

REGENERAÇÃO DE PLANTAS A PARTIR DO CULTIVO DE ÓVULOS DE *CITRUS RETICULATA* CV. DANCY¹

ANA FABIÓLA DA SILVA COELHO², DALMO LOPES DE SIQUEIRA, CLÁUDIO BRUCKNER³, ALUÍZIO BORÉM DE OLIVEIRA⁴ e ANTÔNIO AMÉRICO CARDOSO³

RESUMO - Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de verificar o efeito da polinização, época de coleta, condição de cultivo de óvulos não desenvolvidos de *Citrus reticulata* Blanco cv. Dancy, quanto à indução de embriogênese e o número de embriões desenvolvidos e verificar o efeito da enxertia *in vivo* de embriões cotiledonares, em porta-enxertos obtidos a partir de sementes, sobre a rapidez de obtenção de plantas sadias e redução do período de juvenildade. Óvulos originados de flores com e sem polinização, coletados aos 7, 14, 21 e 28 dias, mantidos sob luz e no escuro foram cultivados em meio básico MT, suplementado com 500 mg.L⁻¹ de extrato de malte. Embriões cotiledonares, obtidos diretamente do cultivo de óvulos, com 4-6 mm de comprimento foram enxertados diretamente em porta-enxertos com 10 meses de idade. Não houve formação de nenhum calo até os 120 dias após o início do cultivo. Entre os tratamentos observaram-se diferenças quanto à porcentagem de óvulos que induziram embriões e ao número de embriões formados. Plantas inteiras foram desenvolvidas no mesmo meio básico. A porcentagem de pegamento dos enxertos foi de 23%, entretanto, foi observado um rápido desenvolvimento das mudas, mostrando boas perspectivas desta técnica em programas de melhoramento e talvez na propagação de plantas livres de viroses, caso a fase juvenil seja reduzida.

Termos para indexação: tangerina Dancy, enxertia de embriões.

PLANTS REGENERATION FROM OVULE CULTURE OF *CITRUS RETICULATA* BLANCO CV. DANCY

ABSTRACT - Undeveloped ovules of *Citrus reticulata* Blanco cv. Dancy were cultivated with the objective to determinate the effect of pollination, harvesting time and culture conditions appropriated for induction of embryogenesis and embryo production. It was verified the effect of *in vivo* grafting of cotyledonary embryos, in ten-month-old rootstock obtained from seeds, on the rapidity of obtention of disease-free plants and on the reduction of the juvenility stage. Ovule originated from pollinated and non-pollinated flowers collected 7, 14, 21 and 28 days after anthesis grown under light and dark conditions were cultured in basic medium MT, added with 500 mg.L⁻¹ of malt extract. Cotyledonary embryos, 4-6 mm long, obtained *in vitro* were grafted *in vivo* on rootstocks. Embryos were directly obtained from ovule culture, however it was observed the formation of a high number of abnormal embryos in all treatments. Whole plants were developed on the same basic medium. It was not observed the formation of callus until 120 days. Differences related to the percentage of ovules that induced embryos and the number of embryos were observed in all treatments. The success rate of embryo grafting was 23%, however, it was observed a fast seedling development, which is a promising technique for breeding programs and maybe in the mass propagation of virus-free plants, in case the juvenile phase be reduced.

Index terms: Dancy mandarine, embryo grafting.

¹ Aceito para publicação em 9 de setembro de 1997.

Extraído da Tese apresentada pelo primeiro autor à Universidade Federal de Viçosa.

² Eng^a Agr^a, M.Sc., Embrapa-Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Ocidental (CPAA), Caixa Postal 319, CEP 69011-970 Manaus, AM. Bolsista do CNPq.

³ Eng. Agr., Dr., Dep. de Fitotecnia, UFV, CEP 36571-000 Viçosa, MG.

⁴ Eng. Agr., Ph.D., Dep. de Fitotecnia, UFV.

INTRODUÇÃO

O melhoramento das espécies cítricas pelos métodos convencionais pouco tem contribuído para a citricultura, pois é seriamente limitado pela poliembrião, esterilidade masculina, incompatibilidade, longo período de juvenilidade e disseminação de viroses (Pasqual, 1985; Ollitrault, 1992).

O desenvolvimento das técnicas de cultura de tecidos e a possibilidade de obter embriões somáticos e zigóticos a partir do cultivo de óvulos constitui um avanço para o melhoramento e propagação destas espécies, reduzindo as barreiras que comprometem o desenvolvimento de programas com espécies cítricas.

