

Análise de poliembrionia em *Citrus*, máxime em toranjas

J. T. A. GURGEL

Assistente e docente-livre da Escola Superior de Agricultura
"Luiz de Queiroz", de Piracicaba

J. SOUBIHE SOB^o.

Engenheiro Agrônomo, Secção de Citricultura e Frutas
Tropicais, Instituto Agronômico de Campinas

ÍNDICE

1 —	Introdução	728
2 —	Número de sementes por fruto e características dos embriões e cotilédones	730
3 —	Análise da poliembrionia	731
	A — Material e método	731
	B — Contagem direta na semente — Dados do quadro 2	732
	C — Contagem após a germinação	733
4 —	Análise estatística da poliembrionia pela Série de Poisson	735
	A — Generalidades	735
	B — Principais espécies poliembriônicas	736
	Processo direto — dados do quadro 2	736
	Processo após a germinação	737
5 —	Análise da variabilidade da poliembrionia pelo teste de diferenças de médias	737
	A — Generalidades	737
	B — Variação entre plantas da mesma espécie e no mesmo ano	738
	C — Variação entre colheitas de uma mesma planta em diferentes anos	739
	D — Variação entre os processos direto e após a germinação, no mesmo ano	740
6 —	Resumo e conclusões	741
7 —	Summary	743
	Agradecimentos	744
	Literatura citada	744

1 — INTRODUÇÃO

O presente trabalho faz parte de um plano de colaboração sôbre melhoramento de *Citrus* estabelecido, em 1938, entre a Secção de Genética, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", de Piracicaba, e as Secções de Citricultura e Frutas Tropicais, Genética e Citologia, e Estação Experimental de Limeira, tôdas do Instituto Agronômico de Campinas.

A poliembrionia representa uma parte importante no melhoramento das plantas. Entre os vários embriões, produzidos na semente, temos que distinguir os nucelares do sexual. O reconhecimento, ainda no viveiro, das plantas oriundas de um ou outro tipo, se faz primeiramente pelo conjunto de caracteres que elas apresentam; naturalmente, se houve algum cruzamento, a planta oriunda do embrião sexual é diferente das demais. Após a descoberta de um gen marcador, como acontece nos *Citrus*, do caráter dominante trifoliado do *Poncirus*, torna-se fácil a distinção entre a planta oriunda do embrião sexual e a dos nucelares. Maiores detalhes sôbre a importância da poliembrionia no melhoramento dos *Citrus* são dados nos trabalhos de TOXOPEUS (1930-31), WEBBER (1931-1932-1943), SWINGLE (1932), TÔRRES (1936), HODGSON (1938), BRIEGER, MOREIRA e LEME (1941), MOREIRA (1941), MOREIRA e GURGEL (1941), BRIEGER e MOREIRA (1945) e LEROY (1947).

Três são as possibilidades de formação de embriões adicionais em *Citrus*, além do sexual:

1) O modo comum de se formarem embriões adicionais em *Citrus* é pelo crescimento de células do nucelo, havendo ligeira preferência das células da região do micrópilo [ver STRASSBURGER (1878), OSAWA (1912), WEBBER (1900, 1931) e TRAUB (1931)].

2) A possibilidade de o embrião sexual dividir-se em dois, que, neste caso, são gêmeos idênticos; esta divisão dá-se num estágio jovem do embrião, quando este ainda é formado por poucas células, conforme citação de FROST (1926).

3) Pela formação de dois sacos embrionários, o que daria também dois embriões sexuais; caso mostrado por BACCHI (1944). Aqui devemos frisar que, nos dois últimos processos, temos uma duplicação de embriões sexuais. Para os que desejarem maiores informações sôbre poliembrionia em *Citrus*, citaremos o resumo da literatura dado por SWINGLE (1943) em *Citrus Industry* e, de modo geral, sôbre poliembrionia, o recente livro de MAHESHWARI (1950) intitulado "An Introduction to the Embryology of Angiosperms."

QUADRO 1

Número de sementes por fruto em várias espécies e híbridos de Citrus

Espécies ou híbridos	Anos	Número de			Sementes por fruto	Extremos de variação
		árvores	frutos	sementes		
<i>Citrus pectinifera</i>	48/49	6	219	1.265	5,77	2 a 12
<i>Citrus limão x lima</i>	48/49	6	59	1.018	17,25	3 a 27
<i>Citrus histrix</i>	48/49	4	29	875	30,17	20 a 47
<i>Citrus</i> sp.	48/49	6	19	1.797	94,57	35 a 133
Toranja chinesa	48/49	6	17	2.239	131,70	42 a 181
Toranja melancia	48/49	6	36	1.496	41,55	13 a 78
Toranja inermis	48/49	6	18	2.074	115,22	66 a 152
Toranja Kaune Paune	48/49	6	18	2.315	128,61	60 a 167
Toranja sunshine	48/49	6	18	1.511	83,94	34 a 129
Toranja vermelha	48/49	6	18	2.012	111,77	64 a 126
Toranja Singapura	48/49	6	19	2.145	112,89	44 a 175
Toranja periforme	48/49	6	18	2.053	114,05	62 a 164
Toranja Zambao	48/49	6	19	1.739	91,57	25 a 141
Toranja doce	48/49	6	18	1.543	85,72	53 a 114
Toranja Indochina	48/49	6	18	2.701	150,05	87 a 185
Toranja Lau-Tau	48/49	5	14	777	55,50	22 a 113
Toranja Shantenayau	48/49	6	17	1.579	92,88	11 a 143
Toranja Stamesa	48/49	6	17	2.065	121,47	94 a 146

Pelo exposto, vemos que era indispensável um levantamento do grau de poliembriõnia de tôdas as variedades, híbridos e espécies da coleção da Estação Experimental de Limeira; a primeira parte já foi publicada num extenso trabalho de MOREIRA, GURGEL e ARRUDA (1947) e, a segunda, aliás bem menor do que a primeira, faz parte da presente publicação. Aqui também estudamos, de modo especial, a poliembriõnia nas toranjas.

