

**NOTAS CIENTÍFICAS**  
**POLIEMBRIONIA E FREQUÊNCIA**  
**DE HÍBRIDOS EM *CITRUS* SPP.<sup>1</sup>**

WALTER DOS SANTOS SOARES FILHO<sup>2</sup>, CÉLIO DOS SANTOS MOREIRA<sup>3</sup>,  
MARIO AUGUSTO PINTO DA CUNHA<sup>4</sup>, ALMIR PINTO DA CUNHA SOBRINHO<sup>5</sup>  
e ORLANDO SAMPAIO PASSOS<sup>6</sup>

RESUMO - Com o objetivo de estudar a relação entre o grau de poliembrionia e a frequência de híbridos em citros, foram realizados cruzamentos controlados utilizando como parentais femininos as tangerinas 'Clementina' e 'Sunki' e os limões 'Cravo' e 'Volkameriano', que apresentam graus de poliembrionia nulo, baixo, baixo a moderado e moderado, respectivamente. Como parentais masculinos empregaram-se *Poncirus trifoliata* e híbridos desta, tendo em vista a característica morfológica dominante folhas trilobadas. Observaram-se nas tangerinas 'Clementina' e 'Sunki' e nos limões 'Cravo' e 'Volkameriano' as seguintes frequências de híbridos: 57,4%, 53,6%, 18,6% e 14,2%, respectivamente. Foi verificada uma associação negativa entre o grau de poliembrionia e a frequência de híbridos.

POLYEMBRYONY AND HYBRIDS FREQUENCY IN *CITRUS* SPP.

ABSTRACT - Controlled crosses were done by using the mandarins 'Clementine' and 'Sunki', the 'Rangpur' lime and the 'Volkamer' lemon as female parents with none, low, low to moderate and moderate polyembryony degrees, respectively, and *Poncirus trifoliata* and its hybrids as male parents for its easily recognizable trifoliolate characteristic. The hybrid frequencies were 57.4%, 53.6%, 18.6% and 14.2% for 'Clementine', 'Sunki', 'Rangpur' and 'Volkamer', respectively. It was also observed a negative association between polyembryony degree and hybrids frequency.

A variabilidade genética presente em *Citrus* e gêneros afins é passível de ser explorada em hibridações visando ao desenvolvimento de novas

---

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 4 de junho de 1999.

<sup>2</sup> Eng. Agrôn., Dr., Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPq), Caixa Postal 007, CEP 44380-000 Cruz das Almas, BA. Bolsista do CNPq. E-mail: wsoares@cnpmf.embrapa.br

<sup>3</sup> Eng. Agrôn., M.Sc., Rua João Peixoto Neto, 234, CEP 44380-000 Cruz das Almas, BA.

<sup>4</sup> Eng. Agrôn., Dr., Embrapa-CNPq. E-mail: maugusto@cnpmf.embrapa.br

<sup>5</sup> Eng. Agrôn., M.Sc., Embrapa-CNPq. E-mail: almir@cnpmf.embrapa.br

<sup>6</sup> Eng. Agrôn., Embrapa-CNPq. E-mail: orlando@cnpmf.embrapa.br

variedades, particularmente porta-enxertos, adaptadas às mais diversas condições de cultivo (Swingle, 1967; Hearn et al., 1974). O melhoramento genético dos citros, porém, tem utilizado muito pouco esse potencial, haja vista que a grande maioria das cultivares em uso surgiu em decorrência de mutações espontâneas (Soost & Cameron, 1975). Essa situação é um reflexo de dificuldades relacionadas à poliembrionia, ao alto grau de heterozigiosidade e ao longo período pré-reprodutivo comumente observados nesse importante grupo de plantas (Cameron & Frost, 1968; Furr, 1969; Salibe, 1971; Soares Filho et al., 1994).

O emprego de marcadores morfológicos, especialmente da característica trifoliada presente em *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., e de marcadores moleculares, baseados em polimorfismos izoenzimáticos e de segmentos de DNA, tem permitido a separação de embriões zigóticos e nucelares oriundos de sementes poliembrionicas; quanto a redução do período pré-reprodutivo, técnicas de indução de florescimento vêm sendo aplicadas (Soares Filho et al., 1997).

