

# **INFLUÊNCIA DO ÁGAR E DO pH SOBRE O CULTIVO *in vitro* DE EMBRIÕES DE LARANJA 'NATAL'**<sup>1</sup>

**Valtemir Gonçalves Ribeiro<sup>2</sup>**

**Moacir Pasqual<sup>2</sup>**

**José Darlan Ramos<sup>2</sup>**

**Gladyston Rodrigues Carvalho<sup>2</sup>**

**Arnaldo Freitas de Oliveira Junior<sup>2</sup>**

## **1. INTRODUÇÃO**

Os projetos de pesquisa relacionados ao melhoramento genético dos citros têm-se dirigido à criação de novas variedades copa e porta-enxerto, mais bem adaptadas aos trópicos: variedades porta-enxerto ananizantes, com a finalidade de aumentar a produtividade; porta-enxertos resistentes ou tolerantes à seca, salinidade e toxidez ao alumínio; e variedades copa precoce e de meia-estação. Entretanto, o longo período pré-produtivo, a alta taxa de heterozigose e a poliembrionia têm dificultado o desenvolvimento dos programas de melhoramento genético dos citros (19).

A poliembrionia é caracterizada pelo desenvolvimento de mais de um embrião na semente (3), além do embrião zigótico, geralmente originados de

---

<sup>1</sup>Aceito para publicação em 20.4.98. Trabalho apresentado pelo primeiro autor à Universidade Federal de Lavras como um dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Fitotecnia, encontrando-se, atualmente, em curso de Doutorado pela ESALQ-USP, Departamento de Produção Vegetal. Cx. P. 09, 13418-900, Piracicaba, SP.

<sup>2</sup>Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras. Cx. P. 37, 37200-000 - Lavras, MG.

células individuais do óvulo, externas ao megagametófito (6), havendo, contudo, possibilidade de existir mais de um embrião zigótico por semente (8).

A formação do endosperma faz-se necessária para o suprimento dos embriões (10). Embriões de citros, quando excisados prematuramente, podem não germinar ou germinar desenvolvendo plântulas malformadas, sendo a germinação precoce caracterizada por um longo período de rápidas divisões celulares não acompanhadas por alongamento celular (12), necessitando, pois, serem inoculados em meios de cultura ajustados (15), adequados para um completo desenvolvimento embrionário.

Valor de pH mais elevado favorece a absorção do molibdênio pelos tecidos vegetais, em detrimento do ferro, cobre, manganês e zinco. Mesmo diferentes fontes de nitrogênio podem ser potencializadas ou não com o ajuste do pH. Meios mais ácidos dificultam a utilização do amônio, enquanto valores de pH mais elevados diminuem o do nitrato (2).

A regeneração e sobrevivência de brotos de *Actinidia deliciosa* foram intensamente reduzidas em pH acima de 5,7. Entretanto, melhores respostas de crescimento de calo foram encontradas em pH 7,0 e 7,5 (7). O número de brotações e o peso da matéria fresca de explantes de kiwi também sofreram influência, por causa das variações na concentração de ágar (9).

O ágar é utilizado como agente solidificante e possui caráter tamponante no meio de cultura (13, 18), contudo, pode ser hidrolisado com a acidez (13, 17) e alterar o potencial das células, tecidos e órgãos vegetais em absorver os constituintes do meio. Aumento da concentração de ágar no meio, embora útil para evitar a vitrificação, pode reduzir a taxa de multiplicação (1, 5).

Existem diversas marcas comerciais de ágar freqüentemente utilizadas em concentrações que variam de 0,4 a 1,0% (2). Na maior parte dos experimentos usam-se concentrações que variam de 0,7 a 1,0% (4), porém, recomenda-se minimizar o seu uso ou otimizá-lo, visto que o ágar é considerado um componente de custo elevado no preparo do meio de cultura.

Concentrações inferiores a 0,4%, associadas a pH abaixo de 4,5, geralmente resultam meios de cultura menos sólidos ou até líquidos, em virtude da polimerização do ágar após a autoclavagem ser bastante reduzida (2). Mesmo utilizando-se concentração intermediária de ágar (0,6%) em pH baixos, observou-se a não solidificação do meio (14).

O presente trabalho teve como objetivo estudar os efeitos de concentrações de ágar e valores de pH no cultivo de embriões *in vitro* de laranjeira 'Natal' (*Citrus sinensis* L. Osbeck).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram utilizados frutos de uma única planta de laranja 'Natal', previamente escolhida, por apresentar boas condições fitossanitárias.

