

# INFLUÊNCIA DA IRRADIAÇÃO GAMA NA PRODUÇÃO DE CALOS NUCELARES DE *CITRUS SINENSIS* OSB. CV. VALÊNCIA *IN VITRO*<sup>1</sup>

MOACIR PASQUAL<sup>2</sup> e AKIHIKO ANDO<sup>3</sup>

**RESUMO** - Os métodos convencionais pouco têm contribuído para o melhoramento das espécies cítricas. A utilização das técnicas de cultura *in vitro* associadas à indução de mutações deverão trazer inestimável contribuição. Nucelos extraídos de frutos em desenvolvimento, doze semanas após a polinização, foram cultivados *in vitro* em meio "MS" adicionado (em mg/l) de: tiamina HCl - 0,2; piridoxina HCl - 1,0; ácido nicotínico - 1,0; meso-inositol - 100; extrato de malte - 500; sacarose - 50.000; ágar - 8.000, com pH ajustado para 5,7. Procedeu-se à irradiação, apenas do meio ou do nucelo, ou de ambos, nas doses de 0,0, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0 e 12,0 kR. A irradiação apenas do nucelo mostrou um efeito similar ao obtido pela irradiação tanto do nucelo como do meio. Doses baixas de radiação (até 2 kR) reduzem o número de embriões diferenciados. A irradiação do meio de cultura aumenta a proliferação de calos, principalmente em doses mais elevadas.

Termos para indexação: cultura de tecidos, <sup>60</sup>CO, tecido nucelar, citros, indução de mutações.

## EFFECTS OF GAMMA IRRADIATION ON NUCELLAR CALLUS PRODUCTION OF THE 'VALÊNCIA' SWEET ORANGE (*CITRUS SINENSIS* OSB.) *IN VITRO*

**ABSTRACT** - The conventional methods of plant breeding have not given a significant contribution for the citrus breeding. A precious improvement by the techniques of tissues culture *in vitro*, associated with induced mutations, is expected. Nucelli extracted from developing fruits with twelve weeks after pollination were cultured *in vitro*, on "MS" medium supplemented (in mg/l) by: thiamine HCl 0.2; pyridoxine HCl 1.0; nicotinic acid 1.0; meso-inositol 100; malt extract; sucrose 50.000; and agar 8.000 with pH = 5.7. The irradiation at 0.0; 0.5; 1.0; 2.0; 4.0; 8.0 and 12.0 kR doses was applied on, only medium, only nucellus, and medium and nucellus together. Irradiation of only nucellus and both nucellus and medium, at the same time, showed similar effects. Low doses of irradiation (until 2 kR) decrease the number of differential embryoids. The irradiation of culture medium, mainly at high doses, increases callus proliferation.

Index terms: tissues culture, <sup>60</sup>CO, nucellar tissues, citrus, mutations induction.

## INTRODUÇÃO

A maioria das cultivares de citros tem se originado a partir de mutações espontâneas ou induzidas, uma vez que o melhoramento genético destas espécies é seriamente dificultado pela ocorrência de poliembrião, esterilidade masculina, incompatibilidade e longo período de juvenildade.

A utilização de agentes mutagênicos sobre tecidos nucelares em meio de cultura conduz a uma elevada formação de calos (Pasqual et al. 1986), os quais permitem a obtenção de variabilidades genéticas que poderão ser úteis para os programas de melhoramento.

A irradiação de tecidos vegetais cultivados *in vitro* e meios de cultura, tem fornecido inúmeros exemplos de degradação e formação de substâncias. O tratamento com radiação baixa os níveis de auxinas (Chourey et al. 1973). Isto forneceria uma explicação sobre o estímulo à embriogênese proporcionado pela irradiação (Kochba & Spiegel-Roy 1976, Spiegel-Roy & Kochba 1980), quando as auxinas fossem reduzidas a um nível mais pró-

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 22 de maio de 1990.

<sup>2</sup> Eng.-Agr., Dr., Prof.-Adj., Dep. de Agric. da ESAL, Caixa Postal 37, CEP 37200 Lavras, MG. Bolsista do CNPq.

<sup>3</sup> Eng.-Agr., Prof.-Assist., Dep. de Genética da ESALQ e Pesquisador do CENA, Caixa Postal 96, CEP 13400 Piracicaba, SP. Bolsista do CNPq.

ximo do ótimo para diferenciação de embriões.

A irradiação de certos componentes do meio pode reduzir drasticamente o peso das culturas e a capacidade para diferenciação de embriões, como observado por Kochba & Spiegel-Roy (1973) em meio adicionado de adenina (20, 40 e 80 mg/l). Em meio suplementado com altas doses de cinetina (1 mg/l) e AIA (ácido indol acético) (1 mg/l), o peso das culturas foi baixo e não houve formação de embriões com ou sem irradiação; por outro lado, com baixas concentrações de cinetina (0,1 mg/l) e AIA (0,1 mg/l) a irradiação diminuiu o crescimento dos calos, porém estimulou notavelmente a diferenciação de embriões.

