

Maio e Junho de 1997

VOL. XLIV

Nº 253

Viçosa - Minas Gerais

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

## GERMINAÇÃO IN VITRO DE SEMENTES IMATURAS DO PORTA-ENXERTO *Citrus sunki* HORT. EX TAN<sup>1</sup>

José Darlan Ramos<sup>2</sup>

Moacir Pasqual<sup>2</sup>

Nilton N. J. Chalfun<sup>2</sup>

Luis Eduardo Corrêa Antunes<sup>2</sup>

### 1. INTRODUÇÃO

O porta-enxerto mais difundido no Brasil é o limoeiro 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck). Segundo KOLLER (9), esse porta-enxerto ocupa 80% das áreas citrícolas do País, o que representa alta vulnerabilidade genética da cultura. Alguns trabalhos de hibridação têm sido feitos no sentido de ampliar a base genética, objetivando maior diversificação e alterando, dessa forma, a hegemonia do limoeiro "Cravo". Com a conscientização da necessidade de diversificação, observa-se que entre os poucos porta-enxertos promissores encontra-se a tangerineira 'Sunki' (*Citrus sunki* Hort. ex Tan.), bastante utilizada na China (7). Este porta-enxerto induz à copa várias características favoráveis, destacando-se precocidade e boa produtividade (5); copa vigorosa (20, 21); bom desempenho geral em solos argilosos (17); e alta resistência ao declínio (23). Entretanto, possui a desvantagem de apresentar pequeno número de sementes (três sementes em média por fruto) (23).

O pequeno número de sementes é detectado na fase final de

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 16.04.1996.

<sup>2</sup> Departamento de Agricultura (Universidade Federal de Lavras) - CP 37 - 37200-000 Lavras-MG (Bolsistas do CNPq).

maturação dos frutos. Entretanto, tem-se observado que em frutos imaturos o número de sementes é bem maior, chegando, inclusive, a 15 por fruto (19).

Devido à reduzida presença de sementes por fruto, a utilização do porta-enxerto 'Sunki' é dificultada. Nesse contexto, a biotecnologia de plantas, especificamente a cultura de tecidos, pode desempenhar papel fundamental, contribuindo para a produção de grande quantidade de plantas em curto espaço de tempo (4).

Para multiplicação *in vitro*, os reguladores de crescimento são os constituintes orgânicos de maior relevância. O equilíbrio entre auxina-citocinina, aparentemente, demonstra ser uma constante nas espécies vegetais para o controle da rizogênese e calogênese (11).

BOUZID (2) obteve resultados satisfatórios no desenvolvimento de gemas e ramos de *Citrus aurantium* a partir de segmentos nodais e internodais juvenis com ANA e cinetina a 1,0 mg/L.

TEIXEIRA e LANI (22) regeneraram plantas a partir de gemas adventícias de segmentos internodais juvenis de *Citrus sinensis* cv. Pera, usando 0,3 mg/L de BAP. CHATUVERDI e MITRA (3), utilizando gemas de *Citrus grandis*, obtiveram 20 a 30 novas gemas por explante, com 0,25 mg/L de BAP e 0,1 mg/L de AMA acrescidos ao MS.

A adição de auxinas e citocininas inibe a embriogênese em nucelos e o desenvolvimento de embriões (14). Embriões somáticos de citros desenvolveram-se diretamente a partir do nucelo (1), tendo sido encontrados de 12 a 40 embriões (13). A quantidade de embriões encontrados é muito variável e depende do estado nutricional do fruto, dos fatores ambientais e do cultivar polinizador (6).

PASQUAL *et alii* (15) obtiveram *in vitro*, sem adição de reguladores de crescimento, até 12 embriões. RAMOS (18) recuperou híbridos pelo cultivo de embriões *in vitro*, utilizando o meio MS de cultura. Esses resultados indicam a necessidade de incrementação de pesquisa, principalmente para germinação de sementes imaturas *in vitro*.