Finalmente, desejamos acrescentar que, no presente trabalho, analisamos a adaptação da poliembriõnia à conhecida série de Poisson, aumentando assim o nosso conhecimento sôbre fenômenos biológicos seguindo leis matemáticas.

2 — NÚMERO DE SEMENTES POR FRUTO E CARACTERÍSTICAS DOS EMBRIÕES E COTILÉDONES

Para maior facilidade de explicação, organizamos o quadro 1, onde damos os números de sementes por fruto, bem como os extremos de variação. Com exceção dos 4 primeiros *Citrus*, que compreendem duas espécies, um híbrido e um tipo desconhecido, os demais representantes são todos constituídos de variedades de toranjas, num total de 14.

As toranjas apresentam, no geral, um grande número de sementes por fruto; assim, a toranja melancia tem, em média, 42 sementes por fruto, e a toranja Indochina chega a ter até 150; nestas, os extremos de variação do número de sementes por fruto vão de 13 a 185.

Todos os valores dados no quadro 1 são provenientes de contagens de dois anos e, portanto, bastante exatos.

Estudando os tamanhos dos cotilédones, resolvemos classificá-los em 4 grupos: grandes, médios, pequenos e muito pequenos. Os muitos pequenos foram encontrados somente nas espécies ou híbridos de média e alta poliembriõnia. Assim, o *Citrus pectinifera*, o *Citrus limão x lima* e o *Citrus histrix* têm os cotilédones grandes de 0,8 cm.; os médios, de 0,6 cm.; os pequenos, de 0,4 cm., e, finalmente, os muito pequenos, de 0,2 cm.

Para este último caso, os cotilédones podem ter tamanhos iguais ou diferentes e de consistência gelatinosa, principalmente os pequenos e muito pequenos; a côr é em geral esverdeada.

As toranjas, em geral, são monoembriônicas, isto é, possuem um único embrião; os seus cotilédones têm consistência dura e sua coloração é branca. Encontramos cotilédones com 2 tamanhos e, às vêzes, até com 3 tamanhos. Nas toranjas, os cotilédones

nes grandes variam de 1,1 a 1,3 cm.; os médios, de 0,9 a 1,1 cm., e os pequenos, de 0,5 a 0,7 cm.

Se confrontarmos os tamanhos dos embriões chamados pequenos com os médios de *Citrus*, verificaremos que são praticamente iguais.

Como as toranjas são monoembriônicas, os embriões são bem desenvolvidos, e os seus cotilédones têm tamanhos iguais.

3 — ANÁLISE DA POLIEMBRIÃO

A — *Material e método*

O material utilizado no presente trabalho foi colhido de árvores da coleção da Estação Experimental de Limeira, do Instituto Agrônomo de Campinas.

Para evitarmos as interferências de fatores que pudessem influir nos resultados da poliembrião, como variabilidade entre árvores e galhos de uma mesma árvore, a colheita se processou da seguinte maneira: escolhemos 3 árvores para cada espécie ou híbrido, e, de pontos diferentes da árvores, colhemos determinado número de frutos normais; extraímos as sementes de cada fruto, as quais foram lavadas, contadas e secadas à sombra, separadamente; quando se atingiu o total de 200 sementes por árvore, passamos a colhêr frutos de outra, e assim sucessivamente. O número de árvores por espécie ou híbrido, às vezes, foi menor do que 3, em virtude de falhas na coleção ou, então, porque as árvores não tinham frutos suficientes para os nossos experimentos.

A determinação do número de embriões foi efetuada pelos 2 métodos seguintes: a) contagem direta na semente; b) contagem dos embriões germinados, também chamado contagem após a germinação.

Para cada método, empregaram-se 300 sementes por espécie ou híbrido. Na contagem direta, retiramos a película (testa) e dissecamos os embriões, às vezes com auxílio de uma lente. Deve-se ter muito cuidado quando se dissecam embriões de sementes de alto grau de poliembrião, como no nosso caso, os de *Citrus pectinifera*, porque muitos embriões minúsculos são encontrados dentro dos cotilédones dos embriões maiores e, também, do lado que foi o micrópilo. Quando encontramos embriões minúsculos do lado do micrópilo, eles podem estar soltos ou presos à película que recobre os embriões. Assim, deve-se retirar a película, lentamente, para evitar que os embriões venham juntos com a mesma; isso nos obriga a examinar a película antes de jogá-la fóra.

No *Citrus histrix* encontrou-se uma semente contendo 2 embriões com cotilédones opostos e, também, uma semente com 3 embriões, sendo que um deles estava localizado no lado oposto.

Observamos, em quase a totalidade das espécies ou híbridos estudados, que muitos embriões eram compostos de 3 cotilédones.

Para a determinação do número de embriões pelo método após a germinação, semeamos, 300 sementes de cada espécie ou híbrido, num canteiro bem preparado. Depois de 60 dias, procedemos ao arrancamento das plantinhas, com todo o cuidado, para que a película externa (testa) não se desligasse dos embriões, evitando, assim, dúvida quanto à origem dos embriões encontrados. Retirando a película exterior, já quase completamente decomposta, efetuamos a contagem dos embriões germinados.

A maioria dos embriões apresentou-se com um caulículo e uma radícula. Os muito pequenos não germinaram, o que sempre se dá em sementeira comum.

A contagem direta foi levada a efeito durante 2 anos, enquanto que a contagem após germinação realizou-se em um único ano. Se assim procedemos, foi porque houve grande variação entre a contagem dos embriões germinados e a contagem direta nas sementes, de sorte que achamos desnecessária a repetição do 1.º método de contagem.

O número de sementes utilizadas na contagem direta, durante 2 anos, bem como na contagem após a germinação, foi de 10.800 e 5.000, respectivamente.

