

CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES IMATUROS DE TANGERINEIRA 'PONCÃ': CONCENTRAÇÕES DO MEIO MS E DA SACAROSE¹

**Moacir Pasqual²
Guilherme Pereira Alves²
Leonardo Ferreira Dutra²
Daniela Rezende Finotti²
Edvan Alves Chagas²**

RESUMO

Objetivou-se estudar a influência de concentrações do meio MS e da sacarose no cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerineira 'Poncã' oriundos de polinização natural. O meio de cultura utilizado foi o MS e os tratamentos consistiram de suas diferentes concentrações (0; 0,25; 0,5; 1 e 2), associadas a diferentes concentrações de sacarose (0; 15; 30; 45 e 60 g.L⁻¹), acrescidos de 0,3 mg.L⁻¹ de GA₃ e de 1 g.L⁻¹ de carvão ativado. Os embriões permaneceram por 48 horas no escuro e depois em sala de crescimento à temperatura de 27±1°C, 16 horas de fotoperíodo e intensidade luminosa de 35 μM.m⁻².s⁻¹. Após 60 dias, as plântulas foram avaliadas com base na altura da parte aérea, número de folhas, comprimento das raízes, massa da matéria seca da parte aérea e massa da matéria seca das raízes. Observaram-se influências das concentrações do meio MS e da sacarose no crescimento e desenvolvimento de plântulas oriundas de embriões de tangerineira 'Poncã'. Melhores resultados são obtidos com o uso do meio MS na sua concentração original, suplementado com 15 a 30 g.L⁻¹ de sacarose.

Palavras-chaves: *Citrus reticulata*, citricultura, cultura de embriões, melhoramento genético.

¹ Aceito para publicação em 1º.04.2002. Apoio financeiro da FAPEMIG.

² Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras (UFLA). Cx. Postal, 37, 37200-000. Lavras, MG. Email: mpasqual@ufla.br

ABSTRACT

IN VITRO CULTURE OF 'PONCÃ' MANDARIN IMMATURE EMBRYOS: MS MEDIUM AND SUCROSE CONCENTRATIONS

This work aimed to study the influence of the MS medium and sucrose concentrations on the *in vitro* culture of 'Poncã' mandarin immature embryos from natural fertilization. The culture medium used was the MS and the treatments consisted of its concentrations (0, 0.25, 0.5, 1 and 2), associated with different sucrose concentrations (0, 15, 30, 45 and 60 g.L⁻¹), added to 0.3 mg.L⁻¹ GA₃ and 1 g.L⁻¹ activated charcoal. The embryos were maintained in the dark for 48 hours and transferred to the growth room at 27±1°C with 16 daily hour photoperiod in 35 µM.m⁻².s⁻¹ light intensity. After 60 days, the plantlets were evaluated based on the height of the aerial part, number of leaves, length of roots, dry matter mass of the aerial part, and dry matter mass of the roots. MS medium and sucrose concentrations influence on growth and development of plantlets originating from embryos of 'Poncã' mandarin were observed. Better results are obtained with MS medium original concentration added to 15-30 g.L⁻¹ sucrose.

Key words: *Citrus reticulata*, citrus culture, embryo culture, breeding.

INTRODUÇÃO

Os métodos de melhoramento clássico, utilizados na obtenção de novos híbridos de *Citrus* e gêneros afins, estão limitados a problemas como esterilidade masculina, incompatibilidade, longo período juvenil, alta heterozigose e poliembrionia.

A cultura de embriões favorece estudos mais aprofundados nas áreas de fisiologia e melhoramento, pois permite o resgate de embriões híbridos imaturos oriundos de cruzamentos incompatíveis (6). A poliembrionia, generalizada entre as espécies de *Citrus*, resulta normalmente em elevada taxa de aborto do embrião zigótico, devido à competição exercida sobre ele pelos embriões nucelares, geralmente mais vigorosos (14). Entretanto, esses embriões podem ser resgatados via cultivo *in vitro* em meio de cultura adequado (13).

O meio utilizado para a cultura de embriões é o MS com algumas variações de hormônios, dependendo do genótipo e estágio de desenvolvimento do embrião, sendo a taxa de germinação inversamente proporcional à idade do embrião (1). Em razão disso, têm sido realizados trabalhos com o objetivo de elucidar os efeitos de diversos fatores no cultivo *in vitro* de embriões de citros, dentre eles o pH, ágar, concentrações do meio MS, sacarose, ácido giberélico e carvão ativado (7, 8, 9, 11), além de estudos de identificação dos estádios de desenvolvimento embrionário (10).

