

# EMBRIOGÊNESE NUCELAR EM ÓVULOS ABORTIVOS DE LARANJA 'PERA' CULTIVADOS *IN VITRO*<sup>1</sup>

MOACIR PASQUAL<sup>2</sup>, AKIHIKO ANDO<sup>3</sup> e OTO JESU CRÓCOMO<sup>4</sup>

**RESUMO** - Existem sérios obstáculos, como apomixia, esterilidade gamética e incompatibilidade ao melhoramento genético das espécies cítricas. Óvulos abortivos da laranja 'Pera' (*Citrus sinensis* Osb.) foram extraídos de frutos em diferentes fases de desenvolvimento (desde antes da antese até o fruto com aproximadamente 3 cm de diâmetro) e cultivados em meio "MS". Constatou-se tendência de maior número de embriões/óvulo a partir da fase em que o fruto apresentou 1,62 cm x 1,60 cm. Óvulos de frutos com 3 cm de diâmetro e pseudobulbilhos obtidos a partir de óvulos abortivos foram inoculados em meio "MS", acrescido de inúmeras substâncias promotoras do crescimento. Os índices embriogênicos mais elevados em óvulos abortivos foram observados na presença de substâncias orgânicas complexas (caseína hidrolizada, extrato de malte, água de coco e extrato de levedura). O desenvolvimento de pseudobulbilhos não foi influenciado pela adição de substâncias de crescimento ao meio "MS"

Termos para indexação: cultura de tecidos, embriogênese somática, calos, citros.

## NUCELLAR EMBRYOGENESIS IN *IN VITRO* CULTURE OF ABORTIVE OVULES OF 'PERA' SWEET ORANGE

**ABSTRACT** - The breeding of citrus species is limited by apomixis, gametic sterility and incompatibility. Abortive ovules were extracted from various stages of developing fruits of 'Pera' sweet orange (*Citrus sinensis* Osb.) and cultured *in vitro* on "MS" medium. Embryogenesis was increased from the time of fruit set up to 1,62 cm x 1,60 cm. Abortive ovules and pseudobulbils obtained from abortive ovules were cultured on "MS" media supplemented with different growth substances. The best results were observed with complex organic substances (casein hydrolysate, malt extract, coconut milk and yeast extract). The development of pseudobulbils were not affected by growth substances.

Index terms: tissues culture, somatic embryogenesis, callus, citrus.

### INTRODUÇÃO

A obtenção de embriões nucleares em citros através da cultura de nucelos *in vitro*, extraídos de sementes fertilizantes de frutos em desenvolvimento, constitui técnica conhecida. Recentemente, segundo observações de Pasqual et al. (1988), foram obtidos, em média, até 6,6 embriões de um único nucelo cultivado em meio "MS" de cultura, com melhores resultados para culturas mantidas no escuro.

A cultura de óvulos não fertilizados ou abortivos constitui outra alternativa para a obtenção de plântulas nucleares, principalmente em cultivares que não produzem sementes, através de óvulos excisados de ovários de flores e frutos em qualquer estágio de desenvolvimento.

A embriogênese *in vitro* tem sido obtida a partir de óvulos não fertilizados ou abortivos com diversas cultivares desde a polinização (Bitters et al. 1970, Navarro et al. 1979, Tusa et al. 1983), algumas se-

manas após a antese, e até três a cinco meses mais tarde (Button & Bornman 1971, Kochba et al. 1972, Deidda 1973, Esan 1973, Juarez et al. 1976). Índices ótimos têm sido registrados em óvulos, seis semanas após a polinização, para a cultivar Robertson, dez a doze semanas para 'Temple' (Bitters et al. 1970), seis a oito semanas para 'Valência' e 'Marsh' com 44% e 68% de sucesso, respectivamente (Kochba et al. 1972), e duas a dez semanas com 68% - 80% de sucesso (Navarro et al. 1979).