A embriogênese somática a partir do cultivo de óvulos tem sido realizada com êxito em espécies poliembriônicas (Moore, 1985; Gmitter Junior & Moore, 1986), entretanto, fatores como a cultivar da qual os óvulos são originados, o estado fisiológico desses óvulos e as condições em que eles são expostos são responsáveis por diferenças na resposta embriogênica. Além disso, o alongamento *in vitro* dos embriões e a subsequente aclimatação é um processo longo e difícil (Button & Kochba, 1977), existindo ainda expressão de características de juvenilidade nas plantas originadas *in vitro*, constituindo importante limitação na propagação dos citros pela técnica de embriogênese somática (Ollitrault, 1992). Este autor reporta a possibilidade de se realizar a propagação maciça de plantas saudáveis e a redução considerável da fase juvenil de plantas cítricas pela combinação das técnicas de embriogênese somática *in vitro* e a de enxertia *in vivo* de embriões cotiledonares originados do cultivo de óvulos.

Diante desses fatos e tendo em vista a importância da embriogênese somática, tanto para o melhoramento como para a propagação dos citros, este trabalho teve como objetivos verificar o efeito da polinização e da época de coleta sobre o potencial morfogênico de óvulos inteiros, cultivados à luz e no escuro, e verificar o efeito da enxertia de embriões cotiledonares, em porta-enxertos obtidos a partir de sementes, sobre a rapidez de obtenção de plantas saudáveis e a redução do período de juvenilidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi executado em diferentes etapas realizadas no pomar, laboratório de Cultura de Tecidos e casa de vegetação, da Universidade Federal de Viçosa, de maio de 1994 a outubro de 1995.

Foram utilizadas três espécies de citros: *Citrus reticulata* Blanco cv. Dancy; [*Poncirus trifoliata* x *Citrus paradisi*] cv. Swingle, empregados como progenitores feminino e masculino, respectivamente, e *Citrus limonia* (L.) Osbeck cv. Cravo, empregada como porta-enxerto para os embriões. Os explantes foram óvulos resultantes de flores com e sem polinização de *Citrus reticulata*.

Os grãos de pólen do citrumeleiro 'Swingle' foram obtidos de ramos cujas flores encontravam-se no estágio de balão. Após um dia, as anteras foram retiradas e acondicionadas em frascos de vidro para posteriormente ser realizada a polinização.

Para a polinização, as flores foram marcadas, emasculadas, também no estágio de balão, polinizadas, protegidas com sacos de papel e identificadas com etiquetas de plástico. As flores restantes do ramo que não estavam na fase indicada para polinização cruzada foram eliminadas para evitar a autopolinização. Para obtenção dos óvulos não fecundados, as flores foram também emasculadas no estágio de balão e protegidas com sacos de papel.

Os porta-enxertos usados na enxertia dos embriões obtidos *in vitro* foram estabelecidos a partir da germinação de sementes de *Citrus limonia* (L.) Osbeck cv. Cravo, em vasos de plástico de 25 cm de altura x 24 cm de diâmetro, contendo uma mistura de terriço, areia e esterco, na proporção de 2:1:1, respectivamente.

Os ovários das flores polinizadas e não polinizadas foram coletados semanalmente após a antese, durante quatro semanas, isto é, com 7, 14, 21 e 28 dias.

A assepsia foi realizada a partir da lavagem dos ovários em água corrente para remoção de restos de pétalas, cálices e estigma. A seguir fez-se o processo de desinfestação dos ovários, que constou de imersão, por um minuto, em álcool a 70% e posteriormente em solução de hipoclorito de sódio a 2%, acrescida de uma gota de Tween-20 para cada 100 mL de solução, por 10 minutos. Depois, em câmara de fluxo laminar, passaram por três lavagens com água deionizada autoclavada.

Após assepsia, os ovários foram cortados transversalmente em seus pólos até a visualização dos lóculos. Sob lupa com aumento de 20 vezes e em condições assépticas, os óvulos foram excisados e inoculados em tubos de ensaio contendo o meio de cultura MT (Murashige & Tucker, 1969), suplementado com 500 mg.L⁻¹ de extrato de malte. O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,1 antes da adição do ágar, utilizando-se KOH 1,0 N ou HCl 0,1 N. O meio de cultura foi solidificado pela adição de 0,5% (p/v) de ágarMerck, distribuindo-se 20 mL do meio por tubo de ensaio (20 x 150 mm), que foram vedados com tampas de polipropileno.

