

EFEITO DO FLOROGLUCINOL NA REAÇÃO MORFOGÊNICA IN VITRO DE SEGMENTOS INTERNODAIS DE *Citrus sinensis* (Linn.)

Osbeck cv. Pêra¹

Edilson Romais Schmidt²

Claudia Teixeira Guimarães²³

Elizonete Ribeiro Garcia Lani³

Sílvio Lopes Teixeira⁴

RESUMO

Conduziu-se este trabalho em condições controladas de laboratório, com o objetivo de avaliar os efeitos do floriglucinol, em diferentes níveis, sobre a reação morfogênica in vitro de segmentos internodais, casca e cilindro central de *Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck cv. Pêra. Utilizou-se, para multiplicação, o meio básico de MS semi-sólido com complementos orgânicos em mg L⁻¹: mio-inositol 100, sacarose 30.000, extrato de malte 500, BAP (6-benzilaminopurina) 0,3 e floriglucinol em níveis 0, 30, 60, 90 e 120 incubados no escuro, por quatro semanas, e mais quatro semanas, sob luz com fotoperíodo de 16 horas. Brotações adventícias obtidas do explante casca foram submetidas ao enraizamento em meio semi-sólido MS com os complementos orgânicos em mg L⁻¹: mio-inositol 55, sacarose 87.600, ANA (ácido α -naftalenoacético) 0,09. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições, considerando-se, em cada uma, a média de quatro tubos de ensaio. Nas avaliações morfogênicas, observou-se que nos explantes casca não ocorreu influência sobre o percentual de culturas caejadas e com gemas adventícias, bem como comprimento das brotações adventícias, o mesmo não ocorrendo com as características número de brotações adventícias por explante e

¹ Aceito para publicação em 09.11.1999.

² Estudante de pós-graduação em Genética e Melhoramento (DS). Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa. 36571-000 Viçosa, MG.

³ BIOAGRO. Universidade Federal de Viçosa. 36571-000 Viçosa, MG.

⁴ Laboratório de Recursos Genéticos da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF). 28015-620 Campos dos Goytacazes, RJ.

porcentagem de brotações enraizadas, que apresentaram redução e aumento linear, respectivamente; nos explantes do cilindro central, não houve influência sobre o percentual de culturas calejadas e com gemas adventícias.

Palavras-chaves: floroglucinol, cultura de tecidos, *Citrus sinensis*.

ABSTRACT

EFFECT OF PHLOROGLUCINOL ON IN VITRO MORPHOGENIC REACTION OF INTERNODE SEGMENTS OF *Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck cv. Pêra

This research was carried out under controlled laboratory conditions to evaluate the effects of phloroglucinol on the in vitro morphogenic reaction of internode segments, bark and central cylinder of *Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck cv. Pêra. The semi-solid MS basic medium was used along with the following organic complements in mg L⁻¹: myo-inositol 100, sucrose 30,000, malt extract 500, BAP 0.3 and phloroglucinol at the levels of 0, 30, 60, 90, 120, incubated in the dark during four plus four weeks, under 16 hour photoperiod light, for multiplication. Adventitious shoots, obtained from the bark explant were submitted to rooting in semi-solid MS medium with the organic complements in mg L⁻¹: myo-inositol 55, sucrose 87,600 and NAA 0.09. The statistical design was completely randomized with five repetitions, considering the average of four test tubes in each replicate. There was no effect on the percentage of cultures with callus formation and with adventitious buds, as well as on the length of adventitious shoots for the bark explants. The number of adventitious shoots per explant and rooted shoots percentage presented reduction and linear increase, respectively. There was no effect on the percentage of cultures either with callus formation or adventitious buds in the central cylinder derived explants.

Key words: phloroglucinol, tissue culture, *Citrus sinensis*.

INTRODUÇÃO

A reação morfogênica de espécies cítricas *in vitro* tem sido descrita em diferentes espécies e utilizando-se diversos tipos de explantes, com o objetivo de recuperar plantas livres de vírus e micropropagação. Nessas espécies, as brotações adventícias têm sido mais freqüentemente obtidas por organogênese indireta, a partir de tecidos desorganizados (6), e devem passar por uma etapa de enraizamento, para, então, as plântulas serem transferidas para o campo.

O floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenzeno) é um composto fenólico que ocorre naturalmente em macieiras, pela degradação enzimática do floridizim glicosídeo (16). Tem sido amplamente utilizado para a multiplicação e o enraizamento in vitro (3, 5, 9, 10, 14, 15).

Para a multiplicação in vitro, constata-se, entre outros, o seu uso em *Ficus benjamina* (5), *Minuartia valentina* (10) e *Malus domestica* (15).

O uso do floroglucinol objetivando enraizamento pôde ser

constatado em porta-enxertos de *Malus* spp. (3, 12, 14, 16, 24), cultivares comerciais de *Malus domestica* (25, 26) e de *Pyrus communis* (1, 23), em *Prunus* spp. (9, 17), *Fragaria* spp. (11), *Rubus* spp. (11, 13), *Carica pentagona* (18) e *Taxus baccata* (20). Pode ser usado em meio indutor de rizogênese (1, 2, 8, 9, 20, 24), durante a fase de multiplicação (3, 24) ou em ambas as fases (24).

É também atribuído ao floroglucinol um efeito sinérgico com auxinas, na rizogênese in vitro de espécies lenhosas (11, 15).

Sendo os citros espécies lenhosas, e sendo a etapa de enraizamento limitante na técnica para regeneração de *Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck cv. Pêra, utilizou-se o floroglucinol, para otimizar o rendimento da obtenção de plântulas a partir da organogênese indireta de segmentos internodais.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, como parte de um projeto de desenvolvimento de técnicas de micropropagação, visando à produção de mutantes de *Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck cv. Pêra.

Utilizaram-se explantes retirados de plantas obtidas de sementes. As plantas com quatro anos de idade, mantidas em casa de vegetação, sofreram poda drástica, permanecendo apenas o caule principal, com 20 cm de altura e de 3 a 4 cm de diâmetro. Para evitar contaminação por fungos, as plantas, após a poda, foram pulverizadas com uma solução de oxiclureto de cobre a 0,064%, e as regas diárias, até a coleta dos ramos, foram restritas apenas ao substrato.

A coleta de ramos, para obtenção de explantes, foi feita quatro semanas após a poda, quando apresentavam comprimento em torno de 20 cm, 15 a 20 internódios e comprimento entre 0,5 e 4 cm. Os ramos, após retirados as folhas e os espinhos, foram friccionados com álcool e separados segmentos internodais de 1,5 cm de comprimento provenientes do terço médio dos ramos, conforme sugerido por Simões et al. (21). Os segmentos foram desinfestados com acaricida à base de dicofol a 0,037% por 5 minutos, álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 2,5% por 15 minutos e enxaguados três vezes em água deionizada e autoclavada. Em seguida, foram divididos ao meio longitudinalmente e separados em casca e cilindro central, conforme Simões et al. (21, 22) para cultivo em meio de multiplicação.

Foram adotados procedimentos para inoculação dos explantes, o meio de cultura e as condições de cultivo em meio de multiplicação, conforme Simões et al. (22). Os tratamentos em mg L⁻¹ de floroglucinol

foram 0, 30, 60, 90, 120. Cada tratamento foi constituído de cinco repetições, e cada uma foi medida, pela média, em quatro tubos de ensaio.

Foi avaliada, ao final do período de escuro (as quatro semanas iniciais), a porcentagem de culturas com calos e gemas adventícias, e, ao final do período luminoso (as quatro semanas seguintes), o número de brotações adventícias por explante e o comprimento das brotações adventícias, sendo usadas apenas brotações que alcançaram tamanho superior a 8 mm.

Brotações adventícias, devidamente separadas de acordo com os tratamentos, foram inoculadas, individualmente, em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, com 20 ml de meio de cultura para enraizamento, contendo sais inorgânicos e vitaminas de Murashige e Skoog (19), acrescido de, em mg L⁻¹: 55 de mio-inositol; 87.600 de sacarose; 0,09 de ANA (ácido (α naftalenoacético); e 7.000 de ágar VETEC. O pH foi ajustado em 5,7+/-0,1 antes da adição do ágar. As culturas foram mantidas, durante três semanas, em sala de crescimento com temperatura de 27+/-2°C sob lâmpadas fluorescentes que forneciam 1.000 lux de intensidade luminosa em fotoperíodo de 16 horas. Cada tratamento foi constituído de cinco repetições, e cada uma foi medida pela média em quatro tubos de ensaio.