A evolução do óvulo *in vitro* normalmente é mais lenta que a do nucelo, obtendo-se embriões até 15 semanas em cultura, sem qualquer crescimento prévio (Navarro et al. 1979).

A técnica da cultura de óvulos não fertilizados foi utilizada por Starrantino & Russo (1983) para introduzir as cultivares 'Newhal', 'Robertson' e 'Gilletts' da Califórnia para a Itália. Os óvulos foram removidos em condições assépticas e remetidos em frascos de vidro com gase.

Muitos autores têm reportado o surgimento esporádico de pequenos calos em cultura de nucelos e óvulos, além dos embriões diferenciados diretamente (Maheshwari & Rangaswamy 1958, Sabharwal 1963, Button & Bornman 1971, Mitra & Chaturvedi 1972, Kochba et al. 1972, Deidda 1973).

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 13 de março de 1989.

<sup>2</sup> Eng. - Agr., Dr., Prof.-Adjunto da ESAL, Caixa Postal 37, CEP 37200 Lavras, MG.

<sup>3</sup> Prof. - Assist., Dep. de Genética, ESALQ, pesquisador do CENA, Caixa Postal 96, CEP 13400 Piracicaba, SP.

<sup>4</sup> Prof.-Titular, Dep. de Química, ESALQ, Diretor do CEBTEC FEALQ e pesquisador do CENA.

Na primeira tentativa de cultura de óvulos com sucesso, Rangaswamy (1958) obteve uma massa de pseudobulbilhos, termo empregado pela primeira vez por La Rue (1954), citado por Rangaswamy (1958), para designar as curiosas bolas de tecidos obtidas em cultura de gametófitos femininos de *Zamia*. Estes calos de citros compreendem nódulos compactos e esféricos de 0,1 mm a 1,0 mm de diâmetro, que variam de cor branca a creme, e que livremente unidos entre si dão ao calo uma estrutura porosa e friável.

Estudos de anatomia e desenvolvimento (Button et al. 1974) e aspectos fisiológicos (Kochba & Spiegel-Roy 1973, Kochba & Button 1974) nestes tecidos evidenciaram que praticamente qualquer célula é naturalmente embriogênica e que os embriões se originam de células individuais. Estes pseudobulbilhos, quando em condições adequadas, podem evoluir formando proembriões e posteriormente plântulas (Button et al. 1974).

Maior quantidade de embriões foi obtida de óvulos com 40 a 60 dias após a antese (Tusa et al. 1983).

Estudos em microscopia eletrônica de calos de Shamouti (Button et al. 1974) mostraram que estes tecidos compreendem pequenos proembriões globulares ou meristemóides em vários estádios de desenvolvimento e são desprovidos de tecido parenquimatoso desorganizado.

Culturas de óvulos não desenvolvidos, extraídos de frutos maduros de algumas cultivares de citros, foram efetuadas por Starrantino & Russo (1980). Embriões foram obtidos de calos oriundos da parede do ovário não polinizado de duas espécies poliembrionicas de citros (Mitra & Chaturvedi 1972) e de pedaços de óvulo não fertilizado de *C. aurantifolia*.

Observou-se a diferenciação de pseudobulbilhos proembriões e regeneração completa de planta a partir de células isoladas de calos formados em meio "MT" (Murashige & Tucker 1969), por maceração em agitador na presença das enzimas "macerase" e "macerozyme" - 3% a 4% (Button & Botha 1975).

Desde que é difícil excisar proembriões jovens, métodos que permitem uma cultura com crescimento contínuo de pseudobulbilhos adquirem especial interesse, fornecendo uma fonte especial de embriões em qualquer época do ano. Graças à capacidade de reproduzirem o genótipo, estes tecidos são de grande valor aos melhoristas de citros.

Objetivou-se, neste trabalho, a determinação de uma metodologia de regeneração de embriões a

partir de óvulos abortivos para posterior uso em programas de melhoramento.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), órgão da Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba, SP.

