

# POLIEMBRIONIA EM CITRUS

Sílvio Moreira

J. T. A. Gurgel (\*) e

Lineu F. de Arruda (\*\*)

## INTRODUÇÃO

De um projeto geral de melhoramento de *Citrus*, organizado em 1938, para cujo planejamento e execução colaboraram as secções de Citricultura, Genética, Citologia e Estação Experimental de Limeira, do Instituto Agrônomo, assim como a secção de Citologia e Genética da E. S. A. "Luiz de Queiroz", constava o estudo detalhado de vários caracteres das espécies e variedades cítricas existentes na coleção da Estação Experimental acima referida. Dentre êsses caracteres, dada a sua importância para os trabalhos projetados, à poliembrionia foi dedicada especial atenção, tendo mesmo sido iniciada a sua determinação dois anos antes (1936), em sementeira da variedade azêda (*Citrus aurantium* L.). (\*\*\*)

De então para cá, tais determinações foram intensificadas e hoje possuímos numerosos dados que reunidos, analisados e comparados, permitem esclarecer pontos ainda obscuros e incertos ou também confirmar aquêles já estabelecidos por outros pesquisadores. Alguns dêsses dados já foram utilizados para explicar certas constatações mencionadas em trabalhos publicados por vários colaboradores do referido plano de melhoramento de *Citrus* (Brieger (3, 5), Bacchi (1), Krug (12), Moreira (13, 15) e Gurgel (9)). Tais dados são agora reunidos e novamente publicados, sob forma diferente, em conjunto com outros ainda inéditos.

Desde os memoráveis trabalhos de Strasburger (18), a poliembrionia em *Citrus* se tornou um fenômeno bem conhecido, tendo sido posteriormente determinada e estudada por numerosos investigadores. Podem ser mencionadas as pesquisas de Webber (27, 28 e 29), Frost (6), Toxopeus (23), Swingle (19), Torres (21, 22), Traub (24), Hatton (10), Hodgson (11), Osawa (17) e muitos outros, que relatam observações e sugerem hipóteses em relação às causas e variações encontradas na manifestação dêste fenômeno.

Não sendo nossa intenção entrar em uma discussão muito ampla da literatura sobre poliembrionia, e mesmo no que diz respeito à questão mais restrita da poliembrionia em *Citrus*, podemos citar o ótimo resumo publicado em "Citrus Industry" (8).

---

(\*) Livre-Docente e assistente da Cadeira de Citologia e Genética da E. S. A. "Luiz de Queiroz" em Piracicaba.

(\*\*) Agrônomo Regional de Limeira.

(\*\*\*) Seguimos a classificação adotada por Swingle (20).

Parece-nos comprovado que a poliembrionia nos *Citrus* é, de um modo geral, devida ao crescimento de células nucelares, situadas à superfície do saco embrionário. Iniciando-se por crescimentos irregulares, elas penetram no interior do saco embrionário, adquirindo, finalmente, a forma esférica, com um pequeno pedúnculo, típico para a formação de embriões normais. Êste processo já foi descrito por Strasburger (18), e verificado por observações de muitos autores.

As observações microscópicas feitas desde o início da formação dos embriões nucelares, deixam claramente ver que são grupos irregulares de células que iniciam o seu crescimento na direção centrípeta, à superfície do saco embrionário; assim, não se pode dizer se cada grupo de células iniciais já corresponde a um só embrião nucelar ou se há ainda divisões secundárias. Também parece que não há uma absoluta limitação a uma ou outra região pré-determinada do saco embrionário, apesar de que se nos afigure que existe intensidade mais acentuada nas regiões do nucelo adjacente à parte micropilar, onde está localizada a oosfera.

O desenvolvimento dos embriões nucelares também não parece sincronizado e o fato de aparecerem, em sementes maduras, embriões grandes e pequenos, pode em parte ser explicado pela maior ou menor precocidade do seu desenvolvimento. Assim, não há, evidentemente, qualquer limitação rígida de ordem histológica com referência ao número de embriões nucelares. De outro lado, devendo conter cada saco embrionário uma só oosfera, era de se esperar, no máximo, um embrião sexual por semente (15, fig. 15 e 16), porém foram observados vários casos com mais de um embrião sexual por semente (6, 7, 24). Registamos tal caso num cruzamento de Calamondin x Trifoliata, no qual, num total de 3 « seedlings », um era Calamondin puro, indicando origem apogâmica, e os dois outros, providos de fôlhas tripartidas, de natureza sexual. Ê interessante observar que êstes híbridos, quando novos, pela conformação das fôlhas, não eram idênticos, e não podemos afirmar se se trata de ações fenotípicas, genéticas, ou, ainda, consequência de uma aberração citológica, porquanto posteriormente os caracteres foliares dêstes híbridos tornaram-se idênticos.

Há duas explicações para o aparecimento de dois embriões sexuais: Frost (6, 7) opinou tratar-se de uma clivagem do embrião, de modo que os dois descendentes representam gêmeos uni-ovais; Bacchi (1), de outro lado, observou, em cortes, a ocorrência rara de dois sacos embrionários no mesmo óvulo, o que daria origem a dois embriões bi-ovais.

A variabilidade do número de embriões foi já observada por muitos autores e parece que os fatores responsáveis por essa variação são muito diversos, além da constituição genética das variedades ou espécies. Traub (24), por exemplo, registou correlação entre poliembrionia e alimentação, devendo-se admitir a influência do meio sôbre a manifestação dêsse fenômeno. Discutindo as relações entre polinização e poliembrionia, Frost (8) manifesta dúvidas de que a fecundação seja um pré-requisito para a embriionia nucelar. De outro lado, não pode haver dúvida, de acôrdo com as investigações de vários autores citados por Frost (8), de que o número de sementes formadas está em relação com a polinização efetuada. Moreira e Gurgel (15)

observaram que há diferença significativa no número de sementes em laranja Baianinha, quando fecundada com pólen das variedades Barão ou Hamlin.

Na análise experimental da poliembrionia encontramos indicações de uma competição entre o único embrião sexual e os numerosos embriões nucelares. Isto já foi constatado pelo método direto de observação microscópica (histológica) por Strasburger (18). Segundo Frost (8) e Toxopeus (23), os embriões sexuais, são menos vigorosos do que os embriões apogâmicos. Assim, não é de se admirar que a natureza do pai, em cruzamento, tenha uma influência diferente nesta competição, pois é de se esperar que algum híbrido seja mais, ou menos, vigoroso (Toxopeus (23), Tórres (21), Frost (6).

O fim principal do presente trabalho é a determinação da distribuição e frequência da poliembrionia nas diferentes espécies e variedades da nossa coleção, para depois escolher o material mais favorável aos estudos detalhados sobre alguns dos problemas acima mencionados. Parece-nos, ainda, que estudos mais minuciosos sobre poliembrionia poderiam ter uma aplicação prática, tanto na obtenção de novas variedades por cruzamento, como no problema do estabelecimento de clones para cavalo, opinião, aliás, já manifestada por Toxopeus (23).

## MÉTODOS APLICADOS

As observações por meio de dois diferentes processos de contagem de poliembrionia, são justificadas pela finalidade que tínhamos em vista. Pareceu-nos interessante, do ponto de vista geral, saber exatamente o número de embriões perfeitos ou imperfeitos, que podiam se formar. Para qualquer fim prático, era apenas de interesse saber o número de embriões suficientemente desenvolvidos, que podem passar da fase embrional para a vida independente, isto é, formar "seedlings".

Dois métodos foram por nós usados para proceder às determinações do número de embriões encontrados nas sementes das plantas cítricas: 1) contagem de embriões germinados; 2) contagem de embriões nas sementes antes de iniciado o processo de germinação ou, como chamamos, processo direto.

### 1. Contagem de embriões germinados

Os quadros 1 e 2 mostram, em resumo, os dados obtidos por este método, os quais, do ponto de vista prático, são bastante interessantes, porque indicam frequências "realmente" obtidas na germinação das sementes.

Vejamos como foram feitas essas determinações.

a) **Dados do quadro 1.** Colhemos, separadamente, frutos normais em 15 árvores de laranja azêda (*Citrus aurantium* L.). Extraímos as sementes, que foram lavadas e imediatamente semeadas em canteiros de terra. Fizemos a sementeira em sulcos rasos (2 cm) cobrindo as sementes com leve camada de terriço.

## QUADRO 1

## POLIEMBRIONIA EM CITRUS

Contagem em sementeira de laranja azêda — 1936

(Fecundação livre)

N.º de Árvores	EM 15.000 SEMENTES GERMINADAS						
	Frequência de embriões				Embriões		Poliembrionia %
	1	2	3	4	Total	$\bar{v}$	
15	14.020	935	42	3	16.028	—	—
Média . . . . .	934,6	62,3	2,8	0,2	1.069	1,1	6,5

Quando a germinação já estava bem adiantada, arrancamos cuidadosamente as sementes com embriões germinados, mas ainda reunidos sob a resistente película externa (texta), de maneira a não haver dúvida quanto à origem dos embriões encontrados. A maior parte das sementes assim arrancadas já possuía pelo menos um embrião com as duas pequenas fôlhas completamente formadas. Rasgando a película já em início de desagregação, contamos todos os embriões encontrados no seu interior e que demonstravam comêço de germinação (formação de radícula e caulículo). A esta contagem escapavam naturalmente aqueles embriões minúsculos, que normalmente nunca germinam em sementeira comum.

De cada planta semeamos cêrca de 5.000 sementes, de modo que tivemos material abundante para escolher mil sementes nas condições acima referidas, desprezando as mal germinadas e aquelas cuja película exterior já se havia decomposto. Foram assim contados os embriões, cuja frequência variou de 1 a 4, em 15.000 sementes. Não fizemos determinação da proporção de germinação nesta sementeira.

b) **Dados do quadro 2.** Fizemos a sementeira em caixas com terra, distribuindo as sementes em linhas e conservando uma distância de 2 cm de uma a outra. Anotamos o número de sementes plantadas, o qual regulou ser 500 de cada planta. Pudemos determinar a percentagem de germinação por ocasião de proceder à contagem dos embriões.

Foram plantadas, individualmente separadas, sementes de 110 plantas pertencentes a 62 variedades e 9 diferentes espécies cítricas, assim como de 10 plantas representando 4 tipos de híbridos.

O arrancamento e a contagem dos embriões foram procedidos do mesmo modo descrito em a, depois de terminada a germinação, isto é, 80 dias após a sementeira (16).

## QUADRO 2

## POLIEMBRIONIA EM CITRUS

Contagem em sementeira — 1938

(Fecundação livre)

ESPÉCIE OU HÍBRIDO	N.º de ár- vo- res	Sementes		Frequência média de embriões (por planta e por classe)							Embriões por sementes	Poliem- brionia
		Plan- tadas	Ger- mina- das %	1	2	3	4	5	6	7		
<i>C. hystrix</i> ..... (papeda)	1	500	26,8	134	—	—	—	—	—	—	1,0	0,0
<i>C. grandis</i> ..... (toranjas)	5	2200	71,1	30,5	0,2	—	—	—	—	—	1,0	0,06
<i>C. aurantium</i> ..... (laranja azêda)	30	14750	41,2	196,6	5,0	0,1	—	—	—	—	1,0	2,6
<i>C. aurantifolia</i> ..... (limas)	11	5410	24,4	110,2	10,9	0,1	—	—	—	—	1,1	9,0
<i>C. reticulata</i> ..... (tangerinas)	1	500	37,6	156	30	2	—	—	—	—	1,2	17,0
<i>C. reticulata</i> ?..... (limão cravo)	3	1500	68,4	315	27	—	—	—	—	—	1,1	7,9
<i>C. limon</i> ..... (limões)	14	6860	41,3	170,7	30,4	3,2	0,4	0,07	—	—	1,1	13,1
<i>C. sinensis</i> ..... (laranja doce)	40	16690	45,6	149,5	48,7	6,2	0,9	0,1	—	—	1,3	26,4
<i>C. paradisi</i> ..... (pomelos)	4	2000	71,7	234,2	115,5	8,2	0,5	—	—	—	1,4	34,4
<i>C. medica</i> ..... (cidras)	1	500	30,0	149	1	—	—	—	—	—	1,0	0,6
<i>C. reticulata</i> x <i>Fortu-</i> <i>nella</i> sp. .... (calamondin)	3	1500	72,1	168,3	139,3	42,6	8,3	0,6	0,3	0,3	1,6	53,1
<i>Poncirus trifoliata</i> x <i>C. sinensis</i> ..... (citrange Rusk)	1	500	34,6	104	53	12	4	—	—	—	1,5	39,9
<i>C. reticulata</i> x <i>C. paradisi</i> ..... (tangelos)	2	1000	57,5	214,5	62,5	8,5	2,0	—	—	—	1,2	23,2
<i>C. sinensis</i> x <i>C. reticulata</i> ..... (tangors)	4	1550	21,2	66,5	14,5	1,0	—	—	—	—	1,2	17,2

## 2. Contagem direta na semente

Na literatura sobre poliembriõnia encontramos referências sobre contagem direta do número de embriões nas sementes dos *Citrus*. Em vista disso, tentamos fazer essa determinação também no material da nossa coleção.