Frutos colhidos de polinização aberta, com aproximadamente quatro centímetros de diâmetro longitudinal, foram lavados, suas sementes removidas e, em câmara de fluxo laminar, sofreram assepsia com álcool a 70%, por 5 minutos, e hipoclorito de sódio, a 2%, por 20 minutos, sendo em seguida enxaguadas três vezes em água bidestilada e autoclavada. Com o auxílio de lupa, bisturi e pinça, as sementes foram excisadas longitudinalmente, iniciando-se pela região oposta à micrópila, cuidadosamente, para não provocar danos aos embriões.

Todos os embriões, independentemente dos estádios de desenvolvimento em que se encontravam, foram inoculados em tubos de ensaio (150 x 20 mm), contendo 15 ml do meio de cultura proposto por MURASHIGE e SKOOG (11), acrescido de ágar a 0,0; 3,5; 7,0; 10,5 e 14,0 g/L, em todas as combinações possíveis com os valores de pH 3,7; 4,7; 5,7 e 6,7, utilizando-se ponte de papel para a dosagem zero de ágar. Esses tubos permaneceram por 48h no escuro e, posteriormente, em sala de crescimento à temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  com fotoperiodismo de 16 h diárias e luminosidade de  $35 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

Após 45 dias da data de inoculação, as plântulas foram avaliadas de acordo com as seguintes características: porcentagem de sobrevivência dos embriões, comprimento do sistema radicular e da parte aérea, número de pares de folhas e peso da matéria fresca.

O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial. Foram utilizadas quatro repetições, constituídas por quatro tubos de ensaio cada, inoculando-se um embrião por tubo. Para fins de análise estatística, a variável sobrevivência dos embriões foi transformada em arco seno raiz quadrada de  $x/100$  e as demais variáveis, em raiz quadrada de  $x+0,5$ .

Os dados foram interpretados por meio de análise de variância e regressão. Os modelos foram escolhidos baseados na significância dos

coeficientes de regressão utilizando-se o teste "t" ao nível de 5% de probabilidade, e no coeficiente de determinação ( $R^2 > 0,70$ ).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se no Quadro 1 que o ágar, ao contrário do pH, provocou respostas significativas de todas as variáveis, havendo interação significativa entre os fatores em relação às variáveis porcentagem de sobrevivência dos embriões, comprimento do sistema radicular, número de pares de folhas e peso da matéria fresca.

**QUADRO 1 – Análise de variância das variáveis porcentagem de sobrevivência dos embriões, comprimentos do sistema radicular e da parte aérea, número de pares de folhas e peso da matéria fresca em plântulas de embriões da laranja 'Natal' (*Citrus sinensis* L. Osb.)**

| Fontes de variação | GL | Quadrados médios           |                                  |                            |                           |                        |
|--------------------|----|----------------------------|----------------------------------|----------------------------|---------------------------|------------------------|
|                    |    | Sobrevivência dos embriões | Comprimento do sistema radicular | Comprimento da parte aérea | Número de pares de folhas | Peso da matéria fresca |
| Ágar               | 4  | 5237,8938*                 | 2,6242**                         | 0,8866**                   | 4,1699**                  | 20028,4326**           |
| pH                 | 3  | 597,5458                   | 0,2459                           | 0,0092                     | 0,2615                    | 2635,6022              |
| Ágar*pH            | 12 | 751,2438**                 | 0,5527**                         | 0,0795                     | 0,3523**                  | 4086,0557*             |
| Resíduo            | 60 | 253,8125                   | 0,1027                           | 0,0418                     | 0,1116                    | 1708,4111              |
| CV (%)             |    | 21,63                      | 19,18                            | 18,67                      | 20,40                     | 50,16                  |

\*F significativo ao nível de 5% de probabilidade  
 \*\*F significativo ao nível de 1% de probabilidade  
 ns: F não-significativo ao nível de 5% de probabilidade

Em relação à porcentagem de sobrevivência dos embriões (Figura 1), verifica-se a interação dos fatores ágar e pH, atingindo-se taxas de sobrevivência próximas a 100% com os valores de pH 5,7 e 6,7, associados às concentrações de 14,0 e 9,4 g/L de ágar, respectivamente. Intervalos de pH entre 5,0 e 6,0 são satisfatórios para o crescimento dos embriões da maioria das espécies (2).

Nota-se, pela Figura 2, que as equações polinomiais dos níveis de pH 5,7 e 6,7, associados à concentração de 8,5 g/L de ágar, proporcionaram 1,9 cm de comprimento do sistema radicular. Semelhante resultado foi verificado com a variável comprimento da parte aérea (Figura 3). Esses dados estão de acordo com GEORGE (4) e CALDAS *et al.* (2), em que faixas de 0,7-1,0 e 0,4-1,0% (p/v) de ágar normalmente são utilizadas para a cultura de tecidos de plantas.

