMBRAPA - CNPH, 1990. p.89-164.

21. GUPTA, P.K.; MASCARENHAS, A.F. & JACANNATHAN, V. Tissue Culture of trees clonal propagation of mature trees of *Eucalyptus citriodora* Hook by Tissue Culture. *Plant Science Letter*, Amsterdam, 20:195-201, 1980.
22. HAISSIG, B.E. Carbohydrate and amino acid concentrations during adventitious root primordium development in *Pinus banksiana* Lamb. cuttings. *Forestry Science*, Washington, 28:813-21, 1982.
23. HEARN, C.J.; HUTCHINSON, D.J. & BARRET, H.C. Breeding citrus rootstock. *HortScience*, Virginia, 9:357-8, 1974.
24. HYNDMAN, S.E.; HASEGAWA, P.M. & BRESSAN, R.A. The role of sucrose and nitrogen in adventitious root formation on cultures rose shoots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, 1:229-38, 1989.
25. INFANTE, R.; MAGNANI, E. & RIGHETTI, B. The role of light and CO₂ in optimising the conditions for shoot proliferation of *Actinidia deliciosa* in vitro. *Physiological Plantarum*, Copenhagen, 77:191-5, 1989.
26. JESSUP, W. & FOWLER, M.W. Interrelationships between carbohydrate metabolism and nitrogen assimilation in cultured plant cells. III Effect of the nitrogen source on the pattern of carbohydrate oxidation in cells of *Acer pseudoplatanus* L. grown in culture. *Planta*, New York, 137:71-6, 1977.
27. JONES, O.P.; HOPGOOD, M.C. & O'FARRELL, D. Propagation in vitro of M26 apple rootstocks. *Journal Horticulture Science*, London, 52(2):235-8, 1977.

28. JOHN, A. & MURRAY, B.W. Micropropagation of Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong) Carr.) Colloquium International Culture In Vitro Essences Forestry. Fontainebleau, AFOCEL, 1981 p.65-70.
29. KITTO S I & YOUNG, M.J. "In vitro" propagation of Carrizo citrange *HortScience*, Virginia, 16(3):305-6, 1981
30. KOCHBA, J. SPIEGEL-ROY, P. & SAFRAN, H. Adventive plants from ovules and nucelli in citrus. *Planta*, New York, 106(2):237-45, 1972
31. LANE W D. Regeneration of woody plants from shoot meristem tips *Plant Science Letters*, Amsterdam, 13:281-5, 1978.
32. IENEE, P. & CHAPEAU, Y. Isolation and culture of sunflower protoplast (*Helianthus annuus* L.): factors influencing the viability of cell colonies derived from protoplasts. *Plant Science*, Berkley, 43:69-75, 1986.
33. MAGALHÃES, J.R. & WILCOX, G.E. Interação entre formas de nitrogênio e reguladores de crescimento. *Pesquisa Agropecuária Brasileiro*, Brasília, 22(6) 576-85, 1987
34. MAHESHWARI, P. & RANGASWAMY, N.S. Polyembriory and in vitro culture of Citrus and Mangifera. *Indian Journal of Horticulture*, Bangalore, 15 275-86, 1958.

35. MANGAT, B.S.; PELEKIS, M.K. & CASSELLS, A.C. Changes in the starch content during organogenesis "in vitro" cultured *Begonia rex* stem explants. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 79:267-74, 1989.
36. MARETZKI, A.; DELA CRUZ, A. & NICKELL, L.G. Extracellular hidrolisis of starch in surgarcane cell suspensions. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 54:521-5, 1971.
37. MARGARA, J. Study of factors in the neoformation of buds in tissue culture of cauliflower D. *Brassica oleracea* var. botrytis D. *Annales de Physiologie Végétale*, 11:95-112, 1969.
38. MOHAMMED, D.G. & VIVADER, W.E. Root production and plantlet development in tissue cultured conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, 14:137-60, 1988.
39. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays whith tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 15:473-97, 1962.
40. _____ & TUCKER, D.P.H. Growth factor requeriment of Citrus tissue culture. In: CHAPMAN, H.D., ed. *International Citrus Symposium*. Riverside, University of California, p.115-1161, 1969.
41. NANDA, K.K. & JAIN, M.K. Utilization of sugars and starch as carbon sources in the rooting of etiolated stem segments of *Populus nigra*. *New Phytologist*, Oxford, 71:825-8, 1972.

42. NAVARRO, L.; ORTIZ, J.M. & JUAREZ, J. Aberrant citrus plants obtained by somatic embryogenesis of nucelli cultures "in vitro". *HortScience*, Virginia, 20(2):214-5, 1985.
43. NÉMETH, G. Induction of rooting. In: BAJAJ, Y.P.S., ed. *Biotechnology in Agriculture and Forestry I*. Berlin, Springer-Verlag, 1986. p.65-86.
44. NOH, E.W.; MINOCHA, S.C. & RIEMENSCHNEIDER, D.E. Adventitious shoot formation from embryonic explants of red pine (*Pinus resinosa*). *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 74:119-24, 1988.
45. OTONI, W.C. Estudos de propagação "in vitro" de *Citrus sinensis* L. Osb. cv. Pêra a partir da cultura de segmentos nodais juvenis. Viçosa, UFV, 1988. 108p. (Tese de Mestrado).
46. PAMPLIN, E.J. & CHAPMAN, J.M. Sucrose supression of chlorophyll synthesis in tissue culture: changes in the activity of the enzymes of the chlorophyll biosynthetic pathway. *Journal of Experimental Botany*, London, 26:212-20, 1975.
47. PASQUAL, M. Regeneração de plantas "in vitro" e radiosensitividade de tecidos nucelares de citros. São Paulo, ESALQ, 1985. 107p. (Tese de Doutorado).
48. RANGAN, T.S.; MURASHIGE, T. & BITTERS, W.P. In vitro initiation of nucellar embryos in monoembryonic citrus. *HortScience*, Virginia, 3:226-7, 1968.