B — Contagem direta na semente

Dados do quadro 2 — *Citrus* diversos e toranjas

Citrus pectinifera — Foram examinados 3 plantas durante 2 anos, 1948 e 1949. De todos os *Citrus* examinados neste trabalho, esta espécie foi a que deu poliembriõnia mais alta, chegando a apresentar até 7 embriões por semente. A percentagem de poliembriõnia variou de 94,12 até 80,00, com valor médio de 89; a média de embriões por semente foi de 3,64 a 2,77, com valor central de 3,28. De modo geral, os resultados de poliembriõnia de 1949 foram levemente inferiores aos obtidos em 1948; como veremos mais adiante, as diferenças de poliembriõnia entre as plantas 1, 2 e 4 que, à primeira vista, parecem pequenas e sem

importância, revelaram que tal não acontece, conforme os testes estatísticos.

Citrus limão x lima — Sendo os dados obtidos nos dois anos de 1948 e 1949 muito semelhantes, reunimo-los num único valor. Como vemos, obtivemos sementes até com 4 embriões, sendo a poliembrião cêrca de 40% e a média de embriões de 1,51. Tratando-se de um híbrido ainda pouco conhecido, a determinação da poliembrião foi baseada num número bastante alto de sementes, perto de 1.000.

Citrus histrix (papeda) — Tendo examinado já diversas papedas de origens diferentes, temos notado que há bastante variação na questão da poliembrião. Assim, em trabalho anterior, MOREIRA, GURGEL e ARRUDA (1947), examinando papedas de duas diferentes origens, acharam que ambas eram monoembriônicas; o mesmo não aconteceu com as 4 plantas provenientes da Estação Experimental de Limeira, onde chegamos a achar sementes até com 4 embriões, dando percentagem de poliembrião de 23,0 e média de embriões por semente de 1,30. A variação entre os indivíduos, nos dois anos, foi muito pequena e, por isso, resolvemos apresentar os dados reunidos dessas 2 plantas.

Citrus sp. — Praticamente podemos dizer que esta espécie é monoembriônica, pois, num total de 600 sementes examinadas de 3 diferentes plantas, em 2 anos, encontramos apenas 1 semente com 2 embriões, isto é, apenas 1 embrião adicional. A percentagem de poliembrião é baixíssima, de 0,17%, e a média de embriões por sementes é praticamente a unidade.

Toranjás (C. grandis) — Já é conhecido que as toranjás são monoembriônicas. Examinando cêrca de 14 tipos diferentes, achamos que apenas uma, a toranja chinesa, apresentou, em quase 900 sementes, 7 sementes de 2 embriões, o que dá uma poliembrião baixíssima, não atingindo nem 1%; estas observações referem-se a 3 plantas, em 2 anos.

Das demais toranjás examinadas, foram *monoembriônicas as seguintes* variedades: melancia, inermes, Kaune Paune, shunshine, vermelha, Singapura, periforme, Zamboa, doce, Indochina, Lau Tau, Shantenyau, e Siamesa; tôdas as observações foram sempre baseadas em 3 diferentes plantas e nos dois anos, 1949 e 1950.

C — Contagem após a germinação

Como temos pouco exemplos, não organizamos os resultados em quadro.

Citrus pectinifera — Num total de 99 sementes, obtivemos, para 1, 2, 3 e 4 embriões por semente, a seguinte distribuição : 38, 45, 12 e 4. A poliembriõnia foi de 61,61% e a média de embriões por semente de 1,82; nestes dados estão incluídos os resultados de 3 plantas diferentes. Vemos, por estes exemplos, que a poliembriõnia obtida após a germinação das sementes foi menor do que a obtida pelo processo direto, como foi mostrado no quadro 2.

Citrus limão x lima — Foram examinadas 236 sementes, e os resultados obtidos para 1, 2 e 3 embriões, por semente, foram os seguintes : 202, 45 e 2. A percentagem de poliembriõnia foi de 17,30 e a média de embriões por semente de 1,19. Também para estes *Citrus* as observações foram baseadas em 3 plantas; os resultados obtidos por este processo são inferiores àqueles obtidos pelo processo direto, conforme vemos no quadro 2.

Citrus histrix (papeda) — Em cerca de 300 sementes, provenientes de 3 plantas, só foi obtida uma única plantinha por semente; embora a papeda tenha dado quase 23% de poliembriõnia pelo processo direto, todavia, pelo processo após a germinação, mostrou ser monoembriônica.

Citrus sp. — Nas 3 plantas examinadas, com cerca de 300 sementes, obtivemos apenas 1 semente com 2 embriões. A percentagem de poliembriõnia foi muito baixa, de 0,40, e a média de embriões por semente praticamente 1,0.

Toranja chinesa (Citrus grandis) — Também obtivemos 1 semente com 2 cotilédones, num total de 300 sementes, o que dá uma percentagem de poliembriõnia de 0,40; a média de embriões por semente foi também a unidade.

Toranjias em geral — As demais variedades estudadas, num total de 14, já enumeradas no capítulo sobre o processo direto, mostraram ser monoembriônicas. As observações foram baseadas em 3 plantas e, quase sempre em cerca de 300 sementes.

Outro fato interessante é que muitas das toranjias, após a germinação, mostravam uma ramificação do caulículo na região do colo, o que dava a impressão, à primeira vista, de que eram poliembriônicas. Por essa razão, recomenda-se, na contagem da poliembriõnia, o arrancamento das plantinhas, para então facilmente podermos precisar se se trata de poliembriõnia verdadeira ou ramificação do caulículo.

4 — ANÁLISE ESTATÍSTICA DA POLIEMBRIONIA PELA SÉRIE DE POISSON

A — Generalidades

Em trabalho anterior, MOREIRA, GURGEL e ARRUDA (1947) e, mais recentemente, GURGEL e SOUBIHE (1951), trataram exaustivamente do problema da adaptação da distribuição da poliembrionia à série de Poisson. Os primeiros trabalharam com *Citrus* e, os últimos, com *Myrtaceae* frutíferas; destarte, iremos tratar a questão, apenas superficialmente.