A esterilização do meio foi realizada por autoclavagem, à temperatura de 121°C e pressão de 1,05 kg/cm², durante 15 minutos. A inoculação dos explantes foi realizada em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar. Os cultivos foram mantidos à temperatura de 27 ± 2°C, com fotoperíodo de 16 horas de luz, 8 horas de escuro e irradiância luminosa

de aproximadamente $13-14 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e em condições de 24 horas de escuro. A cada quatro semanas foram realizados subcultivos utilizando-se o mesmo meio.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 10 repetições e em esquema fatorial 2×4 , sendo cada unidade experimental constituída por um tubo de ensaio contendo 10 óvulos. Os tratamentos constituíram-se de um fatorial de dois tipos de óvulos (originados de flores polinizadas e não polinizadas) com as quatro épocas de coleta dos óvulos. Os resultados foram avaliados por meio de análise de variância e as médias pelo teste de Tukey a 1 e 5% de probabilidade.

Os experimentos foram observados semanalmente; porém os resultados quanto à porcentagem de óvulos que produziram calos foram obtidos aos 90 dias após o início do experimento. A porcentagem de óvulos que induziram embriogênese e o número de embriões formados foram avaliados aos 120 dias após o plaqueamento.

Embriões cotiledonares obtidos *in vitro*, provenientes da etapa anteriormente descrita, com aproximadamente 4-6 mm de comprimento foram selecionados para a enxertia. Utilizaram-se 14 embriões de tangerineira 'Dancy' que tiveram seu pólo radicular cortado antes da realização da enxertia, para facilitar a soldadura, conforme Ollitrault (1992). Em seguida, foram enxertados em porta-enxertos com 10 meses de idade, a uma altura de 15 cm a partir do solo em "T" normal e fixados com fita de plástico transparente, envolvendo-os completamente. Posteriormente, as plantas foram colocadas em casa de vegetação. Após 20 dias, realizou-se o corte da fita de plástico e fez-se a seleção dos enxertos que ainda mantinham-se verdes. Nestes, foi feito o decotamento, ou seja, os porta-enxertos foram cortados três centímetros acima dos enxertos, pincelados com pasta cúprica (oxicloreto de cobre 0,5%) e envolvidos com sacos de plástico, colocados individualmente em cada planta, para manter a umidade. Após cinco meses, as mudas obtidas foram transferidas para o campo.

Para comparar a técnica de enxertia de embriões com a tradicional técnica de alongamento e aclimação *in vitro*, embriões cotiledonares foram individualizados em tubos de ensaio contendo o mesmo meio descrito anteriormente e mantidos à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro. Quando as plântulas atingiram 3-4 cm de comprimento foram transferidas para tubetes e mantidas por 30 dias em ambiente com alta umidade. Após este período foram transplantadas para copos de plástico contendo substrato (mistura (areia, esterco e terriço, 2:1:1) : vermiculita, 2:1), cobertos com sacos de plástico transparentes e mantidos em casa de vegetação. As plântulas foram fertilizadas semanalmente com solução de Hoagland & Arnon (1950). Os sacos perfurados para reduzir gradualmente os níveis de umidade, foram removidos após duas semanas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observações semanais permitiram a verificação das etapas de desenvolvimento e as reações dos explantes. Inicialmente, foi possível observar que os óvulos apresentavam-se esverdeados e entumecidos (5-7 dias após o início do cultivo), o que foi constatado tanto nos óvulos sob luminosidade quanto sob escuridão; entretanto, após 15 dias de cultivo estes, embora continuassem entumecidos, tornaram-se amarelados.

Os primeiros sinais de embriogênese direta foram observados com oito semanas após o início do experimento, em todos os tratamentos. Os embriões originaram-se pelo rompimento dos tegumentos dos óvulos; esta observação coincide com as de Moore (1985) e Goldman (1988). Foi observada a presença de até 20 embriões rompendo os integumentos de um único óvulo, entretanto, foi mais comum o aparecimento de um a três embriões por óvulo.

