

EFEITOS DE ÁCIDO GIBERÉLICO E CARVÃO ATIVADO NO CULTIVO *IN VITRO* DE *CITRUS LIMONIA OSBECK* X *PONCIRUS TRIFOLIATA* (L.) RAF¹

VALTEMIR GONÇALVES RIBEIRO², DENY SANÁBIO³, CLEBER NASCIMENTO DE SOUZA³, PAULO SERGIO NASCIMENTO LOPES³, MARCELO RAMAZOTTI BOCARDO³ e MOACIR PASQUAL⁴

RESUMO - Pesquisou-se o desenvolvimento *in vitro* de embriões de um híbrido do cruzamento *Citrus limonia* Osb. X *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. em meio MS, acrescido de GA₃ (0,0, 0,01, 0,1 e 1,0 mg/L) e carvão ativado (0,0, 0,5, 1,0 e 2,0 g/L), em todas as combinações possíveis. Após a excisão das sementes os embriões obtidos, independentemente dos estádios, foram inoculados nos respectivos meios de cultura. Cada tratamento permaneceu por 48 horas no escuro e 40 dias em sala de crescimento à temperatura de 27 ± 1°C, com 16 horas de luminosidade. Após esse período, as plântulas foram avaliadas, considerando-se o percentual de sobrevivência e comprimento da haste caulinar e do sistema radicular. Verificou-se que a concentração de 0,1 mg/L de GA₃ interagiu antagonicamente em meio de cultivo contendo até 2,0 g/L de carvão ativado. O GA₃ a 0,01 mg/L associado a concentrações de carvão ativado a partir de 0,5 g/L até 2,0 g/L, maximizou o percentual de sobrevivência dos embriões. Os embriões apresentaram o maior comprimento de raiz (4,5 cm) e da haste caulinar (2,1 cm) com carvão ativado na concentração de 0,5 g/L e 2,0 g/L, respectivamente.

Termos para indexação: cultura de embriões, melhoramento genético de citros.

EFFECTS OF GIBBERELLIC ACID (GA₃) AND ACTIVATED COAL ON *IN VITRO* CULTURE OF *CITRUS LIMONIA OSBECK* X *PONCIRUS TRIFOLIATA* L. RAF. EMBRYOS

ABSTRACT - This work utilized fruits of a single plant obtained from the cross between *Citrus limonia* Osb. X *Poncirus trifoliata* L. Raf. Seeds were removed and after excision, all the embryos, regardless their development stages, were inoculated in MS medium added with GA₃ (0.0, 0.01, 0.1 and 1.0 mg/L) and activated coal (0.0, 0.5, 1.0 and 2.0 g/L) in every possible combination. These treatments remained for 48 hours in the dark and afterwards in growth room at the temperature of 27 ± 1°C with 16 hours lighting. After 40 days, seedlings were evaluated by the lengths of the aerial part and root system and percent of survival. The concentration of 0.1 mg/L of GA₃ interacts negatively in culture medium containing up to 2.0 g/L of activated coal. The concentration of 0.01 mg/L of GA₃ associated to activated coal concentration of 0.5 g/L to 2.0 g/L maximized the percentage of embryo survival. Embryos showed the highest length of root (4.5 cm) and shoot (2.1 cm) when cultivated in activated coal at 0.5 g/L and 2.0 g/L, respectively.

Index terms: embryo culture, breeding of citrine.

¹ Aceito para publicação em 2 de junho de 1998.

Extraído da Dissertação de Mestrado do primeiro autor apresentada à UFPA, Lavras, MG.

² Eng. Agrôn., M.Sc., Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho (CNPUV), E.E. de Jales, Estrada da Barra Bonita, s/n, Caixa Postal 14, CEP 15700-000 Jales, SP. Bolsista do CNPq-BIOEX. E-mail: vgribeiro@carpa.ciagri.usp.br

³ Eng. Agrôn., M.Sc., Dep. de Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Caixa Postal 37, CEP 37200-000 Lavras, MG.

⁴ Eng. Agrôn., Dr., Prof. Titular, Dep. de Agricultura, UFPA. Bolsista do CNPq.