As características essenciais da série de Poisson e o método de calcular as frequências esperadas, o subsequente cálculo dos qui-quadrados de cada classe, foram dados em detalhe por GURGEL (1945). Atualmente, para o cálculo das frequências esperadas, estamos-nos utilizando de uma ótima tábua, publicada por MOLINA (1945), a qual traz já calculadas as frequências esperadas para cada classe, com valores da média da distribuição desde 0,001 até 100. Ainda mais, para satisfazer a uma condição teórica, no cálculo do qui-quadrado das classes, temos que reunir frequências esperadas para obter valores maiores do que 5, e, para isso, nessa mesma publicação, existe outra tábua que já traz, acumuladas, as frequências esperadas para os mesmos valores da média acima examinada. Assim, para obtermos os valores das frequências esperadas para determinado valor da média, basta multiplicar os valores da tábua pelo número total de valores observados.

Resumindo, podemos dar as seguintes características da distribuição de Poisson: a) trata-se de uma série descontínua, na qual as frequências das classes só podem ser números inteiros e positivos b) a primeira classe teórica tem sempre o valor zero, e, em consequência disto, a pressão do limite zero geralmente se manifesta, tornando a distribuição assimétrica; c) a frequência dos acontecimentos esperados é tão pequena em relação ao número total de acontecimentos possíveis, que a frequência observada é praticamente independente do número total de observações.

Para a poliembrionia foi necessário fazer um pequeno artifício, para que a adaptação de Poisson fôsse perfeita; como facilmente se depreende, na poliembrionia estamos de fato interessados, não no número total de embriões, isto é, incluindo as sementes com um único embrião, mas sim no número de embriões adicionais. Fazendo êste raciocínio, subtraímos a unidade do valor da média de poliembrionia e teremos a verda-

deira média que procuramos; baseados neste valor da média, calculamos as frequências esperadas para cada classe.

Para economizar quadros de difícil composição, iremos dar aqui apenas os somatórios dos qui-quadrados para cada análise, sabendo de antemão que os testes das classes individuais deram resultados satisfatórios.

B — Principais espécies poliembriônicas

Processo direto — Dados do quadro 2

Das espécies ou híbridos discutidos neste trabalho, somente de alguns deles poderemos fazer uma análise estatística segundo a série de Poisson, pois os demais representantes têm poliembrionia muito baixa. Assim, iremos discutir os seguintes:

Citrus pectinifera — Para esta espécie, temos os resultados de 3 plantas e em dois anos, como veremos mais adiante, quando tratarmos da variabilidade entre plantas. O teste estatístico de delta revelou que as médias de poliembrionia dos indivíduos eram diferentes entre si, razão pela qual iremos dar, em separado, o valor de qui-quadrado de cada indivíduo. Como vemos nas duas últimas colunas do quadro 2, os valores dos somatórios de qui-quadrado foram todos insignificantes, menores do que o nível convencional de 5% de probabilidade; com exceção do pé 4, no ano de 1949, que tem 4 graus de liberdade, os demais têm 5 graus de liberdade, e, para o nível de 5%, o valor somatório de qui-quadrado poderia ser até 11,07, de acordo com a tábua de BRIEGER (1946). Assim, vemos que todos eles são insignificantes; para 4 graus de liberdade, de acordo com a mesma tábua acima citada, o valor do nível de 5% é de 9,49 e, portanto, o valor achado de 2,09 é completamente insignificante; por outras palavras, podemos dizer que a distribuição da poliembrionia nestes *Citrus* segue a série de Poisson.

Citrus limão x lima — Neste caso analisamos os valores das frequências observadas de poliembrionia de dois anos reunidos e de 3 diferentes plantas, pois o teste de delta mostrou que essas médias não diferiam estatisticamente entre si. Mesmo com baixa poliembrionia, a análise estatística, dada pelo teste de qui-quadrado, revelou que a distribuição das frequências segue a série de Poisson, pois o valor do somatório de qui-quadrado é insignificante; com 3 graus de liberdade de que aqui dispomos, o nível de probabilidade de 5% é de 7,82.

Citrus histrix — (papeda) — Embora seja esta também espécie com média de poliembrionia bastante baixa, pois foi a-

penas de 0,51, mesmo assim obtivemos uma adaptação à distribuição de Poisson. Com 2 graus de liberdade, o valor do somatório de qui-quadrado poderia atingir, no nível de probabilidade de 5%, até 5,99, e notamos, no quadro 2, que o valor obtido de 0,18 é completamente insignificante.

Processo após a germinação

Como tínhamos apenas os dados de duas espécies e em um só ano, resolvemos discutir os resultados no texto, sem fazer um quadro especial.

Citrus pectinifera — Os valores de poliembrionia observados em 3 plantas, nas classes com 0, 1, 2 e 3 embriões adicionais, foram de 38, 45, 12 e 4; o total de sementes determinado foi de 99 e, o de embriões, de 180, o que dá uma média de 1,82 embriões por semente, ou de 0,82 embriões adicionais por semente. Os valores de qui-quadrado foram respectivamente de 0,83 — 2,44 — 0,41 — 0,11, com soma de 3,79, e 3 graus de liberdade; tanto os qui-quadrados individuais como o total são todos insignificantes, mostrando que a distribuição observada das plantinhas segue a série de Poisson.

Citrus limão x lima — Aqui também temos 3 árvores reunidas numa única estimativa, e os valores da frequência observada para as classes de 0,1 e 2 embriões adicionais foram de 202, 45 e 2; o número de sementes foi de 237 e, o de embriões, de 282, o que dá uma média de poliembrionia de 1,19, ou média de embriões adicionais de 0,19. Os valores de qui-quadrado para as 3 classes enumeradas tiveram que ser reunidos em apenas 2 classes, e são de 0,02 e 0,08, com soma de 0,10 e 1 grau de liberdade; naturalmente, tanto os valores individuais como o somatório do teste de qui-quadrado são insignificantes e, com isto, temos a prova de que a distribuição observada dos embriões após a germinação, também para este híbrido, segue a distribuição de Poisson.