Embora as células apresentem potencial para realizar fotossíntese *in vitro*, o crescimento da maioria das culturas é sustentado pela fonte de

carboidrato adicionado ao meio de cultura (2). Entretanto, os carboidratos no meio inibem a síntese de clorofila e, portanto, reduzem a capacidade fotossintética das culturas.

A sacarose é o carboidrato mais utilizado nos meios nutritivos, suportando as mais altas taxas de crescimento na maioria das culturas. Os embriões nos estádios iniciais de desenvolvimento necessitam de concentrações elevadas de sacarose, entre 12 e 18% (2). Em *Citrus*, concentrações ótimas podem variar de 2 a 7%, de acordo com o tipo de explante (5). É importante evitar a germinação precoce *in vitro*, pois as plântulas resultantes poderão ser anormais ou fracas. Meios com alta concentração de sacarose têm sido utilizados para minimizar esse processo (6).

Modificações visando otimizar o crescimento *in vitro* no meio de cultura MS são comumente utilizadas, dentre elas as diferentes concentrações. A alta concentração de sais do meio MS, quando comparada a outros meios, pode ser inadequada ao processo morfogênético (12).

Ribeiro et al. (8), estudando o comportamento de embriões de laranjeira 'Pêra' em diferentes concentrações de sacarose e do meio MS, concluíram que o melhor desenvolvimento dos embriões foi observado em meio MS com 75 % da concentração original e 60 g.L⁻¹ de sacarose.

Neste trabalho, objetivou-se estudar a influência de concentrações do meio MS e da sacarose no cultivo *in vitro* de embriões imaturos de frutos de tangerineira 'Poncã'.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se frutos com 3 a 4 cm de diâmetro, provenientes de polinização natural, coletados em plantas de tangerineira 'Poncã' previamente selecionados por apresentarem melhores condições fitossanitárias. As sementes dos frutos foram 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.

Com o 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.

