

INFLUÊNCIA DE REGULADORES DE CRESCIMENTO SOBRE A EMBRIOGÊNESE *IN VITRO* DE NUCÉLOS DE *CITRUS SINENSIS* CV. VALÊNCIA¹

MOACIR PASQUAL², AKIHIKO ANDO e OTTO JESU CRÓCOMO³

RESUMO - Objetivou-se determinar a metodologia de regeneração de plantas *in vitro* a partir de núcelos. Foram extraídos núcelos de frutos da cv. Valência (*Citrus sinensis* Osb.) doze semanas após a polinização, e cultivados em meio constituído pelos macro e micronutrientes do meio "MS", adicionado de (em mg/l): tiamina HCL, 0,2; piridoxina HCL, 1,0; ácido nicotínico, 1,0; mesoinositol, 100; extrato de malte, 500; sacarose, 50.000; ágar, 8.000; e pH, 5,7. Os tratamentos consistiram das combinações em dialélico de cinetina (0,0; 0,25; 0,50; 1,0 e 1,5 mg/l) e 2,4-D (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/l), sendo que dez repetições foram mantidas no escuro e outras dez sob luz (1.500 lux) durante 16 horas diárias a 27°C ± 2°C, em delineamento inteiramente casualizado. Foram obtidos até doze embriões diretamente de um único núcelo, e a adição de cinetina e 2,4-D inibiu esta embriogênese, principalmente com adição de 0,25 mg/l de cinetina + 0,5 mg/l de 2,4-D em culturas mantidas no escuro.

Termos para indexação: cultura de tecidos, embriogênese somática, citros, tecidos nucelares.

EFFECTS OF GROWTH REGULATORS ON *IN VITRO* EMBRYOGENESIS OF NUCELLI IN *CITRUS SINENSIS* CV. VALÊNCIA

ABSTRACT - This paper describes the attempts to determine the methodology for regeneration of plants from nucelli. Nucelli were extracted from 'Valência' fruits (*C. sinensis* Osb.) twelve weeks after pollination and cultivated *in vitro* on "MS" mineral salts supplemented with (mg/l): thiamine HCL, 0.2; pyridoxine HCL, 1.0; nicotinic acid, 1.0; mesoinositol, 100; malt extract, 500; sucrose, 50.000; agar, 8.000; pH, 5.7. The treatments were combinations of kinetin (0.0; 0.25; 0.50; 1.0 and 1.5 mg/l) and 2,4 - dichlorophenoxyacetic acid (D) (0.0; 0.5; 1.0 and 2.0 mg/l) with ten replications in dark and ten in light (1.500 lux) at 27°C ± 2°C. It was possible to get twelve nucellar embryos from a single nucellus. Kinetin and 2,4-D inhibited the embryogenesis. Occasionally the formation of globular callus with high embryogenic potential was observed mainly in 0,25 mg/l kinetin and 0,5 mg/l 2,4-D medium.

Index terms: tissue culture, somatic embryogenesis, citrus, nucellar tissues.

INTRODUÇÃO

O melhoramento das espécies cítricas pelos métodos convencionais é seriamente limitado pela ocorrência de poliembrião, esterilidade masculina, incompatibilidade, e longo período de juvenidade.

O desenvolvimento das técnicas de cultura de tecidos e células e a possibilidade da diferenciação de embriões a partir de células individuais do núcelo, aliados à aplicação de agentes mutagênicos sobre a célula inicial, responsável por esta diferenciação, constituem uma alternativa auxiliar no melhoramento genético das espécies cítricas.

Muitas espécies e cultivares do gênero *Citrus* possuem a característica de reproduzir-se agamicamente por apomixia do tipo agamosperma apóptica ou poliembrião (Frost & Soost 1968, Rangan et al. 1968), formando vários embriões a partir da diferenciação de células individuais no núcelo.

Rangan et al. (1968) e Bitters et al. (1970) foram os primeiros a induzir embriogênese adventícia diretamente em tecidos nucelares excisados de sementes em desenvolvimento de cultivares monoembriônicas de citros, sendo seguidos por vários outros autores (Rangan et al. 1968, Bitters et al. 1970, Deidda 1973, Esan 1973, Juarez et al. 1976). A formação de embriões é observada após três a seis semanas de cultura, na extremidade micropilar do núcelo. Uma temperatura constante de 27°C e 16 horas diárias de luz a 1000 lux são adequadas para embriogênese nucelar (Esan 1973).

Muitos autores têm reportado o surgimento

¹ Aceito para publicação em 20 de janeiro de 1987.

