

INFLUÊNCIA DO pH E DO ÁGAR SOBRE O CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE LARANJEIRA PÊRA¹

VALTEMIR GONÇALVES RIBEIRO², MOACIR PASQUAL³, JOSÉ DARLAN RAMOS⁴,
ARNALDO FREITAS DE OLIVEIRA JUNIOR e GLADYSTON RODRIGUES CARVALHO²

RESUMO - Objetivou-se com o presente trabalho determinar a interação do pH e do ágar no cultivo *in vitro* de embriões da laranja Pêra (*Citrus sinensis* Osb.). Os tratamentos consistiram das concentrações de 0,0; 3,5; 7,0; 10,5 e 14,0 g/L de ágar associadas às aferições de pH do meio de cultura MS em 3,7; 4,7; 5,7 e 6,7, antes da esterilização em autoclave. Maiores comprimentos da haste caulinar e de raiz foram obtidos com o valor de pH 4,7. O percentual de sobrevivência foi maximizado em pH 6,7 com a concentração de 10,5 g/L de ágar e a menor hidratação ocorreu nos tecidos dos embriões quando cultivados em meio nutritivo com valores de pH mais elevados.

Termos para indexação: *Citrus sinensis*, citricultura, cultura de embriões, melhoramento.

EFFECTS OF pH AND AGAR ON *IN VITRO* EMBRYO CULTURE OF ORANGE CV. PÊRA

ABSTRACT - This work had the objective of determining the effects of pH and agar interaction on *in vitro* orange (*Citrus sinensis* Osb.) embryo culture. The 0; 3.5; 7.0; 10.5 and 14.0 g/L agar concentrations were associated with MS media at 3.7; 4.7; 5.7 and 6.7 pH values, previously sterilized in autoclave. The 4.7 pH value showed higher shoot and root growth. Higher percentage of plant survival was achieved at pH 6.7 at 10.5 g/L agar concentration and a linear decrease in plant fresh weight was observed as agar concentration increased.

Index terms: *Citrus sinensis*, citriculture, embryo culture, breeding.

INTRODUÇÃO

No Brasil, os trabalhos de melhoramento de citros tiveram início por volta de 1935, na Estação Experimental do Instituto Agrônomo de Campinas, em Cordeirópolis, SP, com testes comparativos entre diferentes porta-enxertos e produção de plantas nucelares (Moreira, 1980).

Uma barreira para os trabalhos de melhoramento é a ocorrência da poliembrião, que é caracterizada pela presença de dois ou mais embriões na mesma semente (Chapot, 1975; Hearn, 1977). Em trabalhos de hibridação, o embrião zigótico normalmente não se desenvolve quando cultivares poliembriônicas são utilizadas como planta-mãe. Frequentemente, o embrião sexual é suplantado pelos embriões nucelares, antes mesmo da maturação da semente (Moreira & Pio, 1991).

Do ponto de vista prático, a técnica de cultura de tecidos vegetais permite estudar as necessidades nutricionais e físicas dos embriões durante o desenvolvimento *in vitro*, superar a dormência em certos tipos de sementes e, como ferramenta primordial para o melhoramento, resgatar embriões híbridos imaturos de cruzamentos incompatíveis, onde ocorrem barreiras sexuais na formação de sementes (Andreoli, 1986; Pasqual & Pinto, 1988).

¹ Aceito para publicação em 22 de maio de 1997.

Extraído da Dissertação apresentada pelo primeiro autor à Universidade Federal de Lavras (UFLA), para obtenção do grau de Mestre. Apoio Financeiro da FAPEMIG e do CNPq.

² Eng. Agr., M.Sc., Dep. de Agric., UFLA, Caixa Postal 37, CEP 37200-000 Lavras, MG.

³ Eng. Agr., Dr., Prof. Titular, UFLA. Bolsista do CNPq.

⁴ Eng. Agr., Dr., Prof. Adjunto, UFLA. Bolsista do CNPq.