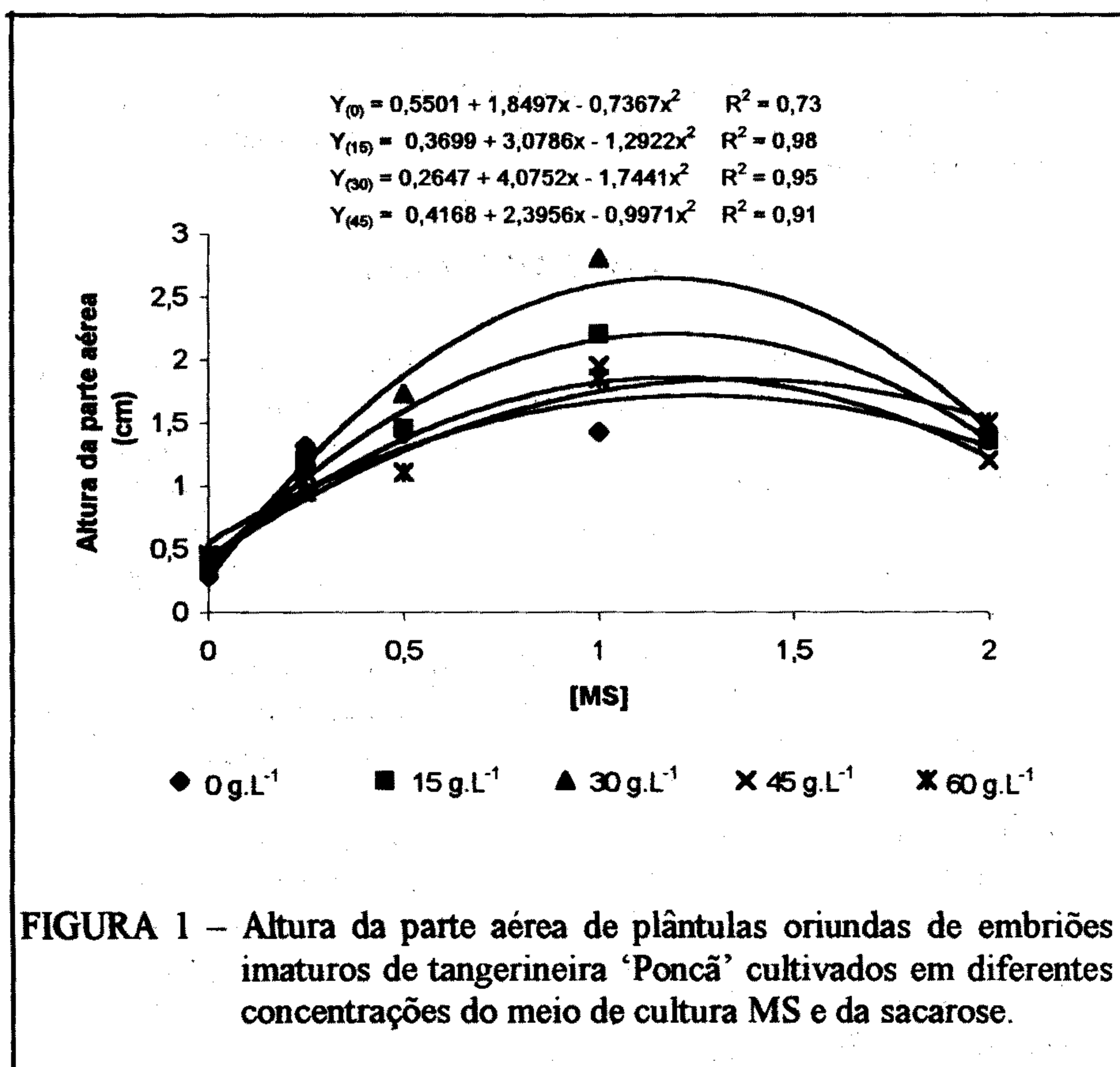
Independentemente dos estádios em que se encontravam, os embriões, foram excisados e inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS (3) em diferentes concentrações (0; 0,25; 0,5; 1 e 2), acrescido de sacarose (0; 15; 30; 45 e 60 g.L⁻¹) e de 0,3 mg.L⁻¹ de GA₃ e 1 g.L⁻¹ de carvão ativado, em todas as combinações possíveis. Os embriões permaneceram por 48 horas no escuro e, após em

sala de crescimento à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 16 horas diárias em intensidade luminosa de $35 \mu\text{Mm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, cada uma constituída por três tubos de ensaio com 15 mL do meio, em esquema fatorial 5×5 .