Este trabalho teve como objetivo estudar a relação existente entre o grau de poliembrionia e a frequência de híbridos em cruzamentos controlados.

O estudo foi realizado na Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMPF), município de Cruz das Almas, Recôncavo Baiano, entre agosto de 1993 e julho de 1995, compreendendo polinizações controladas e o cultivo *in vitro* dos embriões provenientes das mesmas.

Baseando-se no grau de poliembrionia e na diversidade genética, foram escolhidas as seguintes variedades como parentais femininas: tangerina Clementina (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) (monoembrionica); tangerina Sunki (*C. sunki* Hort. ex Tan.) (poliembrionia baixa); limão Cravo (*C. limonia* Osb.) (poliembrionia baixa a moderada); limão Volkameriano (*C. volkameriana* Ten. et Pasq.) (poliembrionia moderada).

Em razão da característica folhas trilobadas, dominante e de fácil identificação visual, utilizou-se como parentais masculinos seleções de *P. trifoliata* (Barnes, Beneke e Diplóide) e híbridos desta espécie, a saber: citranges (*C. sinensis* (L.) Osb. x *P. trifoliata*) Argentina, Coleman, Cunningham, C13, C25, C35, Rusk, Sanford e Troyer; citrumelo (*C. paradisi* Macf. x *P. trifoliata*) Swingle; citrangequats (Kumquat 'Oval' (*Fortunella margarita* (Lour.) Swing.) x citrange Willits) Thomasville 1434 e 1439. O emprego de híbridos de *Poncirus trifoliata* deveu-se à reduzida disponibilidade de pólen desta espécie por ocasião da realização da presente pesquisa.

Os cruzamentos foram realizados de agosto a dezembro de 1993, em março de 1994 e de setembro a dezembro de 1994. O total de polinizações foi 1.050, sendo 479 em tangerina 'Clementina', 294 em tangerina 'Sunki', 220 em limão 'Cravo' e 57 em limão 'Volkameriano'. Flores recém-abertas dos parentais masculinos foram utilizadas em polinizações de flores dos parentais femininos, as quais sofreram emasculação antes da antese. A emasculação deu-se em botões florais próximos da abertura (estádio de balão), eliminando-se cuidadosamente as pétalas e anteras com auxílio de pinça e bisturi, evitando-se o contato com o estigma, estando este receptivo. No intuito de evitar contaminações com pólenes estranhos, após as polinizações as flores foram protegi-

das durante um período de 30 a 60 dias com sacos de gaze, verificando-se por ocasião da remoção destes o vingamento dos frutos, os quais permaneciam devidamente identificados nas plantas por etiquetas de metal.

Quatro ou cinco meses após a polinização os frutos foram colhidos e lavados em água corrente, seguindo-se a retirada das sementes. Estas, por sua vez, foram lavadas com solução de água e detergente, secadas e despojadas do tegumento externo (testa). Sob condições de assepsia, em câmara de fluxo laminar, foram tratadas com etanol 70% durante 5 minutos e a seguir em hipoclorito de sódio 2% por 20 minutos; após cada uma dessas etapas de preparação, efetuaram-se duas e três lavagens sucessivas com água destilada autoclavada, respectivamente.

A extração dos embriões foi realizada sob estereomicroscópio, com auxílio de bisturi e pinça. Mediante corte longitudinal na semente, respeitando certa distância da região micropilar para evitar danos aos embriões, procedeu-se a eliminação do tegumento interno (tégmen).

A poliembrionia foi avaliada com base no número médio de embriões por semente, porcentagem de poliembrionia (frequência de sementes com dois ou mais embriões) e intervalo de variação do número de embriões por semente.

Por ocasião do processo de extração, os embriões, incluindo-se os cotilédones, foram agrupados em quatro classes de tamanho, a saber: classe 1: embriões muito pequenos (MP), com menos de 1,0 mm de comprimento; classe 2: embriões pequenos (P), com 1,0 mm a 2,9 mm de comprimento; classe 3: embriões médios (M), com 3,0 mm a 4,9 mm de comprimento; classe 4: embriões grandes (G), maiores ou iguais a 5,0 mm de comprimento.