² Eng. - Agr., Dr., Prof. - Adjunto, Esc. Sup. de Agric. de Lavras (ESAL), Caixa Postal 37, CEP 37200 Lavras, MG.

³ Eng. - Agr., Dr., Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), USP, Caixa Postal 96, CEP 13400 Piracicaba, SP.

esporádico de pequenos calos em cultura de nucelos, além dos embrióides diferenciados diretamente (Maheshwari & Rangaswamy 1958, Kochba et al. 1972, Deidda 1973). Estes calos de citros compreendem nódulos compactos e esféricos de 0,1 mm a 1,0 mm de diâmetro, que variam de branco a creme, e que unidos entre si dão ao calo uma estrutura porosa e friável.

Estudos de anatomia e desenvolvimento (Button et al. 1974) e aspectos fisiológicos (Kochba & Spiegel-Roy 1973), nestes tecidos, evidenciaram que praticamente qualquer célula é potencialmente embriogênica, e que os embrióides se originam de células individuais.

O meio normalmente utilizado na cultura de tecidos nucelares é o "MS" (Murashige & Skoog 1962), com algumas modificações, principalmente as propostas por Murashige & Tucker (1969) - meio "MT".

Auxinas e citocininas são claramente os compostos de maior significância na cultura de tecidos de plantas. Skoog & Miller (1957) mostraram que com um adequado balanço nos níveis entre esses dois grupos de fitorreguladores poder-se-ia estabelecer um controle sobre o crescimento e diferenciação das culturas *in vitro*. Normalmente, uma alta concentração de auxina e baixa concentração de citocinina promovem o desenvolvimento de raiz e abundante proliferação de células com formação de calos, ao passo que baixa concentração de auxina e alta de citocinina resulta na multiplicação de gemas ou na conseqüente morfogenese somática.

Segundo Esan (1973), a adição das auxinas IAA (ácido 3 indolacético), NAA (ácido alfa-naftalenocético) e 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) ao meio de cultura, suprimiu significativamente ou completamente a embriogênese nucelar, ao passo que inibidores da síntese de auxinas como 7-azi-indol e 5 HNB (2-hidroxi-5-nitro benzilbromida) estimularam fortemente este processo (Kochba & Spiegel-Roy 1977).

Citocininas aparentemente não-essenciais (Murashige & Tucker 1969, Kochba et al. 1972) aumentam a proliferação de pseudobulbilhos (Rangaswamy 1958). Isto tem sido observado com a adição de adenina - 25 a 80 mg/l e BAP (6-benzilaminopurina) - 5 a 25 mg/l (Starrantino et al. 1978).

A embriogênese em nucelo foi suprimida após aplicação de citocinina, sulfato de adenina e timidina (Esan 1973). Na presença de cinetina a inibição aumentou com a concentração e 8-aza-guanina claramente estimulou a embriogênese, mesmo em concentração muito baixa - 0.001 mg/l (Kochba & Spiegel-Roy 1977).

Objetivou-se, com o presente trabalho, o desenvolvimento das técnicas de regeneração de plantas *in vitro* a partir de nucelos, da cultivar Valência, para posterior uso em programas de melhoramento através da indução de mutações pela aplicação de raios gama.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido junto à Seção de Bioquímica de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) órgão da Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba, SP.

Foram utilizados frutos da cv. Valência (*Citrus sinensis* Osb.), doze semanas após a polinização, obtidos na Estação Experimental de Limeira, unidade do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), em Cordeirópolis, SP.

Os frutos foram lavados primeiramente em água corrente, a seguir, em solução de água e detergente, e esterilizados com hipoclorito de sódio 2% durante 20 minutos. Posteriormente, em condições assépticas, fizeram-se três lavagens com água destilada autoclavada. Com os frutos cortados as sementes foram removidas e colocadas em placas-de-petri esterilizadas. Com auxílio de bisturi e sob estereomicroscópio, removeram-se os integumentos, extraindo-se o nucelo. Com um corte transversal na região micropilar no nucelo efetuou-se a eliminação do embrião zigótico.

O meio de cultura utilizado consistiu dos macro e micronutrientes do meio "MS" (Murashige & Skoog 1962), adicionado de (em mg/l): Tiamina HCL - 0,2; piridoxina HCL - 1,0; ácido nicotínico - 1,0; mesoinositol - 100; extrato de malte - 500 e sacarose - 50.000. O pH foi ajustado para 5,7, o meio solidificado com bacto ágar - 8 g/l e autoclavado a 120°C, por 20 minutos.

Os tratamentos consistiram das combinações em dialélico de cinetina (0,0; 0,25; 0,50; 1,0 e 1,5 mg/l) e 2,4-D (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/l).