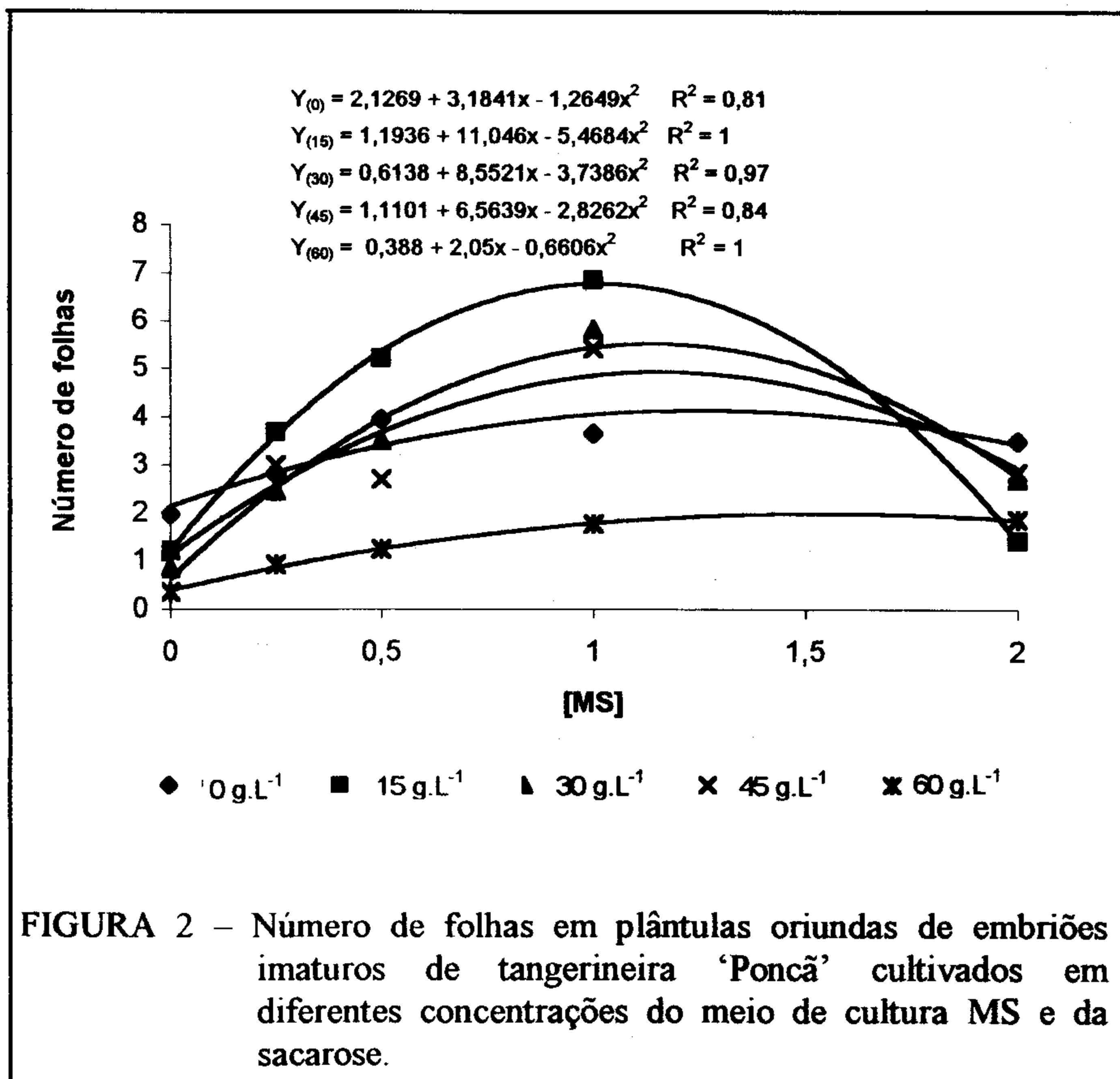
Após 60 dias, as plântulas foram avaliadas com base na altura da parte aérea, número de folhas, comprimento das raízes, massa da matéria seca da parte aérea e massa da matéria seca das raízes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O aumento da concentração do meio de cultura MS proporcionou incremento na altura da parte aérea (Figura 1). Os maiores valores foram obtidos com 1,16 e 1,19 vez a concentração original do MS associadas com 30 e 15 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose, obtendo-se plântulas com 2,64 e 2,2 cm, respectivamente. As menores alturas da parte aérea foram observadas nos valores extremos de sacarose, na ausência ou com 45 e 60 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.



Maiores números de folhas foram obtidos com 1,01 e 1,14 vez a concentração do meio de cultura MS, associado à adição de 15 e 30 g.L⁻¹ de sacarose, obtendo-se 6,77 e 5,5 folhas, respectivamente (Figura 2). Os menores números de folhas por plântulas foram verificados na ausência de sacarose com a adição de 60 g.L⁻¹.



A utilização de 1,1 e 1,23 vez a concentração do meio MS, associadas com 15 e 30 g.L⁻¹ de sacarose, proporcionou a obtenção das maiores massas da matéria seca da parte aérea, respectivamente 13,69 e 10,46 mg (Figura 3). A ausência de sacarose ou a adição de 45 e 60 g.L⁻¹ proporcionaram as menores massas da matéria seca.

As concentrações de 1,14 e 1,13 vez a concentração do meio MS, associados ou à ausência ou à adição de 15 g.L⁻¹ de sacarose, proporcionaram 9,27 e 8,79 mg de massa da matéria seca das raízes, respectivamente (Figura 4). Concentrações mais elevadas de sacarose reduziram a massa da matéria seca das raízes.