O sucesso do cultivo *in vitro* de embriões depende dos fatores genéticos e fisiológicos inerentes aos embriões nucelares e zigóticos, das condições térmicas, fotoperíodismo e meio de cultura, que são também responsáveis pela formação e crescimento dos embriões. Essas exigências podem variar para cada espécie do gênero *Citrus* e, também, dentro de cada cultivar.

Um importante aspecto da cultura de embrião imaturo é definir um meio de cultura que possa sustentar o seu crescimento e desenvolvimento. Isto requer, muitas vezes, testar diferentes meios de cultura, muitas vezes modificados de forma empírica (Hu & Ferreira, 1990).

Os elementos minerais são absorvidos pelas diferentes culturas de acordo com as respectivas exigências nutricionais. Todavia, a acidez ou a basicidade, quando bem ajustados, podem promover maior e melhor aproveitamento dos nutrientes pelo explante. Um valor de pH baixo conduz à competição do H⁺ com os nutrientes catiônicos (NH₄⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺ e Zn²⁺) pelas células dos tecidos radiculares e, em valores mais elevados de pH, diminui a absorção de nutrientes aniônicos como o NO₃⁻, H₂PO₄²⁻, Cl⁻ e MoO₄²⁻ (Torres & Caldas, 1990; Faquin et al., 1996). Quando os íons NH₄⁺ desaparecem da solução, os íons NO₃⁻ passam a ser absorvidos em maior proporção que outros e são trocados por OH⁻ ou HCO₃⁻, elevando rapidamente o pH (Furlani & Furlani, 1988).

O ágar é reconhecido por sua ação gelificante. Aspectos relacionados a sua natureza biológica e de produção têm provocado consideráveis variações em sua qualidade, incluindo-se nível e natureza dos contaminantes orgânicos e inorgânicos (Debergh, 1983); podendo ser essas variações significativas para o sucesso do cultivo *in vitro*. O ágar, também utilizado como agente tamponante (Shinga, 1982) e controlador de fenômenos de vitrificação e hiperhidratação (Williams & Leopold, 1989), pode ser hidrolisado com a acidez do meio de cultura (Romberger & Tabor, 1971), não polimerizando ao esfriar. Normalmente o ágar é utilizado na faixa de 0,4 a 1,0 % (p/v) para cultura de tecidos de plantas (Caldas et al., 1990).

Stoltz (1971), estudando embriões germinados de *Iris* sp., sugere que a concentração de ágar no meio de cultivo deve ser mantida baixa, suficiente para

suportar o peso físico dos embriões, em virtude das altas concentrações causarem restrição no crescimento dos embriões pela redução na disponibilidade de água.

O presente trabalho teve por objetivo estudar as possíveis interações do ágar com o pH no meio MS (Murashige & Skoog, 1962), utilizado para o cultivo *in vitro* de embriões de laranja Pêra (*Citrus sinensis* Osb.).

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram utilizados frutos de 10 semanas com aproximadamente 5,5 cm de comprimento de uma única planta da variedade laranja Pêra (*Citrus sinensis* Osb.), previamente escolhida por apresentar as melhores condições fitossanitárias.

Os frutos após serem lavados tiveram suas sementes removidas e, em câmara de fluxo laminar, sofreram assepsia com álcool (70%) por 5 minutos e hipoclorito de sódio (2%) por 20 minutos, sendo em seguida lavadas três vezes em água bidestilada autoclavada. Com o auxílio de microscópio estereoscópico, bisturi e pinça, os integumentos das sementes foram excisados longitudinalmente a partir da região oposta à micrópila, tomando-se o cuidado de não provocar danos aos embriões.

Todos os embriões, independente dos estádios em que se encontravam, foram inoculados em meio MS, acrescido de ágar (0,0; 3,5; 7,0; 10,5 e 14,0 g/L), ajustados em diferentes valores de pH (3,7; 4,7; 5,7 e 6,7), em todas as combinações. Esses tratamentos permaneceram 48 horas no escuro e posteriormente, em sala de crescimento à temperatura de 27 ± 1°C, com fotoperíodo de 16 horas diárias em intensidade luminosa de 35 μmoles m⁻² s⁻¹.

