

ADEQUAÇÃO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO DO MEIO MT PARA O CULTIVO DE EMBRIÕES IMATUROS DE TANGERINEIRA 'CLEÓPATRA'

Morais-Lino, Lucymeire Souza¹; Silveira, Daniela Garcia²; Souza, Antônio da Silva³; Soares Filho, Walter dos Santos³

¹Doutoranda do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia (UEFS), BR 116, Km 03, CEP 44031-460, Feira de Santana, BA, Fone (75) 3224-8132, e-mail: lsmorais@yahoo.com.br; ²Doutoranda do Curso de Pós-Graduação em Botânica (UEFS), e-mail: danielags@ig.com.br; ³Pesquisadores da *Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical*, C.P. 007, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, Fone (75) 3621-8031, e-mail: assouza@cnpmf.embrapa.br, wsoares@cnpmf.embrapa.br.

INTRODUÇÃO

O *Citrus* e gêneros afins reúnem uma imensa variabilidade genética, passível de ser explorada em hibridações visando o desenvolvimento de novas variedades. Entretanto, o melhoramento genético dos citros pelos métodos convencionais tem sido seriamente limitado, principalmente pela poliembrionia das sementes da maioria das espécies e variedades. Conseqüentemente, cada vez mais aumenta a demanda por métodos que permitam separar os embriões zigóticos dos nucelares (Bastianel et al., 1998) A presença de embriões nucelares tem possibilitado a perpetuação natural de características varietais desejáveis (Hanna & Bashaw, 1987), mas prejudica a germinação dos embriões zigóticos e a distinção precoce das plântulas híbridos dos nucelares (Koller, 1994; Domingues et al., 1998).

O sucesso da cultura de tecidos como meio de propagação de plantas é muito influenciado pela natureza do meio de cultura utilizado (George, 1993), sendo que a concentração de reguladores de crescimento no meio nutritivo é um fator determinante no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultura de tecidos.

Na cultura de embrião imaturo, reguladores de crescimento são muitas vezes usados para evitar a germinação precoce ou para estimular o crescimento embrionário. Dependendo da espécie, o embrião jovem pode ser estimulado a crescer por citocininas, por auxinas ou por giberelinas. As auxinas e as citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas na cultura de tecidos. A formação de raiz, parte aérea e calo em cultura de tecidos é regulada pela disponibilidade e interação dessas duas classes de reguladores de crescimento (Skoog & Miller, 1986).

Este trabalho tem por objetivo adequar concentrações dos reguladores de crescimento ácido naftalenoacético (ANA) e benzilaminopurina (BAP) no meio de cultura para a germinação normal de embriões imaturos de tangerineira 'Cleópatra'.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da *Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical*, em Cruz das Almas, BA. Os frutos foram coletados em plantas de tangerineira 'Cleópatra' (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Citros.

Os frutos após serem lavados tiveram suas sementes removidas que, em câmara de fluxo laminar, sofreram assepsia com álcool (70%) por 5 minutos e hipoclorito de sódio (2%) por 20 minutos, sendo em seguida lavadas três vezes em água destilada autoclavada. Com o auxílio de estereomicroscópio, bisturi e pinça, os integumentos das sementes foram excisados longitudinalmente a partir da região oposta à micrópila, tomando-se o cuidado de não provocar danos aos embriões.

Os embriões de cada semente foram agrupados em quatro classes distintas de tamanho, a saber: < 1,0 mm; 1,0 - 1,9 mm; 2,0 - 2,9 mm e > 6,0 mm, utilizada como testemunha.

As medidas (μm) foram tomadas com o auxílio de uma lente micrométrica graduada conectada na ocular do estereomicroscópio, considerando as dimensões do embrião

incluindo os cotilédones. As mensurações foram convertidas para milímetros, utilizando-se um fator de correção ($x = 0,157$).

Os embriões foram cultivados em meio MT (Murashige & Tucker, 1969) contendo como compostos básicos somente a sacarose, o ágar, metade da concentração normal de macronutrientes e vitaminas, e concentração normal de micronutrientes do MT. O ajuste dos reguladores de crescimento foram realizado respeitando uma combinação de uma dose de ANA mais uma de BAP, em cada experimento. De acordo com o mencionado, foram observadas as seguintes doses para o ANA (0,0; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 mg.L⁻¹) e para o BAP (0,00; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 mg.L⁻¹), considerando 10 repetições.