Há várias vantagens na determinação da poliembriõnia diretamente na semente, bastando lembrar que podemos contar um número bem maior de embriões, do que na sementeira, obtendo-se assim um resultado mais exato, com grande economia de tempo e, principalmente, de espaço.

A técnica usada é muito simples : com uma agulha histológica abre-se o integumento na ponta da semente. Com uma pinça de pontas finas, vai-se retirando o integumento bem como a película que recobre os embriões. A disseção dos embriões é feita com duas agulhas histológicas ; a princípio, enquanto não se tem ainda prática, deve ser feita sob a lupa binocular ; após bastante tirocínio, pode-se fazer à vista desarmada, com exceção apenas das sementes altamente poliembriônicas, como a do Calamondin, laranja lima, etc., em que se encontram embriões pequenos, medindo, às vèzes, menos de milímetro. Na disseção dos embriões das sementes deve-se tomar muito cuidado para não quebrar os cotilédones, retirando sempre que possível os embriões completos. Nas espécies com alta frequência de poliembriõnia deve-se abrir os cotilédones dos embriões maiores, pois é comum encontrar-se embriões pequenos crescendo por dentro dos grandes ; além disso, deve-se ainda observar muito bem os embriões do lado que foi o micrópilo, pois é também comum encontrar-se embriões diminutos até menores de 0,5 mm, por cima e entre os embriões maiores.

Outra dificuldade que ainda se pode encontrar na identificação dos embriões é a variação do número de cotilédones, pois aparecem embriões com 1, 3 e 4 cotilédones, além dos normais, com 2.

No quadro 3 damos o resumo, por espécie cítrica, dos dados obtidos na contagem direta dos embriões nas sementes.

## RESULTADO DAS CONTAGENS DA POLIEMBRIõNIA

Em tôdas as formas de *Citrus* estudadas, a poliembriõnia foi demonstrada de dois modos : **número médio** ou média dos embriões, que se obtém dividindo-se o número total de embriões contados pelo número de sementes consideradas ; e a **percentagem** de poliembriõnia, que se obtém calculando-se em por cento a frequência das sementes com dois ou mais embriões, no total das sementes contadas. Por exemplo, se tivermos só sementes monoembriônicas, a média dos embriões será 1 e a percentagem será zero ; se tivermos apenas sementes de 2 ou mais embriões, a média dos embriões será, no mínimo, 2, e a percentagem será 100. Os casos mais comuns são os compreendidos entre êsses limites, sendo bom frizar que encontramos mais frequentemente sementes monoembriônicas, ao passo que sementes com 100% de poliembriõnia é fato raramente verificado.

Para facilitar a discussão sôbre os resultados obtidos nas contagens da poliembriõnia, quer utilizando-se a contagem dos embriões no processo da germinação, quer no processo direto, achamos conveniente recorrer ao agrupamento das percentagens de poliembriõnia em três classes, estabelecendo-se o critério seguinte :

POLIEMBRIONIA	Processo de contagem	
	Na sementeira	Direto
baixa .....	0%—15%	0%—30%
média .....	15%—30%	30%—60%
alta .....	+30%	+60%

## 1. Contagem de embriões germinados

### a) Dados do quadro 1 — Laranja azêda (*Citrus aurantium* L.).

A contagem da poliembrionia da laranja azêda foi feita em mais de 15.000 sementes, pelo interesse que esta variedade já teve e pode ainda voltar a ter como porta-enxêrto. Do nosso plano de trabalhos em colaboração constava a obtenção de clones desta variedade, utilizando-se do fenômeno da poliembrionia; para isso projetamos polinizar as melhores matrizes de laranja azêda com *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., cujo caráter “trifólio” é dominante sobre o tipo de fôlha comum, o que permitiria distinguir na sementeira os embriões sexuais dos apogâmicos. Depois do aparecimento da “tristeza” dos *Citrus*, êstes estudos foram interrompidos, por estar essa variedade, pelo menos temporariamente, condenada como cavalo para várias espécies cítricas (14).

A percentagem da poliembrionia variou de 4,3 até 8,6; as diferenças dos extremos para a média das 15 árvores estudadas são estatisticamente significantes, o que prova ser possível separar plantas com diferentes graus de poliembrionia. Contudo, essas diferenças, apesar de significantes, não apresentam interesse prático, por serem de ordem muito baixa e sofrerem variações de um ano para outro, como veremos mais adiante.

A poliembrionia na laranja azêda, verificada pelo processo da germinação da semente, é baixa. Obtiveram-se em 15.000 sementes contadas, 93,5% ou 14.020 sementes com um só embrião germinado. A percentagem de poliembrionia foi de 6,5. Entre as poliembrionicas estão incluídas 935 sementes com dois; 42 de três, e 3 com quatro embriões cada uma.

### b) Dados do quadro 2 — *Citrus* diversos e híbridos.

Incluimos na determinação da poliembrionia, os resultados expressos pelo número médio de embriões e pela percentagem; foram contadas sementes de 9 diferentes espécies de *Citrus*, num total de 110 plantas, e 4 diferentes híbridos, não só de espécies do gênero *Citrus*, como também dêste gênero com *Fortunella* e *Poncirus*, num total de 10 plantas

**Papeda** (*Citrus hystrix* DC.). Esta foi a única espécie cujas sementes mostraram ser sempre monoembriônicas na contagem em sementeira. Nas 135 sementes germinadas, provenientes de uma única planta, encontramos sempre um só embrião.



**Toranjas** (*Citrus grandis* (L.) Osbeck). As variedades pertencentes a esta espécie têm sido consideradas, por muitos autores, como monoembriônicas, mas, nas nossas determinações, encontramos uma planta de toranja doce que, dentre 338 sementes germinadas, apresentou uma com 2 embriões. Como veremos posteriormente, fazendo a contagem dos embriões diretamente na semente, encontramos em sementes de algumas plantas embriões adicionais, os quais, sendo muito pequenos, raramente conseguem germinar. Para fins práticos, podemos considerar as toranjas como sendo monoembriônicas.

**Laranja azêda** (*Citrus aurantium* L.). Além dos dados constantes do quadro 1, na nova determinação da poliembrião compreendida em 1938 incluímos também esta espécie, sendo anotada a poliembrião em sementes de 30 plantas, localizadas em 3 diferentes pomares. Encontramos desde plantas monoembriônicas, até plantas com mais de 15% de poliembrião (agro-doce), sendo a percentagem média da poliembrião de 2,6%. Devido à poliembrião ser muito baixa na grande maioria das plantas, a média do número de embriões por semente ficou muito próxima de 1.

Comparando êstes resultados com os do quadro 1, notamos que êles são muito baixos, podendo-se atribuir êste fato ao número menor de sementes contadas, geralmente menos de 250 por planta; a única exceção verificada é a de duas plantas que, na verdade, não devem ser comparadas, pois são representantes de outra variedade, a agro-doce, provavelmente um híbrido (*Citrus aurantium* x *Citrus sinensis*). (24).

**Limas doces e ácidas** (*Citrus aurantifolia* Christm. Swing). Foram analisadas 11 plantas de 4 diferentes origens, variando a poliembrião de 2,9%, na lima selvagem, até 13,8%, na lima da Pérsia. Neste grupo, a poliembrião foi baixa, sendo a percentagem média de 9,0%. O número médio de embriões está próximo de 1; somente duas plantas (lima da Pérsia e limão Cristal) apresentavam sementes de três embriões.

**Limão cravo** (*Citrus reticulata* ?). Sementes de 3 plantas apenas foram examinadas, encontrando-se baixa e constante percentagem de poliembrião, ao redor de 8,0%. O número médio de embriões por semente (1,1) também foi constante. Por haver uma certa dúvida quanto à posição botânica desta forma de *Citrus*, pensando-se, às vezes, tratar-se de uma tangerina ácida (20, p. 415) ou de um híbrido (lima x tangerina) preferiu Webber (28, p. 480, 548, 619, 626) manter o limão cravo no grupo das limas. De acôrdo com os dados do quadro 2, sob o ponto de vista da poliembrião, esta forma cítrica aproxima-se muito mais da espécie *Citrus aurantifolia* do que da *Citrus reticulata* Blanco.

**Mexiriqueira do Rio** (*Citrus reticulata* Blanco). Contamos os embriões de sementes de uma única planta desta espécie, encontrando-se 17,0% de poliembrião. A média foi de 1,2 embriões por semente; o máximo observado foi de 3 embriões em 2 sementes.

**Limões em geral** (*Citrus limon* L. Burm.). Foram analisadas 14 plantas correspondentes a 10 variedades de duas diferentes localidades,

encontrando-se desde limões monoembriônicos, como o Ponderosa e Sweet Lemon, até limões com 32,0 a 53,2% de poliembriõnia, respectivamente, Rugoso e Rio Claro; a poliembriõnia para esta espécie foi em média de 13,1%, o número médio de embriões variou de 1 a 1,7 com um valor médio de 1,1.

**Laranja (ou tangor), tangerina, maracujá, sabará e reticulata** (*Citrus reticulata* x *Citrus sinensis*). Foram analisadas 4 diferentes plantas e variedades, tôdas da Estação Experimental de Limeira. A poliembriõnia foi baixa, variando de 7,7% para laranja tangerina até 25,8% para a laranja reticulata, sendo a média de 17,2%. Apenas em dois casos obtivemos sementes com mais de 3 embriões (sabará e reticulata); o número médio de embriões variou de 1,1 até 1,3 com um valor médio de 1,2.

**Laranjas doces** (*Citrus sinensis* L. Osbeck). Foram analisadas 40 plantas, de 4 diferentes pomares, indo a poliembriõnia desde 7,2% até 52,3%, sendo a média de 26,4%; as médias de embriões variaram de 1,1 até 1,7 com um valor médio de 1,3.

Como vemos, nas laranjas doces encontramos representantes desde poliembriõnia alta, como as laranjas macaé, mangaratiba, seleta amarela e S. Sebastião, com mais de 40% e sementes até com 5 embriões; poliembriõnia média, como nas laranjas caipira B, abacaxi, coronel, sanguínea, etc., entre 15 e 30% e sementes até com 4 embriões; finalmente, poliembriõnia baixa, com menos de 15%, nas laranjas Setubal, açoriana, etc.

**Pomelos** (*Citrus paradisi* Macf). Neste grupo foram analisadas 4 plantas, cada uma de diferente variedade, tôdas de um só pomar. A poliembriõnia oscilou entre média a alta, com valores de 26% para os pomelos triunfo e marsh-seedless, até cerca de 42% para os pomelos Foster e McCarty; os dois tipos com poliembriõnia alta chegaram a ter sementes até com 4 embriões, e os 2 restantes até 3 embriões por semente. A média de poliembriõnia para este grupo foi de 34,4% e o número médio de embriões por semente de 1,4.

**Calamondin** (*Citrus reticulata* var. *austera*? x *Fortunella* sp?). Este híbrido apresenta o mais alto grau de poliembriõnia, variando as plantas de 47,4% até 56,0%, com uma média de 53,1%; portanto, o número de sementes poliembriônicas é maior do que as monoembriônicas. Encontramos em uma planta sementes até com 7 embriões, o que, de fato, é um número bastante alto; nas outras 2 plantas, obtivemos sementes até com 5 embriões. Portanto, dentre tôdas as formas de *Citrus*, nas quais foi determinada a poliembriõnia na germinação da semente, o Calamondin ocupa a mais alta posição, com um recorde de 7 embriões, numa única semente.

**Cidra** (*C. medica* L.). A única planta analisada deu, em 150 sementes germinadas, apenas 1 com 2 embriões, o que dá 0,6% de poliembriõnia; aqui também, praticamente, podemos considerar a poliembriõnia como nula.

**Citrange Rusk** (*C. sinensis* x *P. trifoliata*). Na única planta analisada deste híbrido, constatamos um grau poliembriônico alto, cerca de 40%, encontrando-se sementes até com 4 embriões.

**Tangelos** (*C. reticulata* x *C. paradisi*). Nos dois tangelos analisados, a poliembriõnia foi de grau médio, com valores de 15% e 31%, sendo a média de 23,2%; o tangelo Thornton teve sementes até com 4 embriões, ao passo que o Sampson? teve sementes até com 3 embriões. Os números médios de embriões, por semente, foram 1,1 e 1,4, com valor médio de 1,2.

## 2. Contagem direta na semente

**Dados do quadro 3** — *Citrus* diversos, híbridos e *Poncirus*.

**Papeda** (*C. hystrix*). À semelhança do que aconteceu na determinação da poliembriõnia pelo processo da germinação, também na contagem direta não encontramos qualquer semente poliembriônica, mesmo examinando-se plantas de duas origens diferentes, devendo-se considerar bastante provável que esta espécie seja de fato monoembriônica.

