

# ALTERAÇÕES NA POLIEMBRIONIA E IDENTIFICAÇÃO DO HÍBRIDO EM SEMENTES DE LIMÃO 'CRAVO' OBTIDAS DE CRUZAMENTOS COM *PONCIRUS TRIFOLIATA* (L.) RAF.<sup>1</sup>

JOSÉ DARLAN RAMOS<sup>2</sup> e MOACIR PASQUAL<sup>3</sup>

**RESUMO** - O presente trabalho foi conduzido na Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), Lavras, MG, com o objetivo de verificar a influência da polinização sobre a taxa de poliembriõnia do limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck) e identificar o "seedling" zigótico em cruzamentos deste limão com *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Os parâmetros avaliados foram: número total de sementes, número de sementes viáveis, viabilidade e diâmetro dos frutos, número total de embriões. Os dados foram analisados por correlação. Concluiu-se que os parâmetros avaliados não apresentaram correlação com a idade dos frutos; a faixa ideal encontrada para retirada e contagem dos embriões foi entre 27,0 e 34,0 mm de diâmetro dos frutos; a taxa de poliembriõnia foi alterada pela polinização controlada; a identificação do híbrido pode ser feita após o surgimento do quarto par de folhas da plântula.

**Termos para indexação:** *Citrus limonia* Osbeck, polinização, cultura de tecidos, sementes viáveis, diâmetros dos frutos.

## MODIFICATIONS ON POLYEMBRYONY AND IDENTIFICATION OF THE HYBRID IN SEEDS FROM LEMON 'CRAVO' POLLINATED WITH *PONCIRUS TRIFOLIATA* (L.) RAF.

**ABSTRACT** - The present work was conducted at the Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), Lavras, MG, Brazil. The objective was to determine the effect of pollination on the polyembryony and to identify the hybrid *Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. The variables analysed were: number of seeds per fruit, number of viable seeds, viability and diameter of fruits, and total number of embryos. The analysed variables were submitted to correlation analysis. It was concluded that the evaluated parameters are not correlated with the age of the fruits; the ideal range for score of embryos was 27.0 to 34.0 mm diameter of fruits; the polyembryonic rate was affected by controlled pollination; the identification of the seedling is possible after the sprouting of the fourth pair of leaves.

**Index terms:** *Citrus limonia* Osbeck, pollination, tissue culture, viability of seeds, diameter of the fruit.

## INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira ocupa lugar de destaque no mercado internacional de sucos cítricos, sendo o Brasil o maior produtor e exportador mundial. O crescimento da produção laranja ao longo dos últimos 20 anos esteve,

porém, aliado à expansão da área plantada, em detrimento da produtividade, o que, juntamente com a falta de preocupação com a qualidade dos frutos, poderá afetar, no futuro, a competitividade do suco nacional no mercado externo.

Os trabalhos de melhoramento com espécies cítricas tiveram início na França, por A. Bernard em 1894, que obteve alguns híbridos (citragens) com maior resistência ao frio. A primeira publicação sobre hibridação interespecífica em citros aparentemente autêntica apareceu em 1717, quando Thomas Fair Child relatou um cruzamento entre o limão 'Cravo Poeta' (*Citrus limonia* Osbeck) e o 'Cravo' comum (Allard 1960). No período de 1908 a

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 6 de agosto de 1991.

Extraído da dissertação de Mestrado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), apresentada à ESAL pelo primeiro autor.

<sup>2</sup> Eng.-Agr., M.Sc., Melhoramento Florestal, CAF Florestal Ltda. CEP 35600 Bom Despacho, MG.

<sup>3</sup> Eng.-Agr., Dr., Prof.-Adjunto, Esc. Sup. de Agric. de Lavras (ESAL), Caixa Postal 37, CEP 37200 Lavras, MG. Bolsista do CNPq.

1942, as pesquisas nessa área se restringiram à Flórida e Califórnia nos Estados Unidos. No Brasil, os trabalhos de melhoramento de citros tiveram início por volta de 1935, na Estação Experimental do Instituto Agronômico de Campinas, em Limeira, SP, com testes comparativos entre diferentes porta-enxertos e produção de plantas nucelares (Moreira 1980).

Os primeiros trabalhos de melhoramento envolvendo a cultura de tecidos em citros foram feitas por Schroeder & Spector (1957) e Kordan (1959), sendo intensificados após o desenvolvimento de meios propícios por Murashige & Skoog (1962) e Murashige & Tucker (1969) para propagação *in vitro*.

Atualmente, há necessidade de intensificar esforços no sentido de obter maior variabilidade, principalmente com porta-enxertos, pois o mais difundido, o limão 'Cravo' segundo Passos (1980), ocupa 95% dos pomares, acarretando, assim, uma grande vulnerabilidade genética.