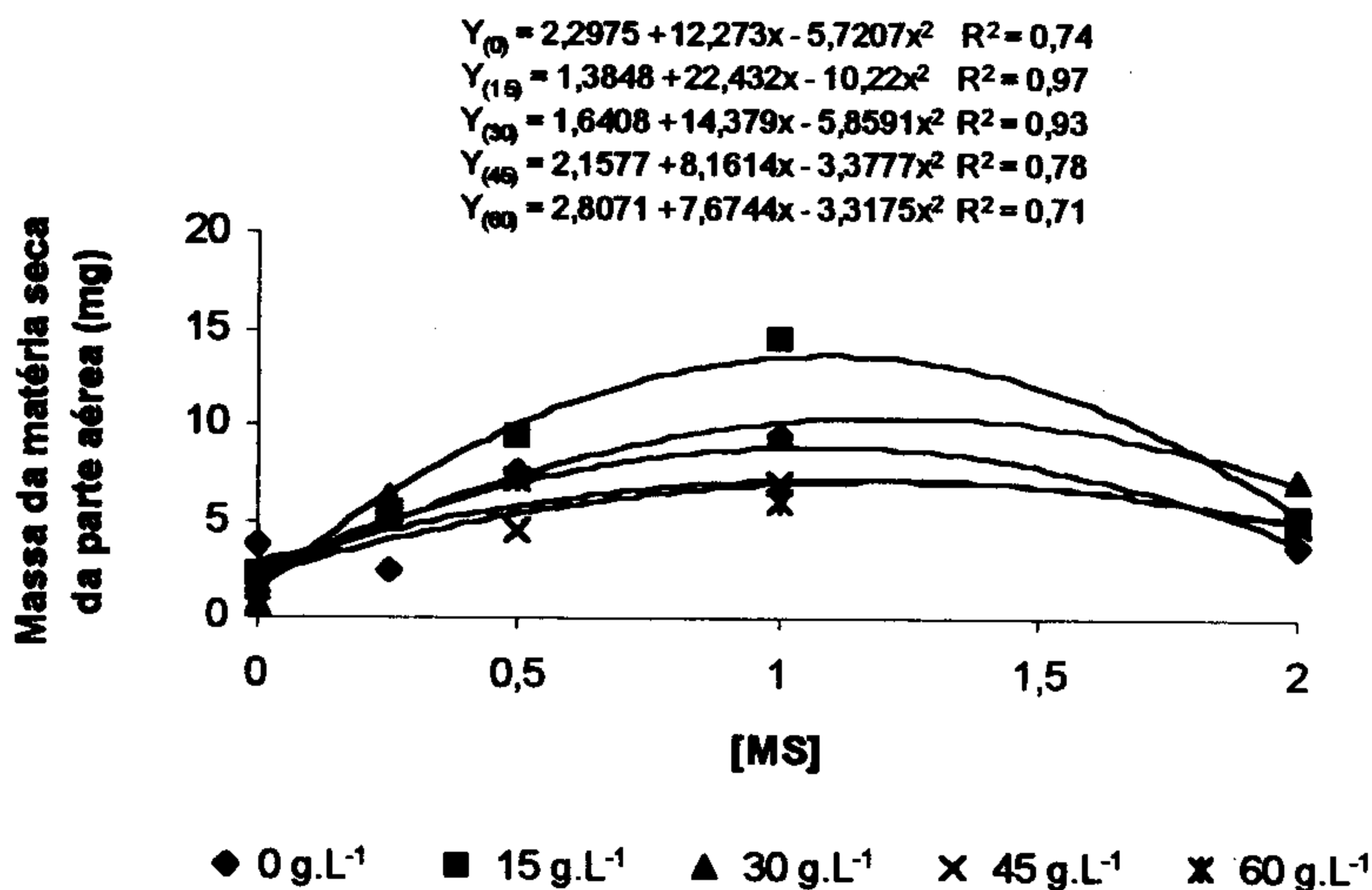


FIGURA 3 – Massa da matéria seca da parte aérea de plântulas oriundas de embriões imaturos de tangerineira ‘Poncã’ cultivados em diferentes concentrações do meio de cultura MS e da sacarose.

