

# CULTIVO *in vitro* DE EMBRIÕES IMATUROS DE TANGERINEIRA 'PONCÃ' EM FUNÇÃO DO pH E DA CONCENTRAÇÃO DE ÁGAR

## *In vitro* CULTURE OF 'PONCÃ' MANDARIN IMMATURE EMBRYOS: pH x AGAR CONCENTRATION

PASQUAL, Moacir <sup>1\*</sup>; FINOTTI, Daniela R. <sup>2</sup>; DUTRA, Leonardo F. <sup>3</sup>; CHAGAS, Edvan A. <sup>4</sup>; RIBEIRO, Luciene de O. <sup>2</sup>

### RESUMO

A cultura de embriões é de grande importância no melhoramento de citros por proporcionar o resgate de embriões híbridos imaturos oriundos de cruzamentos interespecíficos. Objetivou-se estudar a influência do pH e da concentração do ágar no cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerineira 'Poncã'. Embriões foram excisados e inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio de cultura MS modificado em relação à concentração do ágar (0; 3,5; 7; 10,5 e 14 g.L<sup>-1</sup>), ajustado a diferentes pHs (3,7; 4,7; 5,7 e 6,7) e posteriormente esterilizado (121 °C, 20 min.). Os embriões permaneceram por 48 horas no escuro e 60 dias em sala de crescimento a 27 ± 1 °C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 35 µM.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. A utilização de meio de cultura líquido e pH ácido, entre 3,7 e 5,7, proporciona melhor desenvolvimento de embriões de tangerineira 'Poncã'.

Palavras-chave: *Citrus reticulata*, cultura de embriões, melhoramento genético, meio de cultura MS.

### INTRODUÇÃO

Os métodos de melhoramento clássico utilizados no desenvolvimento de novas variedades de citros estão limitados a problemas peculiares, tais como embrião nucelar, elevadas taxas de heterozigose, incompatibilidade sexual, esterilidade masculina e feminina, além do longo período juvenil (SOOST & CAMERON, 1975).

A cultura de embriões é de grande importância no melhoramento dos citros por proporcionar o resgate de embriões híbridos imaturos, oriundos de cruzamentos interespecíficos e intergenéricos. Incompatibilidades são, muitas vezes, encontradas em tais cruzamentos, o que resulta em sementes com embriões abortivos (HU & FERREIRA, 1998). Estes embriões geralmente abortam sem germinar, mas podem, em muitos casos, ser resgatados mediante um apropriado procedimento *in vitro* (SHARMA et al., 1996) e postos a se desenvolver em meio de cultura adequado. Trabalhos têm sido realizados objetivando elucidar os efeitos dos diversos fatores no cultivo *in vitro* de embriões de citros (RIBEIRO et al., 1997, 1998, 1999 e 2000).

Os meios de cultura sólidos ou semi-sólidos normalmente são solidificados com ágar. A consistência do meio de cultura depende da concentração e qualidade de ágar utilizada, do pH, do tipo de explante, da concentração de sais

e da presença de outras substâncias como o carvão ativado, os quais interferem na gelificação (CALDAS et al., 1998; MURASHIGE, 1974). Existem várias marcas comerciais disponíveis de ágar, que usualmente são utilizadas em concentrações que variam de 0,4 a 1 % (CALDAS et al., 1998). Entretanto, recomenda-se minimizá-lo ou otimizá-lo no preparo do meio de cultura, pelo fato do ágar ser considerado o componente de maior custo do meio de cultura (SINGHA, 1984; GEORGE, 1993; PEIXOTO & PASQUAL, 1995).

O pH é um fator crítico e muito importante do meio de cultura, influenciando na disponibilidade de nutrientes, fitorreguladores e no grau de solidificação do ágar. Se bem ajustado, o pH pode promover maior e melhor aproveitamento dos nutrientes pelo explante. Os efeitos do pH podem ser diretos ou indiretos, influenciando, por exemplo, na utilização das fontes de nitrogênio. Valores de pH mais baixos (meios de cultura mais ácidos) dificultam a utilização do amônio, enquanto valores mais altos de pH diminuem a utilização do nitrato (STREET & SHEAT, 1958; MARTIN & ROSE, 1976). Para um crescimento adequado da maioria das espécies, a faixa de 5 a 6,5 revela o melhor ajuste de pH (PIERIK, 1987). Se os níveis de pH forem inferiores a 4,5 e superiores a 7, poderá ocorrer paralisação do crescimento e do desenvolvimento *in vitro* (MURASHIGE, 1974).