INTRODUÇÃO

Na citricultura brasileira, inúmeros são os porta-enxertos empregados, em virtude da diversidade existente entre as copas utilizadas comercialmente e da facilidade de hibridações e alta taxa de mutação nas espécies e variedades cítricas (Moreira & Pio, 1991). O porta-enxerto limão-cravo (*Citrus limonia* Osb.) é utilizado em mais de 80% dos pomares enquanto *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. adapta-se às regiões de temperaturas baixas e/ou com solos rasos. Híbridos

intergenéricos provenientes desses parentais podem apresentar características satisfatórias à adaptação dos citros às novas regiões.

Importante barreira aos trabalhos de melhoramento de citros é a ocorrência da poliembrião, caracterizada pela presença de dois ou mais embriões na semente, em diferentes estádios de desenvolvimento: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar. Isso dificulta a identificação do embrião zigótico e compromete seu desenvolvimento, pela competição com os embriões nucelares (Pasqual et al., 1990). Tais embriões originam plântulas morfológicamente desuniformes quando germinam antes de atingirem o completo desenvolvimento. O cultivo dos embriões *in vitro* pode assegurar-lhes a sobrevivência e auxiliar na identificação do embrião zigótico. Nos vegetais, as giberelinas participam de muitas atividades fisiológicas importantes (Crocomo & Cabral, 1988), tendo efeito no crescimento, especialmente no alongamento caulinar. De acordo com Kochba et al. (1974), o GA₃ promove o desenvolvimento ontogênico natural dos embriões sem primórdio radicular, proporciona diretamente a iniciação de uma zona meristemática radicular e/ou estimula o desenvolvimento de uma zona radicular existente. A incorporação de 1,0 mg/L de GA₃ aumentou o desenvolvimento de raízes em embriões de citros, plenamente ou parcialmente desenvolvidos (Button & Bornman, 1971; Kochba et al., 1974).

O ácido giberélico (GA₃) e uma mistura de GA₄+GA₇ são os mais disponíveis comercialmente, contudo, poucas culturas *in vitro* mostram respostas às giberelinas (Caldas et al., 1990).

O carvão ativado, por adsorver substâncias inibitórias do meio ou produtos tóxicos liberados pelos explantes, promove o crescimento de embriões, podendo ser utilizado com sucesso por diferentes culturas entre 0,2 e 3,0% (Pasqual, 1990). Tilquin (1979) relatou o uso de 1,0 g/L de carvão ativado em meios nutritivos para estimular o enraizamento *Cassava* sp.

Objetivou-se no presente trabalho otimizar as condições para o desenvolvimento dos embriões do híbrido *Citrus limonia* Osb. \times *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., cultivados *in vitro* sob o efeito de diferentes concentrações de ácido giberélico (GA₃) e carvão ativado.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Utilizaram-se frutos de uma única planta de *C. limonia* Osb. \times *P. trifoliata* (L.) Raf., escolhida por apresentar condições fitossanitárias satisfatórias.

Os frutos colhidos foram lavados, suas sementes removidas e, em câmara de fluxo laminar, sofreram assepsia com álcool a 70% por 5 minutos e hipoclorito de sódio a 2% por 20 minutos, sendo em seguida lavadas três vezes em água bidestilada e autoclavada. Com o auxílio de microscópio estereoscópico, bisturi e pinça, as sementes foram excisadas longitudinalmente pela região oposta à micrópila, tomando-se o cuidado de não provocar injúrias aos embriões.

Todos os embriões, independentemente dos estádios em que se encontravam, foram inoculados em meio Murashige & Skoog (1962), acrescido de GA₃ (0,0, 0,01, 0,1 e 1,0 mg/L) e carvão ativado (0,0, 0,5, 1,0 e 2,0 g/L), em esquema fatorial 4x4. Empregaram-se quatro repetições, cada uma constituída de quatro tubos de ensaio contendo 15 mL do meio de cultivo, inoculando-se um embrião por tubo. O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados.

Os explantes permaneceram por 48 horas no escuro, sendo transferidos para sala de crescimento a temperatura de 27 \pm 1°C com 16 horas de iluminação a uma intensidade de iluminação de 35 μ moles/m²/s. Transcorridos 40 dias, as plântulas foram avaliadas pelas características percentagem de sobrevivência e comprimento da haste caulinar e do sistema radicular.