Verificou-se elevado índice de anormalidades nos embriões formados em todos os tratamentos. Embriões pluricotiledonares, unicotiledonares, fusão de embriões e embriões vitrificados foram as principais deformações encontradas. Anomalias similares têm sido relatadas por vários autores (Gonzalez Montenegro & Peña, 1983; Moore, 1985; Pasqual, 1985; Gmitter Junior & Moore, 1986).

Os embriões desenvolveram-se em embriões maduros, foram individualizados e regeneraram plântulas, ou aumentaram em tamanho, originando os chamados pseudobulbilhos, os quais produziram embriões secundários. Esse mesmo comportamento foi observado por Kochba et al. (1972) em laranja doce 'Shamouti' e 'Valência'. A formação de embriões secundários foi verificada ainda nos cotilédones e no hipocótilo das plântulas regeneradas, fato também relatado por Litz et al. (1985) e Sim et al. (1988). Segundo George (1992), os pseudobulbilhos são formados quando as condições de cultivo são desfavoráveis à conclusão do processo embriogênico. Alguns autores relatam ainda que os pseudobulbilhos são derivados de embriões globulares nos quais a polaridade não foi estabelecida durante o estágio de 16-32 células (Button & Botha, 1975; Ollitrault et al., 1994).

Óvulos de *Citrus reticulata* Blanco cv. Dancy não produziram calo em nenhum dos tratamentos realizados, discordando dos resultados obtidos por Vardi et al. (1982) que observaram calos a partir de óvulos de tangerineira 'Dancy', coletados com 1-2 semanas após a antese e mantidos sob luminosidade. Também divergem dos resultados verificados por Ollitrault (1992), que obteve calos brancos e granulares, com alta capacidade embriogênica e produção significativa de embriões, diretamente de óvulos de tangerineira 'Deliciosa'.

Tais resultados provavelmente ocorreram devido ao baixo nível endógeno de substâncias reguladoras de crescimento nos óvulos desta espécie, provavelmente causado pelas condições ambientais e nutricionais das plantas, o que impediu que ocorresse divisão e proliferação celular. Mitra & Chaturvedi (1972) relataram a importância da adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura, para iniciar e dar continuidade ao crescimento dos calos.

Foram avaliados 2.772 embriões. Em geral, a porcentagem de óvulos produzindo mais de um embrião foi o fator de maior contribuição no total de embriões produzidos. Moore (1985) verificou que óvulos não desenvolvidos de tangerineira 'Dancy' cultivados *in vitro* não produziram nenhum embrião.

Não houve interação significativa entre a poli-nização e as quatro épocas de coleta dos óvulos, quando mantidos sob luz, entretanto, foi observada diferença altamente significativa ($P < 0,01$) entre as épocas, verificando-se que a maior porcentagem de embriogênese ocorreu em óvulos coletados aos 7 (37,13%) e aos 14 (48%) dias após a antese (Fig. 1). Quando os óvulos foram mantidos por 24 horas no escuro, não observou-se nenhuma diferença significativa na porcentagem de óvulos entre as épocas de coleta (Fig. 1).

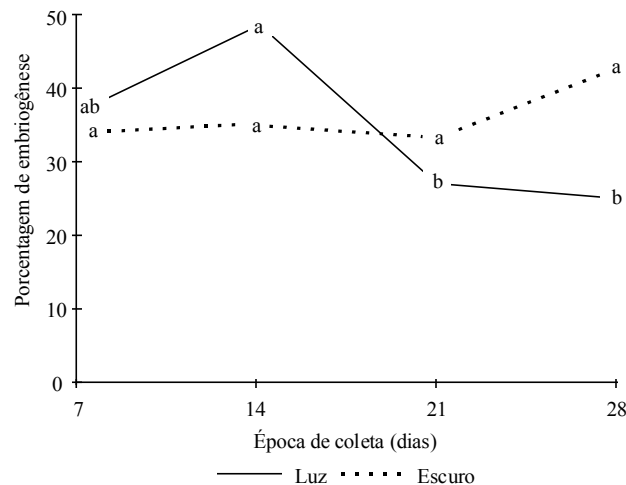


FIG. 1. Efeito da época de coleta sobre a porcentagem média de embriogênese em óvulos de *Citrus reticulata* Blanco cv. Dancy, submetidos à luminosidade e ao escuro. Médias representadas pela mesma letra na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 1 e 5% de probabilidade, na luz e no escuro, respectivamente. C.V. (%) na luz = 52,0 e no escuro = 68,9.