O experimento, tanto na fase de multiplicação quanto na de enraizamento, foi inteiramente casualizado, e os resultados, cujas interpretações pudessem ser feitas pela estatística indutiva, foram interpretados pelas análises de variância e de regressão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O calejamento dos explantes, tanto da casca quanto do cilindro central, não foi influenciado pela presença do floriglucinol em quaisquer de seus níveis, o mesmo não ocorrendo com a porcentagem de culturas com formação de gemas adventícias, que apresentaram considerável redução em todos os níveis, nos explantes do cilindro central (Quadro 1). Verifica-se que nem todas as culturas calejadas do cilindro central apresentaram formação de gemas, o que mostra uma característica inerente ao próprio tipo de explante e não necessariamente a presença do floriglucinol, já que houve redução inclusive na ausência do floriglucinol no meio (Quadro 1). Isto pode ser parcialmente explicado pela constituição anatômica dos explantes, sendo a casca constituída de epiderme, córtex, floema e faixa cambial, e o cilindro central, de parte da faixa cambial, xilema e medula, sendo estes últimos, tecidos mais diferenciados (22).

QUADRO 1 - Porcentagem de culturas calejadas e de culturas com gemas adventícias, em explantes de laranja-pêra, em meio de multiplicação sob diferentes níveis de floroglucinol

Floroglucinol (mg L ⁻¹) ¹	Culturas com calo (%) ²		Culturas com gemas adventícias (%) ²	
	Casca	Cilindro central	Casca	Cilindro central
0	100 (20)	100 (11)	100 (20)	64 (11)
30	100 (20)	100 (12)	100 (20)	67 (12)
60	100 (20)	100 (06)	100 (20)	50 (06)
90	100 (20)	100 (08)	100 (20)	50 (08)
120	100 (20)	100 (09)	100 (20)	44 (09)

¹ Considerando o número total de 20 culturas em cada tratamento.

² Considerando a porcentagem sobre o número de culturas que não apresentaram contaminação, indicadas entre parênteses.

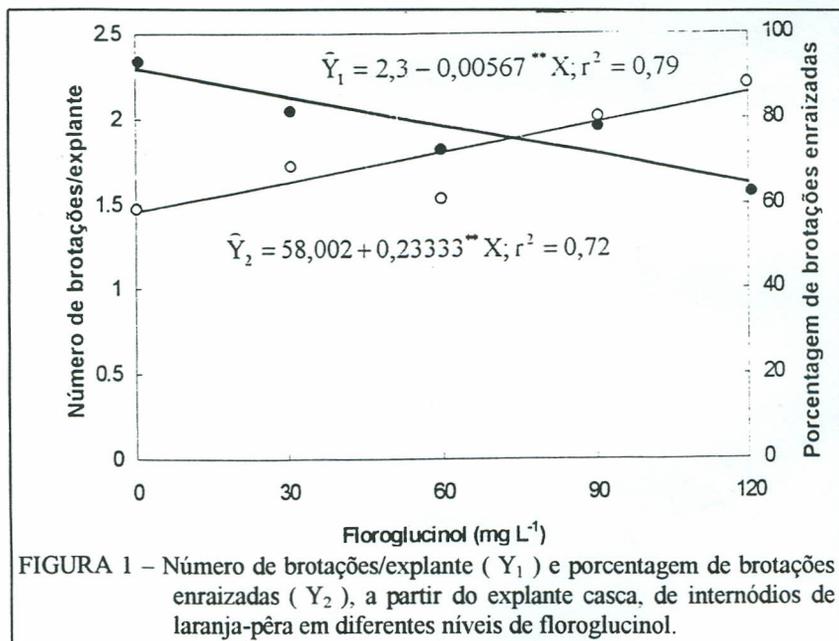
O percentual final de culturas que apresentou formação de gemas nos explantes do cilindro central foi relativamente baixo (Quadro 1), não se prosseguindo o experimento neste tipo de explante.