**Toranjas** (*C. grandis*). Como já vimos, esta espécie tem sido tomada como monoembriônica. Nas nossas contagens baseadas no processo direto e de germinação, observamos plantas com sementes apresentando embriões adicionais. Assim, para as toranjas vermelhas, encontramos, no ano de 1943, duas sementes com 3 embriões e, em 1944, uma semente com 2 embriões. As demais eram plantas monoembriônicas.

Fica comprovado que, embora na maioria dos casos as sementes das toranjas sejam monoembriônicas, pode aparecer algumas sementes com um ou dois embriões adicionais. Nada podemos afirmar quanto à origem destes. Parece-nos provável tratar-se de embriões sexuais.

**Laranja azêda** (*C. aurantium*). Foram analisadas 3 plantas: uma de laranja azêda e duas de agro-doce, tôdas da coleção da Estação Experimental de Limeira. Na primeira, a poliembriõnia foi de 54,0% e nas outras duas de 36,0% e 64,7%, o que dá uma média de 51,5%. Para as mesmas plantas, o número médio de embriões variou de 1,3 a 2,1, com um valor médio de 1,6.

Na determinação direta, o grupo da laranja azêda apresentou alta percentagem de poliembriõnia, e uma planta de agro-doce chegou mesmo a ter até 65,0% e sementes até com 7 embriões. No processo da contagem em sementeira, poucos embriões conseguem germinar. Dão percentagem muito baixa, como vimos no quadro 2.

**Lima da Pérsia** (*C. aurantifolia*). Foram analisadas sementes de 4 plantas, tôdas da Estação Experimental de Limeira. Esta espécie se mostrou mais homogênea que as demais, com valores de poliembriõnia desde 32,1% até 63,8% e média de 46,1%. O número médio de embriões variou de 1,4 até 2,0, com um valor médio de 1,6.

De acôrdo com êstes resultados, a lima da Pérsia exhibe grau médio de poliembriõnia, podendo-se dizer que metade das suas sementes é monoembriônica e outra metade tem uma variação de 2 a 5 embriões por semente.

**Limão cravo** (*C. reticulata*?). Foram analisadas plantas de duas origens diferentes, da Estação Experimental de Limeira e Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". As percentagens de poliembriõnia são muito variáveis, obtendo-se desde 10,3% até 88,9%, sendo a média de 49,6%. O número médio de embriões variou de 1,2 até 2,4 com um valor médio de 1,7.

Pelos dados acima, podemos dizer que no limão cravo a poliembriõnia varia de baixa até alta, sendo que metade das sementes é monoembriônica e metade com 2 até 5 embriões por semente. Novamente, esta variedade apresenta as percentagens e frequências médias semelhantes às da espécie *C. aurantifolia*.

**Limões em geral** (*C. limon*). Dentro desta espécie encontramos, no mínimo, 2 grupos diferentes: um com grau baixo de poliembriõnia, como nos limões doce, ponderosa e sweet lemon; outro com grau alto de poliembriõnia, constituído pelo limão rugoso. Nas formas de baixa poliembriõnia encontramos valores desde 3,0% para o limão ponderosa até 21,0% para o limão doce; na forma de alta poliembriõnia, desde 80,5% até 90,0%, sempre em limão rugoso, provavelmente um híbrido (*C. limon* x *C. medica*), segundo Webber (28, p. 607). A média dos dois grupos não tem valor muito representativo, aproximando-se de 40% de poliembriõnia.

Nestes grupos, o número de embriões, por semente, foi também muito variável, de 2 até 7; a média variou de 1,0 a 1,3 nas formas de baixa poliembriõnia e de 2,4 a 2,8 no limão rugoso.

**Laranja (tangor), maracujá** (*C. reticulata* x *C. sinensis*). Foram analisadas duas plantas da Estação Experimental de Limeira. Os valores de poliembriõnia, bastante próximos um do outro, foram de 82,0% e 91,6%; o número médio de embriões foi de 3,2 e 3,3, respectivamente. A média de poliembriõnia deste híbrido foi de 86,8%. As sementes apresentavam até 9 embriões e podemos dizer que elas têm um alto grau de poliembriõnia.

**Laranjas doces** (*C. sinensis*). Foram analisadas mais de 15 plantas pertencentes a 7 variedades, todas da coleção da Estação Experimental de Limeira. A poliembriõnia variou de 30,8% para laranja açoriana até 95,0% para a laranja lima, sendo a média de 69,5%; o número médio de embriões, por semente, para as mesmas plantas, variou de 1,4 até 4,0 com um valor médio de 2,5.

Deste modo, nas laranjas doces, encontramos plantas com poliembriõnia de grau médio até alto; nas primeiras, os valores de poliembriõnia vão até 60,0%, tendo sementes, no máximo, com 6 embriões; e nas segundas, até 95%, com um recorde de 15 embriões numa única semente.

**Pomelos** (*C. paradisi*). Nas várias plantas examinadas, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", obtivemos alta poliembriõnia, com valor de 73,2%, sendo o número médio de embriões de 2,3. As plantas examinadas mostraram poliembriõnia bastante uniforme.

**Calamondin** (*C. reticulata* var. *austera*? x *Fortunela* sp?). Este foi o híbrido que deu maior percentagem de poliembriõnia no processo de contagem dos embriões germinados. Confirmamos este fato, no processo

de contagem direta, pois constatamos sementes até com 20 embriões. É notável que encontramos várias sementes com 10 até 14 embriões e também que o número de sementes com 3 embriões foi muito maior do que com 2 embriões. A percentagem de poliembriõnia foi de 83,6% e o número médio de embriões 3,6.

**Trifoliata** (*Poncirus trifoliata*). Esta espécie apresentou alto grau de poliembriõnia, chegando a 87,6%, e sementes encerrando até 10 embriões; o número médio de embriões foi de 2,6. Sendo a variação da poliembriõnia entre as plantas muito pequena, reunimos tôdas as determinações em um único valor.

**Pomelo?** Como teremos ocasião de discutir mais adiante, as plantas dêste grupo, na Estação Experimental de Limeira, devem ter tido origem bem diferente, pois, para duas plantas, encontramos poliembriõnia muito baixa, de 0,6% e 1,6%, respectivamente; de outro lado, para uma planta, encontramos a mais alta poliembriõnia até hoje registada, de 99,4%. Uma de suas sementes encerrava o notável número de 20 embriões; o número médio de embriões, por semente, desta planta, foi de 5, havendo apenas 2 sementes com 1 só embrião.

## DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Como se vê pelos quadros 2 e 3, a avaliação da poliembriõnia em *Citrus*, pela germinação da semente ou pela contagem direta, revelou grande diferença. Por êste último processo, a frequência foi bem maior que no primeiro. A razão dessa diferença é que, no processo direto, se contam todos os embriões existentes na semente, e, como já frizamos anteriormente, muitos dêles são bem pequenos, medindo até menos de um milímetro. Por ocasião da germinação, êles ou não estão ainda completamente formados e não conseguem vencer a concorrência dos demais, ou estão mal localizados, às vèzes dentro dos cotilédones dos embriões maiores, e dessa forma não conseguem também germinar.

É interessante notar que nas diversas formas de *Citrus*, utilizando-se os dois processos de contagem, encontram-se diferenças muito acentuadas na poliembriõnia. Para os limões, esta diferença foi de 30%, para a laranja azêda de 50% e para o tangor maracujá de 70%.

Para facilitar as comparações dos resultados obtidos nos dois processos citados, organizamos o quadro 4, no qual damos os valores médios para as diferentes espécies de *Citrus*, híbridos e gêneros correlatos. Como podemos notar alí, a única espécie totalmente monoembriônica foi a papêda (*C. hystrix*); nas toranjas, consideradas monoembriônicas, encontramos, em alguns indivíduos, fraca poliembriõnia. A laranja azêda deu, na germinação, poliembriõnia muito baixa, cêrca de 2,6% e na contagem direta, poliembriõnia média 51,5%, sendo a diferença de 48,9%; a variação de poliembriõnia, tanto em um como no outro processo de contagem, foi da mesma ordem. A lima da Pérsia, o limão cravo e os limões (*C. limon*) que apresentaram no processo da germinação 9,0, 10,3 e 13,1%, deram, respectiva-

**QUADRO 4**  
**POLIEMBRIONIA EM CITRUS**  
**Comparação entre contagens na sementeira e direta. Variação. (Fecundação livre)**

Nome vulgar	Nome científico	CONTAGEM DE EMBRIÕES						Diferença da poliembrionia %	Extremos da variação da percentagem de poliembrionia	
		Na sementeira		Direta		Embriões $\bar{v}$	Poliembrionia %		Sementeira	Direta
		Embriões $\bar{v}$	Poliembrionia %	Embriões $\bar{v}$	Poliembrionia %					
Papada .....	<i>C. hystrix</i>	1,0	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0	0,0-0,0	0,0-0,0	
Toranja .....	<i>C. grandis</i>	1,0	0,1	1,0	0,4	1,0	0,4	0,0-0,3	0,0-1,7	
Laranja azéda .....	<i>C. aurantium</i>	1,0	2,6	1,6	51,5	1,6	51,5	0,0-18,9	36,0-54,0	
Lima da Pérsia .....	<i>C. aurantifolia</i>	1,1	9,0	1,6	46,1	1,6	46,1	2,9-13,8	32,1-63,8	
Limão cravo (Rangpur) .	<i>C. reticulata</i> ?	1,1	10,1	1,7	49,6	1,7	49,6	7,4-17,0	10,3-88,9	
Limões { doce, ponde- rosa, rugoso, Sweet Lemon	<i>C. limon</i>	1,1	13,1	1,7	39,9	1,7	39,9	0,0-53,2	3,0-90,0	
Laranja maracujá .....	<i>C. sinensis</i> x <i>C. reticulata</i>	1,2	17,2	3,2	86,8	3,2	86,8	7,7-25,8	82,0-91,0	
Laranja doce .....	<i>C. sinensis</i>	1,3	26,4	2,5	69,5	2,5	69,5	7,2-52,3	30,8-95,0	
Pomelo .....	<i>C. paradisi</i>	1,4	34,4	2,3	73,2	2,3	73,2	25,6-44,6	73,2	
Calamondin .....	<i>C. reticulata</i> x <i>Fortunela</i>	1,6	53,1	3,6	83,2	3,6	83,2	47,4-56,0	83,2	
Trifoliata .....	<i>Poncirus trifoliata</i>	—	—	2,6	87,6	2,6	87,6	—	87,6	
Pomelo (?) .....	<i>C. paradisi</i> (?)	—	—	5,0 1,0	99,4 1,1	—	—	—	99,4 1,1	

mente, na contagem direta, 46,1, 49,6 e 39,9%, sendo a diferença entre os dois processos de 40%, aproximadamente; estas 3 espécies de *Citrus* apresentaram grande variação de poliembrião, como podemos notar nas últimas colunas do quadro 4. Muito contribuiu para isso, a inclusão, neste grupo, do limão rugoso, que deve ser considerado como híbrido e tem alta poliembrião.

O tangor maracujá, deu, na sementeira, um valor muito baixo de poliembrião, 17,2%, ao passo que na contagem direta foi bem alto, chegando a 86,8% com uma diferença de 70%; a variação da poliembrião dentro de cada processo foi pequena.

Nas laranjas doces e pomelos, as diferenças da poliembrião avaliadas pelos dois processos foram quase iguais, cerca de 40%; as médias das contagens na sementeira foram, respectivamente, de 26,4% e 34,4% e na contagem direta dos embriões de 69,5% e 73,2%. Considerando-se a variação da poliembrião dentro de cada processo, podemos notar que na laranja doce a variação foi bem grande e nos pomelos foi bem menor.

No calamondim, a diferença entre os dois processos de contagem foi de 30%; a variação da contagem em sementeira foi bem pequena.

Em sementes de trifoliata e de pomelo (?) fez-se somente a contagem pelo processo direto, o que impossibilitou uma comparação.

Uma vez que se tem contagens de poliembrião em algumas plantas individualmente pelos dois processos, isto é, da sementeira e direta, pode-se fazer mais algumas comparações (quadro 5), pois, naturalmente, aqui os resultados são mais exatos do que quando se usam as médias das espécies. Para resumir estas comparações, vamos discutir os casos mais interessantes, podendo-se, nos demais, consultar o quadro 5.

Podemos notar que o sweet lemon (E. E. 4), considerado monoembriônico, segundo a contagem em sementeira germinada, revelou poliembrião de 6-7% em contagem direta. Embora baixa, não permite classificá-lo como variedade monoembriônica. Depois do sweet lemon, encontramos as menores diferenças da poliembrião, entre os dois processos, nas laranjas caipiras (E. E. 4 e E. E. 3), da ordem de 25%; as maiores diferenças apareceram na laranja azêda (E. E. 3), (53, 3%) e no limão cravo (E. E. 3 e E. E. 4), 55 e 74%.

