

INFLUÊNCIA DO GA₃ E DO CARVÃO ATIVADO SOBRE O ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE LARANJA 'NATAL'¹

MOACIR PASQUAL², VALTEMIR GONÇALVES RIBEIRO³ e JOSÉ DARLAN RAMOS⁴

RESUMO - Embriões de laranja 'Natal' (*Citrus sinensis* Osb.) foram extraídos de frutos, dez semanas após a polinização, classificados em pequenos (< 3 mm), médios (3-6 mm) e grandes (> 6 mm) e cultivados *in vitro*. Utilizou-se o meio "MS", desprovido de reguladores de crescimento, acrescido de combinações de GA₃ (0,0, 0,01, 0,1 e 1,0 mg/l) e carvão ativado (0,0, 0,3 e 1,0 g/l), sendo o pH ajustado para 5,7, e o meio, solidificado com 7 g/l de ágar. A maior percentagem de enraizamento de embriões foi obtida com 0,01 e 1,0 mg/l de ácido giberélico e 1,0 g/l de carvão ativado. Melhor desenvolvimento de raízes verificou-se com 1,0 g/l de carvão ativado e 1,0 mg/l de ácido giberélico.

Termos para indexação: cultura de tecidos, *Citrus sinensis*, polinização, cultura de embriões.

EFFECT OF GA₃ AND ACTIVE CHARCOAL ON THE *IN VITRO* ROOTING OF 'NATAL' SWEET ORANGE

ABSTRACT - Embryos of 'Natal' sweet orange (*Citrus sinensis* Osb.) were excised from fruits ten weeks after pollination. They were classified by size (< 3 mm, 3-6 mm and > 6 mm) and cultivated *in vitro*. The "MS" media were used without growth regulators, including combinations of gibberellic acid (0.0, 0.01, 0.1 and 1.0 mg/l) and active charcoal (0.0, 0.3 and 1.0 g/l), with pH 5.7 and agar 7 g/l. The highest frequency of rooting was observed in gibberellic acid 0.01 and 1.0 mg/l with active charcoal 1.0 g/l. The best root development was observed in gibberellic acid 1.0 mg/l and active charcoal 1.0 g/l.

Index terms: tissue culture, *Citrus sinensis*, pollination, embryos culture.

INTRODUÇÃO

Os citros, de modo geral, apresentam o fenômeno da poliembrião, que dificulta a identificação dos embriões zigóticos e compromete o seu desenvolvimento pela competição com os embriões nucelares, constituindo sério entrave ao melhoramento das espécies cítricas. A cultura de embriões *in vitro* pode assegurar a sobrevivência do embrião zigótico.

A cultura de embriões permite estudar os fatores que influenciam o crescimento dos embriões e dos primórdios de órgãos na plântula, além de possibilitar o esclarecimento de as-

pectos metabólicos e bioquímicos da germinação e dormência. Do ponto de vista prático, embriões cultivados *in vitro* permitem estudar as necessidades nutricionais e físicas afetas ao seu desenvolvimento, superar a dormência em certos tipos de sementes, testar a viabilidade das sementes e salvar embriões híbridos imaturos oriundos de cruzamentos incompatíveis. Esta última aplicação é, modernamente, a mais amplamente usada.

Embriões excisados da cultivar poliembriônica Laranja-Azeda (*Citrus aurantium*) 100 a 120 dias após a polinização foram cultivados com sucesso por Rangan et al. (1969). Embriões de sementes imaturas de 'Satsuma' (*C. unshiu* Marc.), polinizada por *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., mostraram um bom desenvolvimento quando isolados aos 90 a 120 dias após a polinização e cultivados em meio MS mais suco de pepino-20% (Horiuchi et al. 1976).

¹ Aceito para publicação em 24 de maio de 1990.

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

³ Em curso de Agronomia na ESAL. Bolsista do CNPq.

⁴ Eng. - Agr., em curso de Pós-graduação em Agronomia, Genética e Melhoramento de Plantas. ESAL, Lavras, MG.