Passados 45 dias, as plântulas foram avaliadas pelas características comprimentos da haste caulinar e do sistema radicular, peso da matéria fresca e porcentagem de sobrevivência. Para efeito de análise estatística, os dados das variáveis peso da matéria fresca, comprimentos da haste caulinar e do sistema radicular foram transformados em raiz quadrada de (x+0,5), e os dados do percentual de sobrevivência, em arco seno da raiz (x/100).

Foram usadas quatro repetições, cada uma constituída de quatro tubos de ensaio com 15 mL de meio, em delineamento inteiramente casualizado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fator pH, ao contrário do fator ágar, apresentou efeito significativo pelo teste F (α < 0,01) em todas as variáveis avaliadas; a interação entre os dois

O sucesso do cultivo *in vitro* de embriões depende dos fatores genéticos e fisiológicos inerentes aos embriões nucelares e zigóticos, das condições térmicas, fotoperíodo e meio de cultura, que são também responsáveis pela formação e crescimento dos embriões. Essas exigências podem variar para cada espécie do gênero *Citrus* e, também, dentro de cada cultivar.

Um importante aspecto da cultura de embrião imaturo é definir um meio de cultura que possa sustentar o seu crescimento e desenvolvimento. Isto requer, muitas vezes, testar diferentes meios de cultura, muitas vezes modificados de forma empírica (Hu & Ferreira, 1990).

Os elementos minerais são absorvidos pelas diferentes culturas de acordo com as respectivas exigências nutricionais. Todavia, a acidez ou a basicidade, quando bem ajustados, podem promover maior e melhor aproveitamento dos nutrientes pelo explante. Um valor de pH baixo conduz à competição do H^+ com os nutrientes catiônicos (NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+}) pelas células dos tecidos radiculares e, em valores mais elevados de pH, diminui a absorção de nutrientes aniônicos como o NO_3^- , $H_2PO_4^{2-}$, Cl^- e MoO_4^{2-} (Torres & Caldas, 1990; Faquin et al., 1996). Quando os íons NH_4^+ desaparecem da solução, os íons NO_3^- passam a ser absorvidos em maior proporção que outros e são trocados por OH^- ou HCO_3^- , elevando rapidamente o pH (Furlani & Furlani, 1988).

O ágar é reconhecido por sua ação gelificante. Aspectos relacionados a sua natureza biológica e de produção têm provocado consideráveis variações em sua qualidade, incluindo-se nível e natureza dos contaminantes orgânicos e inorgânicos (Debergh, 1983); podendo ser essas variações significativas para o sucesso do cultivo *in vitro*. O ágar, também utilizado como agente tamponante (Shinga, 1982) e controlador de fenômenos de vitrificação e hiperhidratação (Williams & Leopold, 1989), pode ser hidrolisado com a acidez do meio de cultura (Romberger & Tabor, 1971), não polimerizando ao esfriar. Normalmente o ágar é utilizado na faixa de 0,4 a 1,0 % (p/v) para cultura de tecidos de plantas (Caldas et al., 1990).

Stoltz (1971), estudando embriões germinados de *Iris* sp., sugere que a concentração de ágar no meio de cultivo deve ser mantida baixa, suficiente para

suportar o peso físico dos embriões, em virtude das altas concentrações causarem restrição no crescimento dos embriões pela redução na disponibilidade de água.

O presente trabalho teve por objetivo estudar as possíveis interações do ágar com o pH no meio MS (Murashige & Skoog, 1962), utilizado para o cultivo *in vitro* de embriões de laranja Pêra (*Citrus sinensis* Osb.).

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram utilizados frutos de 10 semanas com aproximadamente 5,5 cm de comprimento de uma única planta da variedade laranja Pêra (*Citrus sinensis* Osb.), previamente escolhida por apresentar as melhores condições fitossanitárias.