5 — ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA POLIEMBRIONIA PELO TESTE DE DIFERENÇAS DE MÉDIAS

A — Generalidades

Fazendo aplicação do teste de delta para avaliar diferenças de médias de poliembrionia, quer entre indivíduos, quer entre anos, poderemos muito mais seguramente julgar os resultados;

assim, utilizando o mesmo teste estatístico, iremos aqui aplicá-lo aos *Citrus*.

A primeira vista, parecerá a muitos que o próprio teste de qui-quadrado seria suficiente para dizer se poderíamos ou não reunir os dados observados de plantas diferentes ou de vários anos, mas acontece que este teste é um teste de homogeneidade dentro da distribuição considerada; êle nada nos diz se diferentes distribuições têm ou não médias diferentes, e, se somarmos as frequências observadas de duas ou mais distribuições que tenham médias diferentes entre si, é perfeitamente possível que o teste de qui-quadrado mostre que também esta nova distribuição é homogênea. Em vista disso, foi necessário aplicar o teste de diferenças de médias, no nosso caso um delta, que é o único que mostra se as médias de poliembrionia das distribuições comparadas podem ou não ser confundidas em uma única distribuição.

B — Variação entre plantas da mesma espécie e no mesmo ano

Tendo determinado, em quase todos os *Citrus* aqui analisados, a poliembrionia em 3 diferentes plantas de cada espécie, variedades ou híbridos, foi fácil verificarmos se havia ou não diferenças entre as plantas consideradas.

Como podemos ver no quadro 2, demos as contagens de poliembrionia separadamente para 3 plantas de *Citrus pectinifera* em dois anos, de 1948 e 1949, utilizando-nos do processo direto de contagem dos embriões na semente. Para calcularmos o teste de diferença de médias, utilizamos a seguinte fórmula :

$$\begin{aligned} \text{diferença de duas médias} &= \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sigma \text{ dif } \bar{x}} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\sigma^2 \bar{x}_1^2 + \sigma_2^2}} = \\ &= \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{\sigma x_1^2}{N_1} + \frac{\sigma x_2^2}{N_2}}} \end{aligned}$$

$$nf = N_1 + N_2 - 2$$

Aplicando essa fórmula, calculamos os valores do teste de delta, dados no quadro 2; nesse mesmo quadro encontramos os valores do desvio padrão da distribuição da poliembrionia para cada planta.

Analisando as plantas 1, 2 e 4 do ano de 1948, iremos notar que somente as médias de poliembrionia das plantas 1 e 2 foram diferentes entre si, como mostrado pelo valor de delta, de 2,16, maior do que aquele do nível de 5% de probabilidade, que é de 1,96; as demais diferenças de médias de poliembrionia das plantas 2 e 4 e, 1 e 4 são insignificantes. Isto nos indica que as médias de poliembrionia das plantas 1 e 4 ou 2 e 4 pertencem à mesma população.

A mesma análise de médias estendemos ao ano de 1949, para as mesmas plantas 1, 2 e 4, só que aqui os resultados foram diferentes do que para o ano anterior; como podemos notar no quadro 2, o teste de delta indicou que somente a diferença das médias de poliembrionia das plantas 1 e 2 é estatisticamente insignificante, e que as demais diferenças, como das médias das plantas 2 e 4 ou 1 e 4, são significantes, mesmo que se considerem níveis de 1% ou 1%; todavia, para os casos que estamos estudando, o nível de significância de 5% é satisfatório (valor de delta de 1,96). Portanto, somente as distribuições das plantas 1 e 2 é que poderiam ser confundidas.

Para os demais *Citrus* que constam da parte inferior do quadro 2, os testes de delta indicaram que as diferenças das médias das plantas estudadas foram insignificantes entre si, e que, por essa razão, pudemos reuni-los numa única estimativa.

Pelo exposto, percebemos que somente um teste estatístico nos pode fornecer os elementos para distinguir diferenças entre as médias de poliembrionia discutidas, às vezes aparentemente tão pequenas e que doutra maneira nos passariam despercebidas.

C — Variação entre colheitas de uma mesma planta em diferentes anos

Para discutirmos este assunto, iremos tomar os mesmos valores das médias do *Citrus pectinifera* dados no quadro 2; aí temos os resultados em dois anos diferentes. Na análise da diferença das duas médias, iremos usar o teste de delta, cuja fórmula demos no capítulo anterior. Fazendo a comparação entre as médias, iremos notar o seguinte: a diferença entre as médias de poliembrionia da planta 1 nos anos de 1948 e 1949 deu um delta de -2,19, que é significativa, tomando-se o nível de 5% como referência (delta de 1,96); para a planta 2, a diferença entre os dois anos deu um delta de 0,48, que é insignificante, e, finalmente, para a diferença da média de poliembrionia da planta

4, o teste delta foi de -3,10, que é significativo. Por outras palavras, somente as médias de poliembrião da planta 2 nos dois anos de 1948 e 1949 não diferem entre si, isto é formam uma população uniforme, sendo que as demais são diferentes entre si.

Como conclusão, podemos dizer que o grau de poliembrião de uma mesma planta pode variar ou não de um ano para outro. As causas que provocam essa variação, entre anos, para umas plantas, e deixam de fazê-lo para outras, dificilmente poderão ser conhecidas.

D — *Variação entre os processos direto e após a germinação, no mesmo ano*

A fim de melhor apreciarmos as diferenças entre as médias de poliembrião obtidas pelos dois processos, organizamos o quadro 3, onde damos exemplos dos mesmos *Citrus* já anteriormente estudados. Como vemos, para o *Citrus* sp. e a toranja chinesa o baixíssimo grau de poliembrião encontrado não permitiu uma análise estatística, mas provavelmente a diferença encontrada não tem importância.