O objetivo do presente trabalho foi o de avaliar a germinação e o desenvolvimento *in vitro* de sementes imaturas da tangerineira 'Sunki' em meio suplementado com ANA e BAP.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Trinta frutos imaturos (10-12 semanas da antese) de tangerineira 'Sunki' (*Citrus sunki* Hort. ex Tan.) do pomar da Universidade Federal de Lavras - UFLA, em Lavras (MG) foram colhidos aleatoriamente em uma planta. Foram medidos seus diâmetros transversal e longitudinal; as

sementes retiradas, contadas e, em seguida, desinfestadas com hipoclorito de sódio, a 1%, durante 20 minutos e colocadas *in vitro* em meio básico MS (12), suplementado com ANA (ácido naftalenacético) e BAP (benziloaminopurina). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (16), disposto em esquema fatorial de 4 x 5 (ANA e BAP) num total de 20 tratamentos com cinco repetições e cinco tubos por parcela. As concentrações utilizadas foram: ANA a 0; 0,01; 0,1; e 1,0 mg/L e BAP a 0; 0,25; 0,50; 1,0; e 2,0 mg/L em todas as combinações possíveis. Após a preparação do meio, adicionaram-se oito gramas por litro de ágar, ajustou-se o pH para 6,0, distribuiu-se 10 ml em cada tubo de ensaio de 25 x 150 mm, fechando-os em seguida com tampa plástica e autoclavados a uma temperatura de 120°C, durante 20 minutos. Em cada tubo colocou-se uma semente e, em seguida, foram fechados e vedados com vitafilm e colocados em sala de crescimento, à temperatura de 27°C e 3.000 lux, com fotoperíodo de 16 horas.

A avaliação foi feita 40 dias após a inoculação, e as variáveis analisadas foram número de sementes germinadas e percentagem de sementes com calogênese.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se pelo Quadro 1 que se tratava de frutos ainda imaturos, pois apresentavam 19,89 mm de diâmetro transversal e 31,08 mm de diâmetro longitudinal, quando comparados com frutos maduros que apresentavam, em média, 37,16 mm e 31,08 mm de diâmetro transversal e longitudinal, respectivamente.

Verifica-se ainda no Quadro 1 que o número total de sementes registradas nessa fase foi de 13,55 por fruto, considerado acima dos valores médios encontrados em outros ambientes, conforme observado por

**QUADRO 1 - Diâmetro transversal e longitudinal do fruto, número total de sementes por fruto, porcentagem de sementes germinadas e percentagem de sementes com calogênese em tangerineira 'Sunki'**

Fruto	Número total de frutos	Diâmetro transversal do fruto (mm)	Diâmetro longitudinal do fruto (mm)	Número total sementes/fruto	% de sementes germinadas	% de sementes com calogênese
Imaturo	30	19,89	19,68	13,55	8	19,33
Maduro	3600....	37,16	31,08	9,69....	--	--

TEÓFILO SOBRINHO (23). O número de sementes por fruto maduro (9,69), quando comparado ao dos frutos imaturos (13,55), sugere que nem todas as sementes completam sua maturação no fruto. Este resultado pode ter sido favorecido pela polinização cruzada, em virtude da proximidade do local de colheita dos frutos às colméias de *Apis mellifera*, pois, segundo WONG (24), a quantidade de sementes do fruto, nas várias espécies e nos cultivares cítricos, varia com as condições de fertilização e clima. Dados similares foram obtidos por MOFFET e RODNEY (10) que, intercalando a variedade de tangerina 'Fairchild' com variedades fornecedoras de pólen, além da colocação de colméias, obtiveram aumento de seis vezes na produção de frutos e de 10 vezes no número de sementes.

Comparando os resultados de germinação e a calogênese, observa-se alta taxa para a segunda em relação à primeira, sugerindo que o meio estudado favoreceu o processo de formação de calos.

Observa-se pelo Quadro 2 que para a característica número de embriões não houve diferença significativa, isto é, a adição de ANA e BAP não alterou a taxa de poliembrionia (1,72) das sementes imaturas de tangerineira 'sunki'.

Os dados do Quadro 2 mostram que houve diferença significativa a 5% de probabilidade para a característica sementes germinadas, tanto para ANA quanto para BAP, enquanto a interação entre esses dois reguladores não teve efeito significativo. A análise de regressão do efeito do ANA (Figura 1), isoladamente, revelou que a equação cúbica é a que melhor representa a variação dos dados obtidos para número de sementes germinadas.