A variação de pH no meio de cultura pode ser devida à absorção diferencial do amônio e do nitrato (SINGHA et al., 1987). Durante o crescimento das células, o pH do meio de cultura se altera à medida que diferentes íons são absorvidos e os produtos metabólicos são excretados para o meio. O processo de autoclavagem e a estocagem também acidificam os meios de cultura (SKIRVIN et al., 1986).

Objetivou-se avaliar a influência do pH e da concentração de ágar no cultivo *in vitro* de embriões imaturos de frutos de tangerineira 'Poncã'.

### MATERIAL E MÉTODOS

Frutos de tangerineira 'Poncã' provenientes de polinização natural, apresentando 3 a 4 cm de diâmetro, tiveram suas sementes removidas e tratadas com álcool (70 %) por cinco minutos e posteriormente em hipoclorito de sódio (2 %), por 20 minutos, sendo em seguida lavadas três vezes em água destilada e autoclavada.

<sup>1</sup> Eng. Agr. Dr. Prof. Titular Depto de Agricultura/UFLA, Lab. Cultura de tecidos. Campus Universitário, CEP 37200-000 Lavras-MG. \*Autor para correspondência <mpasqual@ufla.br >

<sup>2</sup> Aluno de graduação em Agronomia. Depto de Agricultura/UFLA, Lab. Cultura de tecidos. Campus Universitário, CEP 37200-000 Lavras-MG.

<sup>3</sup> Eng. Agr. Dr. Bolsista recém Doutor/CNPq. Depto de Agricultura/UFLA, Lab. Cultura de tecidos. Campus Universitário CEP 37200-000 Lavras-MG.

<sup>4</sup> Eng. Agr. Mestrando em Agronomia. Depto de Agricultura/UFLA, Lab. Cultura de tecidos. Campus Universitário, CEP 37200-000 Lavras-MG.

(Recebido para publicação em 17/06/2002)

Com auxílio de microscópio estereoscópico, bisturi e pinça, os tegumentos das sementes foram separados longitudinalmente pela região oposta à micrópila, tomando-se o cuidado de não provocar danos aos embriões. Os embriões, independentemente dos estádios em que se encontravam, foram excisados e inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), modificado em relação à concentração de ágar (0; 3,5; 7; 10,5 e 14 g.L<sup>-1</sup>), ajustado aos pHs 3,7; 4,7; 5,7 e 6,7 em todas as combinações possíveis. Esses tratamentos permaneceram por 48 horas no escuro e, após, em sala de crescimento, à temperatura de 27 ± 1 °C, fotoperíodo de 16 horas e 35 μMm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> de intensidade luminosa. O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, em fatorial 5 x 4, com quatro repetições, cada uma constituída por três tubos de ensaio. Os dados foram submetidos à análise de variância e a comparação dos resultados por meio de regressão polinomial.

Após 60 dias, as plântulas foram avaliadas com base na altura da parte aérea, número de folhas, massa da parte aérea fresca e seca, comprimento de raízes, massa das raízes frescas e secas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância para as variáveis avaliadas em plântulas oriundas de embriões do cruzamento *Citrus reticulata* x *Citrus sinensis* cultivados em meio de cultura ajustado a diferentes pH e concentrações de ágar encontra-se na Tabela 1.

Maior altura da parte aérea de plântulas (2,3 cm) foi obtida com pH ajustado em 4,7 e 9,3 g.L<sup>-1</sup> de ágar (Figura 1). Posteriormente, verificou-se decréscimo nessa variável à medida em que se aumentou a concentração de ágar.