A adição de AIA não irradiado ao calo irradiado resultou num fenômeno dependente de dose: enquanto em baixas doses de radiação (menos que 8 kR) a embriogênese foi inibida pelo AIA, a inibição foi gradualmente superada por doses mais altas que 8 kR (Kochba & Spiegel-Roy 1977). Algumas doses de radiação (12 a 16 kR), juntamente com níveis de AIA, ainda estimularam a embriogênese e aumentaram a taxa de desenvolvimento de embriões. Usualmente doses letais (30 Kr) ainda permitem a sobrevivência e o crescimento de culturas na presença de AIA (Kochba & Spiegel-Roy 1977). Spiegel-Roy & Kochba (1980) postularam que com certas doses de radiação a auxina é reduzida a níveis subótimos. O AIA adicionado, promoveria então embriogênese, como de fato foi observado.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos junto à seção de radiogenética do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), da Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba, SP.

Os frutos da cv. Valência, doze semanas após a polinização, foram obtidos na E.E. de Limeira, unidade do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), em Cordeirópolis, SP. Antes da remoção das sementes, os frutos foram lavados em solução de detergente e esterilizados com hipoclorito de sódio a 2%, durante 20 minutos. As sementes foram remo-

vidas, e sob estereomicroscópio, através de um corte longitudinal, removeram-se os integumentos. Com um corte transversal na região da micrópila procedeu-se à eliminação do embrião zigótico.

O meio de cultura se constituiu dos macro e micronutrientes do meio "MS", suplementado (em mg/l) com: tiamina HCl - 0,2; piridoxina HCl - 1,0; ácido nicotínico - 1,0; meso-inositol - 100; extrato de malte - 500; e sacarose - 50.000. O pH foi ajustado para 5,7, e o meio, solidificado com bacto ágar (8 g/l) e autoclavado a 120°C por 20 minutos.

Cada nucelo foi inoculado em um tubo de ensaio (de 10 x 20 cm) contendo 10 ml do meio "MS". A irradiação foi feita com raios gama da fonte de <sup>60</sup>Co do CENA-USP, nas doses 0,0, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0 e 12,0 kR, a uma intensidade de 97 kR/ha, para os seguintes tratamentos:

- a. irradiação do meio;
- b. irradiação do nucelo;
- c. irradiação do meio e do nucelo;
- d. testemunha (sem irradiação).

Efetuar-se 20 repetições mantidas à luz (1.500 lux) durante 16 horas diárias e a 27°C, e foram efetuadas as seguintes avaliações: número de embriões por nucelo, percentagens de núclos com calos, de embriões com raiz e de deformações nos cotilédones.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A irradiação apenas dos núclos (Trat. B), mostrou um efeito similar àquele fornecido pela irradiação do nucelo e do meio, por ocasião da inoculação (Trat. C), como se pode observar na Tabela 1 e Fig. 1. Por outro lado, observou-se que com a irradiação apenas do meio de cultura (Trat. A), houve um decréscimo no número de embriões diferenciados, nas doses mais baixas (até 2,0 kR), o qual foi gradualmente se elevando com o aumento das doses de radiação. As doses de 12,0, 8,0 e 4,0 kR não diferiram da testemunha.

Sob o ponto de vista estatístico, os tratamentos do meio (A) nas doses de 4,0, 8,0 e 12,0 kR, do nucelo (B) com 1,0 kR, do nucelo e do meio (C) com 0,5 e 2,0 kR não diferiram da testemunha pelo teste de Tukey a 5% (Tabela 1).

Este estímulo à embriogênese, fornecido pela irradiação do meio de cultura, tem sido

TABELA 1. Observações realizadas em cultura de nucelos de 'Valência' após irradiação do meio (A), do nucelo (B) ou do meio e do nucelo (C).