De acordo com a Figura 1, verifica-se que o menor número de sementes germinadas ocorreu em concentrações próximas a 1,0 mg/L e o maior número, com 0,68 mg/L de ANA.

Esses resultados são semelhantes aos obtidos por alguns autores, a exemplo de BOUZID (2), que obteve resultados satisfatórios com ANA a 1,0 mg/L no desenvolvimento de ramos e gemas de *Citrus aurantium* a partir de segmentos nodais e internodais juvenis. Porém, naquele caso, foram usados explantes já estabelecidos, enquanto no presente trabalho foram colocadas sementes imaturas da tangerineira 'Sunki'.

Esses resultados discordam dos apresentados por RAMOS (18), que, trabalhando com cultura de embriões, obteve desenvolvimento com regeneração posterior de plântulas *in vitro*, utilizando somente meio MS sem adição de reguladores de crescimento.

Os resultados da análise de regressão da BAP (Quadro 2) foram diferentes daqueles registrados com a ANA. Houve significância apenas do efeito linear.

A Figura 2 mostra que à medida que se aumentou a dosagem de

QUADRO 2 - Resumo da análise de variância de sementes germinadas e número de embriões em diferentes concentrações de ANA e BAP em sais de MS

C.V.	G.L.	Quadrado Médio	
		Sementes Germinadas <sup>(1)</sup>	Nº de Embriões <sup>(2)</sup>
ANA	(3)	0,02466*	0,106425 n.s.
Regressão linear	1	0,02868*	0,16319 n.s.
Regressão quadrática	1	0,00002 n.s.	0,00338 n.s.
Regressão cúbica	1	0,04529*	0,15269 n.s.
BAP	(4)	0,01864*	0,10642 n.s.
Regressão linear	1	0,05704*	0,10642 n.s.
Regressão quadrática	1	0,00541 n.s.	0,05521 n.s.
Regressão cúbica	1	0,00542 n.s.	0,05711 n.s.
Regressão grau 4	1	0,00669 n.s.	0,00164 n.s.
ANA & BAP	12	0,01188 n.s.	0,06144 n.s.
Resíduo	80	0,55888	0,0448
C.V. (%)	-	11,23	20,17
Médias	-	0,7446	1,08

\* Significativo a 5%.

n.s. Não-significativo

(1) Dados transformados em  $(x+0,5)^{1/2}$

(2) Dados transformados em  $(x+1)^{1/2}$

BAP, menor foi o número de sementes germinadas.

Esse efeito demonstra que o BAP, aplicado exogenamente, é prejudicial à germinação de sementes, em qualquer das concentrações utilizadas. Esses resultados são contrastantes com as afirmações de KITTO e YOUNG (8), que usando extremidades de ramos de plântulas de citrange 'Carrizo' promoveram a proliferação de cerca de três a quatro brotos por explante, com a utilização de BAP, na dosagem de 5,0 mg/L. Porém, esses resultados foram obtidos a partir de plantas já desenvolvidas, enquanto neste caso utilizaram-se sementes imaturas, o que pode levar a resultados totalmente diversos, um vez que se trata de explantes diferentes.

Pode-se afirmar que o regulador de crescimento BAP pode ser dispensado na germinação de sementes *in vitro* corroborando afirmações de PASQUAL (14) que a adição de citocininas e auxinas podem inibir a embriogênese. Apesar de a afirmativa estar relacionada com núcelos e embriogênese, pode-se, por analogia, comparar os resultados, pois sabe-se que a maioria dos clones de citros são poliembriônicos. Sendo assim, o