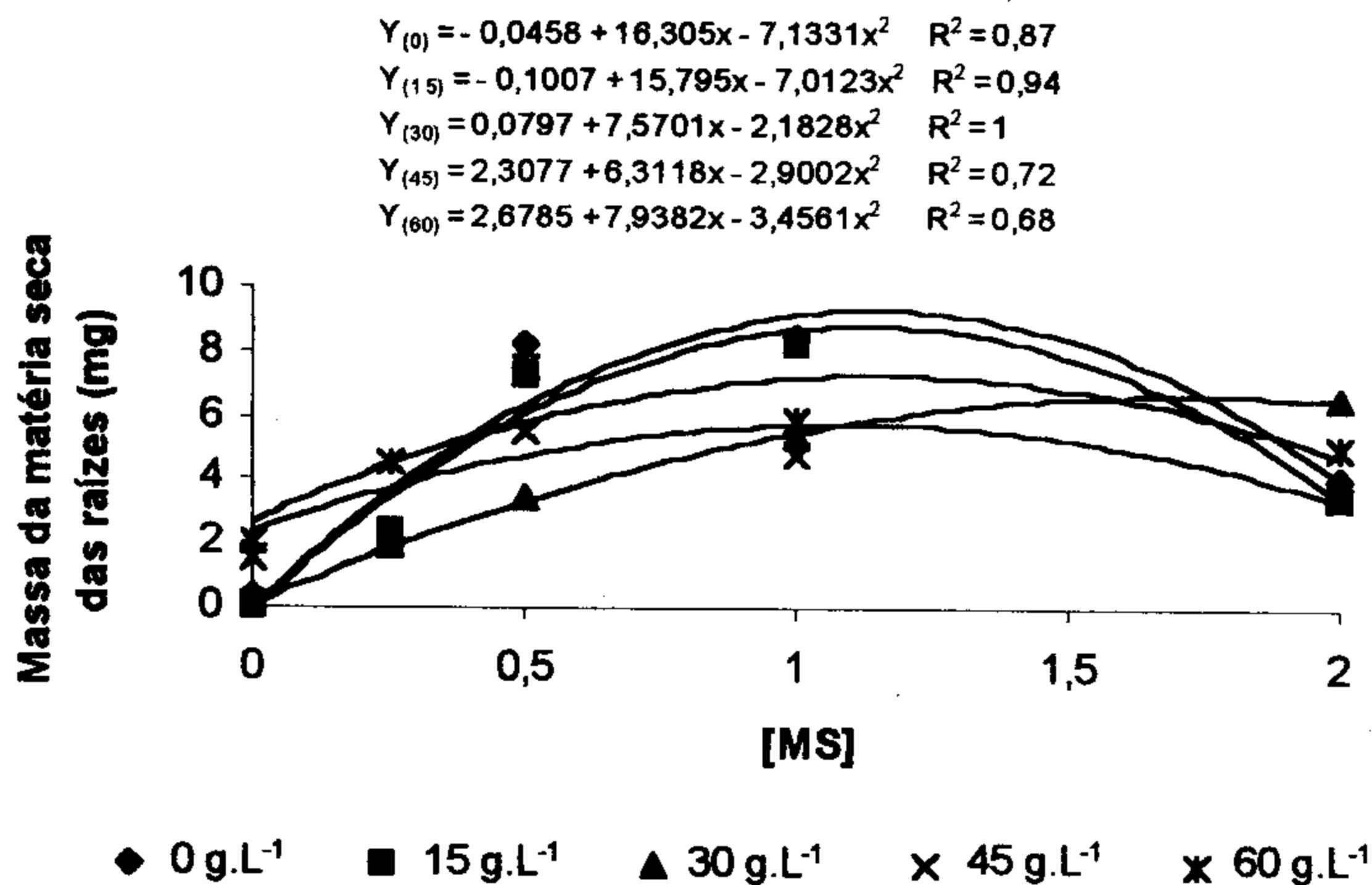