Já podíamos, até certo ponto, prever estes resultados, porque sweet lemon, laranja azêda e limão cravo têm geralmente, um embrião muito forte e os demais bem pequenos. Estes últimos quase nunca conseguem germinar. Na estampa 3, fig. a podemos facilmente observar esse fato em sementes de laranja azêda.

De outro lado, nas plantas em que a diferença entre os dois processos de contar a poliembrião não é grande, como nas laranjas caipira, açoriana e seleta amarela, verifica-se que os embriões não são muito diferentes entre si. Mostram-se todos igualmente bem desenvolvidos, e, portanto, com melhores possibilidades de germinar.

**QUADRO 5**  
**POLIEMBRIONIA EM CITRUS**  
 Comparação entre contagens na sementeira e direta  
 (Fecundação livre)

CITRUS DIVERSOS	N.º da árvore	CONTAGEM DE EMBRIÕES				Diferença da Poliembriõnia %
		Na sementeira		Direta		
		Embriões $\bar{v}$	Poliembriõnia %	Embriões $\bar{v}$	Poliembriõnia %	
Sweet Lemon.....	(E.E. 4)	1,0	0,0	1,1	6,7	5,6
Laranja azêda .....	(E.E. 3)	1,0	0,7	1,3	54,0	53,3
Laranja agro-doce ....	(E.E. 4)	1,2	18,9	2,1	64,7	45,6
Lima da Pérsia .... {	(E.E. 3)	1,1	7,3	1,7	57,1	49,8
	(E.E. 4)	1,1	13,8	1,6	44,9	31,1
Limão Cravo ..... {	(E.E. 3)	1,1	7,4	1,8	62,4	55,0
	(E.E. 4)	1,1	8,0	2,1	82,0	74,0
Laranja açoriana .....	(E.E. 5)	1,1	10,0	1,6	46,2	36,2
Laranja lisa paulista ..	(E.E. 4)	1,3	20,9	2,2	67,6	46,7
Laranja caipira B. ....	(E.E. 4)	1,3	25,0	1,8	47,1	22,1
Laranja caipira B. ....	(E.E. 3)	1,3	27,3	1,7	54,0	26,7
Laranja seleta amarela	(E.E. 3)	1,5	43,6	2,8	79,4	35,8

**QUADRO 6**  
**POLIEMBRIONIA EM CITRUS**  
 Distribuição das frequências em contagens na sementeira e direta

POLIEMBRIONIA	FREQUÊNCIA	
	Sementeira	Direta
Classes em %		
100 — 90 .....	0	7
90 — 80 .....	0	8
80 — 70 .....	0	6
70 — 60 .....	0	5
60 — 50 .....	4	4
50 — 40 .....	9	4
40 — 30 .....	6	6
30 — 20 .....	23	2
20 — 10 .....	25	2
10 — 0 .....	38	9
0 .....	15	7
Total .....	120	60



Para mostrar como se deu a distribuição da frequência dos valores de poliembrionia nos dois processos, organizamos o quadro 6, no qual podemos notar o seguinte: na contagem, em sementes germinadas, encontramos 15 plantas na classe 0% de poliembrionia; na classe de 0 a 10% encontramos a frequência máxima de 38 plantas; logo a seguir, notamos que a frequência vai diminuindo, terminando na classe de 50 a 60%. De outro lado, da coluna do processo direto de contagem dos embriões, notamos distribuição mais ou menos uniforme de frequência nas 11 classes de 0 a 100%, havendo um ligeiro acúmulo nas classes de 0%, de 0% — 10%, de 30-40%, de 80-90% e 90-100%. Por êste processo, conseguimos contar número bem maior de embriões do que pelo processo da germinação. A contagem direta fornece informação precisa sobre o grau de poliembrionia. Pelo processo de germinação encontramos, no máximo, 66%, quando pela contagem direta chegamos até quase 100% de poliembrionia.

## COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS COM OS DE OUTROS AUTORES

### 1. Contagem em sementeira.

Comparando os resultados discutidos no capítulo precedente com os obtidos por outros investigadores verifica-se que o número médio de embriões germinados, por semente, em diversas espécies cítricas não é excessivamente variável. No quadro 7 resumimos os dados publicados por Navarro de Andrade (16), Torres (22), Frost (8), Toxopeus (23) e os constantes dos quadros 1 e 2, todos referentes a contagens em sementeira.

### QUADRO 7

#### POLIEMBRIONIA EM CITRUS

Número médio de embriões germinados por semente, segundo vários autores, comparado com os dados dos quadros 1 e 2.

ESPÉCIES	Navarro (16)	Tôrres (22)	Frost (8)	Toxopeus (23)	Quadros 1 e 2
Toranjas . . . . .	—	1,0	1,1	—	1,0
Laranja azêda . . . . .	1,3	1,2	—	—	1,1
Limas . . . . .	1,1	1,0	—	—	1,1
Limão cravo . . . . .	1,1	—	—	—	1,1
Mandarinas . . . . .	—	1,3	1,2	1,5	1,2
Limões . . . . .	—	1,0	1,0	1,1	1,1
Limão rugoso . . . . .	1,2	1,9	—	1,7	1,2
Laranjas doces . . . . .	1,4	2,0	1,3	—	1,3
Pomelos . . . . .	1,3	1,1	1,2	—	1,4

Os dados de Navarro e de Frost aproximam-se bastante dos nossos ; Tôrres encontrou frequência de embriões bem mais elevada no limão rugoso e nas laranjas doces ; o mesmo acontece com os dados de Toxopeus em relação às mandarinas e ao limão rugoso.

Como veremos no capítulo seguinte, a viabilidade dos embriões está condicionada às condições de meio que lhes sejam proporcionadas, especialmente nas formas de alta poliembrião. As diferenças mencionadas podem ser explicadas como resultantes de melhores ou piores condições para germinação a que foram submetidas as sementes.

## 2. Contagem direta.

Dados referentes à contagem direta são mais raros. Só foi possível comparar os nossos com os mencionados por Tôrres (22) e Toxopeus (23). Os dados deste último são de 4 formas cítricas apenas, como se vê pelo quadro 8 :

### QUADRO 8

#### POLIEMBRIÃO EM CITRUS

Número médio de embriões por semente (contagem direta) segundo vários autores

ESPÉCIES	Tôrres (22)	Toxopeus (23)	Quadro 3
<i>C. hystrix</i> .....	1,0	—	1,0
<i>C. grandis</i> .....	1,0	—	1,0
<i>C. aurantium</i> .....	1,0	—	1,6
<i>C. aurantifolia</i> .....	1,0	2,0	1,6
<i>C. reticulata</i> .....	1,8	6,1	1,7(*)
<i>C. limon</i> .....	1,3	—	1,1
<i>C. hybrida</i> (?) — (limão rugoso) ....	2,0	4,5	2,6
<i>C. sinensis</i> .....	2,6	—	2,5
<i>C. paradisi</i> .....	1,6	—	2,3
<i>C. reticulata</i> x <i>Fortunella</i> .....	5,3	8,9	3,6

(\*) Limão cravo ou "rangpur lime".

Verifica-se pelos dados das colunas 2 e 4, relativa concordância de nossos dados com os obtidos por Tôrres. Frequências bem maiores foram

encontradas por Toxopeus, mostrando a existência de acentuada variação da poliembrião dentro de uma mesma espécie, quando se consideram todos os embriões formados nas sementes, isto é, em contagem direta.

## ASPECTOS QUALITATIVOS DA POLIEMBRIÃO

### 1. Distribuição e características dos embriões.

De acôrdo com o que vimos na introdução dêste trabalho, os embriões adventícios se formam de células do nucelo, situadas nas circunvizinhanças do saco embrionário, as quais crescem para dentro dêste; há, ainda, uma certa tendência das células próximas ao micrópilo, de formar mais embriões. Devido a isto encontramos na região que corresponde ao micrópilo, isto é, ápice da semente, um número maior de embriões, como bem mostram as figs. a e b da estampa 3 e estampa 5.

Os embriões se distribuem na semente com o caulículo e a radícula voltados para o micrópilo. Embriões com os cotilédones voltados para o micrópilo, ou, ainda, situados no meio da semente, são raros. Pudemos notar que é nas sementes altamente poliembriônicas que se encontram mais frequentemente as exceções à regra acima mencionada. Para melhor ilustração disto, damos desenhos de embriões de laranja azêda e calamondin (estampa 3, figs. a e b), nas quais bem se pode notar a posição, tamanho e distribuição dos embriões e, também, o tamanho dos cotilédones. Êsses desenhos representam 3 etapas: a) ao serem retirados o tegumento e a película da semente, mostrando como os embriões se justapõem; b) os embriões afastados, mas mantendo a sua posição relativa na semente; c) embriões abertos, mostrando a posição e tamanho dos cotilédones.

Outro fato interessante que constatamos ao analisarmos a distribuição da frequência da poliembrião (capítulo seguinte) foi a deficiência de sementes na classe de 4 embriões, comprovada pela análise estatística. Observamos que quando há 4 embriões, êles tendem a se justapor em forma de cruz, dentro da semente. Talvez isto cause alguma dificuldade de ordem mecânica que determine a não formação do 4.º embrião.

Quanto à côr, verificamos que na maior parte dos embriões de *Citrus*, predomina a côr branca. Há casos, como no limão cravo, sweet lemon, laranja maracujá e calamondin em que quase todos os embriões são verdes; encontramos ainda casos em que apenas os embriões pequenos são verdes, como em laranja azêda, limão ponderosa e pomelo Mac Carty.

### 2. Tamanho dos embriões e dos cotilédones.

Como já acentuamos, por várias vêzes, os embriões são muito variáveis em tamanho. Seus cotilédones podem ser iguais ou diferentes.

Uma vez que os embriões das diversas formas de *Citrus* têm tamanhos diferentes, resolvemos, para estudar êste caráter, separá-los em três tamanhos: grandes, médios e pequenos; na classe dos pequenos, que para tôdas as formas é menor de 5 mm, podemos distinguir ainda embriões diminutos, menores de 2 mm.

As sementes monoembriônicas ou de poliembriõnia muito baixa têm um embrião muito desenvolvido e de cotilédones iguais como na papeda, toranjas e laranjas azêda e agro-doce. À medida que a poliembriõnia aumenta, como na lima da Pérsia, limões cravo, doce, ponderosa e sweet lemon, a percentagem dos embriões grandes decresce, passando de 100% a 60%. Por outro lado, aumenta a dos embriões médios, enquanto a percentagem dos embriões pequenos mostra-se baixa, menos de 10%. Nas formas de alta poliembriõnia, como na laranja maracujá até o trifoliata, a percentagem de embriões grandes é idêntica ou menor que a dos embriões médios, geralmente de 20 a 40%, havendo um acréscimo notável na classe dos embriões pequenos, que passam a cerca de 40%. À medida que a poliembriõnia cresce, aumenta a variabilidade dos cotilédones.

Uma boa ilustração do que acabamos de expor, isto é, da variabilidade do tamanho dos embriões e dos cotilédones encontra-se nas estampas 3, (figs. a e b), 4 e 5. Na figura a, estampa 3, damos o desenho de 3 sementes de laranja azêda, das quais foram retirados o tegumento e a película, expondo os embriões. Na primeira semente temos 2 embriões grandes, um dêles com os 2 cotilédones iguais e o outro com um cotilédone grande e um pequeno. Na 2.<sup>a</sup> semente, um dos embriões mede a metade do outro, tendo os cotilédones mais ou menos iguais. Na 3.<sup>a</sup> semente, um dos embriões é bem pequeno, com ambos os cotilédones também mais ou menos iguais. A laranja azêda tinha 82% de embriões grandes, 10% de embriões médios e 8% de embriões pequenos.

Na figura b, estampa 3 (desenho de sementes altamente poliembriônicas de calamondin), podemos notar que na primeira semente há um grande número de embriões médios, com cotilédones não muito diferentes. Na segunda e terceira sementes da mesma figura podemos ver alguns embriões com cotilédones bem diferentes. O calamondin tinha 18% de embriões grandes, 43% de embriões médios e 39% de embriões pequenos; nos tipos de embriões grandes e médios há ainda que notar a variação do tamanho dos cotilédones.

Outras particularidades se encontram ainda nos embriões dos *Citrus*, como sejam: cotilédones colados, número diferente de cotilédones, etc.

### 3. Germinação dos embriões dissecados.

Por várias vêzes fizemos a sementeira de embriões dissecados, em caixas com terra bem preparada, e em todos os casos em que os embriões eram grandes e médios (acima de 5 mm) obtivemos boa germinação. Cumpre notar que há formas de *Citrus* que têm os embriões adicionais ainda meio gelatinosos, como na laranja lima, pomelo Mac Carty e lima da Pérsia. Neste caso, êles não germinam.