É vital a distinção entre a descendência zigótica e a nucelar em estádios precoces; o problema poderá ser resolvido com marcadores genéticos seguros que expressem características morfológicas definidas, como é o caso da folha trilobada em *Poncirus trifoliata*.

Existem muitas informações sobre os efeitos do ácido giberélico (GA) em embriões extraídos de sementes dormentes que não germinam mesmo em condições ideais.

Os efeitos do GA₃, de acordo com Kochba et al. (1974), são explicados por duas hipóteses: 1) promove o desenvolvimento ontogenético natural dos embriões sem primórdio radicular àqueles com primórdio, que então desenvolvem raízes na ausência de substâncias exógenas de crescimento; 2) proporciona diretamente a iniciação de uma zona meristemática radicular e/ou estimula o desenvolvimento de uma zona radicular existente.

Apesar de as raízes de plantas intactas serem menos sensíveis a várias giberelinas, a adição de GA ao meio tem promovido o alongamento de raízes em embriões de *Capsella bursapastoris*. Por outro lado, embriões de coco, cujos primórdios radiculares são iniciados sob a influência de GA, geralmente falham quanto a seu alongamento, a menos que sejam transferidos para um meio sem hormônio. Evidências mostram que o efeito do GA aplicado é dependente da idade dos embriões e do sítio de absorção do hormônio (Rhagavan & Torrey 1964).

A incorporação de GA₃ - 1 mg/l aumenta o desenvolvimento de raízes em embriões de citros, plenamente ou parcialmente desenvolvidos (Rangaswamy 1961, Button & Bornman 1971, Kochba et al. 1974), enquanto que reguladores de crescimento, usualmente conhecidos como estimulantes do enraizamento, a exemplo do NAA e IBA, o suprimem.

Baixas concentrações de GA (0,01 mg/l) podem promover o desenvolvimento de embriões jovens de cevada (Schooler 1960, Norstog 1979). GA tem sido efetivo em estimular o crescimento de embriões de feijão (Skene 1969, Nagl 1974, Cionini et al. 1976),

especialmente quando os suspensores são excluídos.

O carvão ativado, segundo Pasqual & Pinto (1988), por absorver substâncias inibitórias do meio ou produtos tóxicos liberados pelos explantes, também pode promover o crescimento dos embriões.

Objetivou-se, com o presente trabalho, determinar o efeito de diferentes concentrações de ácido giberélico e do carvão ativado sobre o enraizamento de embriões de laranja 'Natal'.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de cultura de tecidos da Escola Superior de Agricultura de Lavras, MG, com a cultivar Natal (*Citrus sinensis* Osb.).

Frutos com aproximadamente dez semanas após a polinização (polinização aberta) foram colhidos no pomar da ESAL e levados para o laboratório, onde suas sementes foram removidas e submetidas a uma assepsia em solução de hipoclorito de sódio a 1%, por 15 minutos.

Em câmara asséptica, de fluxo laminar, as sementes foram lavadas por três vezes consecutivas em água destilada autoclavada e, posteriormente, foram dissecadas para a retirada dos embriões. Os embriões foram inoculados em meio "MS" sem reguladores de crescimento e transferidos para sala de crescimento a uma temperatura de 27°C e 16 horas diárias de luz (1.500 lux), onde permaneceram por 30 dias.

A seguir, estes mesmos embriões foram classificados em pequenos (< 3 mm), médios (3-6 mm) e grandes (>6 mm), reinoculados individualmente em tubos de ensaio contendo meio "MS" acrescido de todas as combinações possíveis de GA₃ (0,0, 0,01, 0,1 e 1,0 mg/l) e carvão ativado (0,0, 0,3 e 1,0 g/l). O pH foi ajustado para 5,7 e o meio solidificado por 8 g/l de ágar. O experimento foi conduzido em sala de crescimento com temperatura de 27°C e 16 horas de luz (1.500 lux).

Usou-se o delineamento inteiramente ao acaso, com dez repetições.