Para efeito de análise estatística, os dados da variável percentual de sobrevivência foram transformados segundo arco seno da raiz ($x/100$), e os de comprimento do sistema radicular e da haste caulinar segundo raiz quadrada de ($x+0,5$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A associação de ácido giberélico (GA₃) ao carvão ativado (C.A.) foi significativa em relação às variáveis percentual de sobrevivência, comprimento do sistema radicular e da haste caulinar dos embriões de *C. limonia* Osb. \times *P. trifoliata* (L.) Raf. (Tabela 1).

A maximização da percentagem de sobrevivência dos embriões foi obtida com a mais baixa concentração de GA₃, suplementada com carvão ativado

(Fig. 1). O percentual máximo de sobrevivência correspondeu às combinações de 0,01 mg/L de GA₃ com as concentrações crescentes de carvão ativado de 0,5 g/L a 2,0 g/L. Norstog (1979), confirmou necessidade de se adicionar ácido giberélico para o desenvolvimento de embriões, e Schooler (1960), pesquisando o desenvolvimento de embriões de cevada, também observou a necessidade de baixas concentrações de GA₃. Verificou-se ainda que a concentração de 0,1 mg/L de GA₃ associada às crescentes concentrações de carvão ativado causou a diminuição no percentual de sobrevivência dos embriões híbridos ($\alpha < 0,01$, pelo teste F).

Semelhante atividade do GA₃ a 0,1 mg/L, em presença do carvão ativado, foi verificada no comprimento do sistema radicular e da haste caulinar

(Figs. 2 e 3, respectivamente), dos embriões híbridos, demonstrando a tendência de tal dosagem ser antagonista quando suplementada em meios de cultivo com carvão ativado em até 2,0 g/L.

Esses dados confirmam aqueles obtidos por Pasqual et al. (1990), em que a ação do GA₃ a 0,1 mg/L, em meios contendo carvão ativado, induziu a uma menor taxa de crescimento radicular de embriões de laranjeira 'Natal' (*Citrus sinensis* L. Osb.). Nos tratamentos sem a adição do regulador de crescimento (Figs. 2 e 3) demonstrou-se a eficiência do carvão ativado quando o sistema radicular e a haste caulinar atingiram 4,5 e 2,1 cm de comprimento, nas concentrações de 0,5 e 2,0 g/L, respectivamente.

TABELA 1. Análise de variância das variáveis sobrevivência, comprimento do sistema radicular e da haste caulinar dos embriões do híbrido *C. limonia* Osb. \times *P. trifoliata* (L.) Raf., cultivados em meio de cultura contendo diferentes concentrações de carvão ativado (C.A.) e ácido giberélico (GA₃) UFLA, Lavras, MG, 1997.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado médio		
		Sobrevivência dos embriões (%)	Comprimento do sistema radicular (cm)	Comprimento da haste caulinar (cm)
C.A.	3	82,0461	0,6360**	0,3739**
GA ₃	3	220,1361	0,0946	0,5155**
C.A. x GA ₃	9	1095,6494**	0,6340**	0,4850**
Resíduo	30	169,1329	0,1054	0,0802
C.V.		16,88%	26,53%	32,53%

** $\alpha < 0,01$.

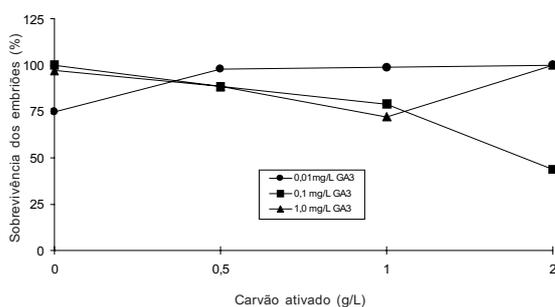


FIG. 1. Efeito do ácido giberélico (GA₃) na presença do carvão ativado sobre o percentual de sobrevivência de embriões do híbrido *C. limonia* Osb. \times *P. trifoliata* (L.) Raf. UFLA, Lavras, MG, 1997.