Os embriões foram cultivados em meio MT (Murashige & Tucker, 1969) modificado (Moreira, 1996). Foram colocados no máximo dois embriões por frasco, mantendo-os em sala de crescimento a  $27\pm 1^\circ\text{C}$ , com 16 horas/dia de iluminação a uma intensidade de 1.500 lux, fornecida por lâmpadas de 30 W Superlux do dia.

Transcorrido um mês de cultivo em laboratório, os *seedlings* foram transplantados para canteiros de isopor, com um composto de terra vegetal + vermiculita na proporção de 3:1, e colocados em condições de casa de vegetação. Nessa ocasião, os *seedlings* trifoliados foram reconhecidos como híbridos e os com limbo foliar simples, como prováveis nucelares. Devido ao emprego de híbridos de *Citrus* com *Poncirus* como parentais masculinos, nos quais a característica folha trilobada encontra-se governada por uma condição heterozigota, é previsível a ocorrência de *seedlings* zigóticos com limbo foliar simples, não identificados visualmente como híbridos.

As taxas de vingamento de frutos nos cruzamentos com tangerina 'Clementina', tangerina 'Sunki', limão 'Cravo' e limão 'Volkameriano' foram de 21,7%, 37,1%, 16,8% e 21,0%, respectivamente. Polinizações efetuadas anteriormente, também empregando como parentais masculinos seleções de *P. trifoliata* e híbridos desta espécie, resultaram em 55,6% de pegamento de frutos em limão 'Cravo', 34,5% em laranja 'Pêra' (*C. sinensis*) e 37,0% em tangerina 'Cleópatra' (*C. reshni* Hort. ex Tan.) (Soares Filho et al., 1994). Essas diferenças nas taxas de pegamento de frutos, particularmente aquelas constatadas em limão 'Cravo' (16,8% e 55,6%), podem ser reflexo de variações

ambientais entre épocas (anos). Além disso, deve-se atentar para a possibilidade da existência de variações na fertilidade do pólen dos parentais masculinos envolvidos nos cruzamentos, influenciando o comportamento do caráter em questão. A esse respeito, polinizações realizadas por Soares Filho et al. (1995a) em tangerina 'Clementina', tangerina 'Sunki', limão 'Cravo' e limão 'Volkameriano', empregando parentais masculinos em sua maioria distintos dos considerados neste trabalho, resultaram em 17,6%, 51,8%, 45,6% e 51,9% de vingamento de frutos, respectivamente.

Em virtude de perdas de frutos ocorridas em período anterior à colheita, utilizaram-se neste trabalho 85 frutos de tangerina 'Clementina', 97 de tangerina 'Sunki', 37 de limão 'Cravo' e 11 de limão 'Volkameriano'. A partir dessas amostras foram estimados o número médio de sementes por fruto, o número médio de embriões por semente, a poliembrião (Tabela 1) e o tamanho de embriões (Tabela 2). Constatou-se uma média de 19,7 sementes por fruto em tangerina 'Clementina', 5,1 em tangerina 'Sunki', 5,2 em limão 'Cravo' e 18,9 em limão 'Volkameriano'. Essas características são inerentes a cada espécie ou cultivar (Moreira et al., 1947), variando em função do ambiente em que se encontram. Soares Filho et al. (1995b), em cruzamentos controlados, obtiveram valores médios, referentes a essas mesmas variedades, de 25,7, 9,9, 8,8 e 35,9 sementes por fruto, respectivamente. Tais valores, superiores aos obtidos neste estudo, também refletem, provavelmente, possíveis influências dos parentais masculinos na expressão do caráter ora discutido (Wong, 1939; Moreira & Gurgel, 1941).