Tratamento kR	Embriões/ frasco (n°)	% de Embriões					Embriões anormais (%)	Frascos com calos globu- lares (%)	
		G	M	P	PRO	C. Raiz			
(Testemunha)	4,9 ab	57,0	15,1	11,4	-	16,5	10,6	18,7	
A	0,5	2,1 bcd	18,7	12,5	12,5	31,5	24,8	9,4	60,0
	1,0	3,1 bcd	30,3	16,0	19,6	10,7	23,4	28,5	22,2
	2,0	2,7 bcd	22,7	11,4	15,9	6,8	43,2	27,2	12,5
	4,0	3,7 abc	11,8	8,5	20,3	27,1	32,3	10,2	43,7
	8,0	3,9 abc	21,0	24,2	16,1	22,6	16,1	14,5	56,2
	12,0	5,9 a	16,7	18,0	18,0	37,3	10,0	21,7	85,8
B	0,5	2,8 bcd	44,4	11,2	15,5	4,5	24,4	8,9	6,3
	1,0	3,3 abc	40,8	6,1	18,4	10,2	24,5	36,7	13,3
	2,0	3,0 bcd	14,3	26,2	14,3	35,7	9,5	30,9	50,0
	4,0	1,8 cde	30,8	15,4	11,5	34,6	7,7	53,8	60,0
	8,0	1,9 cde	50,0	18,7	25,0	0,0	6,3	71,8	5,8
	12,0	0,3 e	40,0	20,0	40,0	0,0	0,0	80,0	6,7
C	0,5	3,6 abc	25,9	37,0	20,4	0,0	15,9	21,0	33,3
	1,0	2,8 bcd	48,0	41,7	0,0	0,0	10,3	23,8	17,6
	2,0	3,3 abcd	36,7	41,6	15,0	0,0	6,7	68,7	27,7
	4,0	1,7 cde	0,0	51,8	25,9	0,0	22,3	66,6	6,2
	8,0	1,0 de	52,9	23,6	0,0	0,0	23,5	66,6	0,0
	12,0	0,3 e	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

G = grande (>6 mm), M = médio (3-6 mm), P = pequenos (<3 mm), PRO = proembriões.

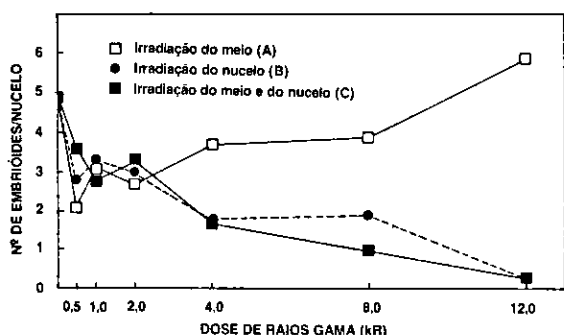


FIG. 1. Número de embriões obtidos de nucelos após irradiação (em diferentes fases) do meio (A), do nucelo (B) ou do nucelo e do meio (C).

atribuído a uma redução dos níveis de auxina (Chourey et al. 1973) ou de outras substâncias inibidoras do processo embriogênico. Auxinas e citocininas inibem a embriogênese de nucelos e calos nucelares, porém a irradiação do meio de cultura adicionado de cinetina 0,1 mg/l e AIA-0,1 mg/l (Spiegel-Roy & Kochba 1980) estimulou notavelmente a diferenciação de embriões. Provavelmente alguma substância componente do meio estaria comprometendo a embriogênese e, com a irradiação, estas substâncias seriam reduzidas a um nível mais próximo do ótimo para diferenciação de embriões.

O incremento na formação de calos constituídos por corpúsculos globulares em meio

tratado com altas doses de radiação, como pode ser visto na Tabela 1 e Fig. 2, fornece outra explicação para o aumento do número de embriões neste mesmo meio. Estes calos são altamente embriogênicos e poderiam ter sido os responsáveis pelo número adicional de embriões diferenciados. A irradiação apenas do nucelo (Trat. B), com doses de 2,0 e 4,0 kR, estimulou fortemente a formação deste tipo de calo (Fig. 2). Nos demais tratamentos, a presença destes calos não foi tão significativa.

Tanto os nucelos quanto os calos nucelares se constituem, juntamente com protoplastos, suspensão celular e microsporos, em materiais extremamente úteis no melhoramento por indução de mutações, utilizando as técnicas de cultura de tecidos e células. Isto significaria também uma pré-seleção em uma escala sem precedente, e uma apreciável contribuição à variabilidade genética.

O desenvolvimento e aperfeiçoamento dos métodos pode, de fato, no futuro, dirigir uma maior parte dos esforços com melhoramento em direção à mutagênese.

O índice de anormalidade de embriões com a irradiação apenas do meio foi inferior àquele com irradiação dos nucelos (Tabela 2), e estes embriões, embora anormais, produzem plantas aparentemente normais. Fato se-

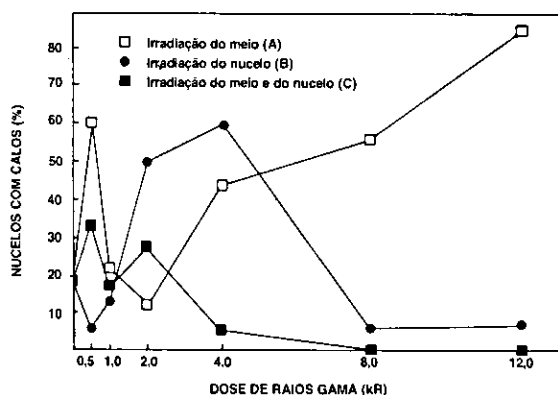


FIG. 2. Nucelos que produziram calos (%) após irradiação (em diferentes doses) do meio (A), do nucelo (B) ou do meio e do nucelo (C).