Os frutos após serem lavados tiveram suas sementes removidas e, em câmara de fluxo laminar, sofreram assepsia com álcool (70%) por 5 minutos e hipoclorito de sódio (2%) por 20 minutos, sendo em seguida lavadas três vezes em água bidestilada autoclavada. Com o auxílio de microscópio estereoscópico, bisturi e pinça, os integumentos das sementes foram excisados longitudinalmente a partir da região oposta à micrópila, tomando-se o cuidado de não provocar danos aos embriões.

Todos os embriões, independente dos estádios em que se encontravam, foram inoculados em meio MS, acrescido de ágar (0,0; 3,5; 7,0; 10,5 e 14,0 g/L), ajustados em diferentes valores de pH (3,7; 4,7; 5,7 e 6,7), em todas as combinações. Esses tratamentos permaneceram 48 horas no escuro e posteriormente, em sala de crescimento à temperatura de $27 \pm 1^\circ C$, com fotoperíodo de 16 horas diárias em intensidade luminosa de $35 \mu moles m^{-2} s^{-1}$.

Passados 45 dias, as plântulas foram avaliadas pelas características comprimentos da haste caulinar e do sistema radicular, peso da matéria fresca e porcentagem de sobrevivência. Para efeito de análise estatística, os dados das variáveis peso da matéria fresca, comprimentos da haste caulinar e do sistema radicular foram transformados em raiz quadrada de $(x+0,5)$, e os dados do percentual de sobrevivência, em arco seno da raiz $(x/100)$.

Foram usadas quatro repetições, cada uma constituída de quatro tubos de ensaio com 15 mL de meio, em delineamento inteiramente casualizado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fator pH, ao contrário do fator ágar, apresentou efeito significativo pelo teste F ($\alpha < 0,01$) em todas as variáveis avaliadas; a interação entre os dois

ágar utilizada, o maior comprimento do sistema radicular foi alcançado entre os pH 4,5 e 5,2, indicando, portanto, que o pH em torno de 4,7 foi o mais adequado para o cultivo *in vitro* de embriões de laranja Pêra.

De forma semelhante, Handro & Floh (1990) relatam que o controle da organogênese é feita pela introdução exógena de sais e de substâncias diversas e que fatores físicos do meio podem exercer efeitos sobre as culturas assim como o pH, a temperatura e a luz. Em algumas culturas, variações nesses fatores podem ocasionar diferentes respostas morfológicas. Calo de *Solanum tuberosum* cresceu num pH de 5,0 ou 5,5 e cultura de raízes de tomateiro teve o crescimento ótimo com o pH inicial de 4,9, segundo Lingappa & Petru, citados por Caldas et al. (1990).

Na Tabela 1, apresenta-se o resumo das equações de regressão das concentrações do fator ágar dentro do fator pH, nas variáveis porcentagem de sobrevivência e comprimento do sistema radicular dos embriões de laranja Pêra. Observa-se pela Fig. 3, que as concentrações de 10,5 e 14,0 g/L de ágar promoveram o maior crescimento radicular

com o pH situado em 4,5; que menores concentrações de ágar (0,0, e 3,5 g/L), semelhantemente obtiveram seus picos com o pH um pouco superior (5,2), e que a concentração de 7,0 g/L de ágar manteve a menor oscilação em todos os níveis de pH, com comprimentos médios de raiz entre 1,5 a 2,0 cm.

De acordo com Romberger & Tabor (1971), altas concentrações de ágar, ou meios muito consistentes, podem limitar a difusão de nutrientes até o explante. O pH afeta a consistência do meio de cultura e, se este for autoclavado em pH abaixo de 4,5, ocorre hidrólise do ágar que impede a sua polimerização ao esfriar. Considerando-se as altas concentrações dos níveis de sais do meio MS, a concentração de 7,0 g/L de ágar é a recomendada (Murashige & Skoog, 1962).