As tangerinas 'Clementina' e 'Sunki' e os limões 'Cravo' e 'Volkameriano' apresentaram número médio de embriões por semente estimados em 1,0, 1,3, 1,5 e 2,1, respectivamente. O número de embriões por semente variou de 1 a 3 na tangerina 'Clementina', 1 a 13 na tangerina 'Sunki', 1 a 5 no limão 'Cravo' e de 1 a 8 no limão 'Volkameriano'. Quanto à porcentagem de poliembrião, as tangerinas 'Clementina' e 'Sunki' e os limões 'Cravo' e 'Volkameriano' manifestaram valores de 1,4%, 15,9%, 35,2% e 58,6%, respectivamente (Tabela 1). Soares Filho et al. (1995b), em cruzamentos controlados nos quais os parentais masculinos foram distintos dos empregados na presente pesquisa, encontraram nas citadas variedades valores médios gerais de 1,0, 1,2, 2,2 e 2,7 para o número médio de embriões por semente, de 1 a 2, 1 a 6, 1 a 8 e 1 a 12, no tocante ao intervalo de variação do número de embriões por semente, e de 0,4%, 10,1%, 59,5% e 77,6% relativamente à poliembrião, respectivamente. Essas variações na poliembrião, entre e dentro de variedades, decorrem tanto de causas ambientais (Moreira et al., 1947; Okudai, 1975; Ikeda, 1982; Tusa et al., 1983), como intrínsecas aos próprios genótipos em si (Parlevliet & Cameron, 1959; Cameron & Soost, 1979; Deidda & Chessa, 1982).

A tangerina 'Clementina' foi o parental feminino que apresentou a maior frequência observada de *seedlings* híbridos (57,4%), seguida pela tangerina 'Sunki' (53,6%), limão 'Cravo' (18,6%) e limão 'Volkameriano' (14,2%) (Tabela 1). Esses resultados encontram-se subestimados em razão do fato de que muitos dos parentais masculinos eram híbridos de *Citrus* com *P. trifoliata*, nos quais a característica folhas trilobadas encontrava-se governada por uma condição heterozigota, implicando a formação de híbridos tanto com folhas

**TABELA 1.** Características de frutos, sementes e embriões resultantes de cruzamentos controlados de *Citrus* spp. com *Poncirus trifoliata* e híbridos desta espécie. Cruz das Almas, BA, 1993-1995.

Variedades	Frutos	Sementes	Embriões	Seedlings	Sementes por fruto		Embriões por semente		Poliembrionia		Porcentagem de seedlings	
					Média	Máximo	Mínimo	Máximo	%	Classificação <sup>1</sup>	Zigóticos	Monofoliados
Clementina	85	1.672	1.689	1.345	19,7	1,0	3	1,4	Mn	57,4	42,6	
Sunki	97	497	625	470	5,1	1,3	13	15,9	B	53,6	46,4	
Cravo	37	193	291	210	5,2	1,5	5	35,2	BM	18,6	81,4	
Volkameriano	11	208	433	367	18,9	2,1	8	58,6	M	14,2	85,8	

<sup>1</sup> Mn: monoembrionica; B: baixa; BM: baixa a moderada; M: moderada.

**TABELA 2.** Classes de tamanho de embrião de tangerinas 'Clementina' e 'Sunki' e limões 'Cravo' e 'Volkameriano', considerando o número total de embriões excisados (NTE) e o número total de embriões zigóticos excisados (NEZ). Cruz das Almas, BA, 1993-1995.

Variedades	NTE	NEZ	Classes de tamanho de embrião <sup>1</sup>													
			Grande		Médio		Pequeno		Muito pequeno							
			Total <sup>2</sup>	Zigóticos	Total	Zigóticos	Total	Zigóticos	Total	Zigóticos						
Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%					
Clementina	1.689	772	1.678	99,3	772	100,0	5	0,3	-	5	0,3	-	1	0,1	-	
Sunki	625	252	513	82,1	244	96,8	37	5,9	6	2,4	47	7,5	2	0,8	28	4,5
Cravo	291	39	214	73,5	37	94,9	50	17,2	2	5,1	25	8,6	-	-	2	0,7
Volkameriano	433	52	308	71,1	43	82,7	64	14,8	7	13,5	49	11,3	2	3,8	12	2,8

<sup>1</sup> Grande:  $\geq 5,0$  mm; médio: 3,0 mm a 4,9 mm; pequeno: 1,0 mm a 2,9 mm; muito pequeno:  $< 1,0$  mm.

<sup>2</sup> Conjunto total de embriões excisados.

trilobadas como com limbo foliar simples, estes últimos não identificáveis visualmente. Além disso, o próprio *P. trifoliata* pode, a depender da seleção utilizada, apresentar a característica folhas trilobadas sob uma condição heterozigota, igualmente impossibilitando a identificação visual de todos os híbridos obtidos (Iglesias et al., 1974; Torres et al., 1978).