Na análise da diferença entre as médias de poliembrião determinada pelos dois processos — direto e após a germinação — utilizamos o teste de delta, cuja fórmula demos anteriormente.

Como vemos no quadro 3, para o *Citrus pectinifera*, a diferença da média de poliembrião obtida pelos dois processos foi de 1,57, e, fazendo o teste de delta, achamos o valor de 13,08, que é altamente significativo (delta, no nível de 5% corresponde a 1,96). Assim, não resta a menor dúvida de que as médias dos processos direto e após a germinação diferem muitíssimo entre si, dando o primeiro resultados muito mais altos que o segundo para melhor apreciarmos estes fatos, damos, na última coluna do quadro 3, a diferença de poliembrião entre os dois processos expressa em percentagem, que, neste caso, está ao redor de 30%.

Para o híbrido *limão* x *lima*, obtivemos resultados idênticos ao anterior, sendo o delta da diferença das médias de poliembrião dos dois processos de 9,50, que é também altamente significativo. A diferença entre a poliembrião dos dois processos é cerca de 30% idêntica à do anterior. Com isto, vemos que, mais uma vez, no processo direto, podemos contar bem mais embriões do que quando usamos contar as platinhas após germinação das sementes.

Conforme nos referimos no início dêste capítulo, para o *Citrus* sp. e toranja chinesa a diferença entre os dois processos estudados é pequeníssima, praticamente desprezível, razão pela qual não compensa aplicarmos testes estatísticos, para verificarmos se essas diferenças são ou não significantes.

Como conclusão, podemos dizer que, de modo geral, a contagem direta de embriões na semente dá resultados maiores do que no processo após a germinação, conclusão esta a que MOREIRA, GURGEL e ARRUDA (1947) já haviam chegado em trabalho anterior sôbre *Citrus*.

6 — RESUMO E CONCLUSÕES

1 — O presente trabalho é um complemento aos estudos de poliembrionia efetuados sôbre *Citrus* e publicados primeiramente por MOREIRA GURGEL e ARRUDA (1947). Faz parte do plano de estudos sôbre o melhoramento dêste importante gênero, estabelecido entre as Secção de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", de Piracicaba, e as Secções de Citricultura e Frutas Tropicais, Genética e Citologia, e Estação Experimental de Limeira, tôdas do Instituto Agronômico de Campinas. Discute-se a origem da poliembrionia em *Citrus*: a) embriões provenientes de células nucelares, sendo, portanto, apogâmicos; b) embriões provenientes de mais do que um saco embrionário; c) embriões oriundos por clivagem, do embrião sexual, originando gêmeos idênticos.

2 — Para *Citrus pectinifera*, híbrido limão x lima, *Citrus histrix* e *Citrus* sp., o número médio de sementes por fruto foi, respectivamente, de 5,8, 17,3, 30,2 e 94,6; para as 14 toranjas estudadas, o número médio de sementes por fruto foi de 100, e os extremos de variação de 11 a 185 sementes (quadro 1); nos três primeiros *Citrus* acima enumerados, os embriões foram classificados em 3 tamanhos: grandes, de 8 mm.; médios de 6 mm., e pequenos, de 4 mm.; a cor dos cotilédones era, no geral, verde, e os embriões pequenos eram de consistência gelatinosa. As toranjas, que, na quase totalidade, tinham um só embrião, apresentavam certa consistência dos cotilédones.

3 — Na determinação da poliembrionia, foram utilizados dois processos: a) contagem direta dos embriões na semente; b) contagem dos embriões após a germinação. Os resultados foram expressos por dois modos diferentes: média do número de embriões por semente e percentagem dos embriões existentes, ou, como chamamos, percentagem de poliembrionia. Pelos dois processos foram determinadas 3 espécies de *Citrus*,

1 híbrido e 14 toranjas, em dois anos consecutivos. No processo direto (quadro 2), o *Citrus pectinifera* deu o maior valor, cêrca de 90% de poliembriõnia e média de embriões de 3,28; o *Citrus histrix*, ou papeda, que anteriormente sempre se revelou monoembriônico, deu 24% de poliembriõnia e 1,30 de média de embriões por semente; o *Citrus* sp. deu um valor baixíssimo de poliembriõnia, de 0,17%, e média 1; o híbrido *limão x lima* deu 40% e média 1,51. Das toranjas, a única que deu poliembriõnia, embora baixíssima, foi a chinesa, de 0,78; as demais são tôdas monoembriônicas: melancia, inerme, Kaune Paune, shunshine, vermelha, Singapura, periforme, Zamboa, doce, Indochina, Lau Tau, Shantenyau e Siamesa.

Para o processo após a germinação, os resultados são, no geral, menores do que no processo direto. Assim: *Citrus pectinifera* deu 61,61 de poliembriõnia, portanto cêrca de 30% de diferença para o processo direto; a média de embriões por semente foi de 1,82 e a diferença foi de 1,46; o *C. histrix*, ou papeda, mostrou-se monoembriônica, pois só germinou 1 único embrião; isto é devido ao fato de os embriões excedentes serem pequenos e ainda não bem formados, pois são de consistência gelatinosa; para o híbrido *limão x lima*, a poliembriõnia determinada após germinação foi de 17% e a diferença entre êste processo e o direto foi de 22,70%, e a média de embriões por semente foi de 1,51, e a diferença para o primeiro processo foi de 0,32. Para o *Citrus* sp. e toranja chinesa a poliembriõnia após a germinação foi baixíssima e quase não há diferença entre os dois processos; as 13 toranjas restantes, já enumeradas anteriormente, foram monoembriônicas; chamou-se a atenção para o fato, que é comum nas toranjas, de haver uma ramificação do caulículo na região do colo, o que dava, à primeira vista, a impressão de que elas eram poliembriônicas; sômente arrancando-se as mudinhas é que se pode notar êsse fato.