TABELA 2. Desenvolvimento de embriões individualizados obtidos de nucelos após irradiação (em diferentes doses) do meio (A), do nucelo (B), ou do nucelo e do meio (C).

Tratamento kR	Raiz	Diferenciação de (%)			Proembriões	
		Parte aérea	Plântula	Embriões		
Testemunha	16,0	11,4	63,0	8,0	12,0	
A	0,5	14,3	28,6	14,3	7,2	28,5
	1,0	8,1	13,5	37,8	5,4	8,1
	2,0	4,5	9,1	45,4	18,2	18,2
	4,0	37,5	0,0	8,3	0,0	25,0
	8,0	5,3	0,0	44,5	15,8	5,3
	12,0	14,7	2,9	44,1	55,9	14,7
B	0,5	21,4	7,1	14,3	0,0	0,0
	1,0	6,3	6,2	53,1	28,1	12,5
	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4,0	44,4	0,0	44,4	0,0	33,3
	8,0	19,6	5,4	34,0	0,0	14,3
	12,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C	0,5	55,2	17,2	10,3	0,0	6,9
	1,0	15,8	26,3	21,0	21,0	10,5
	2,0	6,7	30,0	30,0	6,7	0,0
	4,0	0,0	0,0	50,0	0,0	0,0
	8,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	12,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

melhante havia sido observado por Navarro et al. (1979).

Ainda na Tabela 2 percebe-se que os embriões podem originar novos embriões e proembriões, se constituindo também em uma possibilidade de multiplicação de embriões, desde que lhes sejam fornecidas condições adequadas. Observações similares têm sido feitas por Esan (1973), caracterizando esta proliferação como um processo de gemação.

## CONCLUSÕES

1. A irradiação apenas do nucelo mostrou um efeito similar àquele fornecido pela irradiação do meio e do nucelo;

2. A irradiação do meio de cultura com doses baixas (até 2,0 kR), reduz o número de embriões diferenciados;

3. A irradiação do meio de cultura aumenta a proliferação de calos, principalmente em doses mais elevadas (12,0 kR);

4. Plantas normais são obtidas de embriões aparentemente anormais.

### REFERÊNCIAS

- CHOUREY, P.S.; SMITH, H.H.; COMBATTI, N.C. Effects of X irradiation and indolacetic acid on specific peroxidase isozymes and pith tissue of a *Nicotiana amphiploid*. *Am. J. Bot.*, **60**(9):853-7. 1973.
- ESAN, E.B. **A detailed study of adventive embryogenesis in the rutaceae**. Riverside, University of California, 1973. 223p. Tese Doutorado.
- 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. The use of Citrus tissue culture for mutation breeding: Effects of plant growth substances and gamma irradiation on embryogenesis. In: RESEARCH COORDINATION MEETING ON IMPROVEMENT OF VEGETATIVELY PROPAGATED PLANTS AND TREE CROPS THROUGH INDUCED MUTATIONS, 2, Wageningen, 1976. *Proceedings*. . . Vienna, IAEA, 1976. p.83-91. (IAEA, 194).
- KOCHBA, J. & SPIEGEL-ROY, P. Embryogenesis in gamma-irradiated habituated ovular callus of the 'shamouti' orange as affected by auxin and by tissue age. *Env. Exp. Bot.*, **17**(2/4):151-9, 1977.
- NAVARRO, L.; JUAREZ, J.; BALLESTER, J.F.; PINA, J.A.; ORTEGA, C. Obtención de plantas nucleares libres de virus de diversas variedades de agrios del grupo Navel (*C. sinensis* (L.) Osb.) por cultivo de óvulos *in vitro*. *Anales Inst. Nac. Invest. Agrar., Serie Protección Vegetal*, **12**:95-113, 1979.
- PASQUAL, M.; ANDO, A.; TULMANN NETO, A.; MENTEN, J.O.M. Irradição gama de núcelos de valência (*Citrus sinensis* Osb.) cultivados *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 8, Brasília, 1986. *Anais*. . . Brasília, SBF, 1986. p.111-6.
- SPIEGEL-ROY, P. & KOCHBA, J. Embryogenesis in citrus tissue cultures. In: FIECHTER, A., ed. *Advances in biochemical engineering*. Berlin, Springer-Verlag, 1980. p.27-48.