Os nucelos foram colocados individualmente em frascos (10 cm x 2 cm) contendo 10 ml de meio. Das 20 repetições, dez foram expostas à luz (1.500 lux) durante 16 horas diárias e as dez restantes foram mantidas no escuro, ambas a uma temperatura de 27°C.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. A avaliação foi feita nove semanas após o início da cultura, registrando-se o número médio de embrióides por nucelo e a percentagem de nucelos que apresentaram calos. Para efeito de análise estatística, os

dados referentes ao número de embriões foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$.

Os embriões individualizados foram transferidos para o meio básico "MS" adicionado de GA₃ - 1 mg/l, onde se deu primeiramente a formação da raiz e, posteriormente, da parte aérea. As plântulas apresentando 2 a 4 pares de folhas foram removidas dos tubos de ensaio para potes de plástico, com terra, esterco e areia (4 : 2 : 1) e mantidas em câmara úmida por, aproximadamente, dez dias, sendo que cada dia se efetuava uma redução do índice de umidade. Uma vez perfeitamente adaptadas às condições ambientais, foram transplantadas para sacos de plástico maiores com o mesmo substrato, e irrigadas com solução nutritiva de Hoagland, para posteriores avaliações quanto às principais características de interesse agrônomo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adição de auxina e citocinina promoveu, de modo geral, uma redução no processo de embriogênese dos núcelos de 'Valência' cultivados *in vitro*.

Observa-se, na Tabela 1 e Fig. 1, que, com as culturas expostas à luz, na ausência de 2,4-D, houve diferença significativa para número de embriões por núcelo entre as doses 0,0; 0,25 e 0,5 mg/l de cinetina, pelo teste de Tukey - 5%. A adição de 0,5 mg/l de 2,4-D, na ausência de cinetina, reduziu significativamente o número de embriões e, esta redução foi mais acentuada em presença de cinetina. Percebe-se, ainda, nos valores estabelecidos para a média, na Tabela 1, que os efeitos prejudiciais da adição de doses baixas de cinetina não são significativos, ao contrário do que se verifica com o 2,4-D.

Quando os núcelos foram mantidos no escuro

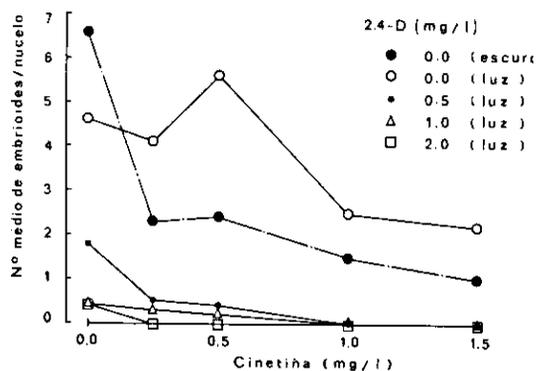


FIG. 1. Número médio de embriões por núcelo nos diferentes níveis de Cinetina e 2,4-D.

(Tabela 2), o número de embriões na ausência de cinetina e 2,4-D foi estatisticamente superior ao dos demais tratamentos. A redução foi drástica já com a adição de 0,25 mg/l de cinetina e observou-se uma tendência, inclusive com diferenças significativas, de ampliar a redução nas doses mais elevadas. A adição de qualquer concentração de 2,4-D a núcelos mantidos no escuro inibiu totalmente a embriogênese, independentemente da presença de cinetina.

Estes resultados estão de acordo com afirmações feitas por Esan (1973), de que a adição de auxinas e citocininas suprime a embriogênese em tecido nucelar de citros. Isto leva a crer que estes tecidos possuem um nível endógeno destas substâncias e que um incremento neste nível pode colocá-lo além dos limites ótimos necessários para que ocorra embriogênese. Prova disso é que a

TABELA 1. Número médio de embriões obtidos em cultura de núcelos de 'Valência', nove semanas após o início da cultura, em diferentes combinações de Cin e 2,4-D expostos à luz.

Cin (mg/l)	2,4-D (mg/l)				Média
	0,0	0,5	1,0	2,0	
0,0	4,6 abA	1,8 aB	0,4 B	0,4 B	1,80 a
0,25	4,1 abA	0,5 bB	0,3 B	0,0 B	1,22 bc
0,50	5,6 aA	0,4 bB	0,2 B	0,0 B	1,55 ab
1,0	2,5 bcA	0,0 bB	0,0 B	0,0 B	0,62 cd
1,5	2,2 cA	0,0 bB	0,0 B	0,0 B	0,55 d
Média	3,80 A	0,54 B	0,18 B	0,80 B	

As médias seguidas da mesma letra (minúscula para níveis de Cin e maiúscula para níveis de 2,4-D) não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

TABELA 2. Número médio de embriões obtidos em cultura de nucelos de 'Valência', nove semanas do início da cultura, em diferentes combinações de Cin e 2,4-D mantidos no escuro.