Como tínhamos interêsse em que se desenvolvesse o maior número possível de embriões, tentamos o cultivo em tubos de ensaio em meio asséptico-com solução nutritiva (solução de Sachs) e pH corrigido para 5. Conseguiu, se obter germinação de embriões até de 2 mm (os embriões foram previamente desinfestados em solução de Uspulum a 1,25 ‰, durante 5 minutos).

Os tubos de ensaio foram mantidos em plena luz e ao fim de 5 dias já se notava que os embriões grandes e médios (de 13 a 15 mm) estavam emitindo raízes; os embriões pequenos de 5 a 2 mm demoraram mais ou menos 20 dias para emitir a radícula. Para se formar o primeiro par de fôlhas, foram necessários de 20 a 25 dias para os embriões grandes e médios, e 1 mês para os embriões pequenos. Estes experimentos foram realizados nos meses de março e abril de 1943, com temperaturas variando de 20 a 30°C.

Não conseguimos obter germinação dos embriões muito pequenos, menores de 2 mm. Talvez, usando outros meios de cultura com sacarose, hormônios ou vitaminas, se consiga que eles também germinem, à semelhança do que acontece com outras plantas.

#### 4. Julgamento do grau de poliembrião pelo aspecto da semente

Desde que iniciámos a determinação da poliembrião na semente, chamou-nos a atenção, nas formas altamente poliembriônicas, a grande variação de conformação que as sementes apresentavam, dentro de uma mesma amostra. Assim, encontramos sementes com muitas anfratuosidades, sementes lisas ou quase lisas, passando ainda por tipos intermediários. Pareceu-nos que essas variações estavam relacionadas com o número de embriões encerrados nas sementes.

Afim de verificar se uma separação (pelo aspecto das sementes) em classes correspondia a diferenças no grau de poliembrião, escolhemos duas formas altamente poliembriônicas, calamondin e o trifoliata. Num lote de sementes, fizemos a separação em 3 tipos: corrugado, meio liso e liso, aos quais atribuímos, respectivamente, o caráter de alta, média e baixa poliembrião. Os resultados dessa contagem, bem como a determinação direta da poliembrião, constam do quadro 9.

#### QUADRO 9

##### POLIEMBRIÃO EM CITRUS

##### Comparação entre aspecto externo das sementes e número de embriões

Tipo de poliembrião	CALAMONDIN					TRIFOLIATA				
	Sementes separadas		Poliembrião			Sementes separadas		Poliembrião		
	n.º	%	Sementes contadas	n.º de embriões	$\bar{V}$	n.º	%	Sementes contadas	n.º de embriões	$\bar{V}$
Alta ..	118	32%	100	512	5,12	72	12%	43	148	3,47
Média .	243	46%	100	361	3,61	429	71%	50	124	2,28
Baixa .	168	22%	100	189	1,89	102	17%	63	103	1,63
Total .	529	100%	300	1.062	3,54	603	100%	156	662	2,41

A seguir, fizemos um teste estatístico para ver se as médias de cada classe eram ou não significativamente diferentes entre si: aplicamos o  $\delta$ -teste para diferenças de médias, porque temos uma distribuição binomial e descontínua, definida pela fórmula:

$$z = \frac{\bar{v}_1 - \bar{v}_2}{\sigma \sqrt{\text{dif.}}} = \frac{\bar{v}_1 - \bar{v}_2}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}} \quad \begin{array}{l} nf_1 = 1 \\ nf_2 = \infty \end{array}$$

Os resultados dessa comparação seguem:

CLASSES COMPARADAS	Calamondin	Trifoliata
	$z$	$\delta$
Alta com média.....	+ 4,45	+ 4.30
Baixa com média .....	— 8,56	— 5.07

Como vemos, os  $\delta$  são todos muito significantes, bem fora do limite de 1% de probabilidade. Em virtude disso, concluimos que as classes separadas pelo aspecto exterior da semente são de fato diferentes. Por outras palavras, que há correlação entre aspecto da semente e grau de poliembrionia. Pode-se muito bem notar isso nas estampas 4 e 5.

Poderíamos estender essa análise para outras formas de *Citrus*. Mas os exemplos dados são patentes. Lembremo-nos de que essas conclusões se aplicam às formas com alta ou média poliembrionia, pois, naquelas com baixa poliembrionia, essa distinção não se torna mais possível.

### ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA POLIEMBRIONIA

Os estudos sôbre a variação do número de embriões por semente mostraram desde logo que tôdas as comparações teriam que ser feitas, tomando-se como base a variação ideal de acaso da "distribuição de Poisson". Esta distribuição, já conhecida desde há muito, tem sido utilizada na estatística. Um resumo dos seus principais testes e o modo de os aplicar foi publicado por Gurgel (9).

Por definição, devemos esperar uma variação segundo a distribuição de Poisson, quando temos: a) uma série descontínua, na qual os valores das classes só podem ser números inteiros e positivos; b) a primeira classe

teórica com o valor zero e em consequência disto, a pressão do limite zero se manifesta, tornando-se a distribuição assimétrica ; c) a frequência dos acontecimentos esperados tão pequena em relação ao número total de acontecimentos possíveis, que a frequência observada é praticamente independente do número total de observações.

Evidentemente, êsses requisitos são satisfeitos para a variação do número de embriões em *Citrus*. A variação é sempre de embriões inteiros, dentro de um número teoricamente ilimitado de embriões. O fato de não existir semente sem embrião parece oferecer uma objeção, mas esta falta aparente da classe zero se explica se considerarmos o seguinte : na poliembrionia, como aliás o nome está dizendo, estamos interessados no número de embriões adicionais que a semente contém além do normal e não no número total de embriões. Assim, nas nossas tabelas, entram as duas seguintes indicações : sementes com um embrião, isto é, sem embrião adicional (classe zero) ; sementes com dois embriões, isto é, com um embrião adicional (classe um), etc. Igualmente podemos exprimir a média por dois modos : média de número de embriões por semente ou média de embriões adicionais, que é igual à média anterior menos um. A distinção entre embrião básico, indispensável, e embriões adicionais, tem que ser feita, para satisfazer às exigências da análise estatística, porém esta distinção não deve ser interpretada em termos biológicos. Pode acontecer que todos os embriões sejam assexuais e, portanto, biologicamente iguais ; ou que um embrião pelo menos, seja sexual e todos os restantes, apogâmicos ; ou, ainda, que todos os embriões sejam sexuais (estampas : 3, figs. a e b ; 4 e 5).

São conhecidas observações que servem para comprovar a asserção acima : em 6 cruzamentos feitos com tangerina Dancy, Frost (8) obteve 100% de embriões apogâmicos ; em cruzamentos efetuados, entre calamondin x trifoliata, observamos (5), que apenas 2,47% das plantas provenientes de 90 sementes, provinham de embrião sexual, caracterizado pela dominância da fôlha tripartida do segundo ; em cruzamento de toranja x trifoliata, obtivemos (5) 100% de plantas com embrião sexual.

Na análise estatística aplicamos dois processos : a) a comparação da distribuição inteira, fazendo um  $\chi^2$  teste das frequências observadas por classe, com as frequências teóricas da série de Poisson, tendo ambas a mesma média e idêntica soma de frequências ; b) comparação pelo teste, do erro "standard" da distribuição observada com o erro "standard" de uma série ideal correspondente, sendo êste último igual à raiz quadrada da média. Êste segundo processo se baseia no princípio de Lexis e foi introduzido na análise estatística por Brieger (4).

Neste último teste, esperávamos, de início, que os erros "standard" observados fôsem sempre maiores do que os erros ideais correspondentes, indicando assim uma variação excessiva ; verificando, porém, como mais adiante explicaremos, que os erros observados eram menores do que os erros ideais, resolvemos aplicar para o  $\theta$  teste os limites bilaterais de probabilidade, recentemente desenvolvidos por Brieger (2).

## 1. Variação entre frutos de uma mesma planta e na mesma colheita

Para verificarmos a variação fenotípica da poliembrião nas sementes de diferentes frutos colhidos simultaneamente e de uma mesma planta, foram contados separadamente os embriões de 10 frutos de pomelo Mac Carty e do trifoliata, constando os resultados dos quadros 10 e 11.

Discutiremos em primeiro lugar os valores referentes ao pomelo Mac Carty (quadro 10). O teste "entre-dentro" para a média dos 10 frutos é altamente significativo, com  $\theta$  igual a 3,43, o qual está fora do limite de 1 ‰ de probabilidade. Os desvios relativos dos frutos em relação à média geral dão 4 valores fora do limite de 1 ‰ de probabilidade, sendo 3 valores negativos e 1 positivo (14.<sup>a</sup> coluna do quadro 10). As médias dos embriões adicionais por fruto (12.<sup>a</sup> coluna) formam uma série contínua, indo desde 0,52 até 2,22 embriões por semente. A variação por fruto é homogênea, como mostra o  $\theta$  teste da última coluna do quadro; comparando os erros "standard", observados e ideais, e aplicando os limites bilaterais de probabilidade de  $\theta$ , achamos dentro desses valores apenas um valor um pouco fora do limite de 5% de probabilidade (valor achado de  $\theta$  igual a 0,78 e valor calculado por interpolação da tábua de Brieger (2) de 0,77 com  $nf1$  igual a 37 e  $nf2$  igual ao infinito). Ainda mais, o  $\theta$  entre o "êrro dentro" (1,12) e o êrro ideal (1,16), dá também um valor não significativo, comprovando desta forma que tôda a variação é do acaso.

A análise para o trifoliata (quadro 11) dá o mesmo resultado que pomelo Mac Carty, com referência à comparação das médias; a variação entre as médias, dada pelo  $\theta$  entre os erros "entre" e "dentro", é 2,33 maior do que o êrro residual. Os valores das médias formam também uma série contínua, indo de 1,17 até 2,49 embriões adicionais por fruto. Os erros individuais por fruto, porém, são com uma exceção única, menores do que o êrro ideal, aparecendo 3 valores menores do que o limite de 1 ‰ de probabilidade, 2 valores menores do que o limite de 1% e 2 valores entre os limites de 1% e 5% de probabilidade. O êrro dentro (1,07) é também estatisticamente menor do que o êrro ideal correspondente, dando um valor de  $\theta$  igual a 0,84 que está fora do limite de 1 ‰ de probabilidade. Assim, fica claro que no trifoliata há uma variação sistematicamente diminuída.

## 2. Variação entre sementes de uma mesma planta e na mesma colheita

Para êste estudo foi determinada a poliembrião em um número bastante grande de sementes obtidas de frutos misturados, colhidos na mesma época, de uma única planta (pomelo Mac Carty, laranja lisa paulista e limão francês) ou de diversas plantas (calamondin, trifoliata e laranja lima).

Pelo exposto nos capítulos anteriores, vemos que para as três primeiras formas de *Citrus* foi eliminada a variação que podia ser causada pela diferença da época de colheita e aquela entre diferentes árvores. A variação realmente observada pode ser atribuída: a) variação entre diferentes frutos;





QUADRO 11

POLLEMBRIONIA EM CITRUS

Varição da poliembrionia entre frutos de poncirus trifoliata

(Fecundação livre)

N.º de ordem	N.º de embriões por classe								Número de		$\bar{v}_1$	$s_1$	$\hat{\sigma} = \frac{\bar{v}_1 - \bar{v}_1}{\sigma \bar{v}_1}$	$\theta = \frac{s}{s_1}$
									Sementes	Embriões				
	1	2	3	4	5	6	7	8						
1	9	36	8	4	1				58	126	1,17	± 1,08	—	0,77
2	8	25	10	4	1				48	109	1,27	± 1,13	(— 2,21)	(0,80)
3	2	24	14	1					41	96	1,34	± 1,16	—	0,53
4	3	24	17	3	1				48	119	1,48	± 1,22	—	0,65
5	3	16	14	2	1				36	90	1,50	± 1,22	—	0,68
6	6	18	15	6	1				46	116	1,52	± 1,23	—	(0,77)
7	7	14	10	4	4				39	101	1,59	± 1,26	—	0,94
8	1	20	12	9	1				43	118	1,74	± 1,32	—	0,67
9	3	17	13	3	2	1	0	1	40	112	1,80	± 1,34	—	1,00
10	1	13	9	2	3	1	1		30	90	2,00	± 1,41	+ 1,44	0,96
11	1	11	14	7	3	2			48	120	2,16	± 1,47	(+ 2,22)	0,89
12	2	9	14	6	2	2	4		39	136	2,49	± 1,58	+ 3,40	1,03
Soma	46	227	150	51	20	6	5	1	506	1333	1,63	± 1,28	—	0,84

$\sigma T = \pm 1,12$        $\sigma E = \pm 2,49$        $\sigma D = \pm 1,07$   
 $\theta = \frac{\sigma E}{\sigma D} = \frac{2,33}{1,28} = 1,82$        $\theta = \frac{\sigma T}{\sigma I} = \frac{1,12}{1,28} = 0,88$        $\frac{nf1 = 11}{nf2 = 494}$        $\frac{nf1 = 505}{nf2 = \infty}$

b) variação inevitável ou residual da poliembrionia. Separando estas duas últimas fontes de variação verificamos, no caso do pomelo Mac Carty e do trifoliata (quadros 10 e 11), uma diferença de variação muito grande: no pomelo Mac Carty as variações “entre” e “dentro” frutos são do acaso; no trifoliata somente a variação “entre” frutos é do acaso, havendo uma significativa e sistematicamente diminuída variação “dentro” frutos. “Confundindo” estas duas fontes de variação obtivemos resultados bem diferentes. O erro total para o pomelo Mac Carty é um pouco maior do que o erro ideal da série de Poisson, sendo o  $\theta$  justamente fora do limite de 5% de probabilidade; em trifoliata, ao contrário, prevalece a redução da variabilidade, sendo o erro total significativamente menor do que o erro ideal.