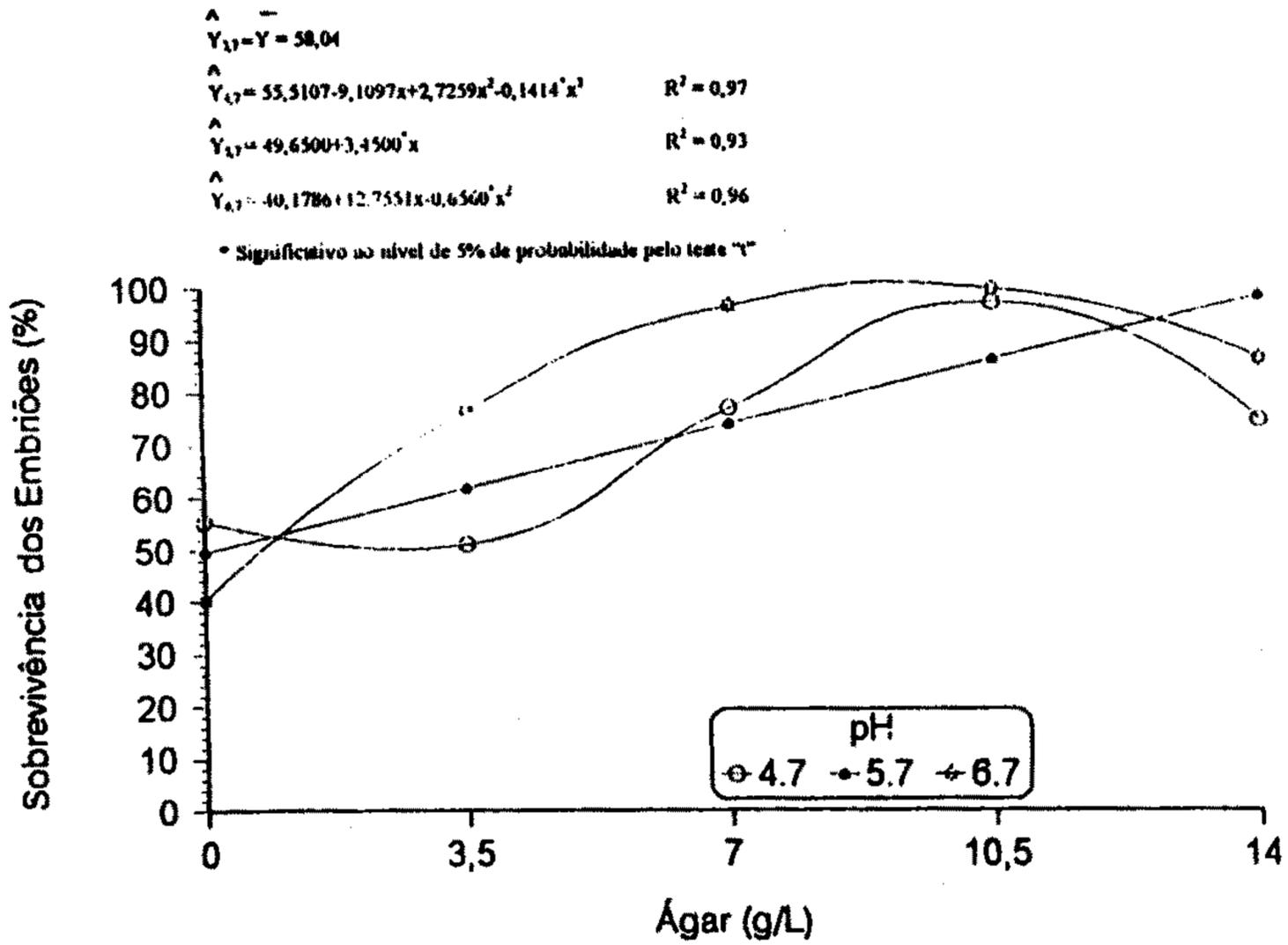


FIGURA 1 – Efeito do ágar sobre a porcentagem de sobrevivência de embriões de laranja ‘Natal’, em diferentes pH’s.