Cin (mg/l)	2,4-D (mg/l)				Média
	0,0	0,5	1,0	2,0	
0,0	6,6 aA	0,0 B	0,0 B	0,0 B	1,65 a
0,25	2,3 bA	0,0 B	0,0 B	0,0 B	0,57 ab
0,5	2,5 bcA	0,0 B	0,0 B	0,0 B	0,62 ab
1,0	1,5 cdA	0,0 B	0,0 B	0,0 B	0,37 b
1,5	1,0 dA	0,0 B	0,0 B	0,0 B	0,25 b
Média	2,8 A	0,0 B	0,0 B	0,0 B	

As médias seguidas da mesma letra (minúscula para níveis de Cin e maiúscula para níveis de 2,4-D) não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

adição de inibidores da síntese de auxinas e citocininas estimula fortemente este processo (Kochba & Spiegel-Roy 1977).

Os primeiros sinais mostrando diferenciação dos nucelos foram observados duas semanas após a inoculação, através de um tecido de coloração verde, que foi gradualmente aumentando de volume, e no final da quarta semana os embriões já eram distinguíveis. Após nove semanas de cultura, podia-se notar uma massa de embriões que ocupava praticamente toda a superfície do frasco, ocasião em que foram individualizados para que tivesse continuidade o processo de desenvolvimento. Chegou-

se a observar doze embriões oriundos de um único nucelo.

A presença de calos originários de nucelos foi evidenciada em praticamente todos os tratamentos, com ou sem a presença de auxina e citocinina, tanto à luz como no escuro (Fig. 2).

Um efeito diferencial também para a produção de calos foi observado de acordo com as condições às quais as culturas foram expostas.

Em meio desprovido de 2,4-D (Fig. 2A), a máxima percentagem de nucelos com calos foi observada com 0,5 mg/l de cinetina quando mantidos no escuro, ao passo que os índices maiores para

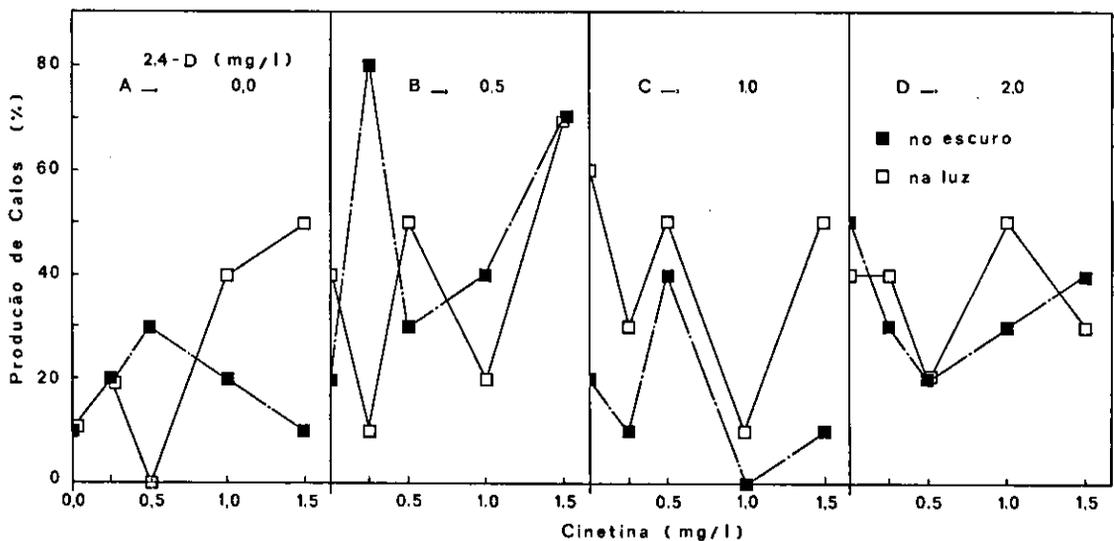


FIG. 2. Produção de calos (%) a partir de nucelos de 'Valência' cultivados em diferentes níveis de Cin e 2,4-D, nove semanas após o início da cultura.

culturas expostas à luz foram observados com concentrações mais elevadas de cinetina, uma vez que estes dois reguladores de crescimento induzem a formação de calos, em razão inversa à diferenciação de embriões. Este mesmo tipo de comportamento ocorre na presença de 0,5 mg/l de 2,4-D e 0,25 mg/l de cinetina (Fig. 2B), onde a presença de calos foi mais evidente no escuro do que na luz.