Para estudarmos a variação da poliembrionia entre as sementes de pomelo Mac Carty, laranja lisa paulista e limão cravo ou francês, fizemos um  $\chi^2$  teste entre as frequências observadas do número de embriões em cada classe, isto é, zero, um, dois, etc., embriões adicionais, e as frequências esperadas pela distribuição de Poisson (9). Sabemos que para o  $\chi^2$  teste ser eficiente, a frequência esperada para as classes extremas tem que ser igual ou maior do que cinco; como em geral o número de sementes por fruto não é grande, temos que juntar as sementes de diversos frutos, mesmo sabendo que com isso introduzimos mais uma fonte de variação, isto é, a variação entre diferentes frutos.

Verificamos que para o pomelo Mac Carty, laranja lisa paulista e limão cravo, cujos frutos são de uma só planta, os  $\chi^2$  totais entre as frequências observadas e esperadas das classes com diferentes graus de poliembrionia são todos não significativos, isto é, abaixo do limite de 5% de probabilidade. Portanto, nestes três *Citrus*, a variação da poliembrionia segue a distribuição de Poisson.

Examinando com mais detalhe os  $\chi^2$  individuais de cada distribuição, notamos que apenas para o pomelo Mac Carty o  $\chi^2$  da última classe é significativo (7,09), aparecendo um número mais elevado de sementes com alta poliembrionia (classes com 5 ou mais embriões adicionais), do que o esperado pela série de Poisson. Esta anormalidade é devida principalmente às sementes de um único fruto (número 10), como se pode notar nos dados do quadro 10.

Passando ao estudo da poliembrionia em calamondin, trifoliata e laranja lima, devemos lembrar que temos aqui “confundidas” três fontes de variação: a) entre plantas diferentes, b) entre frutos, c) residual. Assim, é de se esperar uma variação excessiva.

Como já nos referimos anteriormente, em calamondin e trifoliata foi possível distinguir, pelo aspecto externo da semente, três tipos de poliembrionia, isto é, alta, média e baixa. De acordo com essa separação, fizemos para cada tipo e também para o conjunto (alta + média + baixa) um  $\chi^2$  teste entre as frequências observadas e aquelas esperadas, segundo a distribuição de Poisson.

**Calamondin.** O  $\chi^2$  teste total para o tipo de semente com alta poliembrionia não foi significativo. Esteve abaixo do limite de 5% de probabilidade.

Para os tipos de semente com média e baixa poliembrionia, bem como para o conjunto dos três tipos, o  $\chi^2$  teste foi altamente significativo, fora do limite de 1% de probabilidade. Em outras palavras: no calamondin, excluindo o tipo de sementes com alta poliembrionia, nos demais (média e baixa) ou em conjunto, a frequência observada nas classes de 0, 1, 2, etc., embriões adicionais não segue a distribuição de Poisson.

Analisando os  $\chi^2$  individuais para cada tipo de poliembrionia e também para a classe de zero embriões adicionais por semente, houve, para o conjunto, um grande excesso de embriões sobre o número esperado, excesso esse bem fora do limite de 1‰ de probabilidade; na classe de 3 embriões adicionais por semente houve nos tipos de média poliembrionia e no conjunto, forte deficiência de embriões, fora do limite de 1‰ de probabilidade. No tipo de semente com baixa poliembrionia, houve, para a classe de 3 ou mais embriões adicionais, um excesso de frequência, o mesmo acontecendo no conjunto na classe com 7 ou mais embriões adicionais. É interessante notar que não somente no calamondin, como também na laranja lima e outros *Citrus* estudados, verificamos notável deficiência na classe de sementes com 3 embriões adicionais (ou 4 embriões ao todo), para a qual, até o momento, não encontramos uma explicação satisfatória.

**Trifoliata.** O  $\chi^2$  total não foi significativo, ficando abaixo do limite do 5% de probabilidade, para os tipos de sementes com alta e baixa poliembrionia e também para o conjunto de poliembrionia das sementes; para o tipo de sementes com poliembrionia média, o  $\chi^2$  foi altamente significativo, fora do limite de 1‰ de probabilidade.

Analisando os  $\chi^2$  individuais para as sementes com tipo de poliembrionia média, notamos que houve uma deficiência de embriões na classe de zero embriões adicionais e um excesso de embriões na classe de 2 embriões adicionais, fatos demonstrados pelos valores fora do limite de 1% no primeiro caso, e bem próximo a este limite, no segundo caso.

Disto concluímos: excluindo as sementes com poliembrionia do tipo médio, as demais, com alta e baixa poliembrionia, e também no conjunto dos três tipos a distribuição das frequências nas classes 0, 1, 2, etc. embriões adicionais, seguem a distribuição de Poisson.

**Laranja lima.** Aqui também o  $\chi^2$  total foi significativo, fora do limite de 1% de probabilidade. Conclui-se: na laranja lima a poliembrionia não segue a distribuição de Poisson. Os  $\chi^2$  individuais mostram um excesso de frequência na classe com 2 embriões adicionais e uma falta de frequência na classe com 3 embriões adicionais, o que é mostrado pelo  $\chi^2$  quase significativo no primeiro caso e significativo no segundo, fora do limite de 1% de probabilidade.

### 3. Variação entre plantas da mesma variedade

No quadro 3 registamos os dados referentes ao pomelo Mac Carty, separadamente dos de três outras plantas desta mesma espécie. Há razão especial para justificar este fato. Como já foi mencionado em outro trabalho

(5), as plantas 3 e 8 do pomelo? revelaram-se decididamente quase monoembriônicas, ao passo que a de número 7 produziu sementes com elevadíssima percentagem de poliembriõnia. Tal anormalidade pode ser explicada à luz dos seguintes esclarecimentos: as 3 plantas registadas no quadro 3 como "pomelo?" são "pés francos" provenientes, por sua vez, de um pomeleiro de "pé franco" (13, pg. 529). Por outro lado, não houve qualquer controle de polinização para obtenção das sementes que deram origem às referidas 3 plantas. Assim sendo, é possível, e até provável, tratar-se de plantas híbridas que apresentam caracteres bastante diversos.

Estudando as variações entre plantas nos experimentos de cavalos instalados na Estação Experimental de Limeira, Brieger e Moreira (5) constataram a "extrema heterogeneidade do **Pomelo e limão Ponderosa**, nos quais encontramos, desde copas cilíndricas com altura duas vezes maior que o diâmetro, até copas redondas, nas quais a altura é aproximadamente igual ao diâmetro da copa". Ora, as plantas 3, 7 e 8 de "pomelo?" (estampa 6) estão entre as 8 plantas estudadas por êsses autores.

### QUADRO 12

#### POLIEMBRIONIA EM *CITRUS*

##### Variação da poliembriõnia entre anos na mesma árvore

(Fecundação livre)

<i>CITRUS</i> DIVERSOS	N.º da árvore	Ano	Embriões $\bar{v}$	Poliembriõnia %
Laranja lisa paulista .....	4	1943	2,2	66,1
		1944	2,2	67,6
Toranja vermelha .....	2	1943	1,0	1,1
		1944	1,0	0,0
Limão cravo .....	2	1944	1,2	10,3
	2	1945	2,1	75,8
	3	1944	1,2	17,5
	3	1945	1,8	62,4
	4	1944	1,5	38,2
	4	1945	2,1	82,0
Lima da Pérsia .....	2	1944	2,0	63,8
	2	1945	1,6	48,7
	3	1944	1,7	57,1
	3	1945	1,5	39,1
	4	1944	1,6	44,9
	4	1945	1,6	37,0

Pode-se ainda lembrar que os pomelos (*C. paradisi*) são, possivelmente, híbridos resultantes do cruzamento toranja x laranja doce (*C. grandis* x *C. sinensis*), como admite Swingle (20; pgs. 418-419), o que explicaria o aparecimento em sua descendência, dos pés francos com elevada ou baixíssima (99,4% e 0,6%) percentagem de poliembrião. Essas nossas constatações vêm justificar as dúvidas expressas por este e outros autores em relação à posição taxonômica dos pomelos.

#### 4. Variação entre colheitas de uma mesma planta em diferentes anos

Da contagem da poliembrião pelo processo direto em algumas plantas e em diferentes anos (quadro 12) tiram-se algumas conclusões interessantes :

Na laranja lisa paulista (árvore 4) e na toranja vermelha (árvore 3), a primeira de alta, e a segunda de baixa ou nula poliembrião, podemos notar que a variação entre os dois anos de 1943 e 1944 foi muito pequena e, portanto, sem importância. Todavia, para o limão cravo (árvores 2, 3 e 4) e lima da Pérsia (árvores 2, 3 e 4) observamos uma diferença da poliembrião bastante acentuada entre os anos de 1944 e 1945 ; o mais interessante é que, para o limão cravo, em tôdas as 3 plantas estudadas, a poliembrião foi de 2 a 4 vezes maior em 1945 do que em 1946 e para lima da Pérsia, justamente o oposto, de 0,5 a 1 vezes menor ; devemos concluir que dentro de uma mesma planta e em diferentes anos, podemos encontrar diferenças muito acentuadas na poliembrião. Até o momento não temos uma explicação plausível para este fenômeno, podendo-se invocar apenas a hipótese de Traub (24), segundo a qual, variando a alimentação em diferentes galhos de uma mesma planta, se pode alterar a poliembrião nas sementes dos frutos produzidos nesses galhos ; assim, talvez a alimentação da planta em diferentes anos fôsse alterada pelas variações das condições ambientes, restando ainda a esclarecer porque em uma forma de *Citrus* a poliembrião cresce e em outras decresce, durante os mesmos anos, na mesma localidade (Estação Experimental de Limeira) e em iguais condições ambientes.

### RESUMO E CONCLUSÕES

1. O presente trabalho faz parte do plano de colaboração de estudo dos *Citrus* entre as secções de Citricultura, Genética, Citologia e Estação Experimental de Limeira do Instituto Agrônomo, e a secção de Citologia e Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Trata de estudo detalhado da poliembrião.

2. Em *Citrus* há três tipos poliembriônicos : a) aquêle proveniente do crescimento das células do nucelo, originando embriões apogâmicos (15, figs. 15 a 18) ; b) aquêle que deriva de mais de um saco embrionário (1), obtendo-se assim 2 embriões híbridos, que podem ser ou não diferentes ; c) o que vem da divisão, por clivagem, do embrião sexual (6), produzindo indivíduos iguais.

3. A poliembrionia foi determinada por dois processos: a) contagem de embriões germinados e b) contagem direta de embriões na semente. Os resultados, em ambos os processos, foram expressos de dois modos diferentes: média do número total de embriões por semente e percentagem dos embriões excedentes, ou, como chamamos, percentagem de poliembrionia. Nos dois processos de contagem dos embriões, foram feitas determinações em sementes de 9 espécies de *Citrus*, *Poncirus trifoliata* e 4 híbridos, num total de 110 plantas (quadros 1 a 3).

Comparações entre os resultados obtidos nos dois processos constam do quadro 4, pelas quais se verifica que a única espécie monoembrionica foi a papeda (*C. hystrix*). Na contagem de embriões germinados, encontramos com **baixa** poliembrionia (0 a 15%) as toranjas (*C. grandis*), as laranjas azêda (*C. aurantium*), a lima da Pérsia (*C. aurantifolia*), o limão cravo ou Rangpur (*C. reticulata*?) e os limões (*C. limon*) doce, ponderosa, rugoso e sweet lemon; de **média** poliembrionia (15 a 30%), o tangor maracujá (*C. sinensis* x *C. reticulata*) e laranjas doces (*C. sinensis*); de **alta** poliembrionia (+30%), pomelos (*C. paradisi*) e Calamondin (*C. reticulata* x *Fortunella*). No processo direto de contagem encontramos **baixa** poliembrionia (0 a 30%), nas toranjas (*C. grandis*); **média** poliembrionia (30 a 60%), nas laranjas azêda (*C. aurantium*), lima da Pérsia (*C. aurantifolia*), limão cravo (*C. reticulata*?), limões (*C. limon*) doce, ponderosa, rugoso e sweet lemon; **alta** poliembrionia (+ 60%), no tangor maracujá (*C. sinensis* x *C. reticulata*), laranjas doces (*C. sinensis*), pomelos (*C. paradisi*), Calamondin (*C. reticulata* x *Fortunella*), Trifoliata (*Poncirus trifoliata*), e em uma forma de pomelo (*C. paradisi*?). Nas laranjas doces e no trifoliata encontramos sementes com 10 até 15 embriões e no calamondin e pomelo (?) até com 20 embriões (estampa 3, figs. a e b). Tendo-se também determinado a poliembrionia de algumas plantas pelos dois processos, pôde-se fazer uma comparação individual (quadro 5).