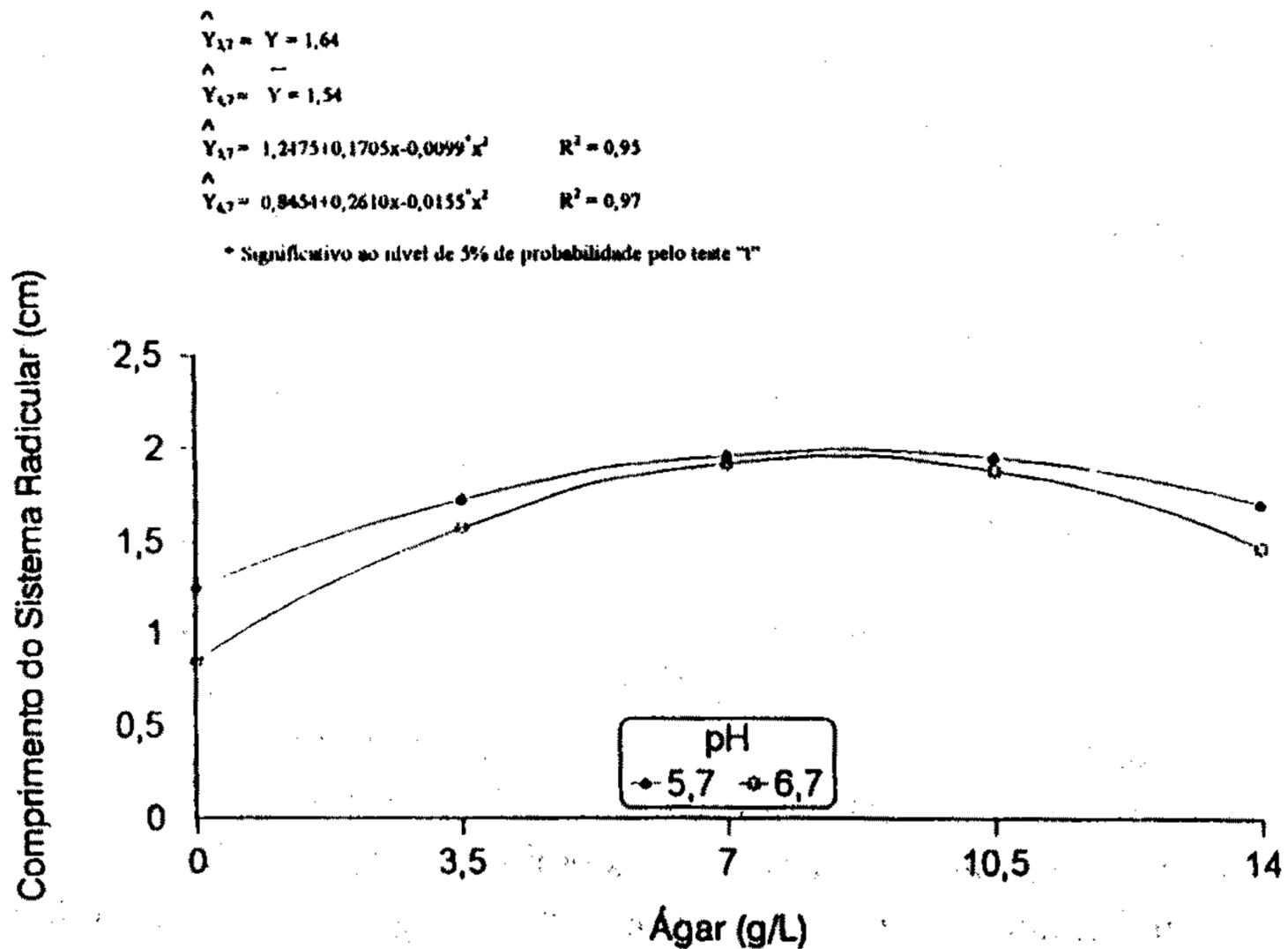
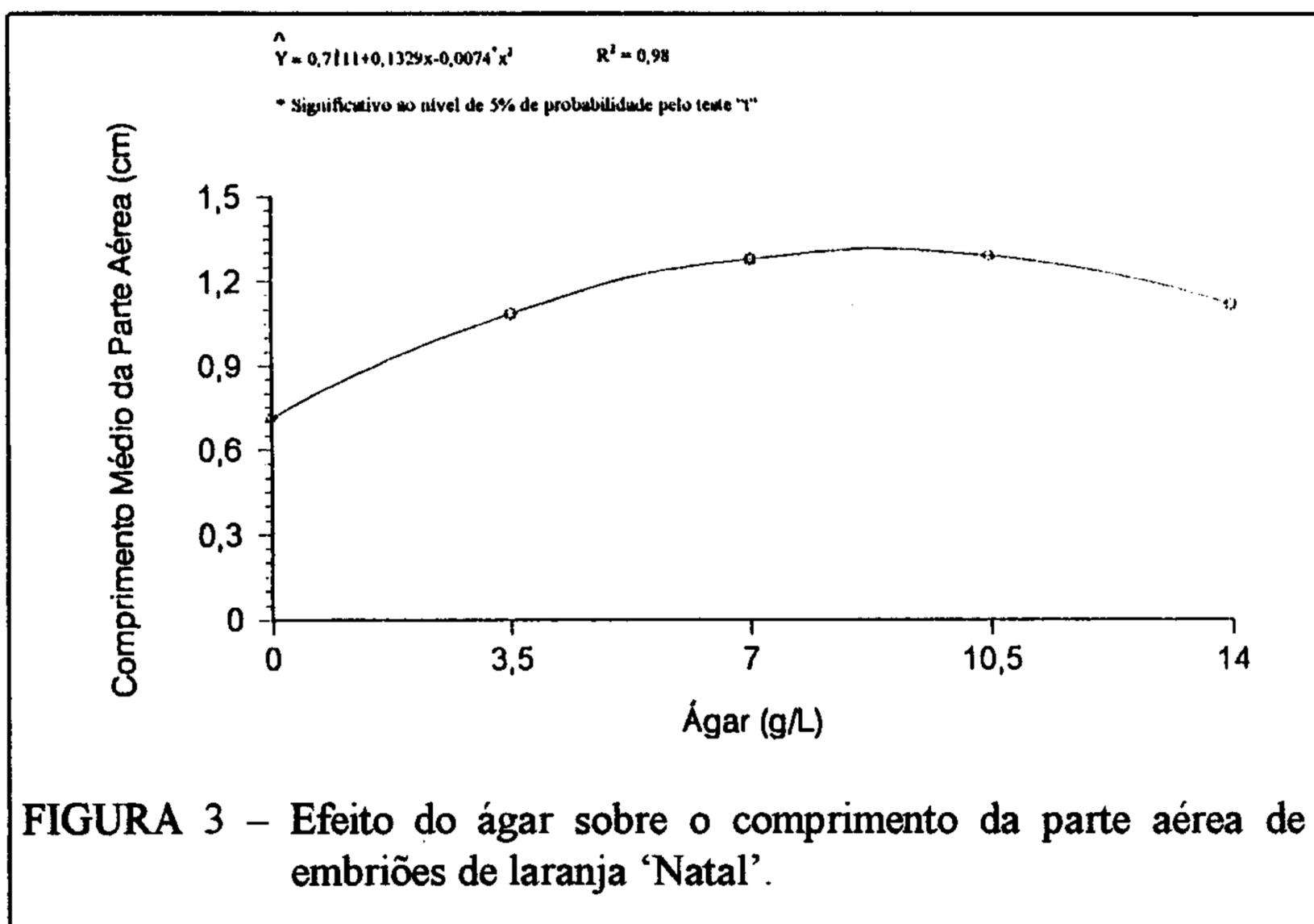


