

# AVALIAÇÃO DE SAIS MS E SACAROSE NA GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE PORTA-ENXERTO DE LIMÃO CRAVO

**Omar Schmidt<sup>1</sup>, Márcio José Vieira de Oliveira<sup>2</sup>, Wanderson Souza Rabello<sup>3</sup>, Edilson Romais Schmidt<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Doutorando em Produção Vegetal, UENF/Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 28013-602, Campos dos Goytacazes-RJ, e-mail: omar-schmidt@ig.com.br

<sup>2</sup>Mestrando em Produção Vegetal, CCA-UFES/Deptº de Fitotecnia, Cx Postal 16, 29500-000, Alegre-ES, e-mail: majovideo@bol.com.br

<sup>3</sup>Graduando em Agronomia, CCA-UFES/Deptº de Fitotecnia, Cx Postal 16, 29500-000, Alegre-ES, e-mail: rabellosouza@hotmail.com

<sup>4</sup>Pof. Adjunto, CEUNES, UFES/Deptº de Ciências da Saúde, Biológicas e Agrárias, 29933-415, São Mateus-ES, email: edilsonschmidt@ceunes.ufes.br

**RESUMO** - Dada a importância da produção de mudas de *Citrus* livres de doenças, a microenxertia torna-se uma opção interessante por originar clones livre de vírus e sem os inconvenientes de juvenildade dos clones novos. A obtenção do porta-enxerto é feita pela germinação *in vitro* de sementes selecionadas, requerendo profissionais habilidosos e meio de cultura que proporcione alto índice de velocidade de germinação (IVG) e alta germinação das sementes, bem como boa produção de matéria fresca e bom crescimento da parte aérea. Nesse trabalho avaliou-se o desenvolvimento *in vitro* do porta enxerto limoeiro cravo em meio com diferentes níveis de sais de MS e de sacarose. Níveis de sais de MS acima de 33,3% se mostraram importantes para o aumento do peso em matéria fresca e do crescimento da parte aérea. No entanto, com o aumento dos níveis acima de 33,3% ocorre diminuição do IVG e da porcentagem de germinação.

**Palavras-chave:** *Citrus limonia* Osbeck, cultivo *in vitro*.

**Área do Conhecimento:** Ciências Agrárias.

## Introdução

As plantas cultivadas do gênero *Citrus*, que abrangem principalmente as laranjeiras, tangerinas, limoeiros, limeiras, pomeleiros e toranjeiras, desempenham grande importância sócio econômica no mundo, devido à grande aceitação na alimentação humana, principalmente sob a forma de fruta fresca e de suco. O sabor é muito apreciado e seu valor nutritivo, como fonte de vitamina C, é conhecido universalmente (KOLLER, 1994). A citricultura no Brasil ocupa lugar de destaque dentre as diversas culturas agrícolas pelo valor da exportação, como também pela sua importância social, gerando um grande número de empregos.

As doenças de *Citrus* causadas principalmente por vírus, viróides, micoplasmas e bactérias têm importância capital, pois pode destruir toda a citricultura de uma extensa região, impedir o seu estabelecimento em certas áreas ou reduzir quantitativa e qualitativamente a produção. Por esse motivo, há muitos anos existe uma grande preocupação no desenvolvimento e utilização de técnicas que permitam obter plantas cítricas livres dessas doenças *in vivo* e *in vitro* (BAPTISTA et al., 1991). Embora os vírus sistêmicos também possam atingir os tecidos meristemáticos, em

alguns casos parece existir uma região próxima às extremidades de raízes e brotos que permanece isenta de vírus, esta evidencia tem permitido a produção de clones livres de vírus através de culturas de tecidos obtido desta região (BEDENDO, 1995).

A microenxertia é uma técnica em que se retira a extremidade apical de um ramo da variedade que se quer limpar de doenças colocando-a sobre a extremidade decepada de um porta-enxerto, cultivado em tubo de ensaio (PAZ & PASQUAL, 1998). De acordo com Dornelles (1988), obtendo-se a pega dessa microenxertia, a planta obtida tem grandes probabilidades de não receber os microorganismos existentes na planta mãe, pois as extremidades meristemáticas geralmente estão livres dos mesmos. Quando esta é multiplicada por enxertia, dará origem a um clone livre de vírus e sem os inconvenientes de juvenildade dos clones novos.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar concentrações de sais MS e sacarose em germinação *in vitro* de sementes de limão Cravo para identificação do melhor tratamento para obtenção de porta-enxerto.