Observa-se, no explante casca (Quadro 2), que houve diferença significativa a 1% na característica número de brotações adventícias por explante. A análise de regressão do efeito do floroglucinol revelou que o efeito linear é o que melhor representa a variação dos dados obtidos, quanto a essa característica (Figura 1), ocorrendo redução do número de brotações adventícias por explante, quando ocorre aumento do nível de floroglucinol. Compton e Preece (4) obtiveram, ao contrário, diferença significativa, com aumento do número de ramos no nível 500 mg L⁻¹ em relação ao nível 50 mg L⁻¹, num meio contendo sais de MS em organogênese indireta em fumo. Esta resposta diferenciada possivelmente seja explicada pelo genótipo, como sugerem James e Wakerell (1982), citados por George e Sherrington (7), que encontraram respostas diferentes na morfogênese da parte aérea em duas variedades distintas de macieira.

QUADRO 2 - Resumo da análise de variância das características número de brotações adventícias por explante, comprimento das brotações adventícias e porcentagem de brotações adventícias enraizadas de laranja-pêra provenientes do explante casca em diferentes níveis de floroglucinol no meio de multiplicação

F.V.	G.L.	Quadrado Médio		
		Brotações adventícias/ explante (n°)	Comprimento das brotações (cm)	Brotações enraizadas (%)
Floroglucinol	4	0,45875**	0,00776n.s.	850,000*
Regressão linear	1	1,44499**	0,01216n.s.	2449,999**
Regressão quadrática	1	0,00357n.s.	0,00357n.s.	321,428n.s.
Regressão cúbica	1	0,18000n.s.	0,01312n.s.	49,999n.s.
Regressão de quarto grau	1	0,20642n.s.	0,00216n.s.	578,565n.s.
Resíduo	20	0,08125	0,00984	225,00
C.V. (%)	-	14,54300	10,67400	20,833
Médias	-	1,96000	0,92920	72,000

*, ** Significativo a 5 e 1%, respectivamente.
n.s. Não-significativo.



Quanto à característica comprimento das brotações adventícias, não houve diferença significativa (Quadro 2). Inicialmente, havendo redução no número de brotações por explantes, era de se esperar aumento no comprimento das brotações, principalmente em razão da menor competição pelos constituintes do meio de cultura (21). No entanto, o número de brotações por explante e o seu decréscimo linear, em virtude do

aumento do nível de floroglucinol, podem ser considerados pequenos para ocasionar um benefício no comprimento das brotações.

Com relação à avaliação das brotações enraizadas, notou-se que houve diferença significativa entre os níveis de pré-condicionamento estudados (Quadro 2), havendo aumento linear de seu percentual com o aumento dos níveis de floroglucinol. Resultados semelhantes foram obtidos por James (11), em *Rubus*, James e Thurbon (14) em porta-enxerto de maçã, e Zimmerman (25), em vários cultivares de maçã. James (11) sugere haver um efeito sinérgico entre auxinas e floroglucinol no enraizamento in vitro de espécies lenhosas e semi-lenhosas.

O mecanismo de ação do floroglucinol ainda é obscuro. Segundo Haissig (1974), citado por James e Thurbon (14), ele pode estar relacionado com o controle endógeno de auxinas pela regulação da AIA-oxidase. Goel e Sharma (8) sugerem que este composto fenólico possa ter a capacidade de inibir outras enzimas, como as fitases.