FIGURA 2 – Efeito do ágar sobre o comprimento do sistema radicular de embriões de laranja ‘Natal’, em diferentes pH’s.



Quanto ao número de pares de folhas (Figura 4), o pH 4,7, associado a 8,4 g/L de ágar, foi o mais responsivo; porém, observa-se que com o pH 3,7 e 14,0 g/L obteve-se resposta semelhante (dois pares de folhas por plântula). O fato de valores de pH mais altos terem maximizado a porcentagem de sobrevivência dos embriões (pH 5,7-6,7), contrariamente ao comprimento do sistema radicular e o número de pares de folhas (pH 3,7-4,7), pode ser atribuído aos estádios de diferenciação dos embriões, em contraposição aos das plântulas, para as quais a absorção dos elementos inorgânicos  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$  e  $\text{MoO}_4^{2-}$  podem estar envolvidos com o crescimento *in vitro*, favorecido pelo valor do pH próximo a 5,0 (2).

A equação correspondente pH 4,7 (Figura 5) demonstrou queda do peso da matéria fresca até a concentração de 14,0 g/L de ágar. O menor peso adquirido (36 mg) pode estar relacionado à menor hidratação dos tecidos dos explantes, quando cultivados em meio de cultura com gradientes de ágar mais elevados; já o peso máximo alcançado pelas plântulas (112 mg) pode estar relacionado, contrariamente, às baixas concentrações de ágar com o meio de cultura acidificado (pH 4,7), tornando-o mais aquoso e, portanto, com mais água disponível aos embriões (1, 16, 20).