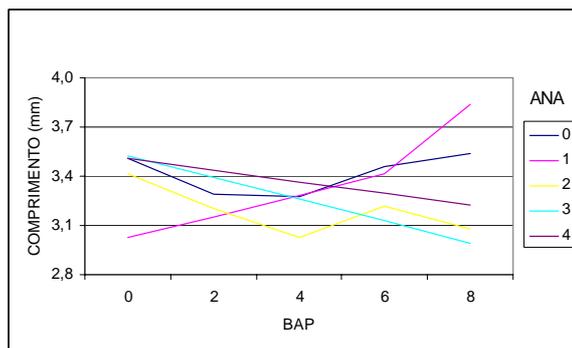
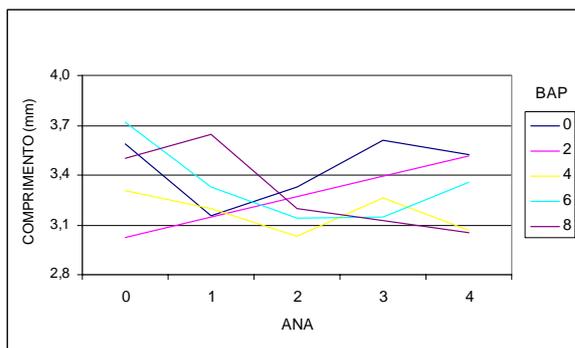
As variáveis porcentagem de germinação e porcentagem de plântulas normais (dados não mostrados), foram submetidas à análise de variância não-paramétrica, utilizando-se o aplicativo SAEG (Sistema para Análises Estatísticas). Para o variável comprimento de plântulas, efetuou-se a análise de variância com o aplicativo SANEST (Sistema de Análise Estatística).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para porcentagem de germinação de embriões, estatisticamente não houve diferenças significativas entre os 25 tratamentos e os quatro tamanhos de embrião estudados. No tocante ao caráter porcentagem de plântulas normais, verificou-se o mesmo resultado para porcentagem de germinação de embriões, onde todos os tratamentos não diferiram entre si estatisticamente (dados não apresentados).

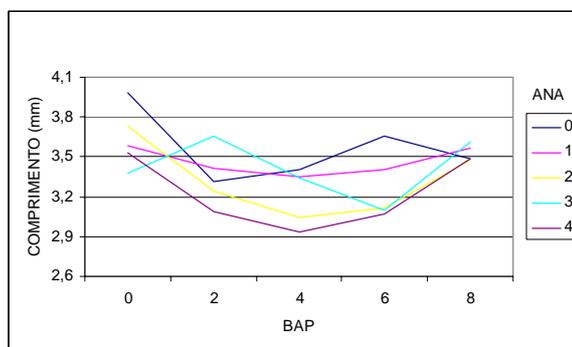
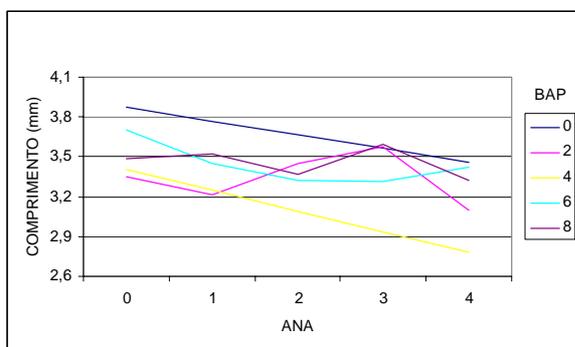
Os resultados do ajuste das doses dos reguladores de crescimento, em relação ao comprimento de plântulas, encontram-se nas Figuras 1 a 4. De um modo geral, verificou-se que, para cada classe de tamanho de embrião, há uma combinação de doses de ANA e BAP mais adequada. Recorreu-se à análise de regressão polinomial para obter resultados mais claros, observando-se que, para embriões menores do que 1 mm, de maior interesse neste trabalho, os níveis de ANA dentro dos fatores de BAP, o fator 8 de BAP foi o que proporcionou maiores comprimentos de plântulas. Quanto aos níveis de BAP dentro dos fatores de ANA o melhor resultado foi o que utilizou o fator 1 de ANA (Figura 1). Para os demais tamanhos observou-se resultados diferentes para as diversas combinações entre os níveis de ANA e BAP (Figuras 2,3 e 4).