4. Os embriões podem ter nas sementes posições várias além da normal; podem êles estar localizados no meio da semente e até em situação oposta ao micrópilo; os embriões grandes e médios (de 14 a 5 mm), germinam facilmente em terra preparada, e os pequenos (de 5 a 2 mm), só germinam em agar com solução nutritiva; embriões muito pequenos, menores de 2 mm, não germinam, nem nesse meio de cultura. Nas formas altamente poliembrionicas, as sementes podem ser separadas pelas suas anfratuosidades, em 3 graus de poliembrionia: alta, média e baixa (estampas 4 e 5).

5. A análise da variabilidade de poliembrionia, revelou: a) Entre frutos de uma mesma planta e da mesma colheita (quadros 10 e 11); foram usados o pomelo Mac Carty e o Trifoliata; a análise estatística revelou que no pomelo Mac Carty a variação da poliembrionia em diferentes frutos foi de acaso, segundo a distribuição de Poisson; no trifoliata, a variação observada foi sistematicamente menor que a esperada segundo a distribuição de Poisson, o que aliás, biologicamente, é difícil de se explicar. b) Entre sementes de uma mesma planta; foi observado que em algumas formas de *Citrus*, a frequência observada de sementes com 1, 2, 3, etc. embriões, seguiu a distribuição de Poisson (pomelo Mac Carty, laranja

lisa paulista e limão cravo) e em outras formas não (laranja lima); nas demais formas analisadas (Calamondin e Trifoliata) foram separados 3 graus de poliembriõnia: baixa, média e alta, havendo resultados diferentes para cada grau. c) Entre plantas da mesma variedade; conforme mostra o quadro 3, no pomelo (?) houve uma planta (número 7) que se distinguiu, por ter uma elevadíssima percentagem de poliembriõnia, das suas irmãs que eram quase monoembriônicas; sendo essas plantas oriundas de sementes de polinização livre, é bem possível que se trate de um híbrido (*C. grandis* x *C. sinensis*). d) Entre colheitas de uma mesma planta em diferentes anos (quadro 12) constatou-se que a poliembriõnia variou bastante de um ano para outro na mesma planta. Em algumas plantas ela aumentou e em outras diminuiu, nos mesmos anos.

6. O grau de poliembriõnia em uma variedade ou forma de *Citrus* pode variar de semente para semente, de fruto para fruto, de árvore para árvore e até de ano para ano, na mesma planta. A determinação do número de embriões adicionais em sementes de um ou alguns frutos de uma variedade cítrica não oferece base segura para se avaliar o grau de poliembriõnia dessa variedade.

Para se ter uma idéia exata sobre o grau de poliembriõnia de uma variedade ou forma cítrica é necessário que sejam examinadas muitas sementes, provenientes de vários frutos produzidos em diversas plantas e de mais de uma colheita. A determinação deve ser feita pela contagem direta dos embriões nas sementes, porquanto na contagem em sementeira, após a germinação, sempre se obtém um grau de poliembriõnia inferior ao real.

### AGRADECIMENTOS

Deixamos aqui consignados os nossos agradecimentos aos Srs.: Eng. Agr. A. J. Rodrigues Filho e Prof. Felipe W. Cabral de Vasconcelos, pelo fornecimento de material dos pomares da Estação Experimental de Limreira e da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", em Piracicaba; Eng. Agr. C. A. Krug e Prof. F. G. Brieger, pelas sugestões e ajuda dispensadas no decorrer do trabalho.

### S U M M A R Y

The studies on polyembryony in *Citrus* reported in this paper show that there is a great variability in the degree of polyembryony among the seeds, fruits and trees of a same form or variety of *Citrus*. Seeds from different crops of the same plant also show considerable variation in the degree of polyembryony.

In order to obtain reliable data on the degree of polyembryony in *Citrus* the samples for study should include a great number of seeds taken from several fruits of different trees. Since there is a yearly variation on the degree of polyembryony it was found necessary to study samples from several crops.

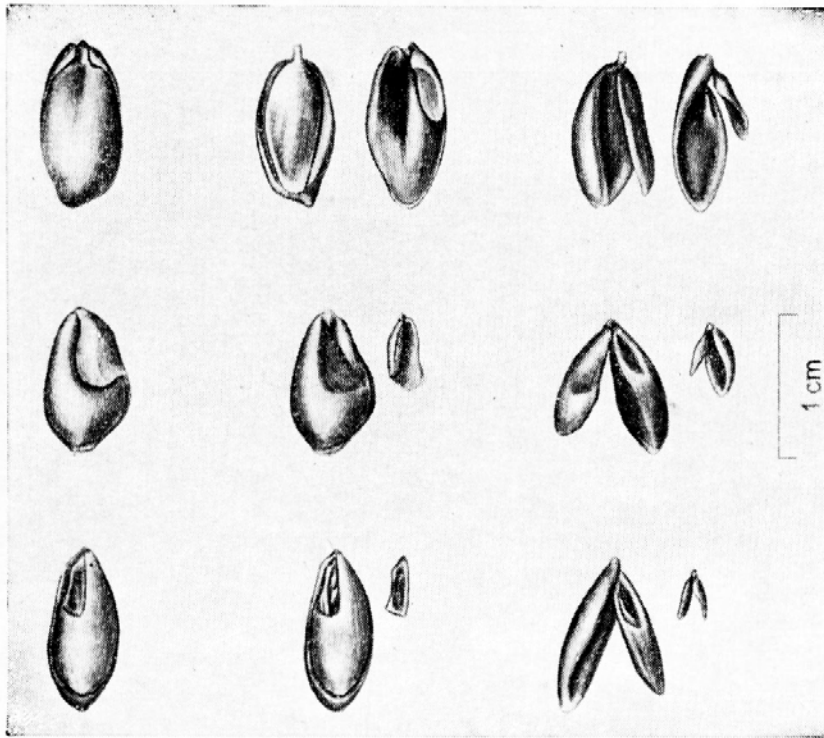
The average number of embryos was determined by direct examination of individual seeds. Determinations based on the number of plants developed from every seed always give lower results as many embryos do not grow into seedlings.



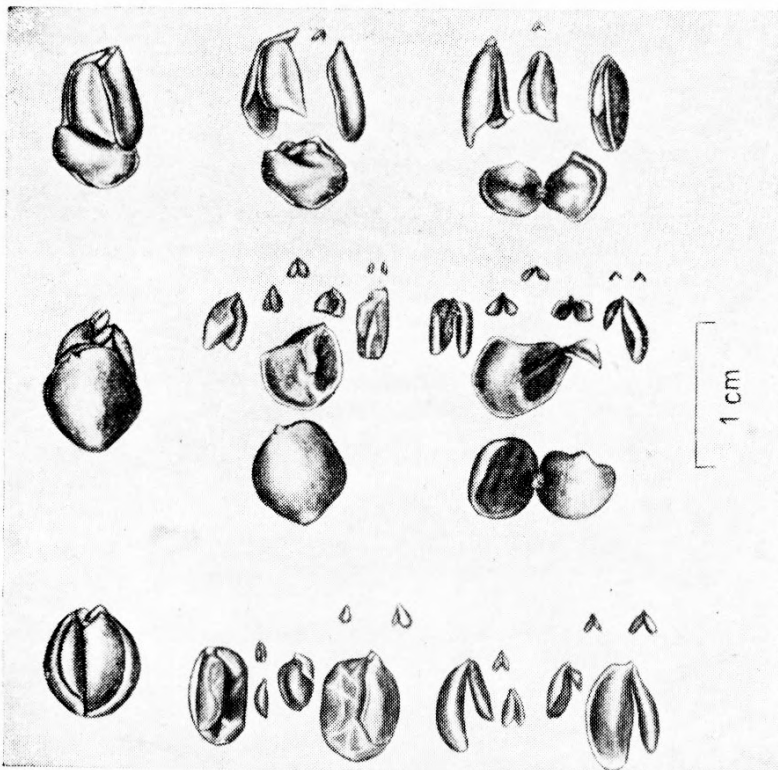
## LITERATURA CITADA

1. **Bacchi, O.** Observações citológicas em *Citrus* III. Megasporogênese, fertilização e poliembrionia. *Bragantia* 4 : 405-412. 1944.
2. **Brieger, F. G.** Limites unilaterais e bilaterais na análise estatística. *Bragantia* 6 : 479-545. 1946.
3. **Brieger, F. G., S. Moreira e Z. Leme.** Estudo sôbre melhoramento da laranja Baía III. *Bragantia* 1 : 567-610. 1941.
4. **Brieger, F. G., A. R. Lima e R. Forster.** Comportamento de variedades e progênies de fumo na resistência ao "vira-cabeça". *Bragantia* 2 : 275-294. 1942.
5. **Brieger, F. G. e S. Moreira.** Experiências de cavalos para *Citrus* II. *Bragantia* 5 : 597-658, figs. 1 a 5. 1945.
6. **Frost, H. B.** Poliembryony, Heterozygosis and Chimeras in Citrus. *Hilgardia* 1 : 365-402. 1926.
7. **Frost, H. B.** The Genetics and Citology of Citrus. *Current. Sci. Especial Number of Genetics* : 24-27. 1938.
8. **Frost, H. B.** *Em Citrus Industry I (History, Botany, and Breeding)* pg. 767-913. Univ. Cal. Press, Berkeley e Los Angeles, U.S.A., 1943.
9. **Gurgel, J. T. A.** Análise Estatística da Distribuição de Poisson. *Anais da E.S.A. "Luiz de Queiroz"* 2 : 300-319. 1945.
10. **Hatton, R. G.** Investigations on Standarlization of Citrus Trees by Propagation Methods. *Imp. Bur. Fruit. Production, Tech. Comm.* 3 : 1932
11. **Hodgson, R. W.** Effects on reproduction by nucellar embryony on clonal characteristics in Citrus. *Jour. Heredity* 29 : 417-419. 1938.
12. **Krug, C. A. e O. Bacchi.** Observações citológicas em *Citrus* II. Variedades triplóides. *Bragantia* 4 : 393-404. 1944.
13. **Moreira, S.** Experiências de cavalos para *Citrus* I. *Bragantia* 1 : 525-565. 1941.
14. **Moreira, S.** Observações sôbre a tristeza dos *Citrus* ou podridão das radículas. *O Biológico* 8 : 269-272. 1942.
15. **Moreira, S. e J. T. A. Gurgel.** A fertilidade do pólen e sua correlação com o número de sementes, em espécies e formas do gênero *Citrus*. *Bragantia* 1 : 669-711. 1941.
16. **Navarro de Andrade, E.** *Em Manual de Citricultura (I. Parte).* Ed. Chácaras e Quintais, pág. 1-198. S. Paulo, 1933.
17. **Osawa, I.** Cytological and experimental studies in Citrus. *Jour. Col. Agr. Imp. Univ. Tokyo* 4 : 83-116. 1912.
18. **Strassburger, E.** Ueber Polyembryonie. *Jenaische Ztschr. fur Naturw.* 12 : 647-667. 1878.
19. **Swingle, W. T.** Recapitulation of seedling characters by nucellar buds developing in the embryo sac of Citrus. *Proceed. Sixtti Internat. Cong. Genetics* 2 : 196-197. 1932.
20. **Swingle, W. T.** *Em Citrus Industry I (History, Botany and Breeding)*, pg. 129-472, Univ. Cal. Press., Berkeley e Los Angeles, U.S.A., 1943.
21. **Torres, J. P.** Progress report on Citrus Hybridization. *The Philip. Jour. Agric.* 3 : 217-229. 1932.
22. **Torres, J. P.** Polyembryony in Citrus and study of hybrid seedlings. *Philip. Jour. Agr.* 7 : 37-58. 1936.
23. **Toxopeus, H. J.** De Polyembryonie Van Citrus. *Haar Beteekenis Voor de Cultuur, Landbouw.* 6 : 1-15, 1930/31.
24. **Traub, Hamilton P.** Artificial control of nucellar embryony in Citrus. *Science* 83 : 165-166. 1936.
25. **Webber, H. J.** Complications in Citrus hybridization caused by polyembryony. *Science* 11 : 308. 1900.
26. **Webber, H. J.** The economic importance of apogamy in Citrus and Mangifera. *Proceed. Amer. Soc. Hort. Sci.* 23 : 57-61. 1931.
27. **Webber, H. J.** Variation in Citrus Seedling and their Relation to Rootstock Selection. *Hilgardia* 7 : 1-79. 1932.
28. **Webber, H. J.** *Em Citrus Industry I (History, Botany and Breeding)* pg. 475-668, Univ. Cal. Press, Berkeley e Los Angeles, U.S.A., 1943.