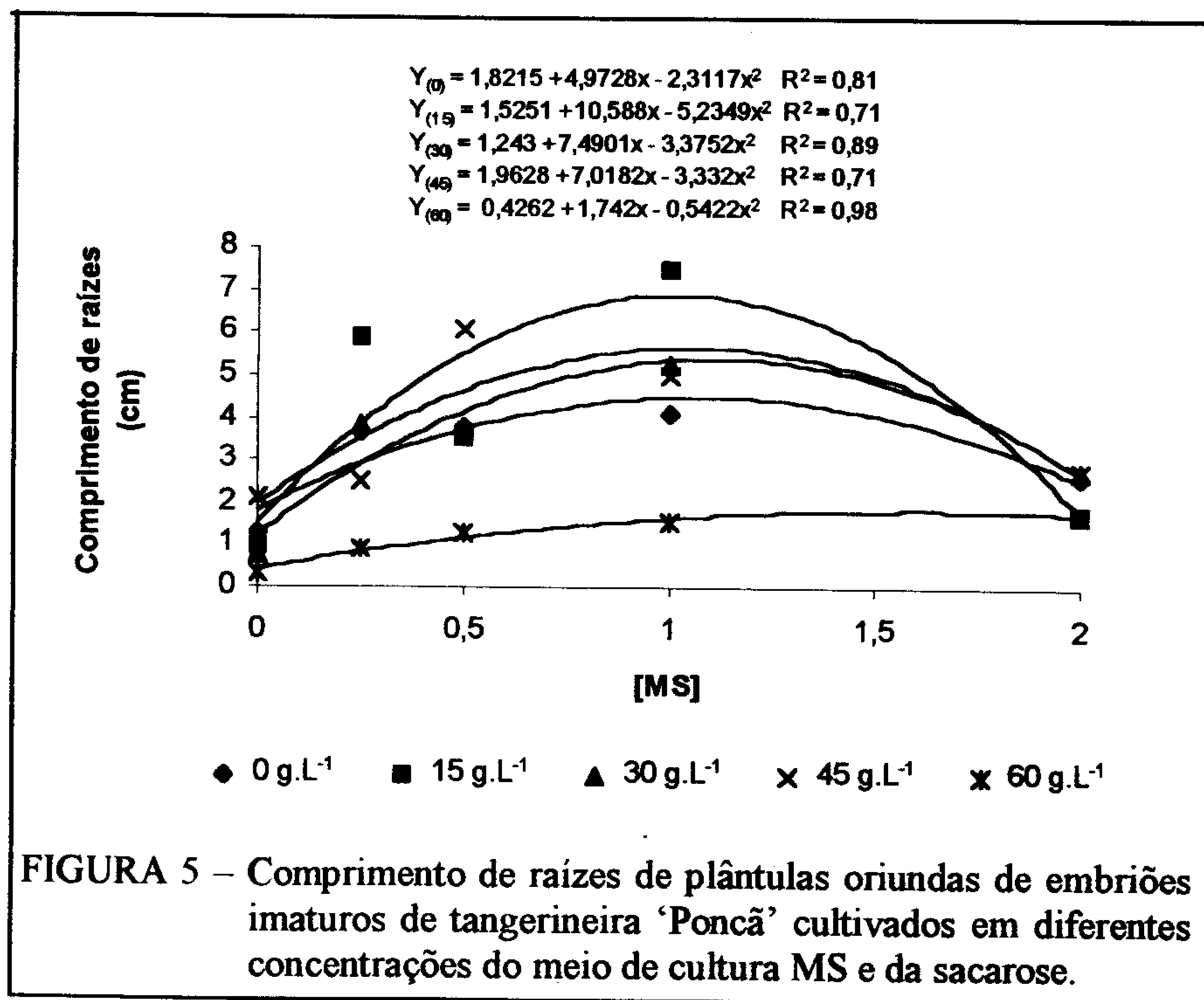