## Materiais e Métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, em Alegre, ES, no período de agosto a setembro de 2004.

Utilizaram-se sementes de limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck) oriundos da Escola Agrotécnica Federal de Alegre (EAFA), sendo provenientes do mesmo lote e apresentando maturação completa. As sementes dos frutos foram extraídas pelo método manual, conforme (KOLLER, 1994). A desinfestação destas foi feita em álcool 70% por trinta segundos e hipoclorito de sódio com 2% de cloro ativo por 10 minutos e enxaguados três vezes em água deionizada e esterilizada. Em seguida, foram retirados os tegumentos internos e externos em condições assépticas em câmara de fluxo laminar horizontal.

O meio de cultura continha sais de MS (19), e sacarose de acordo com os tratamentos, além de vitaminas do meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), sendo solidificado em ágar a  $7 \text{ g.L}^{-1}$  e o pH ajustado para 5,7 antes da autoclavagem.

O delineamento experimental foi do tipo blocos casualizados, com 12 tratamentos, num esquema fatorial com três níveis de sais MS (33,3; 66,7 e 100%) e quatro níveis de sacarose (0, 20, 40 e  $60 \text{ g.L}^{-1}$ ). Cada tratamento foi repetido duas vezes, com 10 tubos de ensaio por repetição, e uma semente por tubo de ensaio. Cada tubo de ensaio de  $25 \times 150 \text{ mm}$  continha 20 ml de meio de cultura.

As sementes foram germinadas no escuro com temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ . Após vinte dias de cultivo *in vitro*, avaliaram-se as variáveis: porcentagem de germinação, matéria fresca e comprimento da parte aérea. Foi calculado também o índice de velocidade de germinação (IVG) de acordo com Maguirre (1962), sendo as germinações mediadas aos 5, 10, 15 e 20 dias após inoculação *in vitro*.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e quando os efeitos foram significativos, foram representados pela análise de regressão linear ou por gráfico em linhas.

## Resultados

O Quadro 1 mostra a relação linear entre o IVG e os níveis de sais MS. Estes resultados demonstram que ocorreu decréscimo linear no IVG com o aumento dos níveis de sais de MS, indicando haver uma sensibilidade do limão Cravo a salinidade.

**QUADRO 1** – Relação linear entre o Índice de velocidade de germinação (IVG) e os níveis de sais de MS (SMS) em porta enxerto limoeiro cravo (Alegre-ES, 2004)

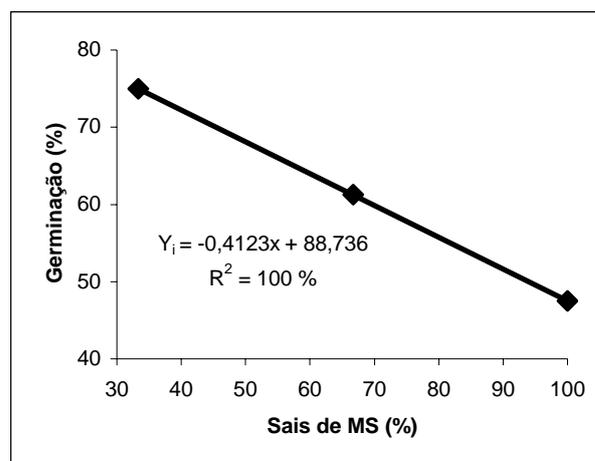
Sacarose ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Equação linear	$R^2$ (%)
0	$\hat{Y}_i = 1,5648 - 0,0015 \text{ (MS)}$	40,40
20	$\hat{Y}_i = 1,5333 - 0,0027 \text{ (MS)}$	98,40
40	$\hat{Y}_i = 1,9097 - 0,0116 \text{ (MS)}$	99,41
60	$\hat{Y}_i = 1,7568 - 0,0086 \text{ (MS)}$	59,98

Houve aumento linear do IVG com aumento dos níveis de sacarose (de 0 até  $60 \text{ g.L}^{-1}$ ) na presença de 33,3 % de sais de MS (Quadro 2). O baixo teor de sais de MS parece ter compensado a adição de sacarose, não afetando o balanço osmótico do meio e sendo favorável ao IVG.