Assim, visando a germinação de embriões imaturos, principalmente os de tamanho inferior a 1,0 mm devido à sua importância neste estudo, tem-se como mais recomendável o emprego da combinação de 0,01 mg.L⁻¹ de ANA e 0,08 mg.L⁻¹ de BAP. Cabe acrescentar que as respostas relativas à germinação dos embriões e ao crescimento e desenvolvimento das plântulas dependem do equilíbrio entre auxinas e citocininas para que ocorra a diferenciação e organogênese celular em cultura de tecidos e órgãos *in vitro* (George & Sherrington, 1984). Isto pode ser verificado nas Figuras 1 a 4, onde observa-se que as variações entre as dosagens dos reguladores de crescimento podem determinar efeitos negativos ou não, a depender da dosagem de ANA e/ou de BAP utilizada.



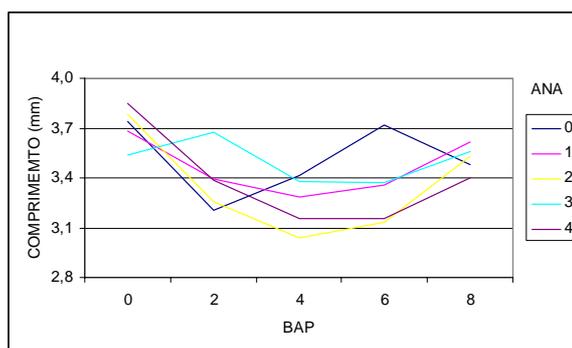
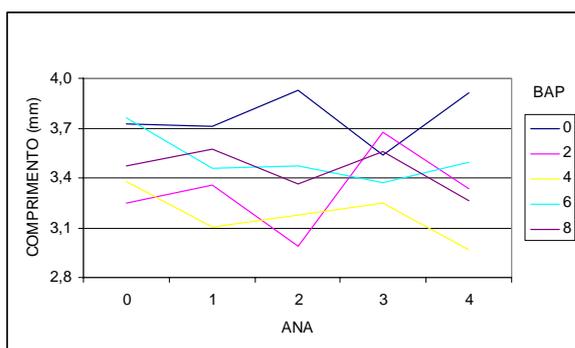
BAP: 0, 2, 4, 6 e 8 = 0; 0,02; 0,04; 0,06 e 0,08 mg. L⁻¹, respectivamente; ANA: 0, 1, 2, 3 e 4 = 0; 0,01; 0,02; 0,03 e 0,04 mg.L⁻¹, respectivamente.

Figura 1. Comprimento de plântulas de tangerineira 'Cleópatra' (*C. resnyi* Hort. ex Tan.), cultivadas em meio de Murashige & Tucker (1969), com diferentes concentrações de ANA e BAP, em função do tamanho do embrião (< 0,9 mm).



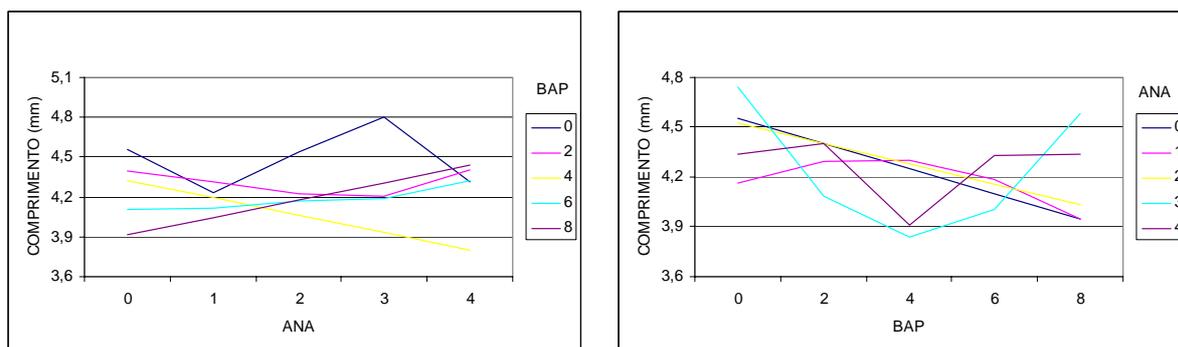
BAP: 0, 2, 4, 6 e 8 = 0; 0,02; 0,04; 0,06 e 0,08 mg. L⁻¹, respectivamente; ANA: 0, 1, 2, 3 e 4 = 0; 0,01; 0,02; 0,03 e 0,04 mg.L⁻¹, respectivamente.