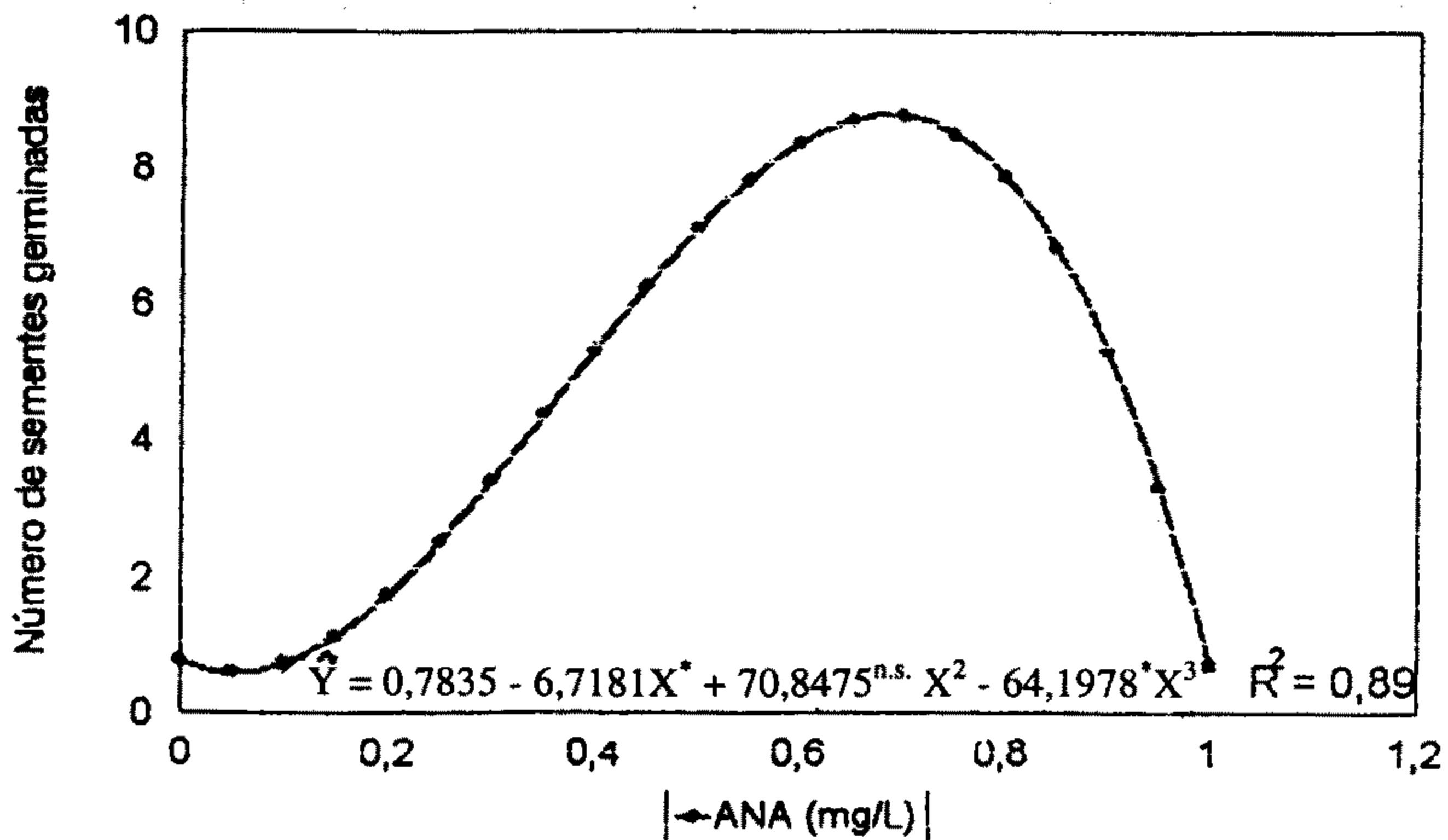


FIGURA 1 - Número de sementes germinadas de tangerineira 'Sunki' (*Citrus sunki* Hort. ex. Tan.) nas diferentes dosagens de ácido naftalenoacético.