O resultado obtido na ausência de ágar (1,58 cm), é pouco inferior ao obtido com a concentração máxima (2,3 cm). Desta forma, para altura da parte aérea de plântulas de tangerineira 'Poncã' oriundas de embriões, pode-se recomendar a utilização de meio de cultura MS com pH ajustado para 4,7 e ausência ou baixa concentração de ágar (3,5 g.L<sup>-1</sup>), inferior ao normalmente recomendado, entre 6 e 7 g.L<sup>-1</sup>. Resultados similares foram obtidos por RIBEIRO et al. (1997) com laranjeira 'Pêra' e RIBEIRO et al. (1999) com laranjeira 'Natal', que observaram maior comprimento da parte

aérea de plântulas, oriundas da cultura de embriões em meio ajustado para pH 4,7 e 8,5 g.L<sup>-1</sup> de ágar.

O pH ajustado para 3,7 e associado a 7,4 g.L<sup>-1</sup> de ágar proporcionou maior número de folhas (10,06) por plântula (Figura 2). Quanto mais elevado o pH (5,7 e 6,7), menor a concentração de ágar a ser utilizada no meio de cultura para obtenção de maior número de folhas. Após atingir uma concentração máxima de ágar houve redução no número de folhas por explante, sendo que essa queda ocorreu antes nos pHs mais elevados. Além disso, o incremento no número de folhas nos meios com pH 5,7 e 6,7 foi pequeno, reafirmando que a cultura de embriões de tangerineira 'Poncã' pode ser realizada em meio de cultura com pH baixo. RIBEIRO et al. (1999) verificaram que o maior número de pares de folhas em explantes oriundos de embriões de laranja 'Natal' foi obtido em pH 4,7 associado a 8,4 g.L<sup>-1</sup> de ágar.

Maiores massas da parte aérea fresca são obtidas com pH ajustado para 4,7, 5,7 e 6,7, na ausência de ágar (Figura 3). Quando o pH foi ajustado para 3,7, associado com 3,7 g.L<sup>-1</sup> de ágar, obteve-se também boa resposta (71,5 cm) para esta variável. À medida que se aumentou a concentração de ágar, houve redução nos valores desta variável. Tendência similar foi observada por RIBEIRO et al. (1999), que constataram queda na massa de embriões frescos de laranja 'Natal', à medida em que se aumentou a concentração de ágar no meio de cultura.

Resultado semelhante foi encontrado para a massa da parte aérea seca (Figura 4), com maior valor (31,84 mg) obtido na ausência de ágar. Quando houve aumento nas concentrações de ágar, constatou-se redução na massa das brotações secas. O pH 3,7 tendeu a proporcionar maiores massas secas.

O pH ajustado em 3,7, na ausência de ágar, proporcionou maior comprimento de raízes (9,08 cm), com posterior queda à medida em que se aumentou a concentração de ágar (Figura 5). Essa resposta assemelha-se à obtida por RIBEIRO et al. (1997), que verificaram maior comprimento do sistema radicular de embriões de laranjeira 'Pêra' em pH 4,7 na ausência de ágar. Quando o pH do meio foi ajustado para 5,7 e 6,7, maior comprimento de raízes foi obtido com 5,1 e 4 g.L<sup>-1</sup> de ágar, respectivamente, a partir do qual houve decréscimo com o aumento das concentrações. RIBEIRO et al. (1999), para os mesmos valores de pH, observaram que o maior comprimento do sistema radicular de embriões de laranja 'Natal' foi obtido com 8,5 g.L<sup>-1</sup> de ágar.

Tabela 1 - Análise de variância para altura da parte aérea (APA), número de folhas (NF), massa da parte aérea fresca (MPAF), massa da parte aérea seca (MPAS), comprimento de raízes (CR), massa de raízes frescas (MRF), e massa de raízes secas (MRS), de plântulas oriundas de embriões imaturos de frutos de tangerineira 'Poncã' cultivados *in vitro* em diferentes concentrações de ágar e pH no meio MS.