As flores e os frutos da cultivar Pera (*Citrus sinensis* Osb.) foram obtidos junto à Estação Experimental Sylvio Moreira, unidade do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), em Cordeirópolis, SP, esterilizados em hipoclorito de sódio 2%, e, em condições assépticas, foram extraídos os óvulos abortivos.

### Experimento 1: Cultura de óvulos abortivos em diferentes fases.

Utilizaram-se flores imediatamente antes da antese, e frutos com as seguintes medidas médias (comprimento x espessura em cm): 0,95 x 0,77; 1,25 x 1,02; 1,62 x 1,60; 2,55 x 2,29; 3,38 x 3,02, colhidos na mesma época. O meio de cultura foi o "MS" adicionado de (em mg/l): tiamina HCl-1,0, 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, o meio solidificado com bacto ágar-8 g/l e autoclavado a 120°C por 20 minutos. Usaram-se dez repetições à luz, e dez no escuro. O experimento foi avaliado pelo número de embriões por óvulo e % de óvulos com calos.

### Experimento 2: Cultura de óvulos abortivos em diferentes meios.

Óvulos foram extraídos de frutos com aproximadamente 3 cm de diâmetro e inoculados no mesmo meio descrito para o experimento 1, porém acrescido de um dos seguintes tratamentos (em mg/l): a) AA-40; b) EM-500; c) EL-500; d) AC-10%; e) CH-400; f) AD-40; g) AD-40 e EM-500; h) AD-40 e NAA-0,25 e ACi-2,0; i) AD-40 e Cin-0,25; j) Cin-0,5 e 2,4-D2,0. As dez repetições foram mantidas à luz. Avaliou-se o número de embriões por óvulo e a percentagem de embriões com plântulas e calos.

### Experimento 3: Desenvolvimento de pseudobulbilhos

Calos friáveis formados em sua maioria por corpúsculos globulares (pseudobulbilhos) obtidos da cultura de óvulos foram subcultivados periodicamente no mesmo meio "MS" e mantidos à luz, até que se tivesse quantidade suficiente para o experimento.

Foram testados os seguintes componentes adicionados ao meio "MS" (em mg/l): a) meio "MS"-testemunha; b) EM-2500; c) EM-2500 e ADS-30; d) EM-2500 e BAP-20; e) ADS-40; f) GA<sub>3</sub>-1; g) GA<sub>3</sub>-1 e ADS-30; h) GA<sub>3</sub>-10 e ADS-60; i) GA<sub>3</sub>-10 j) Cin-0,1 e IAA-1; k) Cin-1 e IAA-0,1; l) AC-10%; m) CH-400 e EL-500. Em cada frasco contendo 20 ml do meio foram colocados aproximadamente 20 pseudobulbilhos e foram usadas dez repetições mantidas à luz.

Após 50 dias da inoculação, o experimento foi avaliado quanto ao número de embriões e proembriões diferenciados, e a percentagem de culturas apresentando crescimento de calos.

Para todos os casos usou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado. As culturas mantidas à luz foram

submetidas a um regime de dezesseis horas diárias de luz e oito horas de escuro, a 27°C.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### a) Cultura de óvulos abortivos em diferentes fases

Melhores resultados foram obtidos a partir de um determinado desenvolvimento do fruto (1,62 cm x 1,60 cm) correspondendo a aproximadamente seis semanas após a polinização (Tabela 1).

O número de embriões obtidos com a cultivar Pera em cultura de óvulos abortivos é bem inferior ao observado em cultura de nucelos de 'Valência', nos mesmos meio e estágio de desenvolvimento. No estágio E<sub>6</sub> da cv. Pera, que corresponde à idade aproximada de doze semanas - fase normalmente utilizada para extração de nucelos de 'Valência' -, obteve-se um número médio de 1,0 embrião por óvulo, quando com a cv. Valência foram obtidos até 6,6 embriões por nucelo. Outra observação é que com a cv. Pera nenhum óvulo diferenciou embriões quando mantido no escuro, e sim, apenas calos, em até 100% dos explantes, contrariando observações feitas com 'Valência', onde o número de embriões foi maior no escuro do que à luz.