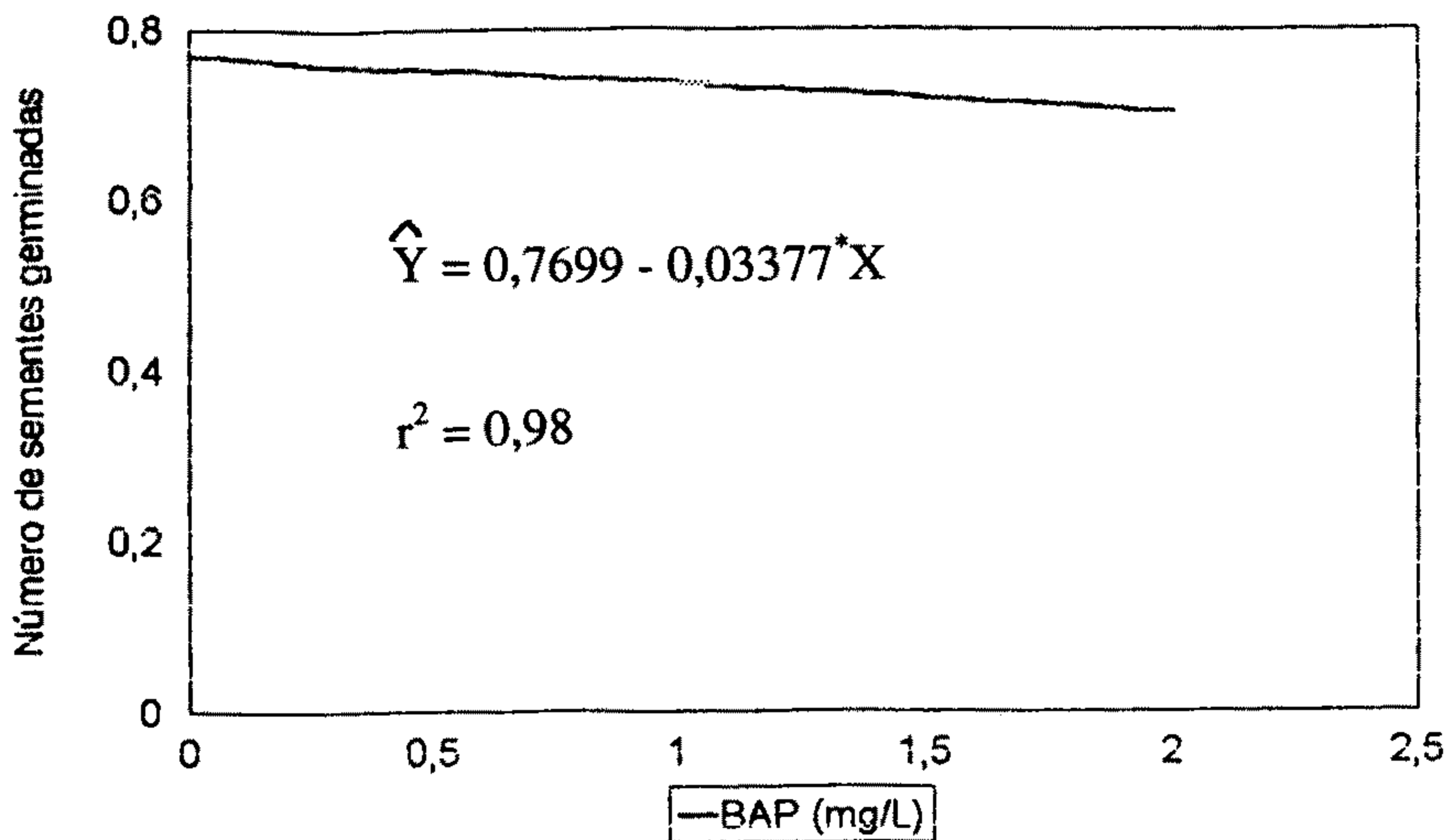


FIGURA 2 - Número de sementes germinadas de tangerineira 'Sunki' (*Citrus sunki* Hort. ex. Tan.) nas diferentes concentrações de benzilaminopurina.

processo e as etapas de desenvolvimento e posterior germinação das sementes e embriões mantêm um estreito relacionamento. Contudo, no caso de auxinas, o que foi observado contradiz as afirmações de PASQUAL (14), já que o regulador de crescimento ANA favoreceu a germinação de semente imaturas da tangerineira 'Sunki'.