Causa de Variação	GL	QM						
		APA	NF	MPAF	MPAS	CR	MRF	MRS
Agar	4	3,29**	39,01**	14036,49**	3418,22**	69,27**	11068,28**	1640,34**
PH	3	0,62**	36,34**	965,60**	199,66**	42,55**	56,95ns	203,60**
Agar x pH	12	1,80**	14,55**	886,61**	162,93**	13,43**	139,91**	138,30**
Resíduo	60	0,09	2,45	12,39	2,48	1,91	35,91	2,90
%		15,04	26,80	10,28	10,16	26,55	22,87	17,22

\*\* : significativo ao nível de 1% de probabilidade

ns: não significativo

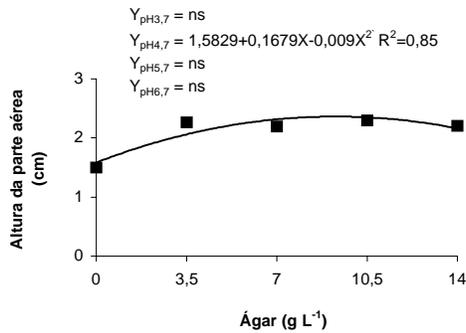


Figura 1 - Altura da parte aérea de plântulas oriundas de embriões imaturos de tangerineira 'Poncã' cultivados *in vitro* em diferentes concentrações de ágar e pHs do meio de cultura MS.

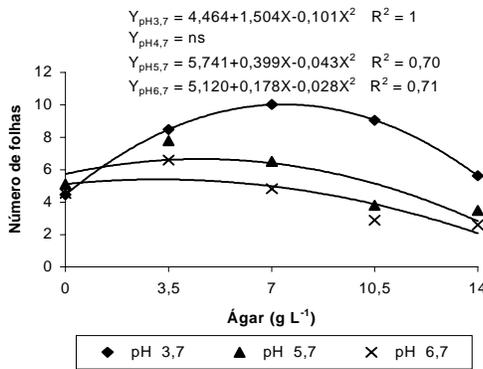


Figura 2 - Número de folhas de plântulas oriundas de embriões imaturos de tangerineira 'Poncã' cultivados *in vitro* em diferentes concentrações de ágar e pHs do meio de cultura MS.

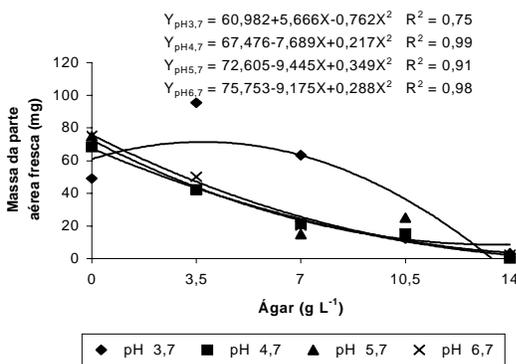


Figura 3 - Massa da parte aérea fresca de plântulas oriundas de embriões imaturos de tangerineira 'Poncã' cultivados *in vitro* em diferentes concentrações de ágar e pHs do meio de cultura MS.

O fato da maioria dos resultados terem sido observados na ausência ou em baixas concentrações de ágar está relacionado ao potencial osmótico. Desta forma, o aumento

das concentrações de ágar promove a elevação do potencial osmótico do meio de cultura, dificultando a difusão dos nutrientes para os embriões e, conseqüentemente, reduzindo seu desenvolvimento. Altas concentrações de ágar, ou meios muito consistentes, podem limitar a difusão de nutrientes até o explante (ROMBERGER & TABOR, 1971). O meio de cultura sem adição de ágar possui consistência líquida ou um pouco mais consistente em baixas concentrações desse solidificante. Há maior absorção de água pelos tecidos dos explantes quando cultivados em meio mais aquoso (WILLIAMS & LEOPOLD, 1989). Além disso, meios líquidos são mais homogêneos, visto que não se estabelece um gradiente de nutrientes, que normalmente ocorre nos meios sólidos.