Observa-se na Fig. 4 que em todas as concentrações de ágar, dentro do fator pH, houve acréscimo do percentual de sobrevivência com a elevação do pH do meio. Esses dados corroboram as observações de Hu & Ferreira (1990), segundo as quais o intervalo de pH entre 5 e 6 parece satisfatório para o crescimento dos embriões da maioria das espécies.

TABELA 1. Resumo das equações de regressão dos valores de pH (3,7; 4,7; 5,7 e 6,7) em presença de concentrações de ágar (0,0; 3,5; 7,0; 10,5 e 14,0 g/L) nas variáveis porcentagem de sobrevivência e comprimento do sistema radicular de embriões de laranja Pêra (*Citrus sinensis* Osb.). UFLA, Lavras, MG, 1996.

| Ágar (g/L) | Equações | Significância | R ² |
|---|---|---------------|----------------|
| Porcentagem de sobrevivência | | | |
| 0,0 | $Y = 9,937427 - 27,4999727x + 6,24999776x^2$ | * | 0,90 |
| 3,5 | $Y = 135,890588 - 78,1249873x + 10,93749922x^2$ | * | 0,97 |
| 7,0 | $Y = 177,874975 - 94,9999922 + 12,49999970x^2$ | ** | 0,98 |
| 10,5 | $Y = -335,421997 + 118,1250489x - 7,8120454x^2$ | ** | 0,93 |
| 14,0 | $Y = -364,406361 + 132,5000448x - 9,37500421x^2$ | * | 0,98 |
| Comprimento do sistema radicular ¹ | | | |
| 0,0 | $Y = -12,150967 + 5,5659065x - 0,54261927x^2$ | ** | 0,60 |
| 3,5 | $Y = -11,804555 + 5,2416689x - 0,50181620x^2$ | ** | 0,99 |
| 7,0 | $Y = 2,736464 - 0,1878643x$ | * | 0,84 |
| 10,5 | $Y = -96,0790 + 57,63014x - 10,995975x^2 + 0,68061531x^3$ | ** | 1,00 |
| 14,0 | $Y = -50,7242 + 30,94824x - 5,925871x^2 + 0,36759242x^3$ | * | 1,00 |

¹ Observações transformadas em raiz quadrada de (X + 0,5).