**QUADRO 2** – Relação linear entre o Índice de velocidade de germinação (IVG) e os níveis de sacarose (S) em porta enxerto limoeiro cravo (Alegre-ES, 2004)

Sais de MS (%)	Equação linear	$R^2$ (%)
33,3	$\hat{Y}_i = 1,449 + 0,023 \text{ (S)}$	76,57
66,7	$\hat{Y}_i = 1,5385 - 0,1058 \text{ (S)}$	99,80
100	$\hat{Y}_i = 1,3445 - 0,0778 \text{ (S)}$	53,99

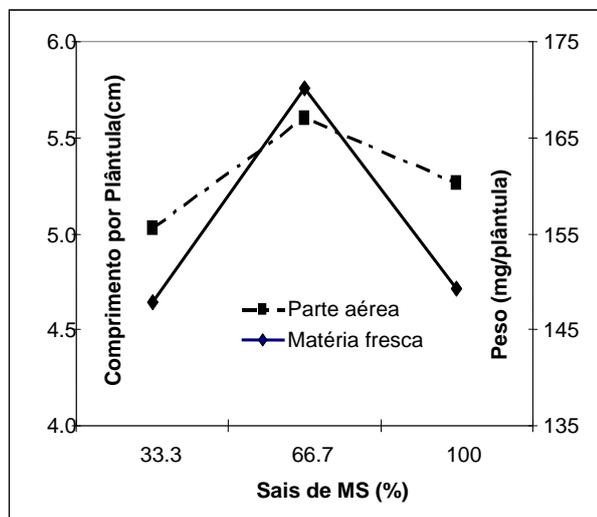
Houve decréscimo do enraizamento com o aumento dos níveis de sais de MS (Figura 1).



**FIGURA 1** – Germinação de sementes de limoeiro cravo após vinte dias sob diferentes níveis de

sais de MS em meio de cultura (Alegre-ES, 2004).

Maior quantidade de matéria fresca bem como maior comprimento da parte aérea foi no nível 66,7% de sais de MS (Figura 2).



**FIGURA 2** – Comprimento da parte aérea e peso de matéria fresca por plântula de limoeiro cravo após vinte dias sob diferentes níveis de sais de MS em meio de cultura (Alegre-ES, 2004).

## Discussão

Resultado semelhante ao Quadro 1 foram demonstrados por Gurgel et al. (2003), em experimento comprovando o menor IVG em porta enxerto de acerola em condições de alta salinidade. Sabe-se que a salinidade, ao reduzir o potencial osmótico do meio, aumenta o tempo de embebição de água pelas sementes, resultando, inicialmente, em prolongamento do período de emergência da plântula (PIZARRO, 1985).

Comportamento semelhante ao Quadro 2 foram observados por Nogueira et al. (2004) em relação à germinação *in vitro* de sementes da planta medicinal *Byrsonina intermedia*. Na presença de 66,7% e 100% de sais de MS, houve decréscimo linear do IVG com aumento dos níveis de sacarose provavelmente devido à baixa diferença de potencial osmótico entre as sementes e o meio de germinação.

Os resultados da Figura 1 concordam com Grattapaglia & Machado (1990) que afirmam que em espécies lenhosas normalmente as respostas morfogênicas são mais acentuadas em baixos teores de sais. Esses resultados diferem dos encontrados para germinação *in vitro* de aceroleira por Gurgel et al. (2003), que não encontraram diferenças significativas para as médias de germinação de sementes em diferentes níveis de sais.

Na Figura 2, o resultado difere dos encontrados por Utino et al. (2001) que testando também de 33,3% até 100% de sais de MS encontraram aumento linear na produção de matéria fresca em explantes de bananeira. Koller e Boeira (1996) salientam a importância do N inorgânico no desenvolvimento do limão Cravo. No presente trabalho, o nível que permitiu maior teor de matéria fresca (66,7% de sais de MS) equivalem a 367,72 mg.L<sup>-1</sup> de N inorgânico. Em trabalhos com solução nutritiva, foi detectado maior acúmulo de matéria fresca a 100 mg.L<sup>-1</sup> de N inorgânico em petúnia (FRET & DIRR, 1986) e 267 mg.L<sup>-1</sup> em cravo (HAYASHI, 2002). Pelo exposto, parece existir um teor ótimo de N inorgânico para diferentes espécies e embora não se tenha isolado o efeito do mesmo no presente trabalho, percebe-se que não é necessário mais que 367,72 mg.L<sup>-1</sup> de N inorgânico (equivalente a 2/3 de sais de MS) para propiciar maior acúmulo de matéria fresca e crescimento de parte aérea na germinação *in vitro* de sementes de limão cravo.