A tentativa de se desenvolver as sementes *in vitro*, possibilitando a germinação da totalidade das sementes de cada fruto, não foi satisfatória. Isso sugere que novas pesquisas devem ser conduzidas com a utilização de novos reguladores de crescimento, como o ácido giberélico.

#### 4. CONCLUSÕES

1) O uso de BAP nas concentrações utilizadas não foi suficiente para promover desenvolvimento satisfatório *in vitro* de sementes imaturas de tangerineira 'Sunki'.

2) A concentração de 0,68 mg/L de ANA favoreceu a germinação de sementes imaturas de tangerineira 'Sunki'.

3) A percentagem de sementes desenvolvidas com posterior germinação foi muito baixa (8%).

#### 5. RESUMO

Frutos imaturos, com 10 a 12 semanas foram colhidos do porta-enxerto tangerineira 'Sunki' (*Citrus sunki* Hort. ex Tan.) do pomar da Universidade Federal de Lavras-UFLA. Posteriormente, suas sementes foram retiradas e desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1%, durante 20 minutos. A seguir, foram inoculadas em tubos de ensaio com dimensões de 25 x 150 mm, contendo 10 ml do meio básico MS suplementado com ANA (ácido naftalenacético) nas concentrações de 0; 0,01; 0,1; e 1,0 mg/L e BAP (benzilaminopurina) a 0; 0,25; 0,50; 1,0; e 2,0 mg/L e em todas as combinações entre os dois hormônios. Posteriormente, os tubos foram levados para sala de crescimento à temperatura de 27°C e 3.000 lux, com fotoperíodo de 16 horas. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições, e os tratamentos dispostos em esquema fatorial de 4 x 5 (níveis de ANA e BAP) com cinco tubos/parcela. Foram avaliados 40 dias após a inoculação. Concluiu-se que as concentrações utilizadas de BAP não permitiram desenvolvimento satisfatório das sementes imaturas; a melhor concentração de ANA estudada foi de 0,68 mg/L; e a germinação das sementes foi de apenas 8%.

## 6. SUMMARY

### (IN VITRO IMMATURE SEED GERMINATION OF *Citrus sunki* HORT. EX TAN. MANDARIN ROOTSTOCK)

Immature 10 to 12 week old fruits were collected from 'sunki' tangerine rootstock (*Citrus sunki* Hort. ex. Tan.) at the orchard of the "Universidade Federal de Lavras". Later their seeds were treated and disinfected with sodium hypochloride at 1% for twenty minutes. Then they were placed in 25 x 150 mm test tubes containing 10 ml of 'MS' medium supplemented by NAA in concentrations of 0, 0.01, 0.1, and 1.0 mg L<sup>-1</sup> and BAP at concentrations of 0, 0.25, 0.5, 1.0, and 2.0 mg L<sup>-1</sup> and in every combination of the two hormones. The cultures were then kept in the growth room for a 16-hour photoperiod, with a light intensity of 3,000 lux, and an average temperature of 25 degrees Celsius. The statistical design used was the entirely randomized factorial scheme with 4 x 5 concentrations (NAA and BAP) with 5 tubes/replication and 5 replications. The evaluation was done after 40 days of culturing. The conclusions were: BAP was not enough to complete seed development; the best concentration of NAA was 0.68 mg/L; only 8% of the seeds germinated.

## 7. LITERATURA CITADA

1. BAKRY, F. J. A embiogênese somática e suas aplicações. In: SIMPÓSIO DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1, Brasília, 1985. *Anais...* Brasília, EMBRAPA-DDT, 1986. p.29.
2. BOUZID, S. Quelques traits du comportement de boutures de *Citrus* en culture 'in vitro'. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences*, 280:1689-1692, 1975.
3. CHATUVERDI, H. C. & MITRA, G. C. Clonal propagation of *Citrus* from somatic callus cultures. *HortScience*, 9:118-120, 1974.
4. CRÓCOMO, O. J.; SHARP, W. R. & MELO, M. (eds). *Biotechnologia para produção vegetal*. Piracicaba, CEBTEC/FEALQ, 1991. 539p.
5. FIGUEIREDO, J. O. de; POMPEU JÚNIOR, J.; RODRIGUEZ, O.; CAETANO, A. A.; ROCHA, T. R. & IGUE, T. Comportamento de dez porta-enxertos para laranja-barão *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. In: CONGRESSO BRASILEIRA DE FRUTICULTURA, 6, Recife, 1981. *Anais...*, Recife, Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1981, v. 2, p. 501-516.
6. FROST, H. B. & SOOST, R. K. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In: BATCHELOR, L. D. & WEBBER, H. J. (eds.). *The citrus industry*. Berkeley, University of California Press, 1968. V. 2, p. 290-323.
7. GIACOMETTI, D. C. Taxonomia e nomenclatura de citros. In: Fundação Cargill. *Citricultura Brasileira*. Campinas, 1980. p. 183-194.
8. KITTO, S. L. & YOUNG, M. J. 'In vitro' propagation of "Carrizo citrange". *HortScience*, 16:305-306, 1981.