Analisando as interações dos fatores ágar e pH, em relação às variáveis porcentagem de sobrevivência dos embriões, comprimento do sistema radicular e número de pares de folhas, em comparação à variável peso da matéria fresca das plântulas, observam-se disparidades entre os

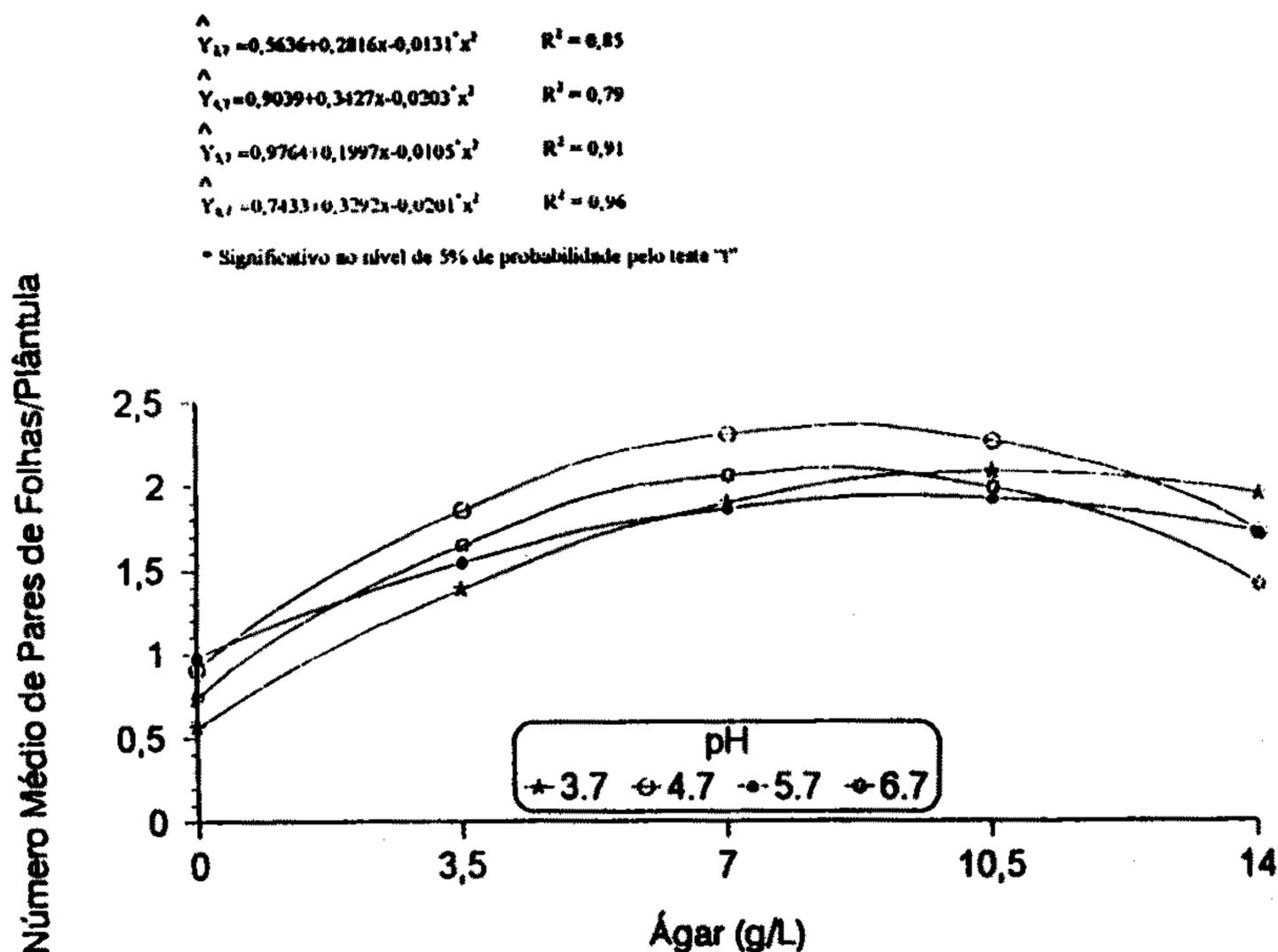


FIGURA 4 – Efeito do ágar sobre o número de pares de folhas de embriões de laranja ‘Natal’, em diferentes pH’s.