Figura 2. Comprimento de plântulas de tangerineira 'Cleópatra' (*C. resnyi* Hort. ex Tan.), cultivadas em meio de Murashige & Tucker (1969), com diferentes concentrações de ANA e BAP, em função do tamanho do embrião (1,0 a 2,9 mm).



BAP: 0, 2, 4, 6 e 8 = 0; 0,02; 0,04; 0,06 e 0,08 mg. L⁻¹, respectivamente; ANA: 0, 1, 2, 3 e 4 = 0; 0,01; 0,02; 0,03 e 0,04 mg.L⁻¹, respectivamente.

Figura 3. Comprimento de plântulas de tangerineira 'Cleópatra' (*C. resnyi* Hort. ex Tan.), cultivadas em meio de Murashige & Tucker (1969), com diferentes concentrações de ANA e BAP, em função do tamanho do embrião (2,0 a 2,9 mm).



BAP: 0, 2, 4, 6 e 8 = 0; 0,02; 0,04; 0,06 e 0,08 mg. L⁻¹, respectivamente; ANA: 0, 1, 2, 3 e 4 = 0; 0,01; 0,02; 0,03 e 0,04 mg.L⁻¹, respectivamente.

Figura 4. Comprimento de plântulas de tangerineira 'Cleópatra' (*C. resnyi* Hort. ex Tan.), cultivadas em meio de Murashige & Tucker (1969), com diferentes concentrações de ANA e BAP, em função do tamanho do embrião (> 6,0 mm).

CONCLUSÕES

Visando a germinação normal de embriões imaturos (< 3,0 mm) e o desenvolvimento de plântulas normais de tangerineira 'Cleópatra', deve-se utilizar as doses de 0,01 mg.L⁻¹ de ANA e 0,08 mg.L⁻¹ de BAP. O resgate de embriões sexuais imaturos reduz o risco de aborto e competição com os nucelares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASTIANEL, M.; SCHWARZ, S. F.; COLETA FILHO, H. D.; LIN, L. L.; MACHADO, M.; KOLLER, O. C. Identification of zygotic and nucellar tangerine seedlings (*Citrus* spp.) using RAPD. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 21, n. 1, 1998.

DOMINGUES, E. T.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; TULMANN NETO, A.; SUGAHARA, V. Y. Poliembrião em clones de laranja 'Pêra' e variedades assemelhadas. **Bragantia**, Campinas, v. 57, n. 2, p. 251-258, 1998.

GEORGE, E. F. The components of culture media. In: GEORGE, E. F. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture**. Part 1. The technology. Eversley: Exegetics, 1993, p. 273-343.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. Plant growth regulators. In: GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories**. Eversley: Exegetics, 1984, p. 284-330.

HANNA, W. W.; BASHAW, E. C. Apomixis: its identification and use in plant breeding. **Crop Science**, Madison, v. 27, p. 1136-1139, 1987.

KOLLER, O. C. Melhoramento: In: **Citricultura: laranja, limão e tangerina**. Porto Alegre: Rígel, 1994. 446 p.

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: University of California, 1969. v. 3, p. 1155-1161.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposium of Society for Experimental Biology**, v. 25, p. 127-133, 1986.

PALAVRAS-CHAVES

Citrus resnyi Hort. ex Tan., resgate de embriões, meio de cultura.