A Fig. 2 mostra que não foi detectada diferença significativa na porcentagem de embriogênese, quando se utilizou como explantes óvulos originados de flores com ou sem polinização, mantidos sob luz e no escuro.

Quanto ao número de embriões obtidos com os óvulos sob luminosidade, observou-se que entre as épocas de coleta não ocorreu diferença significativa. Houve diferença significativa entre os tratamentos de polinização: os óvulos originados de flores sem polinização produziram mais embriões. Nos óvulos mantidos no escuro nenhum dos efeitos mostrou-se significativo (Figs. 3 e 4).

Embora não tenha sido realizada análise estatística no tocante às condições de cultivo, ou seja, luz e escuro, observou-se que os óvulos cultivados no escuro produziram mais embriões. Os resultados indicam que a luz influencia na embriogênese, pois segundo Gonzalez Montenegro & Peña (1983), a produção de embriões somáticos, a partir de óvulos de tangerineira 'Dancy', ocorreu somente quando eles foram submetidos ao escuro. Fato que pode ter ocorrido pelo baixo nível de substâncias reguladoras de crescimento endógenas nos óvulos desta espécie. Quando esses óvulos foram mantidos sob luz, a quantidade dessas substâncias pode ter diminuído, por causa da fotossensibilidade de algumas delas, prejudicando a produção de embriões. Koç et al. (1992), entretanto, reportam o desconhecimento dos fatores endógenos que governam a

formação dos embriões somáticos e a existência de uma diversidade de exigências nutricionais e hormonais nos diferentes tecidos e órgãos.

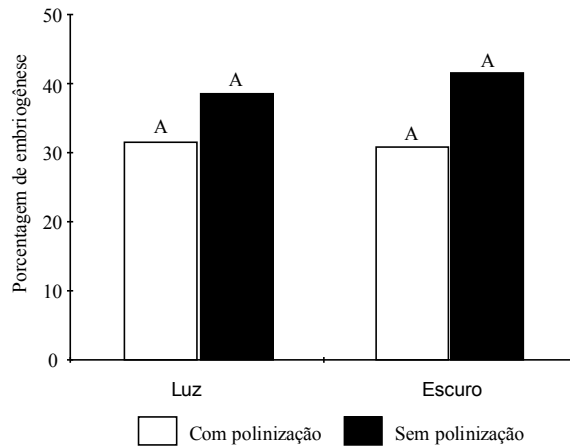


FIG. 2. Efeito da polinização sobre a porcentagem média de embriogênese em óvulos de *Citrus reticulata* Blanco cv. Dancy, submetidos à luminosidade e ao escuro. Médias com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 1 e 5% de probabilidade, na luz e no escuro, respectivamente. C.V. (%) na luz = 52,0 e no escuro = 68,9.

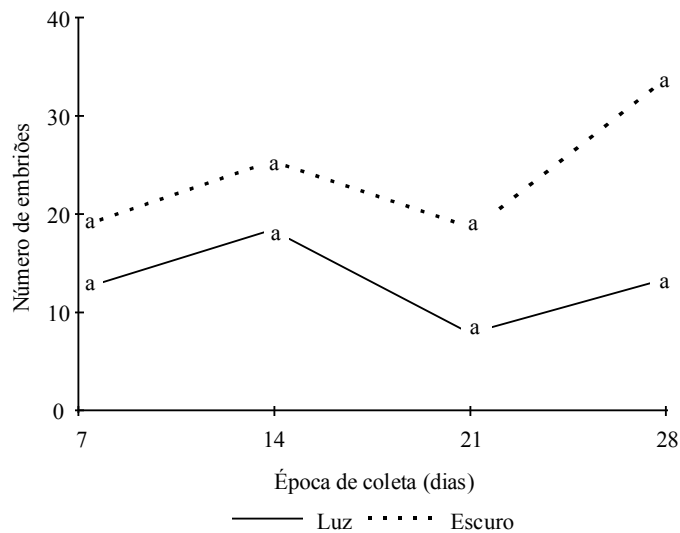


FIG. 3. Efeito da época de coleta sobre o número médio de embriões desenvolvidos em óvulos de *Citrus reticulata* Blanco cv. Dancy, submetidos à luminosidade e ao escuro. Médias representadas pela mesma letra na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. C.V. (%) na luz = 70,0 e no escuro = 93,7.