Constatou-se uma associação negativa entre o grau de poliembrião e a frequência de embriões de maior tamanho, sendo esta evidência muito mais acentuada quando se considera os embriões zigóticos (Tabelas 1 e 2). Esses resultados explicam a razão da nítida associação negativa entre o grau de poliembrião e a frequência de híbridos (Tabela 1), dada a forte tendência dos embriões zigóticos — em sementes com baixo a moderado grau de poliembrião — estarem entre aqueles de maior tamanho ( $\geq 5,0$  mm), o que facilita sua germinação e posterior desenvolvimento em *seedling*, pela maior quantidade de reservas de nutrição presentes em seus cotilédones. Observações realizadas por Frost & Soost (1968), Diaz et al. (1979), Vásquez Araujo (1991), Soares Filho et al. (1994) e Moreira (1996) reforçam essas afirmações.

A tangerina ‘Sunki’, entre os parentais femininos considerados neste estudo, destacou-se por seu potencial de utilização em programas de melhoramento genético de citros dirigidos à criação de novos porta-enxertos, mediante hibridação, haja vista sua taxa relativamente alta de pegamento de frutos (37,1%), baixo grau de poliembrião (15,9%), elevada frequência observada de híbridos (53,6%) e pronunciada concentração de embriões zigóticos na classe de embriões com tamanho igual ou superior a 5 mm (96,8%), o que facilita sobremaneira a germinação e a sobrevivência de híbridos em estádios iniciais de desenvolvimento de *seedling*.

Os resultados obtidos permitem inferir que: a frequência de híbridos apresenta uma associação negativa com o grau de poliembrião dos parentais femininos; o tamanho dos embriões zigóticos apresenta uma associação negativa com o grau de poliembrião dos parentais femininos; a pronunciada concentração de embriões zigóticos na classe de maior tamanho ( $\geq 5,0$  mm) é um indicativo de que em sementes poliembriônicas de citros esses embriões iniciam sua formação anteriormente aos nucelares; a tangerina ‘Sunki’ pode ser indicada como importante parental feminino em programas de melhoramento genético de citros dirigidos à criação de novos porta-enxertos.

## REFERÊNCIAS

- CAMERON, J.W.; FROST, H.B. Genetics, breeding and nucellar embryony. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.B.; WEBBER, H.J. (Eds.). **The citrus industry**. Berkeley : University of California, 1968. v.2, p.325-370.
- CAMERON, J.W.; SOOST, R.K. Sexual and nucellar embryony in  $F_1$  hybrids and advanced crosses of *Citrus* with *Poncirus*. **American Society for Horticultural Science Journal**, Alexandria, Virginia, v.104, p.408-410, 1979.
- DEIDDA, P.; CHESSA, I. A three-gene hypothesis for the inheritance of nucellar embryony in citrus. **Rivista della Ortoflorofruitticoltura Italiana**, Firenze, v.66, p.431-436, 1982.