Estes resultados mostram a exigência diferencial com relação às condições de cultura para as diferentes cultivares, o que está de acordo com citações de outros autores (Bitters et al. 1970, Kochba et al. 1972, Navarro et al. 1979), que identificaram variações significativas na percentagem de sucesso entre cultivares.

Verificou-se a presença de embriões após sete semanas de cultura, o que está de acordo com obser-

**TABELA 1. Número de embriões e percentagem de calos obtidos a partir de cultura de óvulos abortivos de laranja 'Pera' em diferentes fases de desenvolvimento.**

Tratamento	Nº médio de embriões por frasco		% de frascos com calos	
	Luz	Escuro	Luz	Escuro
E <sub>1</sub> - Botão floral	0,0	0,0	0,0	0
E <sub>2</sub> - Frutos com 0,95 x 0,77 cm	0,4	0,0	0,0	30
E <sub>3</sub> - Frutos com 1,25 x 1,02 cm	0,7	0,0	0,0	60
E <sub>4</sub> - Frutos com 1,62 x 1,60 cm	1,0	0,0	0,0	100
E <sub>5</sub> - Frutos com 2,55 x 2,29 cm	1,8	0,0	0,0	80
E <sub>6</sub> - Frutos com 3,38 x 3,02 cm	1,0	0,0	0,0	80

vações anteriores (Navarro et al. 1979), de que os óvulos em cultura demoram mais para mostrar diferenciação (até quinze semanas sem nenhum sinal) do que os nucelos. O meio para este experimento só foi inoculado um mês após sua preparação. Isto evidencia a presença de um determinado balanço de substâncias, como exemplo auxinas e citocininas no meio, que estariam inibindo os processos de embriogênese e formação de calos. Com o envelhecimento do meio, é possível que os níveis destas substâncias se aproximassem mais do ótimo, tendo sido degradadas principalmente pela luz.

Sucessos na cultura de óvulos abortivos têm sido verificados desde a época da polinização até cinco meses depois, porém com índices ótimos em torno de seis a oito semanas para 'Robertson', 'Valência' e 'Marsh' e até dez a doze semanas para 'Temple' (Bitters et al. 1970, Kochba et al. 1972).

### b) Cultura de óvulos abortivos em diferentes meios

Número significativamente baixo de embriões foi também obtido com a cv. Pera, quando diversas substâncias orgânicas reguladoras de crescimento foram adicionadas ao meio de cultura (Tabela 2). Os índices mais elevados foram observados na presença de CH, EM, AC e EL, os quais não diferiram significativamente pelo teste de Tukey a 5%, enquanto

**TABELA 2. Número de embriões e percentagem de plantas e calos obtidos em cultura de óvulos de laranja 'Pera' em meio "MS" adicionado de diferentes substâncias de crescimento.**

Tratamento (mg/l)	Número médio de embriões/óvulo	Percentagem de embriões produzidos	
		Plantas	Calos
AA-40	0,11 d	0	0
EM-500	1,20 a	20	0
EL-500	0,66 abc	80	0
AC-10%	1,00 ab	50	20
CH-400	1,50 a	65	0
AD-40	0,22 cd	20	0
AD-40 + EM-500	0,40 bcd	50	0
AD-40 + Cin-0,25	0,20 cd	60	0
AD-40 + NAA-0,25 + ACi-2	0,25 cd	20	0
Cin-0,5 + 2,4-D-2	0,00 d	0	100

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

níveis inexpressivos se observaram com a adição de AD, Cin e 2,4-D.

Estes resultados estão de acordo com observações de que o EM (Bitters et al. 1970, Kochba & Spiegel-Roy 1973, Navarro et al. 1979), CH (Sabharwal 1963) e AC (Button & Bornman 1971, Mitra & Chaturvedi 1972) promovem embriogênese em tecido nucelar de citros, e que auxinas e citocininas a inibem (Esan 1973). O EL pareceu exercer influência significativa sobre a evolução dos embriões em plantas; segundo Esan (1973), apesar de o EL não ter efeito sobre a embriogênese, aumenta o desenvolvimento dos órgãos em cultura de nucelos.