Apesar de ter sido detectada diferença significativa entre os óvulos com e sem polinização somente quanto ao número de embriões formados, quando os óvulos foram mantidos sob luz observou-se que a porcentagem de óvulos que produziram embriões e o número de embriões produzidos foi sempre maior quando os óvulos foram extraídos de flores não-polinizadas. Uma provável explicação está relacionada à evolução da espécie, pois geralmente para a sua sobrevivência é importante que ocorra variabilidade genética, o que significa a formação de um embrião zigótico. Entretanto, quando o desenvolvimento deste embrião é impedido pela ausência de polinização, possivelmente existe outro mecanismo que pode ser acionado em espécies poliembriônicas, induzindo a produção de embriões somáticos, para com isso assegurar a sobrevivência da espécie. Sob outro ponto de vista, pode ser que em espécies poliembriônicas, quando ocorre um estímulo ao

desenvolvimento do embrião zigótico, pela deposição do grão de pólen sob o estigma da flor ou mesmo sob o desenvolvimento completo deste embrião, ocorra também a produção de substâncias que inibem ou diminuem a formação de embriões somáticos. Neste trabalho, por ter-se impedido o desenvolvimento do embrião zigótico, os embriões somáticos desenvolveram-se sem qualquer barreira, resultando um maior número de embriões somáticos em óvulos cujas flores não foram polinizadas.

Os primeiros sinais de desenvolvimento dos embriões enxertados foram observados aproximadamente aos 45 dias após a operação, manifestando-se com o surgimento de pequenas gemas. Na avaliação realizada aos 60 dias após a enxertia, observou-se que apenas três enxertos sobreviveram e emitiram brotações, com média de 9,5 cm de comprimento. Seis meses após a enxertia, as mudas obtidas foram transferidas para o campo.

A taxa de sucesso da enxertia de embriões foi de 23%, entretanto melhores resultados poderiam ser obtidos com o controle de fatores ambientais, como temperatura e luminosidade, ou talvez utilizando-se outra técnica de enxertia. Ollitrault (1992), quando utilizou pela primeira vez esta técnica em *Citrus* obteve 60% de pegamento, número ainda menor que o verificado no método tradicional (80%). O mesmo autor afirma ainda que a superioridade da técnica de enxertia de embriões deve-se à supressão de algumas etapas na obtenção de plantas saudáveis.

Em comparação com esta técnica, observou-se uma taxa de regeneração das plântulas de 60%, entretanto o período de crescimento foi muito longo.

A Fig. 5 mostra a diferença observada entre os dois processos. A muda à esquerda foi obtida pelo método de enxertia de embrião e possui a mesma idade que a plântula obtida *in vitro*, observada no tubo de ensaio.

A técnica de enxertia de embriões, se otimizada, possui elevado potencial para aplicação na propagação em massa de plantas livres de doenças e na produção de plantas matrizes.

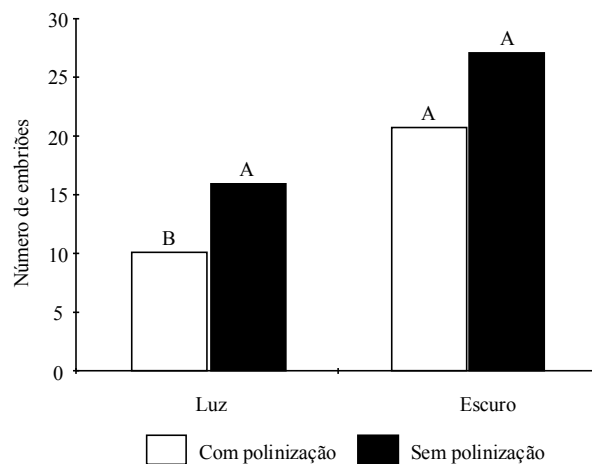


FIG. 4. Efeito da polinização sobre o número médio de embriões desenvolvidos em óvulos de *Citrus reticulata* Blanco cv. Dancy, submetidos à luminosidade e ao escuro. Médias com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. C.V. (%) na luz = 70,0 e no escuro = 93,7.



FIG. 5. Comparação entre as plantas obtidas pelo método de enxertia de embriões e a tradicional técnica de alongamento e aclimação *in vitro*, aos seis meses após a realização das duas técnicas.