Com relação ao comprimento da parte aérea, a média foi de 5,3 cm, resultado semelhante aos obtidos por Paiva & Souza (1992) em citros. Murashige et al. (1972) afirmaram que o tamanho ideal para a realização da enxertia *in vitro* é quando os micro porta-enxertos atingem mais ou menos 5 cm de comprimento.

## Conclusões

O maior índice de velocidade de germinação e a maior porcentagem de germinação de sementes ocorrem em meio com 33,3% de sais de MS;

Em meio com 33,3% de sais de MS, o maior índice de velocidade de germinação ocorre na presença de sacarose a 60g.L<sup>-1</sup>;

Em meio com 66,7% ou 100% de sais de MS o maior índice de velocidade de germinação ocorre na ausência de sacarose;

Níveis de 66,7% de sais de MS propiciam maior peso de matéria fresca por plântula e comprimento da parte aérea.

## Referências

BAPTISTA, R.P., ROSSETTI, V.V., MULLER, G.W., SILVÉRIO, J.L. Microenxertia. In: RODRIGUES, O., VIÉGAS, F., POMPEU JR. J., AMARO, A. A. **Citricultura brasileira**. 2. ed., v.2. Campinas: Fundação Cargill, 1991. p.763-786.

BEDENDO, I.P. Vírus. In: BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H., AMORIN, L. (eds.). **Manual de fitopatologia**. V. 1, São Paulo: CERES, 1995. p. 133-160.

DORNELLES, C. **Introdução à citricultura**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1988. 96 p.

FRET, J.J. & DIRR, M.A. Effect of nitrogen and calcium stock plant nutrition on Petúnia x Hybrida leaf and anther explant growth in vitro. **Scientia Horticulturae**, v.28, p.289-298, 1986.

GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. (eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP, EMBRAPA – CNPH, 1990. p.99-169.

GURGEL, M.T., FERNANDES, P.D., GHEYI, H.R., SANTOS, F.J. de S., BEZERRA, I.L., NOBRE, R. R.G. Estresse salino na germinação e formação de porta-enxerto de aceroleira. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.7, p.31-36, 2003.

HAYASHI, T.K., MOREIRA, A., AMARAL, A.F. de C., MELO, M. Tratamento de matrizes de cravo (*Dianthus caryophyllus* L., Caryophyllaceae) com nitrogênio e calogênese *in vitro*. **Scientia Agrícola**, v.59, p.47-52, 2002.

KOLLER, O.C. & BOEIRA, R.C. Adubação orgânica e inorgânica em sementeiras de citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.21, p.645-654, 1996.

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

MAGUIRRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seeding emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, p.176-177, 1962.

MURASHIGE, T., BITTERS, W.P., RANGAN, T.S., NAVAR, E.M., ROISTACHER, C.N., HOLLIDAY, P.B. A technique of shoot apex grafting and its utilization to wards recovering virus free citrus clone. **HortScience**, v.7, p.118-119, 1972.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

NOGUEIRA, R.C., PAIVA, R., CASTRO, A.H., VIEIRA, C.V., ABBADE, L.C., ALVARENGA, A.A. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, p.1053-1059, 2004.

PAIVA, L.V. & SOUZA, M. de. Obtenção de porta-enxertos para a microenxertia em citros. **Ciência e Prática**, v.18, p.76-78, 1992.

PAZ, P.O. da & PASQUAL, M. Microenxertia. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S & BUSCO, J.A. (eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. V.2, Brasília, EMBRAPA-CNPH, 1998. p. 147-159.

PIZARRO, F. **Drenaje agrícola y recuperacion de suelos salinos**. Madrid: Editora Agrícola Española, S.A., 1985. 542p.

UTINO, S., CARNEIRO, I.F., CHAVES, L.J. Crescimento e oxidação de explantes de bananeira-prata (*Musa AAB*) *in vitro*: I. concentrações de sais de ferro, cobre e zinco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, p.225-229, 2001.