FIGURA 4 – Massa da matéria seca das raízes de plântulas oriundas de embriões imaturos de tangerineira ‘Poncã’ cultivados em diferentes concentrações do meio de cultura MS e da sacarose.

Maior comprimento de raízes (6,88 cm) foi obtido com o meio MS na sua concentração normal, adicionado de 15 g.L⁻¹ de sacarose (Figura 5). Menor comprimento de raízes foi obtido em meio de cultura sem sacarose ou com a adição de 60 g.L⁻¹.



Os valores de todas as variáveis analisadas foram incrementados à medida que se aumentou a concentração do meio de cultura MS até um ponto máximo, a partir do qual se verificou decréscimo.

É importante ressaltar que o ponto de maior eficiência em relação à concentração do meio MS permaneceu próximo a 1, chegando no máximo a 1,61 vez, indicando que a concentração original do meio MS é adequada à cultura de embriões de tangerineira ‘Poncã’. O meio MS possui alta concentração de sais em sua composição, quando comparado a outros meios de cultura (12). Dessa forma, os efeitos negativos causados por concentrações maiores do meio MS provavelmente são devidos a uma elevação ainda maior do que a normalmente presente na composição original, tomando-se inadequada ao processo morfogênético.

De maneira geral a concentração adequada de sacarose situou-se entre 15 e 30 g.L⁻¹, sendo esta última normalmente mais usada no meio MS, corroborando a necessidade da sua utilização no meio de cultura. A sacarose, como fonte de carboidratos, visa suprir as necessidades

metabólicas dos explantes, participando na geração de energia ou como fonte de esqueletos carbônicos para processos biossintéticos implicados na diferenciação celular e crescimento (4).

Os resultado no presente trabalho diferem dos obtidos por Ribeiro et al. (8), que no cultivo de embriões de laranjeira 'Pêra' constataram melhor desenvolvimento em meio MS com 75% da sua fórmula original e 45-60 g.L⁻¹ de sacarose. No entanto, mesmo tendo ambos os trabalhos sido realizados com o gênero *Citrus*, as espécies são diferentes, de sorte que o fator genótipo pode ter influenciado na diferença entre os resultados.

CONCLUSÕES

1) Há influência da concentração do meio MS e da sacarose sobre o crescimento e desenvolvimento tanto da parte aérea quanto do sistema radicular de plântulas oriundas de embriões de tangerineira 'Poncã'.

2) Melhores resultados são obtidos com o uso do meio MS na sua concentração original, suplementado com 15 a 30 g.L⁻¹ de sacarose.

REFERÊNCIAS

1. BRUCK, D.K. & WALKER, D.B. Cell determination during embryogenesis in *Citrus jambhiri*. II. Epidermal differentiation as a out-time event. *American Journal of Botany*, 72:1602-9, 1985.
2. CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P. & FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S. & Buso, J.A. (eds.). *Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas*. Brasília, EMBRAPA, CBAB, 1998. p.87-132.
3. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultivars. *Physiologia Plantarum*, 15:473-479, 1962.
4. NAGAO, E.O. Efeitos da sacarose, nitrogênio inorgânico e ácido indolbutírico na propagação *in vitro* do porta-enxerto *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Lavras, UFLA, 1993. 56p. (Dissertação de Mestrado).
5. NAVARRO, L.; ORTIZ, J.M. & JUAREZ, J. Aberrant citrus plants obtained by somatic embryogenesis of nucelli cultures *in vitro*. *HortScience*, 20:214-5, 1985.
6. PASQUAL, M. & PINTO, J.E.B.P. Cultura de embriões. *Notícias da Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas*, 9:2-12, 1988.
7. RIBEIRO, V.G.; PASQUAL, M.; RAMOS, J.D.; OLIVEIRA JUNIOR, A.F. de O. & CARVALHO, G.R. Influência do pH e do ágar sobre o cultivo *in vitro* de embriões de laranjeira 'Pêra'. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 32:1147-52, 1997.
8. RIBEIRO, V.G.; PASQUAL, M.; RAMOS, J.D.; VICHATO, M. & SANÁBIO, D. Cultivo *in vitro* de embriões de laranja 'Pêra': concentrações do meio MS e sacarose. *Ciência e Agrotecnologia*, 22:429-34, 1998.
9. RIBEIRO, V.G.; PASQUAL, M.; RAMOS, J.D.; CARVALHO, G.R. & OLIVEIRA JÚNIOR, A.F. de O. Influência do ágar e do pH sobre o cultivo *in vitro* de embriões de laranja 'Natal'. *Revista Ceres*, 46:587-95, 1999.
10. RIBEIRO, V.G.; PASQUAL, M.; RAMOS, J.D.; BEARZOTI, E. & NETO, S.D. Estádios de desenvolvimento embrionário e localização do embrião zigótico em sementes de citros. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34:1327-33, 1999.

11. RIBEIRO, V.G.; SANÁBIO, D.; SOUZA, C.N. de; LOPES, P.S.N.; BOCARDO, M.R. & PASQUAL, M. Efeitos de ácido giberélico e carvão ativado no cultivo *in vitro* de *Citrus limonia* Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 35:27-30, 2000.
12. SAKUTA, M. Effects of nitrogen source on betacyanin accumulation and growth in suspension culture of *Phytolacca americana*. Physiologia Plantarum, 71:459-63, 1987.
13. SHARMA, D.R.; KAUR, R. & KUMAR, K. Embryo rescue in plants - A review. Euphytica, 89:325-37, 1996.
14. SOOST, R.K. & CAMERON, J.W. *Citrus*. In: Janick, J. & Moore, J.N. (eds.). Advances in fruit breeding. West Lafayette, Purdue University Press, 1975. p.507-40.