O experimento foi avaliado, 30 dias após a instalação, quanto à percentagem de enraizamento e comprimento das raízes, e, para efeito de análise estatística, os dados foram transformados para $\sqrt{x + 0,5}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados relativos à percentagem de enraizamento de embriões pequenos, médios e grandes são expostos na Tabela 1 e Fig. 1, para as diferentes concentrações de GA₃ e carvão ativado utilizadas.

Obteve-se algum enraizamento de embriões pequenos em GA₃ na razão de 0,0 ou 0,01 mg/l apenas quando carvão na proporção de 1,0 g/l foi incorporado ao meio de cultura (Fig. 1a). Com GA₃ a 1,0 mg/l índices razoáveis foram observados também em carvão a 0,3 g/l. Estes resultados estão de acordo com afirmações de Kochba et al. (1974), de que os embriões pequenos são estimulados pelo GA₃ a desenvolverem os primórdios radiculares, para depois entrarem na fase de emissão de raízes.

Para embriões considerados médios (Fig. 1b), as melhores taxas de enraizamento foram registradas com GA₃ a 0,01 e 1,0 mg/l, independentemente da concentração de carvão utilizada. Vale ressaltar que estes embriões, já com algum grau de desenvolvimento, respondem bem a concentrações menores de GA₃, mesmo sem a inclusão de carvão ativado. Isto comprova que os embriões precisam passar pelas diferentes fases de desenvolvimento e que nos estádios mais precoces são mais exigentes em termos nutricionais.

Nos embriões grandes foram observadas as mais altas percentagens de enraizamento, evi-

denciando sempre as doses 0,01 e 1,0 mg/l de GA₃ (Fig. 1c); neste caso, a concentração de 1,0 g/l de carvão apresentou um comportamento superior ao das demais.

Este efeito, mais acentuado do GA₃ em embriões maiores, traz uma indicação clara da necessidade de os embriões evoluírem, através

TABELA 1. Enraizamento (%) de embriões pequenos, médios e grandes de laranja 'Natal' em diferentes concentrações de GA₃ e carvão ativado.

Tratamentos		Percentagem de enraizamento		
GA ₃ (mg/l)	Carvão ativado (g/l)	Embriões		
		Pequenos	Médios	Grandes
1,0	1,0	16,7	33,3	83,3
1,0	0,3	50,0	33,3	66,7
1,0	0,0	0,0	33,3	0,0
0,1	1,0	0,0	0,0	50,0
0,1	0,3	0,0	0,0	0,0
0,1	0,0	0,0	20,0	0,0
0,01	1,0	33,3	50,0	83,3
0,01	0,3	0,0	50,0	33,3
0,01	0,0	0,0	50,0	40,0
0,0	1,0	16,7	25,0	50,0
0,0	0,3	0,0	40,0	50,0
0,0	0,0	0,0	16,7	16,7

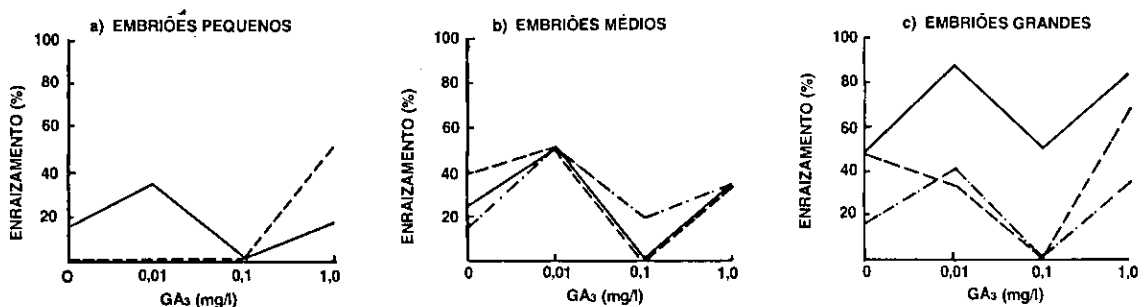


FIG. 1. Percentagem de enraizamento de embriões pequenos, médios e grandes, em diferentes concentrações de ácido giberélico e de carvão ativado.