4 — Foram dadas as razões por que se pensava que a distribuição por frequência da poliembriõnia nos *Citrus* seguisse a Série de Poisson, e a seguir deu-se a prova estatística (quadro 2); os valores individuais, bem como os totais do teste de qui-quadrado mostram que a poliembriõnia nos *Citrus* estudados, como *pectinifera*, *limão x lima* e *histrix* segue a referida série, pois todos os valores foram insignificantes; discutiu-se também a mesma adaptação da poliembriõnia à série de Poisson para os valores obtidos após a germinação das sementes para os mesmos *Citrus* acima referidos.

5 — Estudou-se a variabilidade da poliembriõnia sôbre vários aspectos, utilizando-se do teste de diferença de médias: a)

variação entre plantas da mesma espécie e no mesmo ano. Mostrou-se que pode haver diferenças significantes entre as médias de poliembrionia entre plantas da mesma espécie; como podemos vêr no quadro 2, alguns deltas da comparação entre plantas do *Citrus pectinifera* foram significantes; b) variação entre colheitas da mesma planta em diferentes anos. Analisando a diferença entre as médias de poliembrionia entre as plantas do *Citrus pectinifera* nos anos de 1948 e 1949 (quadro 2) achamos os seguintes valores: planta 1, delta de -2,19, significante; planta 2: delta de 0,48, insignificante; planta 4: delta de -3,10 significante; c) variação entre os processos direto e após a germinação, no mesmo ano. Para melhor mostrar estas variações entre processos, organizamos o quadro 3. Aí vemos, na coluna do teste de delta, que, para *Citrus pectinifera*, *limão x lima* e *histrix* há diferenças altamente significantes entre os dois processos, dando o processo de contagem dos embriões diretamente na semente resultados sempre maiores. Isto é, fácil entender-se, uma vez que, no processo de germinação da semente, muitos dos embriões médios, pequenos ou muito pequenos não conseguem germinar, quer por concorrência dos embriões maiores, quer por não estarem ainda completamente desenvolvidos.

7 — SUMMARY AND CONCLUSIONS

1 — This paper is a joined publication of the Dept. of Genetics, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", University of São Paulo, and Secção de Citricultura e Frutas Tropicais, Instituto Agronômico, de Campinas, and deal with the number of seed per fruit and the polyembryony in *Citrus*, with special reference to the pummelos (*C. grandis*).

2 — For *C. pectinifera*, hibrid *limon x acid lime*, *C. histrix* and *Citrus sp.* the mean of seeds per fruit is 5,8 - 17,3 - 30,2 - 94,6; for 14 pummelos the average was 100 and the range of variation 11 to 185 seeds per fruit. For the four above mentioned *Citrus* the cotyledons were classified into 3 types: big (near 8 mm.), medium (near 6 mm) and small (near 4 mm) and for the pummelos there was only one size of cotyledons, about 10 mm (table 1).

3 — The polyembryony was determined by two processes: a) counting of the embryos in the mature seed; b) counting after germination in flats or seed-beds. The results obtained are in table 2; the process a gave larger results than process b.

The following pummelos are monoembryonics: melancia, inermé, Kaune Paune, sunshine, vermelha, Singapura, periforme, Zamboa, doce, Indochina, Lau-Tau, Shantenyau and Siamesa. Sometime it was found a branching of the main stem that gave a impression of polyembryonic seeds.

4 — It was shown by the x2 test that the distribution of embryo numbers fits the Poisson's series (table 2) in both processes.

5 — It is discussed in table 2 the variability of polyembryony for the following cases: a) between plants, within years. The teste for the differences of mean of polyembryony between 3 plants of *C. pectinifera* is statistically significant in 1948 and 1949; b) between yields of the same plant, within year. The same case of *C. pectinifera* may be used for this purpose; c) between process, within year. It is shown in table 3, for *C. pectinifera* and the hibrid "limon x acid lime" that there is a statistically signicant between both process above mentioned.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao prof. F. Brieger e eng. agr. Silvio Moreira, respectivamente, Chefes das Secção de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" e da Secção de Citricultura e Frutas Tropicais do Instituto Agrônômico de Campinas, pelas sugestões e orientações dadas no desenvolvimento dêste trabalho; aos engenheiros agrônomos Clovis de Toledo Pisa e Carlos Roessing, Chefes da Estação Experimental de Citricultura de Limeira, pelo fornecimento de material científico do pomar da referida Estação Experimental.

LITERATURA CITADA

- STRASSBURGER, E., 1878 — Ueber Polyembryonie. Jenaische Ztschr. fur Naturw. 12: 647-667.
- WEBBER, H. J., 1900 — Complications in Citrus hybridization caused by polyembryony. Science 11: 308.
- OSAWA, I., 1912 — Cytological and experimental studies in Citrus. Jour. Col. Agr. Imp. Univ. Tokio 4: 83-116.
- FROST, H. B., 1926 — Polyembryony, Heterozygosis and Chimeras in Citrus. Hilgardia 1: 365-402.