Um exame mais detalhado de alguns calos fez verificar a presença de corpúsculos globulares (pseudobulbilhos), alguns dos quais posteriormente se transformaram em embriões. Como os embriões formados têm origem unicelular, estes calos globulares constituem excelente material para estudos de indução de mutações, através dos quais se pode contornar o problema do quimerismo, normalmente verificado no tratamento de órgãos multicelulares.

CONCLUSÕES

1. Obtêm-se *in vitro* até doze embriões, diretamente de um único nucelo, sem a adição de reguladores de crescimento.

2. A embriogênese de núclos no escuro, na ausência de reguladores de crescimento, é mais acentuada do que na luz (1.500 lux).

3. Adição de 2,4-D e cinetina inibe a embriogênese em núclos de citros cv. Valência e o posterior desenvolvimento de embriões, independentemente da presença ou ausência de luz.

4. Há formação esporádica de calos globulares potencialmente embriogênicos na ausência de luz a partir de núclos, sendo mais marcante com adição de 0,25 e 0,5 mg/l de cinetina e 2,4-D, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- BITTERS, W.P.; MURASHIGE, T.; RANGAN, T.S.; NAUER, E. *Investigations on established virus-free citrus plants through tissue culture*. Los Angeles, California Citrus Nurserymen's Society, 1970. p.27-30.
- BUTTON, J.; KOCHBA, J.; BORNMAN, C.H. Fine structure of an embryoid development from embryogenic ovular callus of 'shamouti' orange (*Citrus sinensis* Osb.). *J. Exp. Bot.*, 25(85):446-57, 1974.
- DEIDDA, D. Embrioni nucellari di clementine ottenuti in vitro. *Riv. Ortoflorofruttic.*, 54(4):291-6, 1973.
- ESAN, E.B. A detailed study of adventive embryogenesis in the rutaceae. Riverside, University of California, 1973. 233p. Tese Doutorado.
- FROST, H.B. & SOOST, R.K. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J. ed. *The citrus industry*. Berkeley, University of California Press, 1968. v.2, p.290-324.
- JUAREZ, J.; NAVARRO, L.; GUARDIOLA, J.L. Obtention de plants nucellaires de divers cultivars de clémentiniers au moyen de la culture de nucelle *in vitro*. *Fruits*, 31(12):751-62, 1976.
- KOCHBA, J. & SPIEGEL-ROY, P. Effect of culture media on embryoid formation from ovular callus of 'shamouti' orange (*Citrus sinensis*). *J. Plant Breed.*, 69:156-62, 1973.
- KOCHBA, J. & SPIEGEL-ROY, P. Embryogenesis in gamma-irradiated habituated ovular callus of the "shamouti" orange as affected by auxin and by tissue age. *Environ. Exp. Bot.*, 17(2-4):151-9, 1977.
- KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P.; SAFRAN, H. Adventive plants from ovules and nucelli in Citrus. *Planta*, 106:236-45, 1972.
- MAHESHWARI, P. & RANGASWAMY, N.S. Polyembryony and *in vitro* culture of Citrus and Mangifera. *Indian J. Hortic.*, 15:275-86, 1958.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15:473-97, 1962.
- MURASHIGE, T. & TUCKER, D.P.H. Growth factor requirements of citrus tissue culture. In: CHAPMAN, H.D., ed. *Proceedings of the First International Citrus Symposium*. Riverside, s.ed., 1969. v.3, p.1155-61.
- RANGAN, T.S.; MURASHIGE, T.; BITTERS, W.P. *In vitro* initiation of nucellar embryos in monoembryonic Citrus. *Hortic. Sci.*, 3:226-7, 1968.
- RANGASWAMY, N.S. Culture of nucellar tissue of Citrus *in vitro*. *Experientia*, 14(3):111-2, 1958.
- SKOOG, F. & MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultivated *in vitro*. In: SOCIETY OF EXPERIMENTAL BIOLOGY. *Symposium*, 11, 1957. *Biological action of growth substances*. s.l., 1957. p.118-31.
- STARRANTINO, A.; SPINA, P.; RUSSO, F. Embriogenesi nucellare e sviluppo di piantine *in vitro* dalle nucelle di alcune specie di agrumi. *G. Bot. Ital.*, 112:41-52, 1978.