49. ROEST, S. & BOKELMANN, G.S. Vegetative propagation of carnation in vitro through multiple shoot development. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, 19:691-9, 1981.
50. RUTLEDGE, C.B. & DOUGLAS, G.C. Culture of meristem tips and micropropagation of 12 commercial clones of poplar in vitro. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 72:367-73, 1988.
51. SAID, A.G.E. & MURASHIGE, T. Continuous cultures of tomato and citron roots "in vitro". *In vitro*, Gaithersburg, 15(8): 593-602, 1979.
52. SAKUTA, M. Effects of sucrose source on betacyanin accumulation and growth in suspension cultures of *Phytolacca americana*. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 71:459-63, 1987.
53. SAUTON, A.; MOURA, A.; & LUIZ, A. Plant regeneration from Citrus root meristms. *Journal of Horticultural Science*, Ashford, 57(2):227-31, 1982.
54. SIM, G.E.; GOH, C.J. & LOH, C.S. Micropropagation of *Citrus mitis* Blanco-multiple bud formation from shoot and root explants in the presence of 6-Benzylamino purine. *Plant Science*, Ireland, 59:203-10, 1989.
55. SIPKINS, I. The growth of *Acer pseudoplatanus* cells in synthetic liquid medium: response to the carbohydrate, nitrogenous and growth hormone constituents. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 82:606-16, 1970.

56. SOMMER, H.E. & CALDAS, L.S. "In vitro" methods applied to forest trees. In: THORPE, T.A., ed. **Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture**. New York, Academic Press, 1981. p.349-58.
57. SPIEGEL-ROY, P.E. & VARDI, A. Citrus. In: EVANS, D.A.; SHARP, V.R. & YAMADA, Y., eds. **Handbook of Plant Cell Culture**. New York, MacMillan, 1985. v.3, p.355-359.
58. SRISKANDARAJASH, S. & MULLINS, M.G. Micropropagation of Granny Smith apple: factors affecting root formation in vitro. **Journal Horticulture Science**, London, 56:71-6, 1981.
59. STAFFORD, A. & FOWLER, M.W. Effects of carbon and nitrogen growth limitation upon nutrient uptake and metabolism in batch cultures of *Cathartus roseus* (L.) G. Don. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, 2:239-51, 1983.
60. THOMPSON, M.R. & THORPE, T.A. Metabolic and non-metabolic roles carbohydrates. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J., eds. **Cell and Tissue Culture in Forestry**. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers, 1987. p.35-7.
61. THORPE, T.A. Carbohydrate utilization and metabolism. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J. eds. **Tissue Culture in Forestry**. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers, 1982. p.325-68.

62. THORPE, T.A. & BEAUDOIN-EAGAN, L.D. C-metabolism during growth and shoot formation in tobacco callus cultures. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie*, Stuttgart, 113:337-346, 1984.
63. TREMBLAY, L. & TREMBLAY, F.M. Carbohydrate requirements for the development of black spruce (*Picea mariana* (Mill.) BSP) and red spruce (*P. rubens* Sarg.) somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, 27:95-103, 1991.
64. WAKANA, A & UEMOTO, S. Adventice embryogenesis in citrus. I. The occurrence of adventive embryos without pollination or fertilization. *American Journal of Botany*, Ohio, 74(4):517-30, 1987.
65. WESTCOTT, R.J. & HENSHAW, G. Phenolic synthesis and phenylalanine ammonia-lyase activity in suspension cultures of *Acer pseudoplatanus* L. *Planta*, New York, 131:67-73, 1976.
66. WIJNSMA, R. The influence of initial sucrose and nitrate concentrations on the growth of *Chinchona lidgeriana* cell suspension cultures and the production of alkaloides and antraquinones. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, 7:21-9, 1980.
67. YAMADA, Y. & SATO, F. Photoautotrophic culture of chlorophyllous cultured cells. *Plant and Cell Physiology*, 19(4):691-9, 1978.
68. YATAZAWA, M. & FURURASHI, K. Nitrogen source for the growth of rice callus tissue. *Soil Science Plant Nutrition*, London, 14:73-9, 1978.

69. ZENK, M.H.; EL-SHAGI, H.; ARENS, H.; STÖCKIGT, J.; WEILER, E.W. & DEUS, B. Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in culture suspension cultures of *Catharanthus roseus*. In: BARZ, W.; REINHARD, E. & ZENK, M., eds. *Plant Tissue Culture and its Bio-technological Application*. Berlin, Springer Verlag, 1977. p.27-43.
70. ZIMMERMAN, R. Factors affecting "in vitro" propagation of apple cultivars. *Acta Horticulture*, London, 131:171-178, 1983.
71. ZIMMERMAN, U. Physics of turgor and osmoregulation. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, 29:121-48, 1978.