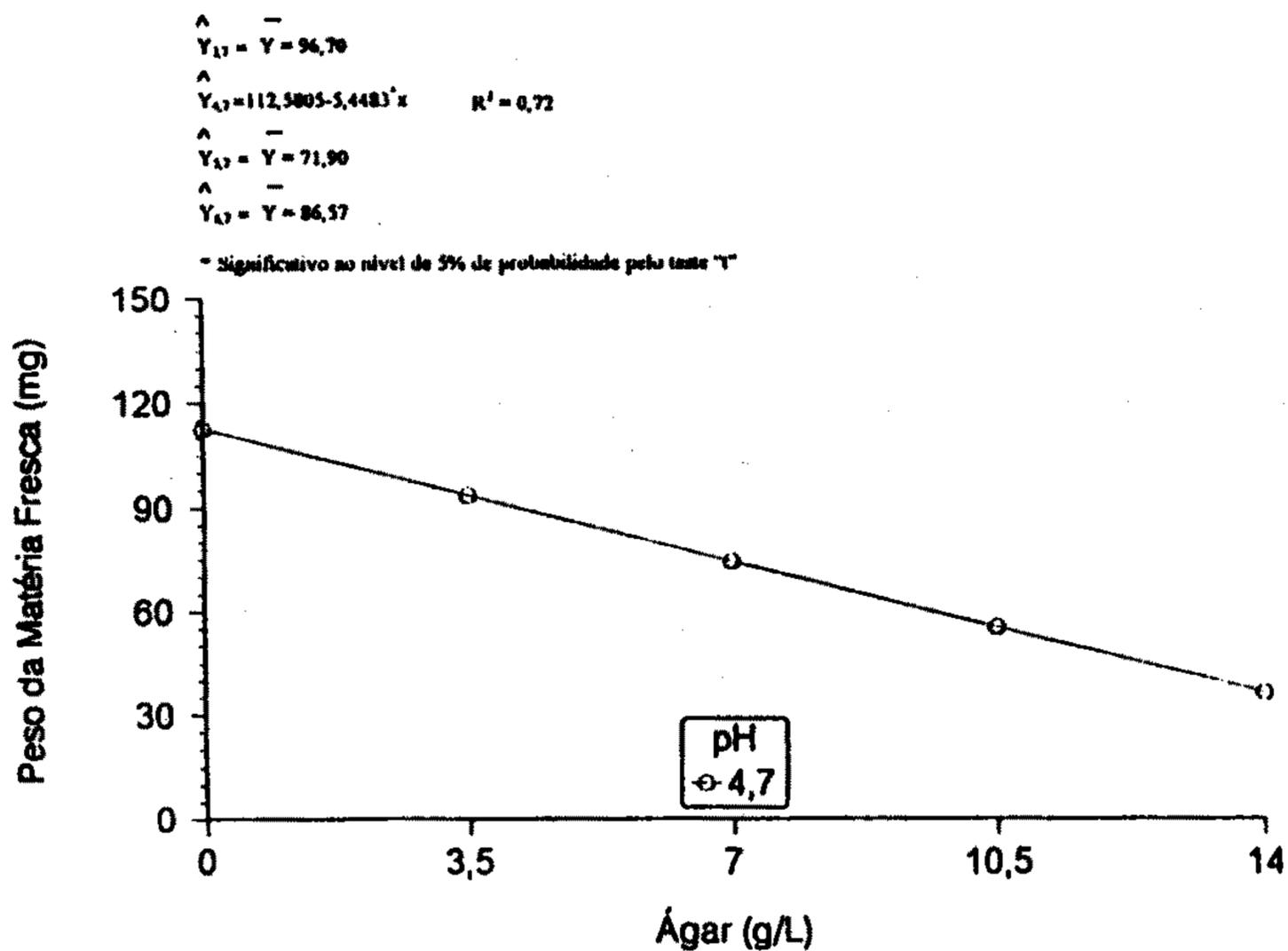


FIGURA 5 – Efeito do ágar sobre o peso da matéria fresca de embriões de laranja ‘Natal’.

valores ótimos assumidos para esta variável, em relação aos das demais, fortalecendo a hipótese de que o ganho em peso da matéria fresca deve-se à maior hidratação das plântulas, pelo seu cultivo em meio de cultura com valores baixos de ágar e pH (tomando-o mais aquoso), e não a ganhos reais proporcionados pelo desenvolvimento e crescimento *in vitro*.

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

Determinou-se a interação do ágar e do pH no cultivo *in vitro* de embriões da laranjeira 'Natal' (*Citrus sinensis* L. Osb.). Os tratamentos consistiram das concentrações de ágar (0,0; 3,5; 7,0; 10,5 e 14,0 g/L), associadas a valores de pH (3,7; 4,7; 5,7 e 6,7), em meio de cultura MS, antes da esterilização pelo uso da autoclave. Maiores comprimentos da parte aérea, do sistema radicular e do número de pares de folhas foram, em média, obtidos com a concentração de 8,7 g/L de ágar. O percentual de sobrevivência foi maximizado com 9,7 g/L de ágar em pH 6,7. Ocorreu queda do peso da matéria fresca com o meio de cultura, sendo solidificado gradualmente até o limite máximo estabelecido.