CONCLUSÕES

1. A embriogênese em *Citrus reticulata* Blanco cv. Dancy é obtida pelo cultivo de óvulos fecundados ou não, mantidos sob luz ou no escuro.
2. A indução de embriogênese é mais acentuada com óvulos coletados aos 7 e 14 dias, se mantidos sob luz.
3. Maior número de embriões é obtido quando o cultivo é realizado no escuro; a época de coleta não afeta o número de embriões formados.
4. Óvulos desta espécie, até os 120 dias de cultivo, não produzem calos.
5. A técnica de enxertia de embriões é viável.

REFERÊNCIAS

- BUTTON, J.; BOTHA, C.E.J. Enzymic maceration of *Citrus* and the regeneration of plants from single cells. **Journal Experimental of Botany**, London, v.26, n.94, p.723-729, Oct. 1975.
- BUTTON, J.; KOCHBA, J. Tissue culture in the *Citrus* industry. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. (Eds.). **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture**. Berlin: Springer-Verlag, 1977. p.70-92.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. 2.ed. Great Britain: Exegetics, 1992. 574p.
- GMITTER JUNIOR, F.G.; MOORE, G.A. Plant regeneration from undeveloped ovules and embryogenic calli of *Citrus*: embryo production, germination, and plant survival. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.6, p.139-147, 1986.

- GOLDMAN, M.H.S. **Cultura de tecidos nucelares, isolamento e radiosensitividade de protoplastos de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Pera**. Piracicaba: ESALQ, 1988. 127p. Dissertação de Mestrado.
- GONZALEZ MONTENEGRO, M.; PEÑA, I. Cultivo *in vitro* de ovulos de algunas especies del genero *Citrus*. **Ciencia y Técnica en la Agricultura**. Serie: Citricos y Otros Frutales, Cuba, v.5, n.4, p.7-16, dic. 1983.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley: Univ. of California, 1950. (Circular, 347).
- KOÇ, N.K.; CAN, C.; ÇINAR, A. Effects of some culture media on somatic embryogenesis and rooting in ovular callus of 'Shamouti' orange (*Citrus sinensis* (L.) Osb.). **Tropical Journal of Agriculture and Forestry**, Doga, v.16, p.140-147, 1992.
- KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P.; SAFRAN, H. Adventive plants from ovules and nucellus in *Citrus*. **Planta**, Berlin, v.106, n.3, p.237-245, July/Sept. 1972.
- LITZ, R.E.; MOORE, G.A.; SRINIVASAN, C. *In vitro* systems for propagation and improvement of tropical fruits and palms. **Horticultural Reviews**, New York, v.7, p.157-200, 1985.
- MITRA, G.C.; CHATURVEDI, H.C. Embryoids and complete plants from unpollinated ovaries and from ovules of *in vivo* grown emasculated flower buds of *Citrus* spp. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, New York, v.99, n.4, p.184-189, July/Aug. 1972
- MOORE, G.A. Factors affecting *in vitro* embryogenesis from undeveloped ovules of mature *Citrus* fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.110, n.1, p.66-70, 1985.
- MURASHIGE, T.; TUCKER, D.P.H. Growth factor requirements of *Citrus* tissue culture. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1969, **Proceedings...** Riverside: Univ. of California, Riverside, 1969. v.3, p.1155-1161.
- OLLITRAULT, P. Somatic embryo grafting: a promising technique for *Citrus* breeding and propagation. **Fruits**, Montpellier, v.47, p.213-218, 1992. Numéro spécial Agrumes.
- OLLITRAULT, P.; DAMBIER, D.; CABASSON, C. Optimized management of *Citrus* embryogenic callus for breeding programmes. **Fruits**, Montpellier, v.49, n.5/6, p.394-397, Sept./Dec. 1994. Special on Tropical Orchards.
- PASQUAL, M. **Regeneração de plantas *in vitro* e radiosensitividade de tecidos nucelares de citros**. Piracicaba: ESALQ, 1985. 106p. Dissertação de Doutorado.
- SIM, G.; LOH, C.; GOH, C. Direct somatic embryogenesis from protoplasts of *Citrus mitis* Blanco. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.7, p.418-420, 1988.
- VARDI, A.; SPIEGEL-ROY, P.; GALUN, E. Plant regeneration from *Citrus* protoplasts: variability in methodological requirements among cultivars and species. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.62, p.171-176, 1982.