9. KOLLER, O. C. *Citricultura: laranjas e tangerina*. Porto Alegre, Editora Rígel, 1994. 446 p.
10. MOFFET, J. & RODNEY, R. Fairchild tangerine seed bees and pollinator trees. *Citrograph*, 56:407-408, 1971.
11. MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. *Annual Review of Plant Physiology*, 25:135-166, 1974.
12. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for growth and bioassays tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497, 1962.
13. OHTA, Y. & FURUSATO. Embryoculture in *Citrus*. *Republic Kihara Institute Biology Research*, 8:49-54, 1957.
14. PASQUAL, M. *Regeneração de plantas 'in vitro' e radio-sensitividade de tecidos nucleares de citros*. Piracicaba, ESALQ, 1985. 107 p. (Tese de Doutorado).
15. PASQUAL, M.; ANDO, A. & CRÓCOMO, O. J. *Desenvolvimento de embriões nucleares de Citrus sinensis Osbeck cv. Valência, 'in vitro'*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9, Campinas, 1987. *Anais...* Campinas, Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1987, V. 1., p. 305-309.
16. PIMENTEL-GOMES, F. *Curso de Estatística Experimental*. 11ª ed. São Paulo, Nobel, 1985. 466 p.
17. POMPEU JUNIOR, J., FIGUEIREDO, J. O.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; JORGE, J. de P. N. & SALIBE, A. A. Porta-enxerto para laranjeira Hamlim. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 4, Salvador, 1978. *Anais...*, Salvador, Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1978, V. 2, p. 105-110.
18. RAMOS, J. D. Taxa de poliembriônia e identificação do embrião 'in vitro' dos porta-enxertos *Citrus limonia Osbeck cv. Cravo e Poncirus trifoliata (L.) Raf.* Lavras, ESAL, 1990. 73 p. (Dissertação de Mestrado).
19. RAMOS, J. D. *Caracterização fenotípica do fruto, micropropagação e germinação de sementes do porta-enxerto tangerina 'Sunki'* (*Citrus sunki Hort. ex. Tan.*). Lavras, ESAL, 1994. 85 p. (Tese de Doutorado).
20. SALIBE, A. A. Importância do porta-enxerto na citricultura. In: ENCONTRO NACIONAL DE CITRICULTURA, 5, Rio de Janeiro, 1978. *Anais...*, Rio de Janeiro, PESAGRO-Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1978. 14 p.
21. SALIBE A. A. & MISCHAN, N. M. Efeito do porta-enxerto e da localidade nas características de cinco variedades de laranja doce *Citrus sinensis (L.) Osbeck*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 4, Salvador, 1978. *Anais...*, Salvador, Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1978. p. 93-104.
22. TEIXEIRA, S. L. & LANI, E. R. G. 'In vitro' regeneration of *Citrus sinensis cv. Pera*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 6, Minneapolis, Minnesota, 1986. p. 146a.
23. TEÓFILO SOBRINHO, J. Variedades copas e porta-enxertos para os citros In: MENTEN, J. O. M. (Ed.). *Curso intensivo de Citricultura*. Piracicaba, ESALQ/CERES, 1991. p. 25-36.
24. WONG, C. Y. The influence of pollination on seed development in certain varieties of *Citrus*. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sc.*, 37:161-164, 1940.