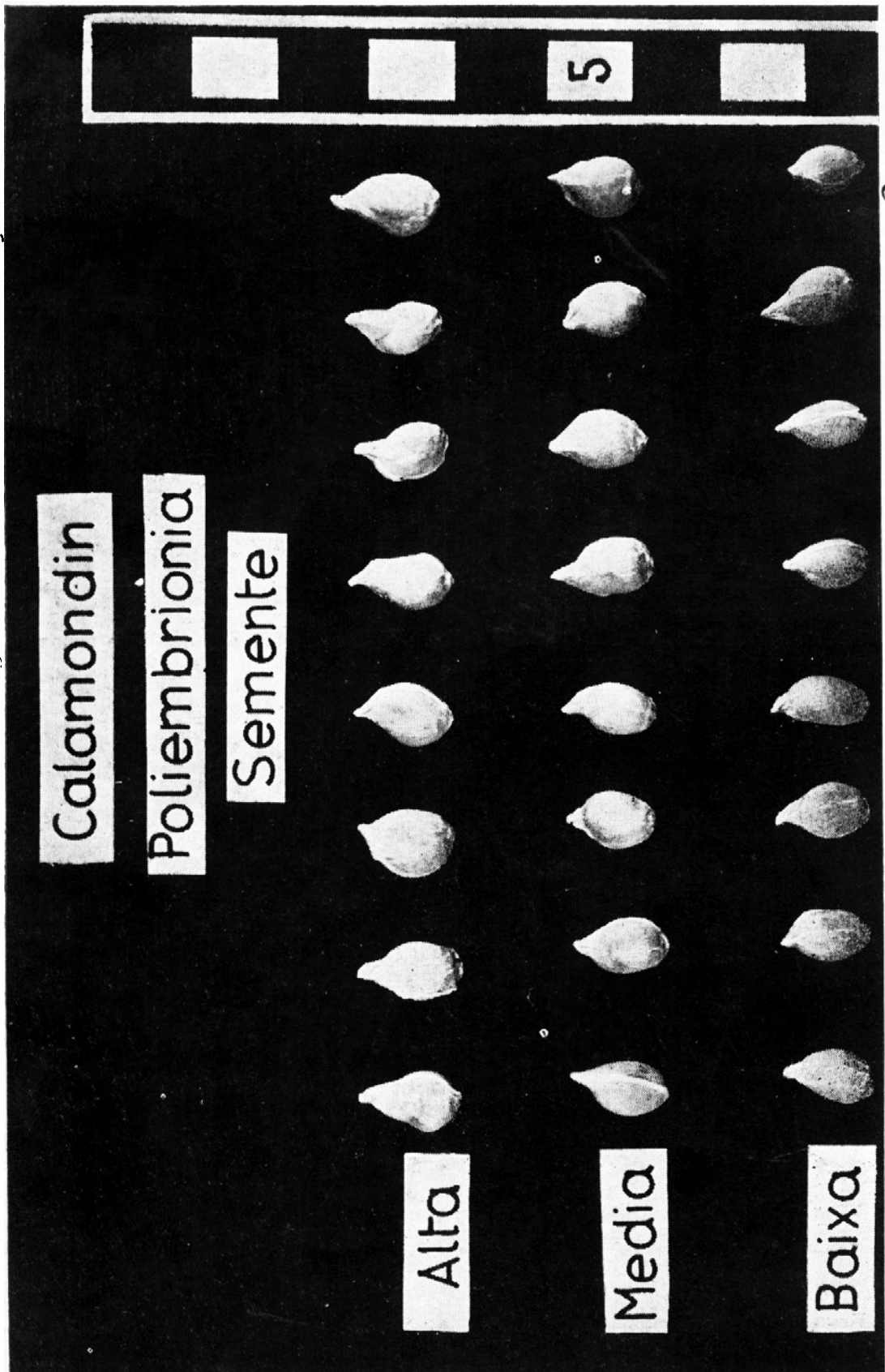
Est. 3



a) — Três sementes de baixa poliembriõnia, em laranja azêda, representadas em três etapas : ao serem retirados o integumento e a película ; posição relativa dos embriões e embriões abertos, mostrando os cotilédones. Pode-se notar a posição e o tamanho dos embriões, e também dos seus cotilédones.

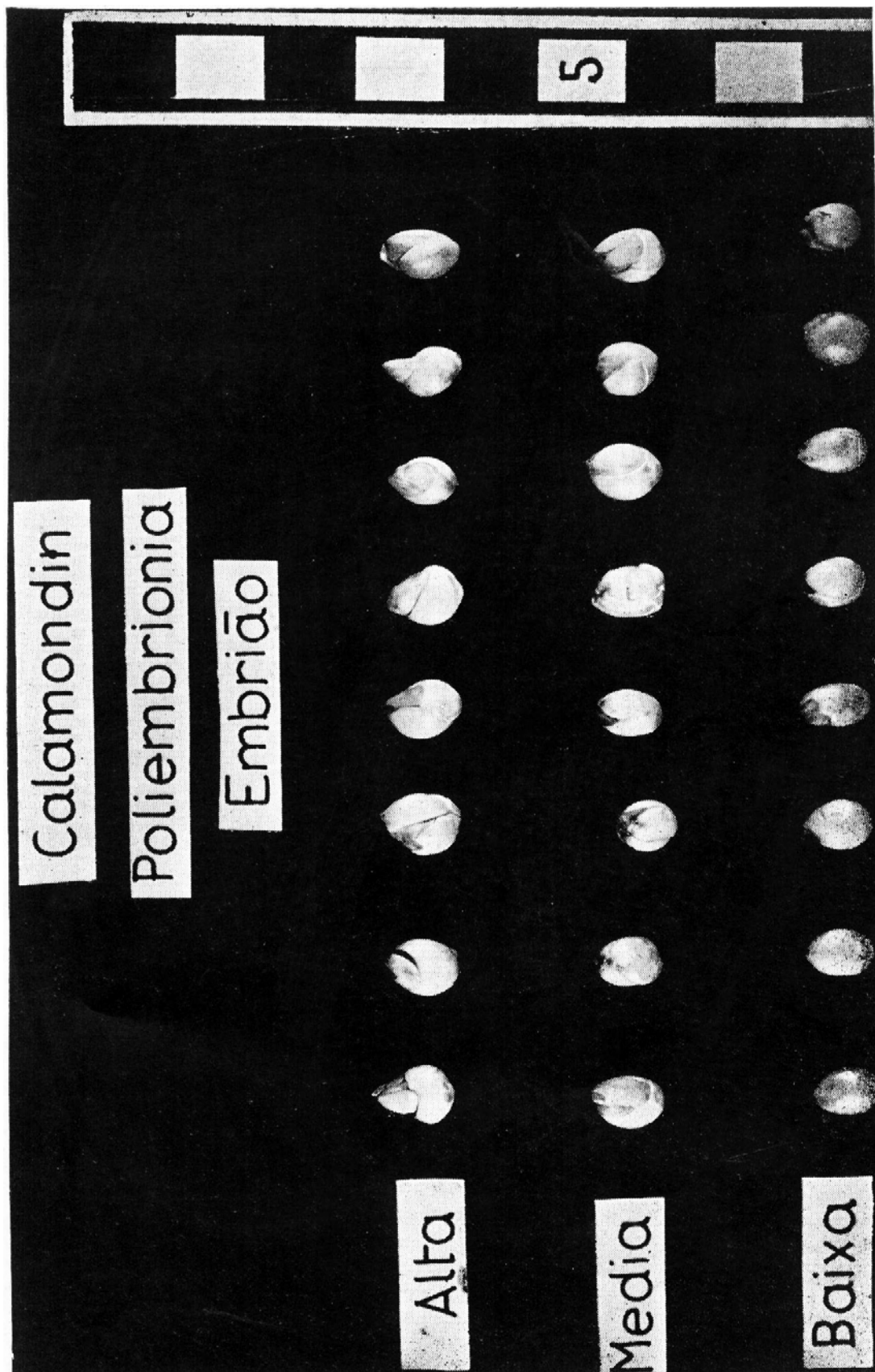


b) — Três sementes de alta poliembriõnia, em Calamondin, representadas nas mesmas etapas como indicado em a.

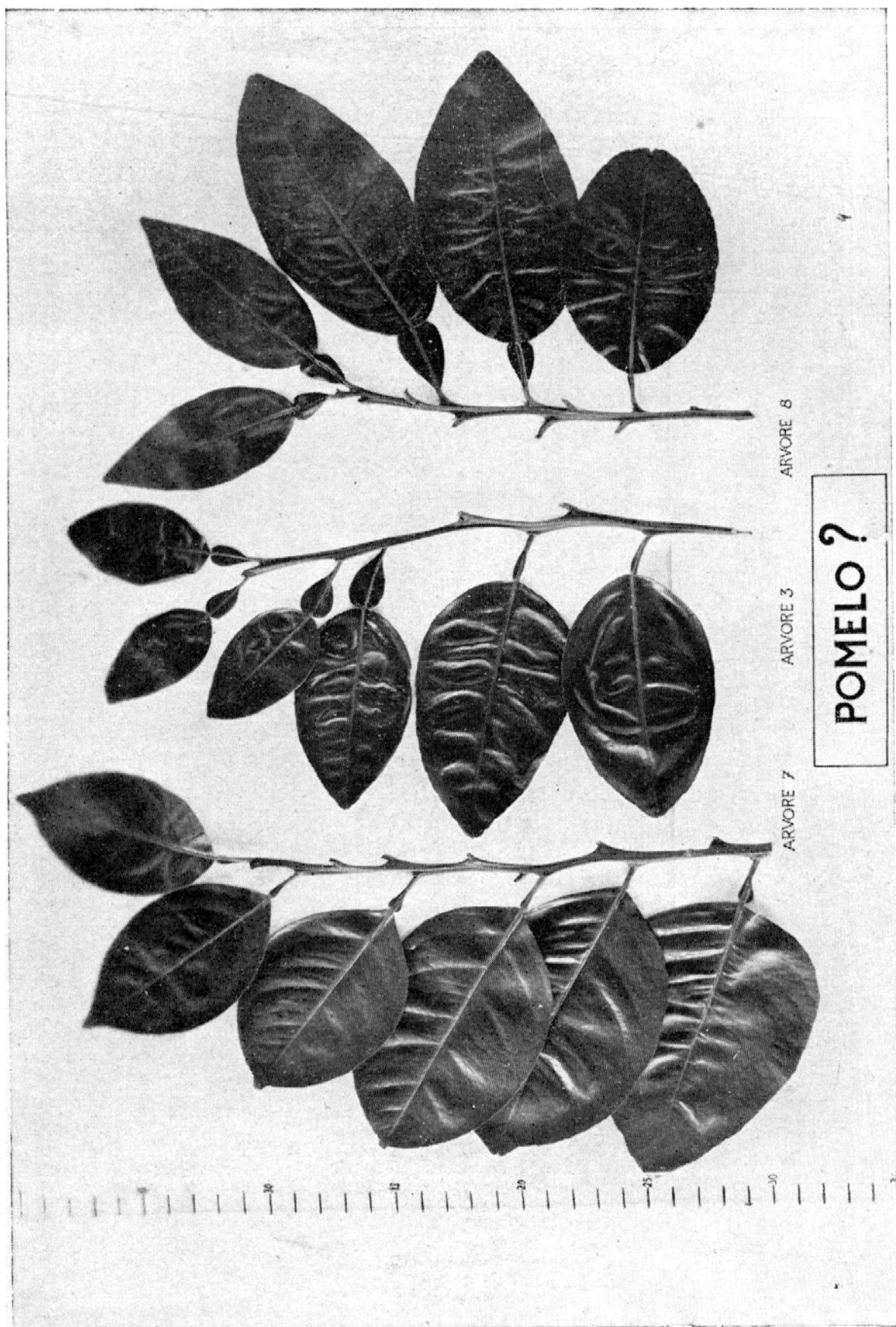


Sementes poliembriônicas de Calamondin, onde foi possível, pelo aspecto externo da semente, separar três classes de poliembrionia : baixa, média e alta.

Est. 5



As mesmas sementes da Est. 4, das quais foram retirados o integumento e a película, deixando ver os embriões.



Mostrando as diferenças das fôlhas em ramos das três plantas de *Pomelo* (?).  
A árvore 7 é altamente poliembriônica (99,4%); as árvores 3 e 8 são quase monoembriônicas (0,6% e 1,5%).