- TOXOPEUS, H. J., 1930-31 — De Polyembrionie Van Citrus. Haar Betekenis Voor de Cultuur, Landbouw. 6: 1-15.
- WEBBER, H. J., 1931 — The economic importance of apogamy in Citrus and Mangifera. Proceed. Amer. Soc. Hort. Sci. 28: 57-61.
- SWINGLE, W. T., 1932 — Recapitulation of seedling characters by nucelar buds developing in the embryo sac of Citrus. Proceed. Sixty Internat. Cong. Genetics 2: 196-197.
- TORRES, J. P., 1932 — Progress report on Citrus Hybridization. The Philip. Jour. Agric. 3: 217-229.
- WEBBER, H. J., 1932 — Variation in Citrus Seedling and their Relation to Rootstock Selection. Hilgardia 7: 1-79.
- TRAUB, Hamilton P., 1936 — Artificial control of nucellar embryony in Citrus. Science 83: 165-166.
- TORRES, J. P., 1936 — Polyembryony in Citrus and study of hybrid seedlings Philip. Jour. Agrc. 7: 37-58.
- FROST, H. B., 1938 — The Genetics and Citology of Citrus. Current. Sci. Especial Number of Genetics. 24-27.
- HODGSON, R. W., 1938 — Effects on reproduction by nucellar embryony on clonal characteristics in Citrus. Jour. Heredity 29: 417-419.
- BRIEGER, F. G., S. MOREIRA e Z. LEME, 1941 — Estudo sobre melhoramento da laranja Baía III. Bragantia 1: 567-610.
- MOREIRA, S., 1941 — Experiências de cavalos para Citrus I. Bragantia 1: 525-565.
- MOREIRA, S. e J. T. A. GUARGEL, 1941 — A fertilidade do pólen e sua correlação com o número de sementes, em espécies e formas do gênero *Citrus*. Bragantia 1: 669-711.
- FROST, H. B., 1943 — Em Citrus Industry I (History, Botany, and Breeding) pg. 767-913. 1a. ed., Univ. Cal. Press, Berkeley e Los Angeles, U. S. A.
- SWINGLE, W. T., 1943 — Em Citrus Industry I (History, Botany and Breeding), pag. 129-472, 1a. ed., Univ. Cal. Press., Berkeley e Los Angeles, U. S. A.
- WEBBER, H. J., 1943 — Em Citrus Industry I (History, Botany and Breeding) pg. 475-668, 1a. ed., Univ. Cal Press, Berkeley e Los Angeles, U. S. A.
- BACCHI, O., 1944 — Observações citológicas em *Citrus* III. Megasporogênese, fertilização e poliembrionia. Bragantia 4: 405-412.

-
- GURGEL, J. T. A., 1945 — Análise Estatística da Distribuição de Poisson. Anais da E. S. A. "Luiz de Queiroz" 2: 300-319.
- BRIEGER, F. G., 1946 — Limites unilaterais e bilaterais na análise estatística. *Bragantia* 6: 479-546.
- MOREIRA, S., J. T. A. GURGEL e LINEU F. de ARRUDA, 1947 — Poliembrionia em *Citrus*. *Bragantia* 7: 69-106.
- LEROY, J. F., 1947 — La polyembryonie chez les "Citrus". Sont intérêt dans la culture et amélioration. *Rev. Bot. Appl. et Agr. Trop.* 301-302: 483-495.
- MAHESHWARÍ, P., 1950 — An Introduction to the Embryology of Angiosperms. pág. 400, 1a. ed., McGraw-Hill Book Company, Inc. New York.
- GURGEL, J. T. A. e J. SOUBIHE SOB., 1951 — Número de sementes por fruto e poliembrionia em *Myrtaceae* frutíferas. *Bragantia*, (em impressão).

QUADRO 2

Contagem dos embriões nas sementes, sem germiná-las (fecundação livre)

Espécies ou híbridos	Anos	Número de plantas	Número de		Distribuição da frequência de embriões								Embriões por semente \bar{x}	Poliembrionia %	Devio padrão da distribuição	Teste de		Série de Poisson	
			Sementes	Embriões	1	2	3	4	5	6	7	8				Comparação entre pés:		nf	
<i>Citrus pectinifera</i>	1948	1	113	359	12	24	40	17	10	9	1	—	3,18	89,38	± 1,41	1 : 2	— 2,16	5,62	5
	1948	2	100	359	6	12	34	22	18	7	1	—	3,59	94,00	± 1,33	2 : 4	+ 0,98	8,74	5
	1948	4	102	349	6	19	30	28	12	6	1	—	3,42	94,12	± 1,25	1 : 4	— 1,33	4,95	5
	1949	1	99	360	12	12	24	22	16	8	4	1	3,64	87,87	± 1,65	1 : 2	+ 0,71	5,98	5
	1949	2	100	349	9	17	25	26	14	7	1	1	3,49	91,00	± 1,33	2 : 4	+ 3,79	2,05	5
	1949	4	100	277	20	25	26	19	7	3	—	—	2,77	80,00	± 1,32	1 : 4	+ 4,14	2,09	4
		Número de árvores														Comparação entre anos			
Citrus limão x lima	48/49	6	621	938	375	188	45	13	—	—	—	—	1,51	39,61	—	48/49	+ 1,11	2,74	3
Citrus histrix	48/49	4	476	601	367	94	14	1	—	—	—	—	1,26	22,90	—	48/49	+ 0,40	0,18	2
Citrus sp.	48/49	6	600	601	599	1	—	—	—	—	—	—	1,00	0,17	—	—	—	—	—
Toranja chinesa	48/49	6	898	905	891	7	—	—	—	—	—	—	1,01	0,78	—	—	—	—	—

QUADRO 3

Comparação da poliembrionia determinada diretamente na semente e após germinação

Nome científico e vulgar	Ano	Direta		Após germinação		Comparação dos processos		Teste de delta	Diferença de poliembrionia %
		Embriões	Poliembr.	Embriões	Poliembr.	Direto	germinada		
		\bar{x}_1	%	\bar{x}_2	%	$\bar{x}_1 - \bar{x}_2$	$\sigma \text{ dif } \bar{x}$		
<i>Citrus pectinifera</i>	1948	3,39	92,38	1,82	61,61	1,57	± 0,12	13,08	30,77
<i>Citrus limão x lima</i>	1948	1,57	46,87	1,19	17,30	0,38	± 0,04	9,50	29,57
<i>Citrus histrix</i>	1948	1,24	20,60	1,00	0,00	—	—	—	20,60
<i>Citrus sp.</i>	1948	1,00	0,30	1,00	0,40	—	—	—	— 0,10
Toranja chinesa	1948	1,00	1,70	1,00	0,40	—	—	—	1,30