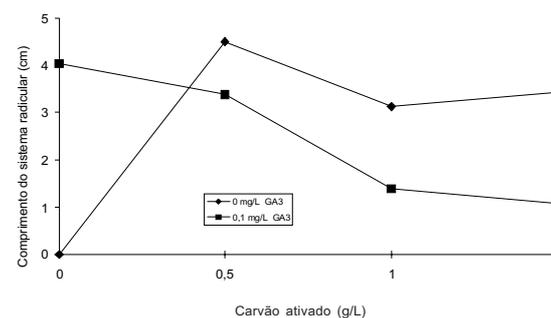


FIG. 2. Efeito do ácido giberélico (GA₃) na presença do carvão ativado sobre o comprimento do sistema radicular de embriões do híbrido *C. limonia* Osb. \times *P. trifoliata* (L.) Raf. UFLA, Lavras, MG, 1997.

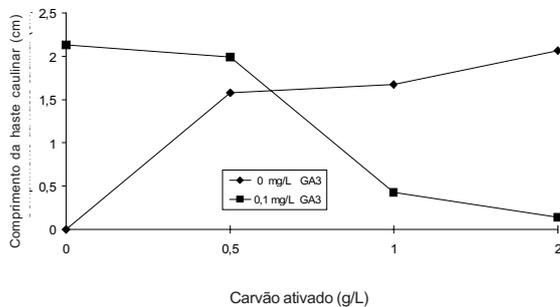


FIG. 3. Efeito do ácido giberélico (GA₃) na presença do carvão ativado sobre o comprimento da haste caulinar de embriões do híbrido *C. limonia* Osb. x *P. trifoliata* (L.) Raf. UFLA, Lavras, MG, 1997.

Dada a capacidade do carvão ativado em adsorver substâncias tóxicas que casualmente são adicionadas ao meio de cultivo por seus componentes básicos, em decorrência dos níveis de impureza dos contaminantes orgânicos e inorgânicos e dos aspectos relacionados à sua natureza biológica e de produção (Debergh, 1983), supõe-se que algum componente inibitório ao desenvolvimento e ao crescimento dos embriões podem ter sido adsorvidos pelo carvão ativado, em auxílio ao desenvolvimento *in vitro* dos embriões do híbrido estudado.

CONCLUSÃO

A suplementação do meio MS com ácido giberélico (GA₃) a 0,01 mg/L e carvão ativado nas concentrações de 0,5 g/L até 2,0 g/L favorece o desenvolvimento e o crescimento dos embriões do híbrido *Citrus limonia* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf., cultivados *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- BUTTON, J.; BORNMAN, C.H. Development of nucellar plants from unpollinated and unfertilised ovules of the 'Washington navel' orange *in vitro*. **Journal of South African Botany**, v.37, p.127-134, 1971.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília : Embrapa-CNPq/ABCTP, 1990. p.37-70.
- CROCOMO, O.J.; CABRAL, J.B. **A biotecnologia no melhoramento de plantas tropicais**. Brasília : ABEAS, 1988. 39p. Curso de Agricultura Tropical.
- DEBERGH, P.C. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.59, p.270-276, 1983.
- KOCHBA, J.; BUTTON, J.; SPIEGEL-ROY, P.; BORNMAN, CH.; KOCHBA, M. Stimulation of rooting of citrus embryoids by giberellic acid and adenine sulphate. **Annals of Botany**, v.38, p.795-802, 1974.
- MOREIRA, C.S.; PIO, R.M. Melhoramento de Citrus. In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A.A. (Eds.). **Citricultura brasileira**. 2.ed. Campinas : Fundação Cargill, 1991. v.2, p.116-152.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-479, 1962.
- NORSTOG, K.J. Embryo culture as a tool in the study of comparative and development morphology. In: SHARP, W.R.; LARSEN, P.O.; PADDOCK, E.F.; RHAGAVAN, V. (Eds.). **Plant cell and tissue culture**. Columbus : Ohio State Univ. Press, 1979. p.197-202.
- PASQUAL, M. **Introdução à cultura de tecidos**. Lavras : ESAL, 1990. 33p.
- PASQUAL, M.; RIBEIRO, V.G.; RAMOS, J.D. Influência do GA₃ e do carvão ativado sobre o enraizamento *in vitro* de embriões de laranja 'Natal'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.25, n.10, p.1477-1482, out. 1990.
- SCHOOLER, A.B. The effect of gibberel and gibberellic acid (K salt) in embryo culture media for *Hordeum vulgare* L. **Agronomy Journal**, Madison, v.52, n.7, p.411, July 1960.
- TILQUIN, J.P. Plant regeneration from stem callus of cassava. **Canadian Journal of Botany**, v.57, p.1761-1763, 1979.