### c) Desenvolvimento de pseudobulbilhos

A evolução de pseudobulbilhos para proembriões e mesmo para embriões não foi significativamente estimulada pela adição de substâncias orgânicas complexas e de vários reguladores de crescimento, cujo comportamento se mostrou estatisticamente igual ao do tratamento-testemunha (Tabela 3). A proliferação de novos pseudobulbilhos ou calos globulares também apresentou valores elevados na testemunha, em comparação com os demais tratamentos. Isto mostra que o meio básico "MS", acrescido de EM-500 mg/l, fornece as condições necessárias tanto para a evolução dos pseudobulbilhos em proembriões e embriões, como para proliferação de calos.

**TABELA 3.** Desenvolvimento de pseudobulbilhos cultivados em meio "MS" adicionado de diferentes substâncias de crescimento.

Tratamento (mg/l)	Nº médio/frasco de		Fracos de calos (%)
	Embriões	Proembriões	
Testemunha ("MS")	29,4 a	34,9 ab	55,6
EM-2500	19,4 ab	34,1 ab	71,4
EM-2500 + ADS-30	17,6 ab	46,2 a	63,6
EM-2500 + BAP-20	4,1 b	28,4 ab	37,5
ADS-40	8,8 ab	32,7 ab	30,0
GA <sub>3</sub> -1	20,1 ab	28,2 ab	45,5
GA <sub>3</sub> - 1 + ADS-30	26,7 ab	23,0 ab	28,5
GA <sub>3</sub> -10 + ADS-60	16,5 ab	20,8 b	48,6
GA <sub>3</sub> -10	17,7 ab	39,4 ab	50,0
Cin-0,1 + IAA-1	11,7 ab	32,6 ab	34,6
Cin-1 + IAA-0,1	17,9 ab	26,9 ab	68,3
AC-10%	13,3 ab	21,6 ab	30,1
CH-400 + EL-500	17,7 ab	20,3 b	47,7

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

Estes resultados discordam, em parte, das observações feitas por vários autores, segundo as quais a formação de pseudobulbilhos com posterior transformação em embriões e plantas é estimulada por EM e AD (Button & Bornman 1971, Starrantino et al, 1978), por CH (Rangaswamy 1961, Sabharwal 1963) e por outras citocininas (Rangaswamy 1958, Kochba & Spiegel-Roy 1976a).

As citocininas, embora não essenciais à embriogênese, estimulam a formação de calos (Starrantino et al. 1978), o que foi comprovado pela adição de Cin-1,0 mg/l e IAA-0,1 mg/l, cuja combinação é tida como padrão para cultura de calos nucleares de citros (Kochba & Spiegel-Roy 1973a).

### CONCLUSÕES

1. Óvulos abortivos de laranja 'Pera' dão origem a embriões à luz, e a calos altamente embriogênicos, no escuro.
2. Obteve-se maior número de embriões por óvulo abortivo com adição de substâncias complexas (CH, EM, AC e EL) ao meio de cultura.
3. A adição de diferentes substâncias de crescimento ao meio "MS" não exerce influência sobre o desenvolvimento de pseudobulbilhos.