As espécies cítricas apresentam grande variabilidade e facilidade de hibridações naturais (Cameron & Soost 1976, Chapot 1975), e, apesar disso, quando são feitas hibridações artificiais, o híbrido não se desenvolve satisfatoriamente, além de apresentar vários problemas, como poliembrião (Frost & Soost 1968 e Hearn 1977), longo período de juvenildade (Leopold & Kriedemann 1975), e a não-expressão do vigor híbrido, entre outros (Moreira 1980).

São muitas as controvérsias sobre a necessidade de polinização e fecundação para o desenvolvimento dos embriões nucelares. Para Maheshwari & Ranga Swamy (1958) e Frost & Soost (1968), a polinização e fecundação são pré-requisitos para a embriogênese nucelar, apesar de ter sido registrada a formação de sementes em *C. sinensis* Osbeck e *C. paradisi* Macf. e de embriões *in vitro* (Button & Bornman 1971 e Kochba et al. 1972) sem polinização. Alguns híbridos interespecíficos requerem, para o desenvolvimento de embriões asexuais, a ocorrência da polinização (Frost & Soost 1968); no entanto, não é muito clara a necessidade de fertilização (Esen 1977).

Métodos bioquímicos, como análise de flavonóides, têm sido usados para distinção de plântulas híbridas de nucelares (Tatum & Berry 1977 e Esen 1977). De acordo com Lima (1977), o uso de isoenzimas para identificação do embrião sexual é muito mais eficiente do que através da morfologia foliar. Várias são as tentativas para distinguir as plântulas nucelares das sexuais de citros, através da análise infravermelho de óleos essenciais nas folhas (Pieringer & Edwards 1965) ou morfologia das folhas das progênes (Teich & Spiegel-Roy 1972).

Em cruzamentos de *Poncirus trifoliata* com limão 'Cravo', a identificação foi feita 20 dias após o cultivo, com uso de enzimas peroxidase *in vitro* e, posteriormente, esse mesmo cruzamento foi confirmado através do aparecimento da característica trifoliada (Esen 1977).

Este trabalho teve por objetivo verificar a influência da polinização sobre a poliembrião e identificar *in vitro* o híbrido de limão 'Cravo' com *Poncirus trifoliata*.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no pomar e laboratório de cultura de tecidos da Escola Superior de Agricultura de Lavras, MG.

Trezentas hibridações foram feitas no início de floração do progenitor feminino, limão 'Cravo'. As flores de *Poncirus trifoliata* foram colhidas na fase de balão, armazenadas em placas-de-petri contendo papel de filtro, e aí conservadas até a antese. Após aproximadamente dois dias, houve a liberação dos grãos de pólen, os quais, aptos para a germinação do tubo polínico, foram levados para se efetuarem as hibridações das flores do progenitor feminino, que também estavam no estágio de balão. Selecionou-se uma flor em cada ramo, a qual foi emasculada, polinizada, protegida com um saquinho de papel e identificada com uma etiqueta de papelão. As flores restantes do ramo foram eliminadas.

Todos os frutos fertilizados provenientes das polinizações foram colhidos quando apresentavam um diâmetro favorável que facilitasse a contagem dos embriões individualmente. Essa fase, para o limão 'Cravo', está em torno de 27,0 a 34,0 mm de diâmetro, confirmada por experimentos anteriores, ou a

partir da décima semana após a hibridação. Os frutos foram transportados para o laboratório, seu diâmetro foi mensurado com ajuda de um paquímetro e posteriormente abertos, e suas sementes, retiradas.

Foi feita uma assepsia das 225 sementes com hipoclorito de sódio a 3%, durante 20 minutos. Após este período, as sementes foram lavadas por três vezes na câmara de fluxo laminar, e a seguir, cortadas longitudinalmente, e seus embriões, excisados e contados individualmente. Os embriões provenientes de uma mesma semente foram inoculados num mesmo tubo de ensaio contendo 10 ml do meio "MS" de cultura (Murashige & Skoog 1962), identificados e levados para sala de crescimento com 27°C e intensidade luminosa de mais ou menos 3.000 lux, durante 16 horas diárias.

Os híbridos foram identificados pela característica trifoliada, dominante do *Poncirus trifoliata*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises de correlação entre as variáveis estudadas dos frutos oriundos da hibridação artificial entre limão 'Cravo' e *Poncirus trifoliata* estão apresentados na Tabela 1. Observa-se que não existe diferença significativa para nenhum dos parâmetros estudados. No entanto, a maior correlação apresentada foi da variável taxa de poliembrionia em relação ao diâmetro dos frutos.