Embora para um crescimento adequado da maioria das espécies o melhor valor de pH esteja entre 5 e 6,5 e que em valores inferiores a 4,5 pode ocorrer paralisação do crescimento e do desenvolvimento *in vitro*, esse resultado não foi verificado neste trabalho nem nos de RIBEIRO et al. (1997 e 1999). Tal comportamento pode indicar que embriões de citros não encontram dificuldade para se desenvolver em pHs baixos.

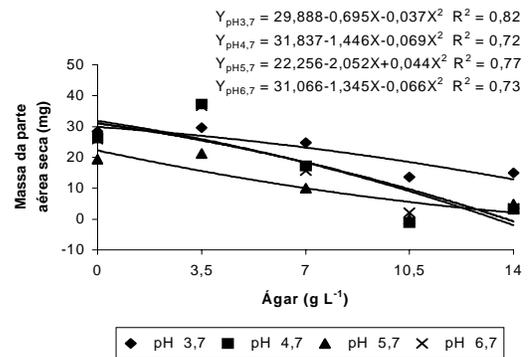


Figura 4 - Massa da parte aérea seca de plântulas oriundas de embriões imaturos de tangerineira 'Poncã' cultivados *in vitro* em diferentes concentrações de ágar e pHs do meio de cultura MS.

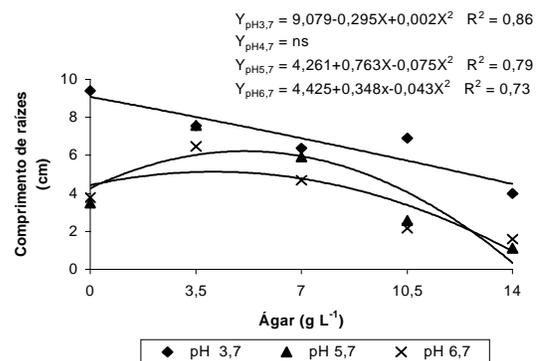


Figura 5 - Comprimento de raízes de plântulas oriundas de embriões imaturos de tangerineira 'Poncã' cultivados *in vitro* em diferentes concentrações de ágar e pHs do meio de cultura MS.

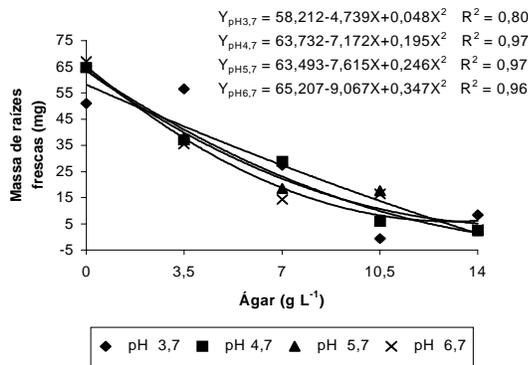


Figura 6 - Massa de raízes frescas de plântulas oriundas de embriões imaturos de tangerineira 'Poncã' cultivados *in vitro* em diferentes concentrações de ágar e pHs do meio de cultura MS.

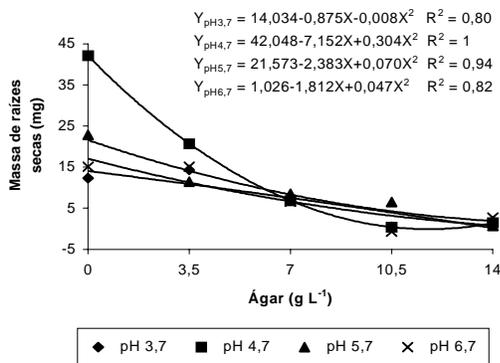


Figura 7 - Massa de raízes secas de plântulas oriundas de embriões imaturos de tangerineira 'Poncã' cultivados *in vitro* em diferentes concentrações de ágar e pHs do meio de cultura MS.

## CONCLUSÃO

A utilização de meio de cultura líquido e pH ácido, entre 3,7 e 5,7, proporciona melhor desenvolvimento de embriões de tangerineira 'Poncã'.