- DIAZ, E.D.L.; XIQUES, X.; CAPIRO, N.; LIMA, H. La poliembrionia en el género *Citrus*. **Ciência y Técnica en la Agricultura, Cítricos y Otros Frutales**, Havana, v.2, n.1, p.95-104, 1979.
- FROST, H.B.; SOOST, R.K. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.B.; WEBBER, H.J. (Eds.). **The citrus industry**. Berkeley : University of California, 1968. v.2, p.290-324.
- FURR, J.R. Citrus breeding for the arid Southwestern United States. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1968, Riverside. **Proceedings**. Riverside : University of California, 1969. v.1, p.191-197.
- HEARN, C.J.; HUTCHISON, D.J.; BARRET, H.C. Breeding citrus rootstocks. **HortScience**, Alexandria, v.9, n.4, p.357-358, 1974.
- IGLESIAS, L.; LIMA, H.; SIMON, J.P. Isozyme identification of zygotic and nucellar seedlings in citrus. **Journal of Heredity**, New York, v.65, p.81-84, 1974.
- IKEDA, F. Repression of polyembryony by gamma-rays in polyembryonic citrus. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 5., 1981, Tokyo. **Proceedings**. Tokyo : International Society of Citriculture, 1982. v.1, p.39-44.
- MOREIRA, C. dos S. **Frequência de híbridos em citros (*Citrus* spp.) em relação ao grau de poliembrionia**. Cruz das Almas : UFBA, 1996. 78p. Dissertação de Mestrado.
- MOREIRA, S.; GURGEL, J.T.A. A fertilidade do pólen e sua correlação com o número de sementes em espécies e formas do gênero *Citrus*. **Bragantia**, Campinas, v.1, p.660-711, 1941.
- MOREIRA, S.; GURGEL, J.T.; ARRUDA, L.F. Poliembrionia em *Citrus*. **Bragantia**, Campinas, v.7, n.3, p.69-106, 1947.
- MURASHIGE, T.; TUCKER, D.P.H. Growth factor requirement of citrus tissue culture. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 1., 1968, Riverside. **Proceedings**. Riverside : University of California, 1969. v.3, p.1155-1161.
- OKUDAI, N. Studies on an effective method for obtaining hybrid seedlings in polyembryonic citrus. I. Differences in the strains of satsuma mandarin. **Japanese Society for Horticultural Science. Journal**, Kyoto, v.1, p.54-55, 1975.
- PARLEVLIET, J.E.; CAMERON, J.W. Evidence on the inheritance of nucellar embryony in citrus. **American Society for Horticultural Science. Proceedings**, Alexandria, v.74, p.252-260, 1959.
- SALIBE, A.A. Aspectos do melhoramento de plantas fruteiras no Brasil. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.26, n.6, p.688-691, 1971.
- SOARES FILHO, W. dos S.; CUNHA SOBRINHO, A.P. da; LEE, L.M. Influence of pollinators on fruit set in citrus. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.403, p.39-46, 1995a.
- SOARES FILHO, W. dos S.; LEE, L.M.; CUNHA SOBRINHO, A.P. da. Influence of pollinators on polyembryony in citrus. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.403, p.256-265, 1995b.
- SOARES FILHO, W. dos S.; VÁSQUEZ ARAUJO, J.E.; CUNHA, M.A.P. da; CUNHA SOBRINHO, A.P. da; PASSOS, O.S. Degree of polyembryony, size and

survival of the zygotic embryo in citrus. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 7. 1992, Acireale. **Proceedings**. Acireale : International Society of Citriculture, 1994. v.1, p.135-138.

- SOARES FILHO, W. dos S.; VILARINHOS, A.D.; CUNHA SOBRINHO, A.P. da; OLIVEIRA, A.A.R.; SOUZA, A. da S.; CRUZ, J.L.; MORAIS, L.S.; CASTRO NETO, M.T. de; GUERRA FILHO, M. dos S.; CUNHA, M.A.P. da; PASSOS, O.S.; MEISSNER FILHO, P.E.; OLIVEIRA, R.P. de. **Programa de melhoramento genético de citros da Embrapa-CNPMPF: obtenção de híbridos**. Cruz das Almas : Embrapa-CNPMPF, 1997. 34p. (Embrapa-CNPMPF. Documentos, 74).
- SOOST, R.K.; CAMERON, J.W. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Eds.). **Advances in fruit breeding**. West Lafayette : Purdue University Press, 1975. p.507-540.
- SWINGLE, W.T. The botany of *Citrus* and its relatives. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.B. (Eds.). **The citrus Industry**. Berkeley : University of California, 1967. v.1, p.190-430.
- TORRES, A.M.; SOOST, R.K.; DIEDENHOFEN, U. Leaf isozymes as genetic markers in citrus. **American Journal of Botany**, Columbus, v.65, p.869-881, 1978.
- TUSA, N.; GERACI, G.; OCCORSO, G. Coltura *in vitro* di ovuli in due specie di agrumi. **Rivista della Ortoflorofrutticoltura Italiana**, Firenze, v.67, p.129-131, 1983.
- VÁSQUEZ ARAUJO, J.E. **Identificação de embriões zigóticos em sementes poliembriônicas de citros (*Citrus* spp.) mediante características morfológicas**. Cruz das Almas : UFBA, 1991. 74p. Dissertação de Mestrado.
- WONG, C.Y. The influence of pollination on seed development in certain varieties of citrus. **American Society for Horticultural Science. Journal**, Alexandria, v.37, p.161-164, 1939.