Analisando-se a Tabela 2, observa-se que a variável número total de embriões contidos no fruto foi incrementada, com relação ao valor obtido em polinização natural, apresentando, conseqüentemente, uma taxa de poliembrionia média de 2,39. Esse resultado pode ser explica-

**TABELA 1. Correlação de Parson entre diâmetro de frutos, número total de sementes, número de sementes viáveis, número total de embriões, taxa de poliembrionia, e viabilidade de sementes de cruzamentos entre limão 'Cravo' e *P. trifoliata*. ESAL, Lavras, MG, 1989.**

Variáveis	Nº de observ.	Correlação	T	Signific.
Diâmetro x nº total sementes	15	-0,0936	-0,3391NS	0,3700
Diâmetro x nº sementes viáveis	15	0,0745	0,2694NS	0,3959
Diâmetro x nº total embriões	15	0,3571	1,3785NS	0,0957
Diâmetro x taxa poliembrionia	15	0,5596	2,4343NS	0,150
Diâmetro x viabilidade sementes	15	0,1572	0,5740NS	0,2879

NS = não-significativo.

**TABELA 2. Médias, desvio-padrão e coeficientes de variação do número total de sementes, número de sementes viáveis, número total de embriões, viabilidade das sementes, taxa de poliembrionia e diâmetro dos frutos, obtidos em cruzamentos entre limão 'Cravo' e *P. trifoliata*. ESAL, Lavras, MG, 1989.**

Variáveis	Poliniz. natural	Polinização com "Limão trifoliata"		
		Média	Desvio-padrão	CV(%)
Nº total de sementes	-	10,20	4,39	43,09
Nº total de sementes viáveis	-	8,40	3,85	45,84
Nº total de embriões	-	21,33	13,46	63,08
Viabilidade das sementes	-	82,05	22,89	27,90
Taxa de poliembrionia	1,41	2,39	0,88	36,59
Diâmetro dos frutos	-	30,77	3,04	9,87

do pela maior quantidade de grãos de pólen colocados de uma só vez no estigma da planta-mãe, quando foi feita a polinização controlada. Observa-se também, um alto valor expresso da viabilidade das sementes, por causa da época de colheita, que foi feita dentro da faixa ideal, intencionalmente, para facilitar a contagem dos embriões.

Este aumento da taxa de poliembrião, provocado pela polinização controlada, concorda com afirmações de vários autores (Maheshwari & Ranga Swamy 1958; Frost & Soost 1968), de que polinização e fecundação são pré-requisitos para a embriogênese nucelar, apesar de ter sido registrada a formação de sementes de diversas espécies de citros por Button & Bornman (1971) e Kochba et al. (1972) sem polinização.

Apesar de cada semente em geral apresentar somente um embrião sexual, observou-se, no presente trabalho, uma baixa percentagem de desenvolvimento do embrião, em torno de 40%. Segundo Gurgel (1952), as sementes cítricas apresentam somente um embrião sexual, e o restante, de natureza agâmica, proveniente das células do nucelo; no entanto, alguns embriões não se desenvolvem, e dentre esses pode estar o sexual.

Foi observado, também, no trabalho, uma variabilidade entre plântulas nucleares de uma mesma semente; esse resultado é corroborado por Iglesias et al. (1974), porém, teoricamente, segundo Frost & Soost (1968), deveriam ter a mesma constituição genética.

A identificação do híbrido em tubo de ensaio foi realizada logo após o surgimento da característica trifoliada em uma das plântulas de um mesmo tubo, o que aconteceu com o surgimento do quarto par de folhas verdadeiras. Este resultado está de acordo com Teich & Spiegel-Roy (1972), que afirmam que, além da análise infra-vermelha de óleos essenciais nas folhas, o uso de marcadores genéticos é uma tentativa promissora, constituindo um meio mais acessível economicamente.

A técnica usada neste trabalho facilita a identificação e transporte das plântulas para outros ambientes, apesar de ser sua eficiência

questionada; segundo Lima (1977), o uso de isoenzimas seria mais seguro e mais eficiente, apesar de altamente dispendioso e sofisticado.

## CONCLUSÕES

1. Os parâmetros número total de sementes, número total de embriões, taxa de poliembrião e viabilidade das sementes não apresentaram correlação com o diâmetro ou idade dos frutos.

2. A faixa ideal encontrada para retirada e contagem dos embriões foi entre 27,0 a 34,0 mm de diâmetro dos frutos de limão 'Cravo'.

3. A polinização artificial com *P. trifoliata* influiu significativamente na taxa de poliembrião do limão 'Cravo', aumentando-a.