Carvão Ativado: 1,0 g/l —————; 0,3 g/l - - - - -; 0,0 g/l - . - . - . - . - . - . - . - . - .

das diversas fases de desenvolvimento, para posteriormente, serem submetidos ao processo de enraizamento.

Verifica-se, na Fig. 2, independentemente do tamanho dos embriões, uma possível interação entre o GA₃ e o carvão ativado, uma vez que quando se usou carvão a 0,3 g/l obtiveram-se índices mais elevados de germinação com a concentração mais alta de GA₃ (1,0 mg/l), enquanto que o uso de 1,0 g de carvão propiciou efeitos mais significativos do GA₃ a 0,01 mg/l. Considerando-se que o carvão tem a capacidade de absorver substâncias que são tóxicas ao explante (Pasqual & Pinto 1988), pode-se supor que o meio "MS" contém alguns componentes inibitórios à germinação de embriões, o que tem sido comprovado em outros explantes, onde a porcentagem de germinação foi maior quando se usou apenas 1/2 ou 1/3 dos sais do meio "MS".

A Tabela 2 evidencia que o comprimento das raízes mostrou significância para ácido giberélico (GA₃) nos embriões pequenos e médios ao nível de 5% de probabilidade, e nos embriões grandes, ao nível de 1%. Significância a 1% também foi mostrada pelos embriões grandes para carvão ativado.

Observa-se, na Tabela 3, que, tanto para embriões pequenos como para embriões gran-

des, o melhor crescimento das raízes foi verificado em GA₃ - 1,0 mg/l, não apresentando, no entanto, diferença significativa para GA₃ a 0,01 mg/l e testemunha. Por outro lado, a diferença estatística evidenciada para embriões médios (Tabela 1) não foi revelada pela aplicação do teste de Tukey (Tabela 3).

Estes dados concordam com afirmações de vários autores de que o GA₃ tem sido efetivo em promover o crescimento de embriões, mesmo em concentrações baixas como 0,01 mg/l usadas em embriões jovens de cevada (Schooler 1960, Norstog 1979).

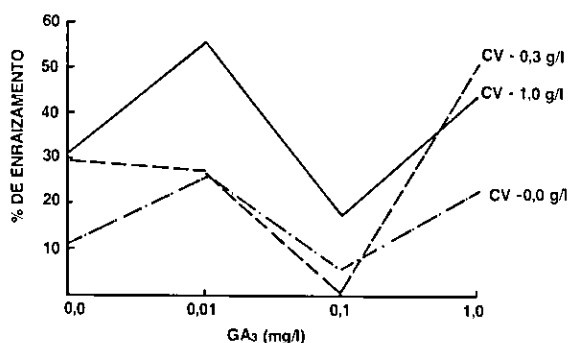


FIG. 2. Porcentagem média de enraizamento de embriões (independente de tamanho) em diferentes concentrações de GA₃ e carvão ativado.

TABELA 2. Quadrados médios para comprimento de raízes de embriões pequenos, médios e grandes com o respectivo grau de significância.

Fontes de variação	Quadrados médios		
	Embriões		
	Pequenos	Médios	Grandes
Total de redução	0,1576429	0,1149524	1,138515
Média	0,3987783	0,61154712	8,375357
Carvão ativado (cv)	0,8724449	0,7302552	0,8091540**
Ácido giberélico	0,1995303*	0,1467030*	0,7613841**
CV x GA ₃	0,1199759	0,2963288	0,2307263
Resíduo	0,5605562	0,4430392	0,1342216
Coefficiente de variação	30,022%	26,038%	35,206%

Os efeitos mais significativos identificados com GA₃ a 1,0 mg/l concordam com resultados obtidos por Rangaswamy (1961), Button & Bornman (1971) e Kochba et al. (1974), os quais indicam que o GA₃ 1,0 mg/l aumentou o desenvolvimento de raízes em embriões plenamente ou parcialmente desenvolvidos de citros.