#### 5. SUMMARY

##### (EFFECTS OF AGAR AND pH ON *in vitro* ORANGE 'NATAL' CULTIVAR EMBRYO CULTURE)

The objective of this work was to determine the effects of agar and pH interaction on *in vitro* orange (*Citrus sinensis* L. Osb.) 'Natal' cultivar embryo culture. The treatments consisted of agar concentrations 0.0, 3.5, 7.0, 10.5 and 14.0 g/L associated with MS media at pH's of 3.7, 4.7, 5.7 and 6.7, previously sterilized in autoclave. Higher aerial part length, root growth and number of leaves were in average obtained at 8.7 g/L agar concentration. Survival percentage was maximized with agar at 9.7 g/L and 6.7 pH. A decreased in fresh matter weight was observed as the culture medium was being gradually solidified up to the maximum limit established.

#### 6. LITERATURA CITADA

1. BRAND, M.H. Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoots *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 5(3):203-209, 1993.
2. CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P. & FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. (eds.). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília, Embrapa-CNPH/ABCTP, 1990. p.37-70.

3. CHAPOT, H. The Citrus plant. In: *Citrus*. Switzerland, Ciba-Geigy, 1975. p.6-13. (Technical Monograph, 4).
4. GEORGE, E.F. The components of culture media. In: *Plant propagation by tissue culture*. 2.ed. Great Britain, Exegetics, 1993. p. 273-343.
5. GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.L. & CALDAS, L.S.(eds.). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília, Embrapa-CNPQ/ABCPT, 1990. p.99-170.
6. KOLTUNOW, A. M. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *The Plant Cell*, 5:1425-1437, 1993.
7. MARINO, G. & BATTISTINI, S. Leaf-callus growth, shoot regeneration and somaclonal variation in *Actinidia deliciosa*: effect of media pH. *Acta Horticulturae*, 280:37-44, 1990.
8. MEDINA FILHO, H.P.; BORDIGNON, R.; BALLVE, R.M.L. & SIQUEIRA, W.J. Genetic proof of the occurrence of mono and dizygotic hybrid twins in citrus rootstocks. *Revista Brasileira de Genética*, 16:703-711, 1993.
9. MONETTE, P.L. Micropropagation of kiwifruit using non-axenic shoot tips. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 6:73-82, 1986.
10. MOORE, G. A. Factors affecting in vitro embryogenesis from undeveloped ovules of mature Citrus fruits. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 110:66-70, 1985.
11. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-479, 1962.
12. PASQUAL, M. & PINTO, J.E.B.P. Cultura de embriões. *Notícias da Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas*, 9:2-12, 1988.
13. PASQUAL, M.; RIBEIRO, V.G.; MACIEL, A.L.de R. & CARVALHO, G.R. Alterações do pH pela autoclavagem e armazenamento do meio MS de cultura. *Ciência e Prática*, 18:9-12, 1994.
14. PIERIK, R.L.M. *In vitro culture of higher plants*. Dordrecht, Martinus Nyhoff, 1987. 344p.
15. RIBEIRO, V.G. *Localização de embriões zigóticos e nucleares em sementes de citros e ajustes do meio MS para o resgate de embriões imaturos "in vitro"*. Lavras, UFLA, 1997. 61 p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia).
16. RIBEIRO, V.G.; PASQUAL, M.; RAMOS, J.D.; OLIVEIRA JUNIOR, A.F. de & CARVALHO, G.R. Influência do pH e do ágar sobre o cultivo *in vitro* de embriões de laranja 'Pêra'. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 32:1147-1152, 1997.
17. ROMBERGER, J.A. & TABOR, C.A. The *Picea abies* shoot apical meristem in culture. *American Journal of Botany*, 58:131-140, 1971.
18. SHINGA, S. Influence of agar concentration on *in vitro* shoot proliferation of *Malus* sp 'Almey' and *Pyrus communis* 'Seckel'. *Journal American Society for Horticultural Science*, 107:657-660, 1982.
19. SOARES FILHO, W. dos S.; LEE, M. & CUNHA SOBRINHO, A.P. da. Influence of pollinators on polyembryony in Citrus. *Acta Horticulturae*, 403:256-265, 1995.
20. WILLIAMS, R.J. & LEOPOLD, A.C. The glassy state in corn embryos. *Plant Physiology*, 89:977-881, 1989.