### REFERÊNCIAS

- BITTERS, W.P.; MURASHIGE, T.T.S. RANGAN, T.S.; NAUER, E. Investigations on established virus-free citrus plants through tissue culture. *Calif. Citrus Nurserymen's Soc.*, California, 9:27-30, 1970.
- BUTTON, J. & BORNMAN, C.H. Development of nucellar plants from unpollinated and unfertilised ovules of the Washington navel orange *in vitro*. *J.S. Afr. Bot.*, 37(2):127-34, 1971.
- BUTTON, J. & BOTHA, C.E.J. Enzymatic maceration of Citrus callus and the regeneration of plants from single cells. *J. Exp. Bot.*, Oxford, 26(94):723-9, 1975.
- BUTTON, J.; KOCHBA, J.; BORNMAN, C.H. Fine structure of an embryoid development from embryogenic ovular callus of "Shamouti" orange (*Citrus sinensis* Osb.). *J. Exp. Bot.*, Oxford, 25(85):446-57, 1974.
- DEIDDA, D. Embrioni nocellari di clementine ottenuti *in vitro*. *Riv. Ortoflorofruttic. Ital.*, 54(4):291-6, 1973.
- ESAN, E.B. *A detailed study of adventive embryogenesis in the Rutaceae*. Riverside University of California, 1973. 233p. Tese
- JUAREZ, J.; NAVARRO, L.; GUARDIOLA, J.L. Obtention de plants nucleaires de divers cultivars de clementiniers au moyen de la culture de nucelle *in vitro*. *Fruits*. Paris, 31(12):751-62, 1976.

- KOCHBA, J. & BUTTON, J. The stimulation of embryogenesis and embryoid development in habituated ovular callus from the "Shamouti" orange (*Citrus sinensis*) as affected by tissue age and sucrose concentration. *J. Plant Physiol.*, Berlin, **73**:415-21, 1974.
- KOCHBA, J. & SPIEGEL-ROY, P. Effect of culture media on embryoid formation from ovular callus of "Shamouti" orange (*Citrus sinensis*). *J. Plant Breed.*, Berlin, **69**:156-62, 1973.
- KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P.; SAFRAN, H. Adventive plants from ovules and nucelli in Citrus. *Planta*. Berlin, **106**:237-45, 1972.
- MAHESHWARI, P. & RANGASWAMY, M.S. Polyembryony and *in vitro* culture of Citrus and Mangifera. *Indian J. Hort.* Bangalore, India, **15**:275-86, 1958.
- MITRA, G.C. & CHATURVEDI, H.C. Embryoids and complete plants from unpollinated ovaries and from ovules of *in vivo* grown emasculated flower buds of Citrus spp. *Bull. Torrey Bot. Club.*, New York, **99**:184-9, 1972.
- MURASHIGE, T. & TUCKER, D.P.H. Growth factor requirements of citrus tissue culture In: CHAPMAN, H.D. Ed. *Proc. First Int. Citrus Symp.* Riverside, California, 1969. p.1155-61.
- 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.) Osbeck) por cultivo de óvulos *in vitro*. *Anales del I.N.I.A.* Madrid, Serie Protección Vegetal, **12**:95-113, 1979.
- PASQUAL, M.; ANDO, A.; CRÓCOMO, O.J. Influência dos reguladores de crescimento sobre a embriogênese *in vitro* de nucelos de *Citrus sinensis* cv. Valência. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, **23**(3):255-59, 1988.
- RANGASWAMY, N.S. Culture of nucellar tissue of Citrus *in vitro*. *Experientia*. New York, **14**(3):111-2, 1958.
- SAEHARWAL, P.S. *In vitro* culture of ovules, nucelli and embryos of *Citrus aurantifolia* Swingle. In: MAHESHWARI, P. Ed. *Plant Embryology - a symposium*. Nova Delhi, s.ed., 1963.
- STARRANTINO, A. & RUSSO, F. Reproduction of seedless orange cultivars from undeveloped ovules raised *in vitro*. *Acta Hort.* Hamburg, **131**:253-8, 1983.
- STARRANTINO, A. & RUSSO, F. Seedlings from undeveloped ovules of ripe fruits of polyembryonic citrus cultivars. *Hort Sci.*, Virginia, **15**(3):296-7, 1980.
- TUSA, N.; CERACI, G.; OCCORSO, G. Coltura *in vitro* di ovuli in due specie di agrumi. *Riv. Ortoflorofruttic. Ital.*, **67**:129-38, 1983.