Os resultados do crescimento das raízes de embriões grandes para as diferentes concentrações de carvão são apresentados na Fig. 3, onde se evidencia o melhor tratamento em 1,0 g/l, não diferindo significativamente de carvão 0,3 g/l.

TABELA 3. Comprimento médio das raízes (cm) de embriões pequenos, médios e grandes em presença de diversas concentrações de GA₃

Tratamentos mg/l	Comprimento das raízes (cm)		
	Embriões		
	Pequenos	Médios	Grandes
GA ₃ - 0,0	0,7416 ab	0,7416 a	1,0383 ab
GA ₃ - 0,01	0,7462 ab	0,9083 a	1,0329 ab
GA ₃ - 0,1	0,7071 b	0,7071 a	0,7698 b
GA ₃ - 1,0	0,9596 a	0,8785 a	1,3214 a

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey - 5%.



FIG. 3. Comprimento médio (cm) de raízes de embriões grandes em diferentes concentrações de carvão ativado.

CONCLUSÕES

1. Melhor enraizamento de embriões é obtido com 0,01 e 1,0 mg/l de GA₃ e 1,0 g/l de carvão ativado.

2. Diferentes concentrações de carvão ativado e de ácido giberélico influenciam significativamente o desenvolvimento radicular de embriões.

3. Maior comprimento radicular de embriões grandes é obtido com 1 g/l de carvão ativado.

4. Maior comprimento radicular de embriões pequenos, médios e grandes é obtido com 1 mg/l de ácido giberélico.

5. Há necessidade de os embriões evoluírem, através das diversas fases de desenvolvimento, antes de serem submetidos ao processo de enraizamento.

REFERÊNCIAS

- BUTTON, J. & BORNMAN, C.H. Development of nucellar plants from unpollinated and unfertilised ovules of the Washington navel orange *in vitro*. *Journal South African Botany*, **37**: 127-34, 1971.
- CIONINI, P.G.; BENNICI, A.; ALPI, A.; D'AMATO, F. Suspensor, gibberellin and *in vitro* development of *Phaseolus coccineus* embryos. *Planta*, **131**:115-17, 1976.
- HORIUCHI, S.; YUDA, E.; NAKAGAMA, S. *In vitro* culture of young embryo in polyembryonic citrus. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.*, **45**:253-60, 1976.
- KOCHBA, J.; BUTTON, J.; SPIEGEL-ROY, P.; BORNMAN, C.H.; KOCHBA, M. Stimulation of rooting of citrus embryoids by gibberellic acid and adenine sulphate. *Ann. Bot.*, **38**:795-802, 1974.
- NAGL, W. The *Phaseolus* suspensor and its polytene chromosomes. *Z. Pflanzenphysiol.* **73**:1-44, 1974.
- 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 University Press, 1979. p.197-202.
- PASQUAL, M. & PINTO, J.E.B.P. Cultura de embriões. **ABCTP Notícias**, 9:2-12, 1988.
- RANGAN, T.S.; MURASHIGE, T.; BITTERS, W.P. *In vitro* studies of zygotic and nucellar embryogenesis in citurs. In: CHAPMAN, H.D., ed. **Proc. First Int. Citrus Symp.** s.l., s.ed., 1969. p.255-9.
- RANGASWAMY, N.S. Experimental studies on female reproductive structures of *Citrus microcarpa*, Bunge. **Phytomorph.**, 11:109-27, 1961.
- RHAGAVAN, V. & TORREY, J.G. Effects of certain growth substances on the growth and morphogenesis of immature embryos of *Capsella* in culture. **Plant Physiol.**, 39:691-99, 1964.
- SCHOOLER, A.B. The effect of gibberel and gibberellic acid (K salt) in embryo culture media for *Hordeum vulgare*. **Agron. J.**, 52:411, 1960.
- SKENE, K.G.M. Stimulation of germination of immature bean embryos by gibberellic acid. **Planta**, 87:181-92, 1969.