4. A identificação do híbrido entre limão 'Cravo' e *P. trifoliata* deve ser feita após o surgimento do quarto par de folhas.

## REFERÊNCIAS

- ALLARD, R.W. Hibridação interespecífica no melhoramento de plantas. In: PRINCÍPIOS do melhoramento genético das plantas. São Paulo: Edgard Blucher, 1960. p.349-355.
- BUTTON, J.; BORNMAN, C.H. Development of nucellar plants from unpollinated and unfertilized ovules of the Washington navel orange *in vitro*. *Journal South African Botany*, Cleromont, v.32, n.2, p.127-134, 1971.
- CAMERON, J.W.; SOOST, R.R. Citrus. In: SIMMONDS, N.W. (Ed.). *Evolution of Crop Plants*. New York: Longman, 1976. p.261-262.
- CHAPOT, H. The citrus plant. In: CITRUS. Switzerland: [s.n.], 1975. p.6-13. (Técnica monograph, 4).
- ESEN, A. Separation of nucellar and zygotic citrus seedlings by use of polyphenol oxidase-catalyzed browning. *Proceedings, International Society of Citriculture*, v.2, p.616-618, 1977.
- FROST, H.B.; SOOST, R.K. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In:

- BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J. **The Citrus Industry**. Berkeley: University of California Press, 1968. n.2, cap. 4, p.290-323.
- GURGEL, J.T.A. Poliembrionia e embriogenia adventícia em *Citrus*, *Mangifera* e *Eugenia*. **Du-senia**, Curitiba, v.3, n.6, p.443-450, nov. 1952.
- HEARN, C.J. Recongnition of zygotic seedlings in certain orange crosses by vegetative characters. **Proceedings International Society of Citriculture**, v.2, p.601-604, 1977.
- IGLESIAS, L.; LIMA, H.; SIMON, J.P. Isoenzyme identification of zygotic and nucellar seedlings in *Citrus*. **The Journal of Heredity**, Washington, v.65, p.81-84, Mar./Apr. 1974.
- KOCHBA, J.; SPIEGEL-ROY, P.; SAFRAN, H. Adventive plants from ovules and nucelli in *citrus*. **Planta**, Berlin, v.106, p.237-245, 1972.
- KORDAN, H.A. Proliferation of excised juice vesicles of lemon *in vitro*. **Science**, v.129, p.779-780, 1959.
- LEOPOLD, A.C.; KRIEDEMANN, P.E. Juvenility, maturity and senescense. In:\_\_\_\_\_. **Plant growth and development**. New York: McGraw-Hill, 1975. cap. 11, p.249-269.
- LIMA, H. Estudio comparativo de la efectividad de las técnicas utilizadas para la diferenciación de posturas nucelares y cigóticos en cítricos. **Proceedings, International Society of Citriculture**, v.2, p.641-644, 1977.
- MAHESHWARI, P.; RANGA SWAMY, N.S. Polymembryony and *in vitro* Culture of Citrus and *Mangifera*. **The Indian Journal of Horticulture**, Bangalore, v.15, p.275-286, 1958.
- MOREIRA, C.S. Melhoramento de citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F. **Citricultura Brasileira**, Campinas: Fundação Cargill, 1980. v.1, p.195-223.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- MURASHIGE, T.; TUCKER, D.L.M. Growth factor requirements of citrus tissue culture. In: CHAPMAN, H.D. (Ed.). **Proceedings, First International Citrus Symposium**, Riverside: California, v.3, p.1155-1161, 1969.
- PASSOS, O.S. **Melhoramento de citros na Califórnia (EUA) e sugestões para a citricultura brasileira**. Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMP, 1980. 9p. (EMBRAPA-CNPMP. Miscelânea, 2).
- PIERINGER, A.P.; EDWARDS, G.J. Identification of nucellar and zygotic citrus seedlings by infrared spectroscopy. **Proceedings of the American Society Horticultural Science**. Virginia, v.84, p.226-234, 1965.
- SCHROEDER, C.A.; SPECTOR, C. Effect of gibberellic acid and indolacetic acid on growth of excised fruit tissue. **Science**. Washington, v.126, n.3276, p.701-702, Oct. 1957.
- TATUM, J.H.; BERRY, R.E. Separation of nucellar and zygotic citrus seedlings by their flavonoids and other non-volatile components. **Proceedings International Society of Citriculture**, v.2, p.614-616, 1977.
- TEICH, A.H.; SPIEGEL-ROY, P. Differentiation between nucellar and zygotic citrus seedlings by leaf shape. **Theoretical Applied genetics**. Berlin, v.42, p.314-315, 1972.