REFERÊNCIAS

1. ALMAARRI, K.; ARNAUD, Y. & MIGINIAC, E. Micropropagation of *Pyrus communis* cultivar passe crassane seedlings and cultivar Williams-factors affecting root formation in vitro and ex vitro. *Scientia Horticulturae*, 58:207-14, 1994.
2. BERARDI, G.; INFANTE, R. & NERI, D. Micropropagation of *Pyrus calleriana* from seedlings. *Scientia Horticulturae*, 53:157-65, 1993.
3. CABONI, E.; BOUMIS, G. & DAMIANO, C. Effects of phenols, gibberellic acid and carbohydrates on the rooting of the apple rootstock M.9 Jork. *Agronomie*, 12: 789-94, 1992.
4. COMPTON, M.E. & PREECE, J.E. Effects of phenolic compounds on tobacco callus and blackberry shoot cultures. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 113:160-3, 1988.
5. DELAMO, J.B. & PICOZO, I. In vitro propagation of *Ficus benjamina* cv. Starlight from axillary buds with BAP and phloroglucinol. *Gartenbauwissenschaft*, 57:29-32, 1992.
6. DURAN-VILA, N.; ORTEGA, V. & NAVARRO, L. Morphogenesis and tissue cultures of three Citrus species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 16:123-33, 1989.
7. GEORGE, E.F. & SHERRINGTON, P.D. Plant propagation by tissue culture-Handbook and directory of commercial laboratories. Eversley, Eastern Press, 1984. 709 p.
8. GOEL, M. & SHARMA, C.B. Inhibition of plant phytaes by phloroglucinol. *Phytochemistry*, 18:939-42, 1979.
9. HAMMATT, N. Promotion by phloroglucinol of adventitious root formation in micropropagated shoots of adult wild cherry (*Prunus avium* L.). *Plant Growth Regulation*, 14:127-32, 1994.
10. IBANEZ, M.R. & AMO-MARCO, J.B. Promotion by phloroglucinol of micropropagation of *Minuartia valentina*, an endangered and endemic Spanish plant. *Plant Growth Regulation*, 26:49-56, 1998.
11. JAMES, D.J. Role of auxin and phloroglucinol in adventitious root formation of *Rubus* and *Fragaria* grown in vitro. *Journal of Horticultural Science*, 54:273-7, 1979.
12. JAMES, D.J. Adventitious root formation in vitro in apple rootstocks (*Malus pumila*): factores affecting the length of the auxin sensitive phase in M.9. *Physiologia Plantarum*, 57:149-53, 1983.

13. JAMES, D.J.; KNIGHT, V.H. & THURBON, I.J. Micropropagation of red raspberry and the influence of phloroglucinol. *Scientia Horticulturae*, 12:313-9, 1980.
14. JAMES, D.J. & THURBON, I.J. Shoot and root initiation in vitro in apple rootstock M.9 and the promotive effects of phloroglucinol. *Journal of Horticultural Science*, 56:15-20, 1981.
15. JONES, O.P. Effect of phloridizin and phloroglucinol on apple shoots. *Nature*, 262:392-3, 1976.
16. JONES, O.P. & HATFIELD, S.G.S. Root initiation in apple shoots cultured in vitro with and phenolic compounds. *Journal of Horticultural Science*, 51:495-9, 1976.
17. JONES, O.P. & HOPGOOD, M.E. The successful propagation in vitro of two rootstocks of *Prunus*: the plum rootstock Pixy (*P. insititia*) and the cherry rootstock F12/1 (*P. avium*). *Journal of Horticultural Science*, 54:63-6, 1979.
18. JORDAN, M. & PIWANSKI, D. Regeneration of babaco (*Carica pentagona* (Heilborn) Badillo) using leaf explants and shoot-tip culture. *Phyton*, 61:109-15, 1997.
19. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-97, 1962.
20. NANDI, S.K.; PALNI, L.M.S. & RIKHARI, H.C. Chemical induction of adventitious root formation in *Taxus baccata* cuttings. *Plant Growth Regulation*, 19:117-22, 1996.
21. SIMÕES, M.O.M.; SILVA, E.A.M.; TEIXEIRA, S.L. & CECON, P.R. Obtenção de brotações adventícias de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck de regiões isoladas de internódios em diferentes estádios de desenvolvimento. *Revista Ceres*, 37:337-44, 1990.
22. SIMÕES, M.O.M.; SILVA, E.A.M. & TEIXEIRA, S.L. Ontogênese das brotações adventícias de *Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck cv. Pêra, cultivadas in vitro segundo os tipos utilizados de explantes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 26:797-805, 1991.
23. WANG, Q.C. Factors affecting rooting of microcuttings of the pear rootstock BP10030. *Scientia Horticulturae*, 45:209-13, 1991.
24. WEBSTER, C.A. & JONES, O.P. Micropropagation of some cold-hardy dwarfing rootstocks for apple. *Journal of Horticultural Science*, 66:1-6, 1991.
25. ZIMMERMAN, R.H. Rooting apple cultivar in vitro: interactions among light, temperature, phloroglucinol and auxin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 3: 301-11, 1984.
26. ZIMMERMAN, R.H. & BROOME, O.C. Phloroglucinol and in vitro rooting apple cultivar cuttings. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 106: 648-52, 1981.