## ABSTRACT

The culture of embryos is of great importance in the citrus improvement for providing the rescue of hybrid immature embryos from inter-specific crossings. The influence of pH and agar in the *in vitro* culture of immature embryos of 'Poncã' mandarin was evaluated. Embryos were removed and inoculated individually in test tubes containing 15 mL of MS culture medium modified in relation to the agar (0; 3.5; 7; 10.5 and 14 g.L<sup>-1</sup>), adjusted to different pHs (3.7; 4.7; 5.7 and 6.7) and later sterilized (121 °C, 20 min.). The embryos were maintained for 48 hours in the darkness and 60 days in the growth room, to 27 ± 1 °C, 16 hours photoperiod and of 35 µM.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> light intensity. Liquid medium culture and acid pH, between 3.7 and 5.7, provides better development of embryos 'Poncã' mandarin.

Key words: *Citrus reticulata*, embryo culture, genetic improvement, MS culture medium.

## REFERÊNCIAS

- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA; CBAB, 1998. p.87-132.
- GEORGE, E.F. The components of tissue media. **Plant propagation by tissue culture**. 2.ed. Edington, v.9, p.273-343, 1993.
- HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, CNPH; CBAB, 1998. v.2, p.371-393.
- MARTIN, S.M.; ROSE, D. Growth of plant cell (*Ipomoea*) suspension cultures at controlled pH levels. **Canadian Journal of Botany**, v.54, p.1264-1270, 1976.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, v.25, p.135-166, 1974.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- PEIXOTO, P.H.P.; PASQUAL, M. Micropropagação da videira: efeitos do pH e do ágar. **Revista Ceres**, v.42, p.432-443, 1995.
- PIERIK, R.L.M. **In vitro culture of higher plants**. Dordrecht: Martinus Nyjhoff, 1987. 344p.
- RIBEIRO, V.G.; PASQUAL, M.; RAMOS, J.D. et al.. Influência do pH e do ágar sobre o cultivo *in vitro* de embriões de laranja 'Pêra'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.32, p.1147-1152, 1997.
- RIBEIRO, V.G.; PASQUAL, M.; RAMOS, J.D. et al. Cultivo *in vitro* de embriões de laranja 'Pêra': concentrações do meio MS e sacarose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.22, p.429-434, 1998.
- RIBEIRO, V.G.; PASQUAL, M.; RAMOS, J.D. et al. Influência do ágar e do pH sobre o cultivo *in vitro* de embriões de laranja 'Natal'. **Revista Ceres**, v.46, p.587-595, 1999.
- RIBEIRO, V.G.; SANÁBIO, D.; SOUZA, C.N. de et al. Efeitos de ácido giberélico e carvão ativado no cultivo *in vitro* de *Citrus limonia* Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.27-30, 2000.
- ROMBERGER, J.A.; TABOR, C.A. The *Picea abies* shoot apical meristem in culture. **American Journal of Botany**, v.58, p.131-140, 1971.
- SHARMA, D.R.; KAUR, R.; KUMAR, K. Embryo rescue in plants - a review. **Euphytica**, v.89, p.325-337, 1996.
- SINGHA, S. Influence of two commercial agar on *in vitro* proliferation of 'Almey' crabapple and 'Seckel' pear. **Hortscience**, v.19, p.227-228, 1984.
- SINGHA, S.; OBERLY, G.H.; TOWNSEND, E.C. Changes in nutrients composition and pH of culture medium during *in vitro* shoot proliferation of crabapple and pear. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.2, p.209-220, 1987.
- SKIRVIN, R.M.; CHU, M.C.; MANN, M.L. et al. Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time and cultured plant material. **Plant Cell Reports**, v.5, p.292-294, 1986.
- SOOST, R.K.; CAMERON, J.W. Citrus. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Ed.) **Advances in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1975. p.507-540.
- STREET, H.E.; SHEAT, D.E.G. The absorption and availability of nitrate and ammonia. In: RUHLAND, W. (Ed.) **Encyclopedia of plant physiology**. Berlin: Springer-Verlag, 1958. v.8, p.150-165.
- WILLIAMS, R.J.; LEOPOLD, A.C. The glassy state in corn embryos. **Plant Physiology**, v. 89, p.977-981, 1989.