** e * significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

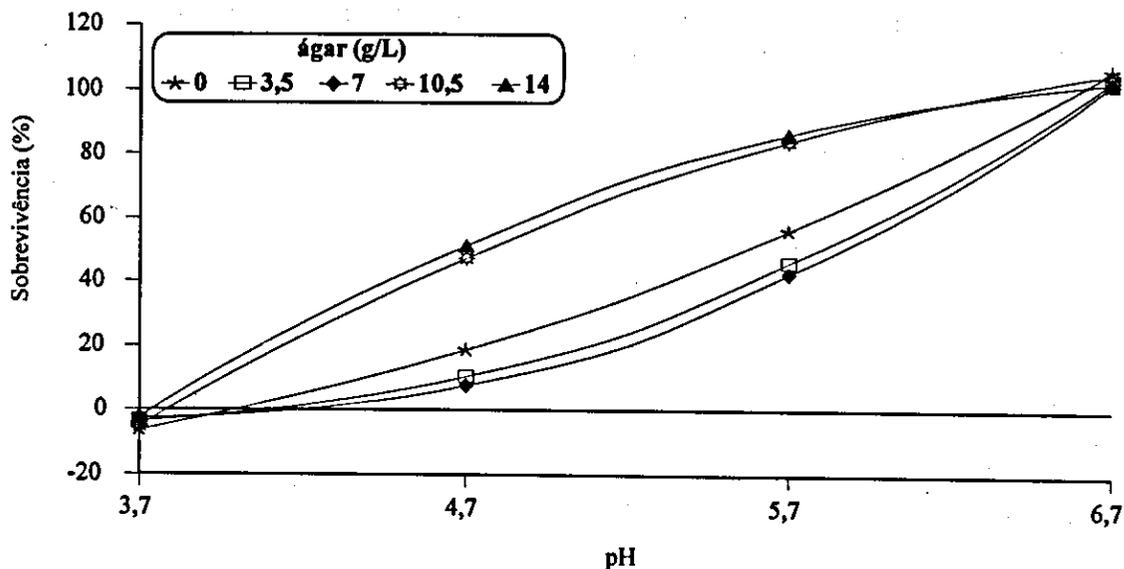


FIG. 4. Efeito do pH na presença do ágar sobre a porcentagem de sobrevivência de embriões de laranja Pêra (*Citrus sinensis* Osb.). UFLA, Lavras, MG, 1996.

CONCLUSÕES

1. Concentrações de ágar e valores de pH interagem significativamente no crescimento do sistema radicular e no percentual de sobrevivência *in vitro* de embriões de laranja Pêra (*Citrus sinensis* Osb.).

2. Para maximizar o desenvolvimento e o crescimento dos embriões de laranja Pêra *in vitro*, os embriões devem ser cultivados em meio MS acrescido de 10,5 g/L de ágar.

3. Para aumentar o percentual de germinação, o valor do pH do meio MS (acrescido de 10,5 g/L de ágar) deve ser aferido inicialmente em 6,7.

REFERÊNCIAS

- ANDREOLI, C. Cultura de embriões. In: SIMPÓSIO DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1., 1985, Brasília. Anais... Brasília: [s.n.], 1986. p.25-28.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCTP/Embrapa-CNPB, 1990. p.37-70.
- CHAPOT, H. The *Citrus* plant. In: CITRUS. Switzerland: Ciba-Geigy, 1975. p.6-13. (Technical Monograph, 4).
- DEBERGH, P.C. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.59, p.270-276, 1983.
- FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E.; VILELA, L.A.A. Produção de alface em hidroponia. Lavras: UFLA, 1996. 50p.
- FURLANI, A.M.C.; FURLANI, P.R. Composição e pH de soluções nutritivas para estudos fisiológicos e seleção de plantas em condições nutricionais adversas. Campinas: IAC, 1988. 29p. (IAC. Boletim Técnico, 121).
- HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Aspectos básicos do controle da morfogênese "in vitro". In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCTP/Embrapa-CNPB, 1990. p.203-212.
- HEARN, C.J. Recognition of zygotic seedlings in certain orange crosses by vegetative characters. *Proceeding of the International Society of Citriculture*, v.2, p.611-614, 1977.
- HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCTP/Embrapa-CNPB, 1990. p.71-86.

- MOREIRA, C.S. Melhoria de citros. In: RODRIGUES, O.; VIEGAS, F. *Citricultura brasileira*. Campinas: Fundação Cargill, 1980. v.1, p.195-223.
- MOREIRA, C.S.; PIO, R.M. Melhoria de Citros, In: RODRIGUES, O.; VIEGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A.A. (Eds.). *Citricultura brasileira*. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v.2, p.116-152.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15, p.473-479, 1962.
- PASQUAL, M.; PINTO, J.E.B.P. Cultura de embriões. *Notícias da Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas*, Brasília, v.9, p.2-12, ago. 1988.
- ROMBERGER, J.A.; TABOR, C.A. The *Picea abies* shoot apical meristem in culture. *American Journal of Botany*, Lancaster, v.58, p.131-140, 1971.
- SHINGA, S. Influence of agar concentration on "in vitro" shoot proliferation of *Malus* sp. *Almey and Pyrus communis* Seckel. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v.107, p.657-660, 1982.
- STOLTZ, L.P. Agar restriction of the growth of excised mature *Iris* embryos. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v.96, p.681-684, 1971.
- TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: ABCTP/Embrapa-CNPq, 1990. 433p.
- WILLIAMS, R.J.; LEOPOLD, A.C. The glassy state in corn embryos. *Plant Physiology*, v.89, p.977-981, 1989.